

ACE2 発現に注目した腸内環境改善による新型コロナウイルス感染に伴う
重症化予防の検討

所属名 大分大学 医学部 内分泌代謝・膠原病・腎臓内科学講座

報告者名 後藤 孔郎

要旨

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のヒト感染 (COVID-19) には、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 2が不可欠な受容体である。ウイルス粒子表面に王冠様突起 (Spike) タンパク質 (Sタンパク) が存在し、このSタンパクが受容体に結合して細胞内に感染する。ACE2は肺、心臓や消化管に多く発現している。COVID-19が重症化する要因として肥満が考えられている。また、腸内環境および腸内炎症というものがCOVID-19の重症化に深く関与している。以前より乳製品に含まれるホエイペプチドは善玉菌を増加させることで腸内環境を整えることが知られている。今回、肥満によるSARS-CoV-2の臓器内浸潤の亢進がホエイペプチドによって軽減されることを明らかにする。

緒言：

COVID-19 が猛威を振っており、社会的・経済的に大きな打撃を与えている。SARS-CoV-2 の感染には、ACE2 が不可欠な受容体であることが明らかになっている。事実、肺組織には多くの ACE2 が発現しており、このことが肺炎の重症化に大きく関与している。また、COVID-19 は下痢といった消化器症状をもたらすことが知られているが、これには小腸に存在する ACE2 が関与していることが推測されている。小腸の上皮細胞では ACE2 はアミノ酸トランスポーターと共局在しており、さらに ACE2 による消化管のよるアミノ酸吸収制御は、抗菌ペプチドの産生などを介した腸内細菌叢の恒常性維持に重要であり、マウスモデルの炎症性腸炎に対して ACE2 が防御的作用をもつことが解明されている。一方、肥満は腸内細菌叢を悪化させ、いわゆる“悪玉菌”から炎症惹起物質であるエンドトキシンが合成される。また、肥満に伴う小腸内での炎症性変化によって腸管バリアが破綻し、上記のエンドトキシンが腸管腔から門脈へと放出され、体循環を介して全身に炎症性病変もたらすと考えられている。さらにエンドトキシンが肺に到達すると、急性肺障害の原因となることが知られている。COVID-19 により重症化する要因として、糖尿病や肥満が考えられている。重症化と血中 ACE2 濃度との関連を検討したところ、高度肥満や血糖コントロールの悪化がみられるほど血中 ACE2 濃度が増加しており、多臓器からの ACE2 発現の増加によるものではないかと報告されている。しかしながら、肥満や糖尿病といった病態において、肺や小腸に ACE2 発現が増加しているかについては不明である。本研究の目的は、①肥満モデル動物で小腸や肺などの臓器内で ACE2 発現が増加するか、②腸内環境改善作用をもつホエイペプチドの摂取によって多臓器内での ACE2 発現増加や SARS-CoV-2 の臓器内感染が改善するか、③ホエイペプチドの摂取によって血中エンドトキシンが低下するか、を検討する。

方法：

1 実験動物・

雄野性 (C57BL/6J) マウス；

2 実験飼料：

通常餌（餌中の 20%が脂肪成分）、高脂肪餌（餌中の 60%が脂肪成分）

それぞれの飼料に 3%ホエイペプチド添加

3 実験方法

通常餌+コントロール（ホエイペプチド添加なし）群（NC+CNT）、通常餌+ホエイペプチド添加群（NC+Whey）、高脂肪餌+コントロール群（HF+CNT）、高脂肪餌+ホエイペプチド添加群（HF+Whey）の 4 群を作成し、2ヶ月飼育する。

4 分析方法：

A) 肺、心臓、小腸における評価：

- 1) 血中 ACE2 濃度、肺や小腸の ACE2 発現を評価する。また、COVID-19 患者では大動脈内に多くの SARS-CoV-2 が感染しており血栓形成に関与するとされていることから、心臓内の ACE2 発現を評価する。
- 2) ACE2 自体には抗炎症性作用があるため、肺、小腸内、心臓における炎症性サイトカインである tumor-necrotizing factor (TNF)- α の発現を測定する。
- 3) 腸管バリアに必要なタンパク質である ZO-1 に対する抗体を用いて、小腸における腸管バリアを免疫組織学的に評価する。
- 4) 血中のエンドトキシンの 1 つである lipopolysaccharide (LPS)の血中濃度を測定する。

