

2. ACE2 デコイを用いた新型コロナウイルスに対する治療薬の開発

岡本 徹, 伊東 祐美, 鈴木 達也

順天堂大学大学院医学研究科微生物学

2019年から始まった新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) によるパンデミックから4年目を迎えようとしている。当研究室では、2020年6月からいつまでパンデミックが続くのか、日常生活がいつまで制限されるのか予想ができない中、レセプターデコイを使った治療薬を開発するプロジェクトに取り組んだ。レセプターデコイは、SARS-CoV-2のレセプターであるアンジオテンシン変換酵素2 (Angiotensin-converting enzyme 2: ACE2) を利用し、SARS-CoV-2のスパイク蛋白質との結合能を亢進する変異を導入したACE2組換え蛋白質である。この高親和性ACE2を囃 (おとり = decoy (デコイ)) 蛋白質としてSARS-CoV-2が本来のACE2に結合するところをACE2デコイに置き換えることで感染を阻害し治療効果を期待する戦略である。本稿では、ウイルス学とは異なる多くの研究者の先生との共同研究の中で進めてきたACE2デコイ開発を紹介する。

新型コロナウイルスの感染様式

SARS-CoV-2の粒子は、ヌクレオカプシド (N)、膜 (M)、エンベロープ (E)、スパイク (S) の4つの構造蛋白質から形成される。SARS-CoV-2が標的とする細胞に感染する際には、ウイルス表面に露出しているスパイク蛋白質が宿主細胞表面に発現しているACE2を認識する (図1A)¹⁾。スパイク蛋白質は、3量体を形成しウイルス粒子の膜上に挿入されている。ウイルス粒子上のスパイク蛋白質は、ウイルス粒子が細胞外に放出される際にFurinによってS1とS2サブユニットに切断を受け、お互いが非共有的に会合して成熟ウイルスとなる。SARS-CoV-2のスパイク蛋白質が認識するレセプターはACE2であり、スパイク蛋白質のS1サブユニット内のReceptor-Binding Domain (RBD) 領域と高い親和性も持って結合する。

ACE2との結合は、スパイク蛋白質のダイナミックな構造変化を誘導し、S2サブユニット内のS2' サイトが露出され、細胞膜上のTransmembrane protease, serine 2 (TMPRSS2) あるいはACE2依存的なエンドサイトーシス後にエンドソーム内のCathepsin L (CTSL) によって切断される。S2' サイトの切断はS2領域の融合ペプチド (Fusion peptide) を露出し、ウイルスの細胞侵入における膜融合が開始される¹⁾。

SARS-CoV-2のスパイク蛋白質に対する抗体が感染中和に寄与することから、ロナプリーブ (Casirivimab, Imdevimab)、ゼビュディ (Sotrovimab)、エバシェルド (Tixagevimab, Cilgavimab) といった中和抗体が臨床利用された。これらはスパイク蛋白質のRBD領域を認識する抗体であり、臨床研究から重症化の抑制と回復までの期間短縮が認められ中和抗体がCOVID-19の治療に有効であることが示されている²⁻⁶⁾。しかしながら、これらの抗体が認識するエピトープは2021年から出現した変異株であるオミクロン株では変異が導入されており、効果が減弱している^{7,8)}。したがって、SARS-CoV-2の感染過程はCOVID-19の治療標的となるが、相次ぐ変異株に対応できない中和抗体に代わる治療戦略を必要とする。

