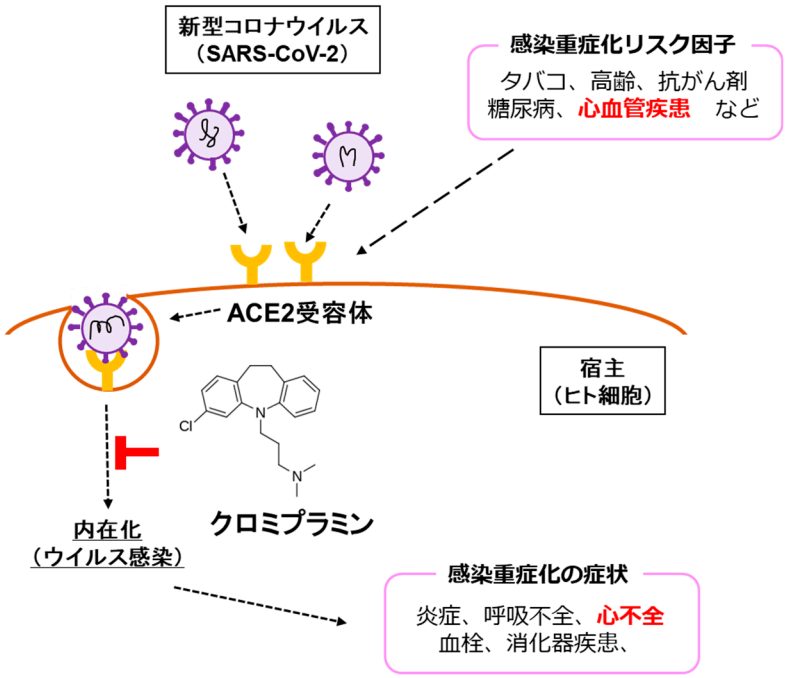
136　ACE2に着目したCOVID-19重症化機構の解明とその応用	加藤　百合

【目的】2019 年末に中国の武漢で発生した新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の感染拡大は 2 年経過した今なお世界中で大きな問題となっている。COVID-19 の原因ウイルスである SARS-CoV-2 によるウイルス感染や重症化メカニズムが明らかになりつつあり、ワクチン接種や RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性や炎症応答を標的とする治療薬が次々と承認されているものの、未だに有効な治療薬・治療法は確立できていない。本研究では、SARS-CoV-2 感染経路において重要である angiotensin converting enzyme 2（ACE2）に着目し、COVID-19 重症化機構を明らかにするとともに、ドラッグリポジショニングにより既承認薬の中から候補治療薬を探索することで、新たな感染重症化の予防・治療につながる新規概念の確立を目的とした。

【方法】ACE2-EGFP 安定発現株に人工三量体の精製スパイクタンパク質（S タンパク質）を処置する *in vitro* 偽感染モデルを確立し、ACE2 内在化機構を抑制する化合物を探索した。見いだした化合物が実際に SARS-CoV-2 感染を細胞レベルで抑制するか検証した。また、COVID-19 重症化リスク因子や後遺症に心疾患や心不全が含まれていることから心臓に着目し、*in vitro* 偽感染モデルを用いて心筋細胞における心機能への影響を検討した。

【結果】当研究室が以前同定した心不全を抑制する候補薬のうち、ACE2 内在化を強く抑制するクロミプラミン（三環系抗うつ薬）見いだし、さらにクロミプラミンは SARS-CoV-2 感染を細胞レベルで抑制した。心筋細胞では S タンパク質処置によりミトコンドリア機能が抑制され、心筋収縮力も低下することが明らかとなった。さらに、クロミプラミンにより S タンパク質によるミトコンドリア機能障害および心筋収縮力抑制が改善することも明らかとなった。