B) 新型コロナウイルスのリコンビナント S タンパク (Rp)の全身投与による各臓器への分布に関する評価：

SARS-CoV-2 には、ウイルス粒子表面に王冠様突起 (Spike) タンパク質 (S タンパク) が存在し、この S タンパクが受容体に結合してウイルスの RNA ゲノムが細胞内に侵入することで細胞内に感染する。このような ACE2 の S タンパクに対する親和性は SARS-Cov-2 では極めて高いことが報告されている。新型コロナウイルスのリコンビナント S タンパク (Rp) を SARS-CoV-2 に見立てて、Rp の全身投与によって Rp が組織内に分布すれば、SARS-CoV-2 が臓器に感染していることと考える。上記 4 群に対して、Rp (10 μ g) を腹腔内投与し、投与 8 時間後に各臓器を採取する。その後、肺、小腸、心臓における Rp の含有量を定量する。

5 統計解析

統計解析については、SPSS statistics を用いて、分散分析後 Fisher PLSD 検定で、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

1. 各群での体重変化

HF + CNT 群および HF + Whey 群では、CD + CNT 群および CD + Whey 群より有意な体重増加がみられたが、ホエイペプチドの有無による体重変化は認められなかった（表 1）。

2. 血中 LPS 濃度の変化

高脂肪摂取により血中 LPS 濃度の増加が、ホエイペプチドを摂取させることにより抑制された（図 1）。

3. 腸管バリアの評価

高脂肪摂取により腸管バリアの保持に必要なタンパク質である ZO-1 発現の低下が、ホエイペプチド摂取により改善された（図 2）。

4. 血中および臓器内 ACE2 発現の変化

高脂肪摂取により血中 ACE2 濃度および肺、心臓、小腸内での ACE2 発現が増加したが、ホエイペプチド摂取により抑制された（図 3）。

4. 臓器内での炎症性変化

高脂肪摂取により肺、心臓、小腸内での炎症性サイトカインである TNF- α 発現が増加したが、ホエイペプチド摂取により抑制された（図 4）。

5. 臓器内 SARS-CoV-2 リコンビナント S タンパク (Rp) の変化

高脂肪摂取により肺および心臓内の Rp 含有量が増加したが、ホエイペプチド摂取により各臓器内の Rp 含有量が軽減された（図 5）。一方、小腸内 Rp はほとんど検知できなかった。

考察

SARS-CoV-2 の感染には、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 2 が不可欠な受容体であることが明らかになっている。事実、ACE2 が欠損した動物に SARS-CoV を感染させても肺障害や臓器内への感染が軽減されることが示されている¹⁾。また、小腸の上皮細胞では ACE2 はアミノ酸トランスポーターと共局在しており、さらに ACE2 による消化管のよるアミノ酸吸収制御は、抗菌ペプチドの産生などを介した腸内細菌叢の恒常性維持に重要であり、マウスモデルの炎症性腸炎に対して ACE2 が防御的作用をもつことが解明されている²⁾。肥満は腸内細菌叢を悪化させ、いわゆる“悪玉菌”から炎症惹起物質であるエンドトキシンが合成される。また、肥満に伴う小腸内での炎症性変化によって腸管バリアが破綻し、

上記のエンドトキシンが腸管腔から門脈へと放出され、体循環を介して全身に炎症性病変もたらすと考えられている³⁾。さらにエンドトキシンが肺に到達すると、急性肺障害の原因となることが知られている。