連絡先

〒113-8421

東京都文京区本郷2-1-1

順天堂大学大学院医学研究科微生物学

TEL: 03-5802-1040

E-mail: toruokamoto@juntendo.ac.jp

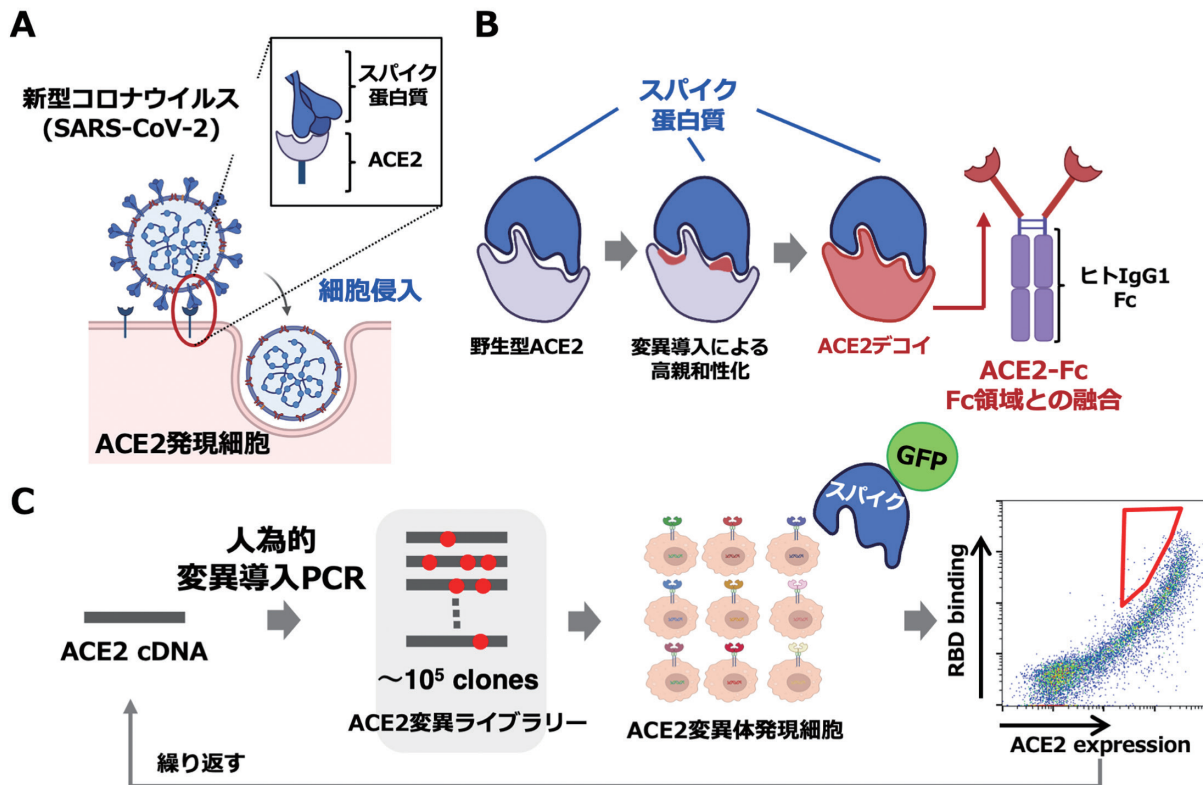


図1 SARS-CoV-2に対するレセプターデコイの作製

(A) SARS-CoV-2の侵入経路。SARS-CoV-2のスパイク蛋白質は細胞表面に発現しているACE2を認識し結合後に細胞内に侵入する。(B) スパイク蛋白質とACE2の結合に着目し、より強固に結合するACE2の組換え蛋白質を作製し、COVID-19の治療薬としての利用を検討した。(C) 高親和性ACE2の樹立方法。ACE2のcDNAをテンプレートにランダムに変異が導入されるPCRを行ってさまざまな箇所に導入されたACE2変異ライブラリーを作製した。このライブラリーはレンチウイルスベクターによって293T細胞に導入し、GFP融合スパイク蛋白質と反応させ、高親和性ACE2発現細胞をセルソーターで集める。得られた細胞株からゲノムDNAを抽出し、再度ランダムPCRを繰り返して得られた。

レセプターデコイ

SARS-CoV-1, SARS-CoV-2のレセプターはACE2が知られている。ACE2はAngiotensin II (Ang IIもしくはAng1-8) からAngiotensin (1-7) (Ang 1-7)に変換する酵素活性を持つ。Ang IIはRenin-Angiotensin System (RAS)によって産生され、Angiotensin Type 1 receptor (AT1R)を介して、血圧上昇作用を持つほか、炎症促進、線維増殖性、血管収縮作用等を調節する。一方でACE2によって産生されるAng1-7はMas receptor (MAS)を介して抗炎症を誘導する⁹⁾。急性呼吸促迫症候群 (Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS)の患者においては、高いAng IIが認められることから、可溶性ACE2の組換え体(rhACE2)を用いてAng IIの減少とAng1-7による肺での炎症保護作用を検討がなされ、複数種のARDSのマウスモデルにおいてrhACE2による治療効果が認められることが分かっ

た¹⁰⁾。したがって、ARDSの治療薬としてのrhACE2を用いた臨床試験が行われたものの、健常人・ARDS患者共に、著名な副作用はなかったものの症状の改善には至らなかった^{11,12)}。