ACE2 を介した SARS-CoV-2 感染経路



136. ACE2 に着目した COVID-19 重症化機構の解明とその応用

加藤　百合

九州大学 大学院薬学研究院 臨床薬学部門 生理学分野

Key words：COVID-19，ACE2，ドラッグリポジショニング

緒　言

2019 年末に中国の武漢で発生した新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の感染拡大は 2 年経過した今なお世界中で大きな問題となっている［1，2］。ワクチン接種や RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性や炎症応答を標的とする治療薬が承認されているものの、変異株が次々と発生し、未だに有効な治療薬・治療法は確立できていない。COVID-19 の原因ウイルスである SARS-CoV-2 は、ウイルス表面上のスパイクタンパク質を介して宿主細胞膜上の angiotensin converting enzyme 2（ACE2）と結合し、細胞内に取り込まれ感染する［3］。感染重症化を引き起こすリスク因子として、喫煙、年齢、心疾患、糖尿病などの既往歴などが報告されており、感染が治った後でも血管炎、心不全、味覚障害といった重篤な後遺症が指摘され、肺以外の様々な臓器にも焦点が当てられるようになった。感染者の肺や心臓においてウイルスが検出されたことから、ACE2 が発現している組織において SARS-CoV-2 が取り込まれて機能障害を引き起こしている可能性が報告されていた［4］。さらに、感染者の組織において ACE2 発現量が上昇していたことから、ACE2 の発現量が SARS-CoV-2 感染に対する感受性に反映されることが示唆されていた。そこで、本研究では SARS-CoV-2 野生株と変異株に共通する標的受容体である ACE2 の内在化に着目し、COVID-19 重症化機構を明らかにし、既存の治療薬とは異なる新たな治療候補薬を見いだすことを目的とした。

方　法

1. ACE2-EGFP 安定発現株 HEK293T 細胞を用いた ACE2 内在化阻害作用を持つ化合物の探索

カイコ-バキュロウイルス発現系を用いて精製した人工三量体 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質（以下、S タンパク質、九州大学能学研究院の日下部先生より供与）を、ACE2-GFP 安定発現 HEK293T 細胞（国立医薬基盤研究所の今井教授より供与）に添加し 3 時間培養後、細胞膜上の ACE2 内在化を検出する *in vitro* 偽感染モデルを構築した（図 1a）。当研究室で見いだした心不全を抑制する既承認薬 13 化合物を予め細胞に処置し、S タンパク質にて刺激後、ACE2 内在化抑制効果を検証した。

2. クロミプラミンの阻害様式の検討

1、10 μM クロミプラミンをそれぞれ添加して、各濃度における S タンパク質による ACE2 内在化率を算出した。また、ACE2 と S タンパク質の直接結合に関与するかを ELISA 法にて検証し、さらにクロミプラミン存在下で ACE2 酵素活性が影響を受けないか検討した。

3. S タンパク質による心機能障害の測定

ラット胎児初代培養心筋細胞やヒト由来の iPS 心筋細胞に S タンパク質を処置して、細胞中の炎症性サイトカイン mRNA の発現量の変化やミトコンドリアの酸素消費量、心筋の収縮速度を測定した。

結　果

1.　抗うつ薬クロミプラミンはACE2内在化を抑制する

13 種の既承認薬の中から、ACE2 内在化を抑制する三環系抗うつ薬の 1 つであるクロミプラミンを見いだした（図 1b）。IC_{50}は 682 nM であった［5］。クロミプラミンはクラスリン依存性のエンドサイトーシス阻害作用を持つことが知られているため［6］、他の抗うつ薬やエンドサイトーシス阻害剤でも同様に実験を行ったが、クロミプラミンほど強く内在化を抑制する化合物は見いだせなかった。さらに、COVID-19 治療候補薬として論文報告されていた複数種類の薬剤においても、ACE2 内在化抑制効果は得られなかった。実際に、クロミプラミンを処置したヒト由来の iPS 心筋細胞に SARS-CoV-2 を感染させると、コントロールと比較して有意に細胞内のウイルス RNA 量が減少したことから、クロミプラミンはウイルス感染を抑制することを明らかにした。