COVID-19 が重症化する要因として肥満があげられ、高度肥満がみられるほど血中 ACE2 濃度が増加している⁴⁾。さらに慢性腎不全の患者において、腎不全の程度が悪化するほど血中 ACE2 濃度が増加することが報告されており、腎臓内での ACE2 発現が増加したため ADAM17 酵素によって shedding され、血中 ACE2 濃度が増加したと推測されている⁵⁾。また、慢性閉塞性肺疾患の患者において肺組織内の ACE2 発現が有意に亢進していることが認められている⁶⁾。しかしながら肥満や糖尿病といった病態において、肺や小腸に ACE2 発現が増加しているかについての詳細な検討は、国内外を通じて皆無である。

本研究によって、肥満は血中のみならず肺、小腸や心臓といった多臓器内での ACE2 発現が亢進し、ホエイペプチドを摂取させるとそのような増加が軽減されることを認めた。さらには、肥満は臓器内での ACE2 発現の増加に伴い、新型コロナウイルスのリコンビナント S タンパク (Rp) の肺や心臓といった臓器内への浸潤も増加し、ホエイペプチドの摂取によってそのような変化が軽減された。このような現象のメカニズムを考える際に、エンドトキシンの1つである血中 LPS 濃度に注目したい。LPS は炎症惹起物質であり、臓器内で炎症性変化をもたらすことが知られている。血中 LPS 濃度の上昇は、腸管バリアの破綻によってもたらされる。今回の研究においても、肥満は血中 LPS 濃度を増加させるが、ホエイペプチドの摂取によって抑制されることを認めた。その要因の1つとして、ホエイペプチドが肥満による腸管バリアの破綻を保持したことが示唆される。さらに血中 LPS の増加が肺や心臓といった臓器内での炎症性変化をもたらし、抗炎症作用を有する ACE2 発現が代償的に亢進させることで各臓器内での ACE2 発現が増加したことが推測される。一方、今回、肥満によって小腸内の ACE2 発現が増加したにもかかわらず、小腸内への Rp 浸潤の有意な変化がみられなかった。理由としては、小腸内での ACE2 は腸上皮細胞に多く存在するので、Rp を腹腔内投与しても腸上皮に Rp が到達しなかったためと推測される。

以上より、本研究によって肥満では腸管バリアの破綻による血中 LPS 濃度の増加が肺や心臓での ACE2 発現を亢進させ、さらに SARS-CoV-2 の各臓器内への浸潤が容易に行われることが示唆され、一方、ホエイペプチドの摂取は腸管バリアを保持させ、血中 LPS 濃度や臓器内 ACE2 発現を促成させることによって、SARS-CoV-2 の臓器内浸潤を軽減させることが推測された。

参考文献：

1. Kuba K, Imai Y, Rao S, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med.* 11(8):875-9. (2005)
2. Camargo SMR, Vuille-Dit-Bille RN, Meier CF, et al. ACE2 and gut amino acid transport. *Clin Sci (Lond).* 134(21):2823-2833. (2020)
3. Hersoug LG, Møller P, Loft S. Role of microbiota-derived lipopolysaccharide in adipose tissue inflammation, adipocyte size and pyroptosis during obesity. *Nutr Res Rev.* 31(2):153-163. (2018)
4. Emilsson V, Gudmundsson EF, Aspelund T, et al. Serum levels of ACE2 are higher in patients with obesity and diabetes. *Obes Sci Pract.* 7(2):239-243. (2020)
5. Zipeto D, Palmeira JDF, Argañaraz GA, et al. ACE2/ADAM17/TMPRSS2 Interplay May Be the Main Risk Factor for COVID-19. *Front Immunol.* 11:576745. (2020)
6. Pinto BGG, Oliveira AER, Singh Y, et al. ACE2 Expression Is Increased in the Lungs of Patients With Comorbidities Associated With Severe COVID-19. *J Infect Dis.* 222(4):556-563. (2020)

表 1. 各群における体重

	体重 (g)
NC + CNT	25.4 ± 0.62
NC + Whey	24.3 ± 0.93
HF + CNT	34.9 ± 1.83 *
HF + Whey	35.3 ± 1.3 *

* $p < 0.05$ vs. NC + CNT, NC + Whey