SARS-CoV-2のパンデミック下において、このrhACE2のCOVID-19治療へのリポジショニングが検討された。すなわち、可溶性rhACE2をSARS-CoV-2のレセプターデコイとして投与し、SARS-CoV-2に実際のレセプターとしてのACE2の代わりに結合させることで感染を中和することができるかを検討した。その結果、血管オルガノイドや腎臓オルガノイドを用いたSARS-CoV-2感染モデルにおいて、rhACE2は効果的に感染抑制できることが示された¹³⁾。しかしながら、rhACE2を用いたPhase II臨床試験では、症状改善には至らず十分な成果が得られなかった (ClinicalTrials.gov identifier NCT04335136)。この原因としては、rhACE2は単量体であり体内での半減期が3

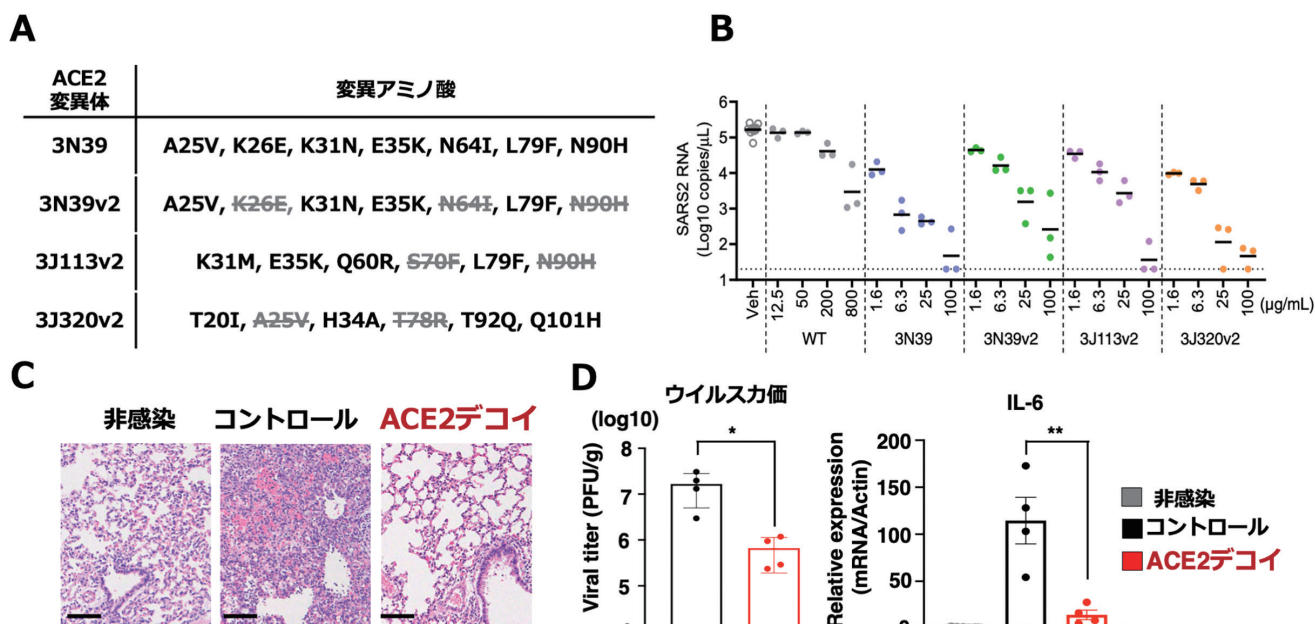


図2 ACE2 デコイの評価

(A) 得られた ACE2 デコイの変異導入箇所 (B) SARS-CoV-2 (武漢株) を $\text{Moi}=0.1$ で感染させ、2 時間後に組換え蛋白質を含む培地に置換し、さらに 22 時間培養後の上清を回収し、qPCR によってウイルス RNA 量を定量した。(C) シリアンハムスターに SARS-CoV-2 を感染させ、2 時間後に ACE2 デコイを (20mg/kg) 腹腔投与により処理した。コントロールにはヒト IgG を用いた。感染 5 日後に肺を回収し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、肺での病変を観察した。(D) 感染 5 日後に肺を回収し、ウイルスカ価の測定と IL-6 の遺伝子発現を検討した。

時間程度であり、安定性が低いことで標的である肺組織に充分量の薬剤が届けられないことが考えられる。したがって、COVID-19 治療としては rhACE2 の安定性の向上や rhACE2 の質的な改善、病巣部への投与方法の検討が求められる。