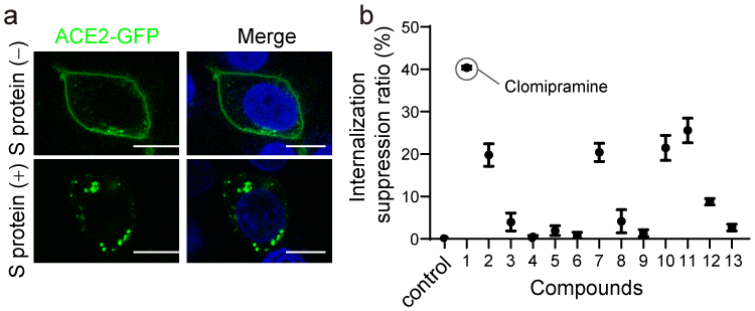


図 1.　ACE2 内在化抑制効果を持つ化合物の探索

a）S タンパク質処置をした ACE2-GFP 安定発現 HEK293T 細胞（スケールバー：20 μm）。

b）心不全治療候補薬（13 化合物）における ACE2 内在化抑制効果。

2. ACE2 内在化においてクロミプラミンは非競合阻害する

1、10 μM クロミプラミンをそれぞれ添加して ACE2 内在化率を測定した結果、高濃度のクロミプラミン存在下では S タンパク質濃度を上昇させても ACE 内在化率がコントロールに比べて下がったことから、非競合阻害であることが示唆された（図 2a）。また、ACE2 と S タンパク質の直接結合を阻害するか検証した結果、高濃度のクロミプラミンでは直接結合を阻害することを明らかにした（図 2b）。ACE2 の本来の機能はアンギオテンシンの変換であり、クロミプラミン曝露後に ACE2 酵素活性を測定すると、クロミプラミンの濃度を上げても活性に変化は見られなかった（図 2C）。

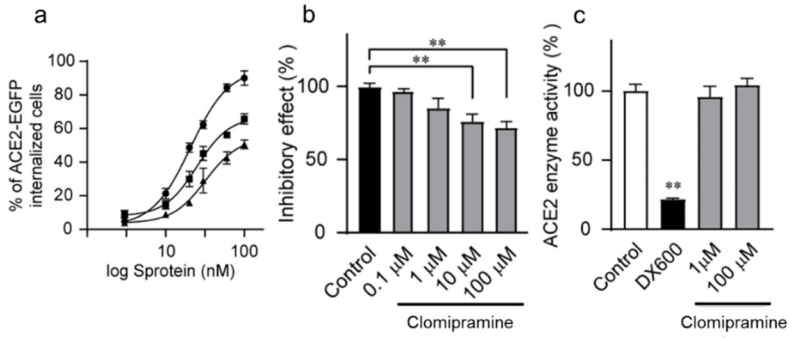


図 2.　クロミプラミンによる ACE2 内在化阻害様式の検討

a）クロミプラミン存在化での S タンパク質濃度依存的な ACE2 内在化率。●：コントロール、■：1 μM クロミプラミン、▲：10 μM クロミプラミン。

b）クロミプラミンによる ACE2 と S タンパク質の直接結合阻害効果。

c）クロミプラミンによる ACE2 酵素活性阻害効果。DX600：ACE2 酵素活性阻害剤。

**P＜0.01（Tukey 検定）。

3. S タンパク質刺激は心筋のミトコンドリア機能や収縮能に障害を与える

ラット新生児初代培養心筋細胞を S タンパク質で刺激をした結果、細胞内の炎症性サイトカイン（TNF-α、IL-1β、IL-6）の mRNA 発現量が有意に上昇した。さらに、S タンパク質刺激したヒト由来の iPS 心筋細胞においてミトコンドリア機能の指標の 1 つである酸素消費量がコントロールと比較して減少していること見いだした。同時に、心筋収縮速度も減少していることを明らかにした。これらの機能障害に対して、クロミプラミンを処置しておくと改善傾向が見られた。

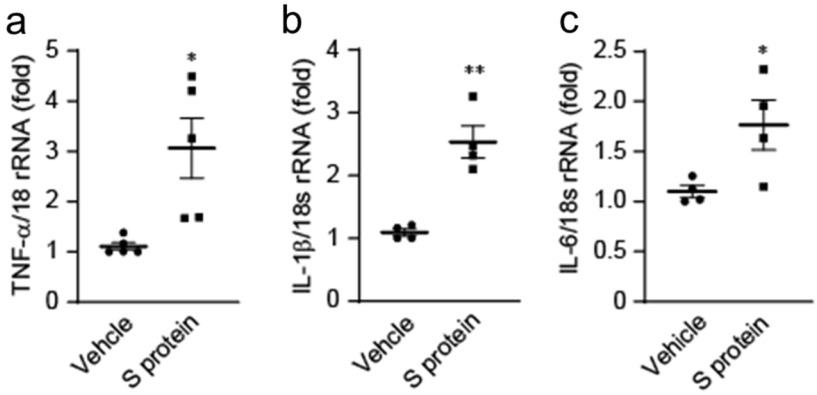


図 3. ラット新生児初代培養心筋細胞における S タンパク質刺激による炎症性サイトカインの発現変化
a）TNF-α、b）IL-1β、c）IL-6。*P＜0.05、**P＜0.01（t-test 検定）。

考　察

本研究により、心不全を抑制する既承認薬のうち ACE2 内在化を抑制し、SARS-CoV-2 感染を抑制するクロミプラミンを見い出した。クロミプラミンはクラスリン依存性のエンドサイトーシス阻害剤として知られているが、同じ作用を持つ他の抗うつ薬において ACE2 内在化抑制効果がクロミプラミンほど見られなかったことから、クロミプラミンにはクラスリン以外の内在化に関与する新規の標的があると考えられる。今後、この標的を明らかにしていく予定である。

また、S タンパク質処置により細胞内での炎症性サイトカインの発現増加が見られており、最近の研究から SARS-CoV-2 の感染により DAMPs の 1 つである ATP が細胞から放出されることが報告されている。これらのことが、炎症や臓器不全を引き起こすサイトカインストームの要因となりうる可能性がある。さらに、ミトコンドリアの酸素消費量や心筋収縮速度が S タンパク質処置により減少したことから、COVID-19 感染者の後遺症の 1 つである心不全の発症や COVID-19 のワクチン接種にて稀に報告されている心膜炎、心筋炎の発症にもこの心筋機能障害が関与している可能性が考えらえる。現在は、変異株でも同様のことが確認できるか検証中である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院薬学研究院生理学分野の西田基宏教授、西山和宏講師、九州大学大学院農学研究院資源生物学部門昆虫ゲノム化学研究室の日下部宜宏教授、李在萬准教授、国立医薬品食品衛生研究所の諫田泰成教授、国立医薬基盤研究所の今井由美子教授である。本研究の遂行に協力していただいた九州大学大学院薬学研究院生理学分野の皆様ならびに、本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。

文 献

1) Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med. 2020;382(8):727-33. Epub 2020/01/25. doi: 10.1056/NEJMoa2001017. PubMed PMID: 31978945; PubMed Central PMCID: PMCPMC7092803.

2) Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. Lancet. 2020;395(10223):470-3. Epub 2020/01/28. doi: 10.1016/s0140-6736(20)30185-9. PubMed PMID: 31986257; PubMed Central PMCID: PMCPMC7135038.

3) Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell. 2020;181(2):271-80.e8. Epub 2020/03/07. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052. PubMed PMID: 32142651; PubMed Central PMCID: PMCPMC7102627.

4) Bojkova D, Wagner JUG, Shumliakivska M, Aslan GS, Saleem U, Hansen A, et al. SARS-CoV-2 infects and induces cytotoxic effects in human cardiomyocytes. Cardiovasc Res. 2020;116(14):2207-15. Epub 2020/09/24. doi: 10.1093/cvr/cvaa267. PubMed PMID: 32966582; PubMed Central PMCID: PMCPMC7543363.

5) Kato Y, Yamada S, Nishiyama K, Satsuka A, Re S, Tomokiyo D, et al. Clomipramine suppresses ACE2-mediated SARS-CoV-2 entry. bioRxiv. 2021:2021.03.13.435221. doi: 10.1101/2021.03.13.435221.

6) Vercauteren D, Vandenbroucke RE, Jones AT, Rejman J, Demeester J, De Smedt SC, et al. The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. Mol Ther. 2010;18(3):561-9. Epub 2009/12/17. doi: 10.1038/mt.2009.281. PubMed PMID: 20010917; PubMed Central PMCID: PMCPMC2839427.