このような状況で、いくつかの研究グループが高親和性 ACE2 デコイの開発を進めた (図 1B)。すでに ARDS の臨床応用された rhACE2 と異なる点としては、①蛋白質の安定化のために抗体の Fc 領域と融合蛋白質として発現させる、②さまざまな手法でスパイク蛋白質との結合親和性を亢進させた変異が導入されている点異なる。本稿では、我々の開発した ACE2 デコイに関して詳細を解説する。

高親和性レセプターデコイ : 3N39, 3J113, 3J320¹⁴⁻¹⁷⁾

本研究は、京都府立医科大学循環器内科の星野温先生、大阪大学蛋白質研究所の高木淳一先生との 3 研究室で開始された。まず、ACE2 の cDNA をテンプレートとしてランダムに変異が導入される PCR を行い、ACE2 の変異ライブラリーを作製した。作製した ACE2 ライブラリーを 293T 細胞にレンチウイルスベクターを用いて導入し、SARS-CoV-2 のスパイク蛋白質の組換え蛋白質を処理し

て、強く結合した細胞をセルソーターで回収し培養するサイクルを繰り返して高親和性の ACE2 変異体を取得した (図 1C)。その結果、3N39, 3J113, 3J320 の 3 種類の高親和性 ACE2 デコイを得た (図 2A)。得られたデコイはヒトイムノグロブリン (hIgG1) の Fc 領域と融合蛋白質として調整し、スパイク蛋白質との親和性を検討したところ、0.29, 1.14, 3.39 nM となり、最も高い親和性を持つ 3N39 では野生型 ACE2 (17.63 nM) と比較しておよそ 100 倍近く親和性が亢進している事がわかった。それぞれの ACE2 デコイは 7 カ所程度のアミノ酸変異が認められ、スパイク蛋白質との親和性の亢進に必要な十分である 4 カ所のアミノ酸変異に絞る事ができた (図 2A)。この 4 カ所を決定したバージョンを 3N39v2, 3J113v2, 3J320v2 とし検討を進めることとした¹⁴⁾。

まず、得られた ACE2 デコイを用いてシュードウイルスを用いた感染阻害効果を野生型 ACE2 との比較を行った。感染阻害効果を IC50 で算出したところ、野生型 ACE2 では 24.8 μg/mL であったのに比較して、3N39v2, 3J113v2, 3J320v2 は、82, 330, 68 ng/mL となり、高親和性 ACE2 では 500 倍近く感染中和能が亢進する事がわかった。また、感染性のウイルスを用いて評価したところ、シュードウイルスのデータと同様に 3N39v2, 3J113v2,

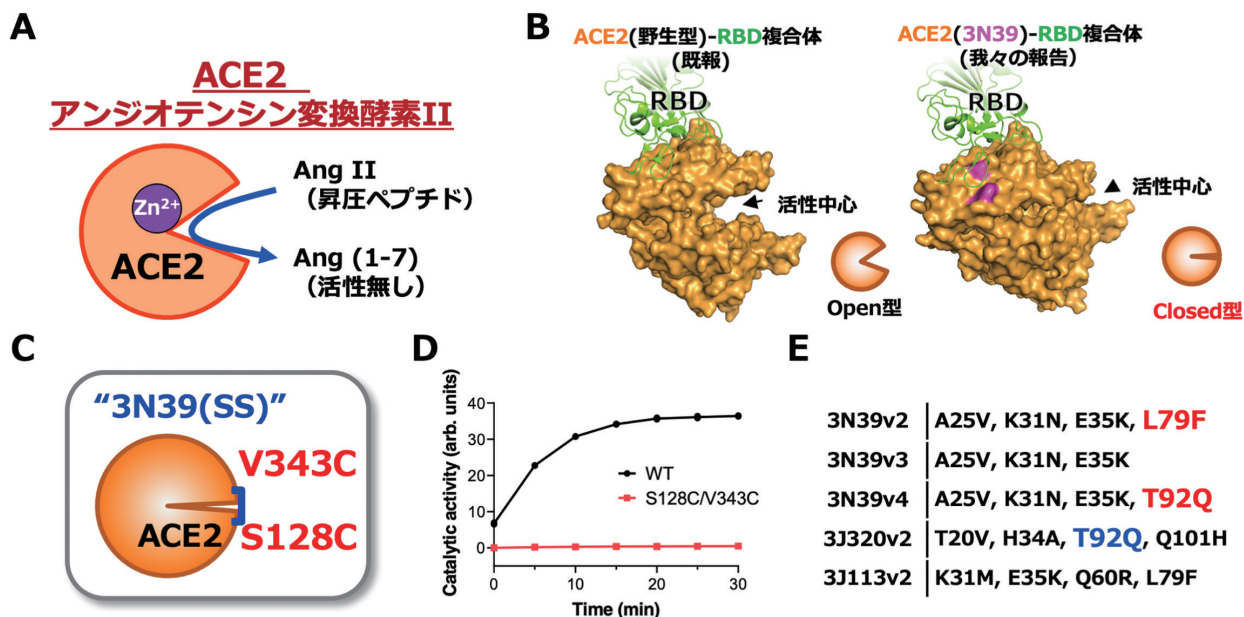


図3 ACE2の立体構造からACE2の酵素活性の失活変異の同定

(A) ACE2はAng IIをAng 1-7に変換する酵素活性がある。ACE2の酵素活性は亜鉛イオン (Zn^{2+}) 結合サイトに変異を導入することにより失活することが言われているが、蛋白質の安定性が低下することが知られており、蛋白質の安定性を維持している酵素活性のないACE2蛋白質はこれまでに報告がなかった。(B) 当時までに報告されていたACE2の構造は活性中心がopen型であるが、高木先生が解明された構造はclosed型であった。(C) closed型のACE2の構造において最も接近しているSer128とVal343に着目し、それぞれをCysに置換することで人工的にジスルフィド結合を生じさせclosed型を維持する戦略を検討した。(D) WT-ACE2とS128C/V343C-ACE2の酵素活性を検討したところ、S128C/V343Cの変異では酵素活性が完全に失活した。(E) これまで使用していた3N39v2はL79Fの変異はヒト免疫原性が生じたため、DMSにより検討し、3J320に導入されているT92QがL79Fを代替できること、さらにT92Qには免疫原性がないため、3N39v2のL79FをT92Qに入れ替えた3N39v4を最終のACE2デコイとして決定した。3N39v4にはS128C/V343Cの変異も存在する。

3J320v2は野生型ACE2よりも効率良くウイルス増殖を抑制することが確認できた(図2B)。したがって、デコイを高親和性化することで効率良くウイルス感染を中和できる事が分かった。次に、ハムスターを用いた動物モデルを用いて、3N39v2の治療効果を検討した。ハムスターにSARS-CoV-2を感染後に、ACE2デコイ(3N39v2)を投与し感染5日後の肺を採取し検討したところ、ACE2デコイ投与により肺の炎症像の改善(図2C)や炎症性サイトカインの遺伝子発現、ウイルス力価の低下が認められ(図2D)、ACE2デコイによる治療効果が確認された¹⁴⁾。

ACE2デコイを治療薬とするための検討

本ACE2デコイの治療薬として使用を考えた際、①ACE2自身の酵素活性の検討、②ACE2デコイの抗原性の確認、③ACE2デコイの安定性の検討、④耐性ウイルスの出現の可能性を検討する必要があると考えた。

① ACE2自身の酵素活性の検討

前述の通り、ACE2にはAng IIからAng 1-7に変換す

る酵素活性を持つ(図3A)。Ang1-7はMASを介して肺保護作用を示すことが知られており、COVID-19の治療として、ACE2自身の酵素活性によってAng1-7を産生させ肺での抗炎症と保護作用を賦与するためにACE2の酵素活性は保持した方が良いとの考察もある¹⁸⁾。一方でRASで産生されるそれぞれのペプチドのバランスは生体の恒常性維持に重要であり、大量のACE2の投与はAng IIの減少、Ang1-7の産生を生じ、バランスが崩れることが予想される。我々は、COVID-19のようにさまざまな年齢層や既往歴を持つ患者すべてに対してACE2デコイを安全に使用するために感染中和活性のみを有し、酵素活性を失活させた形態が望ましいと考えた。しかしながら、当時はACE2の酵素活性を失活させるためには亜鉛イオンとの結合サイトに変異を導入することが知られていたが、亜鉛イオンとの結合サイトの変異はACE2の蛋白質の安定化に影響するため、別の手法が必要であった。3N39とスパイク蛋白質の構造解析の結果、それまでに明らかになっ

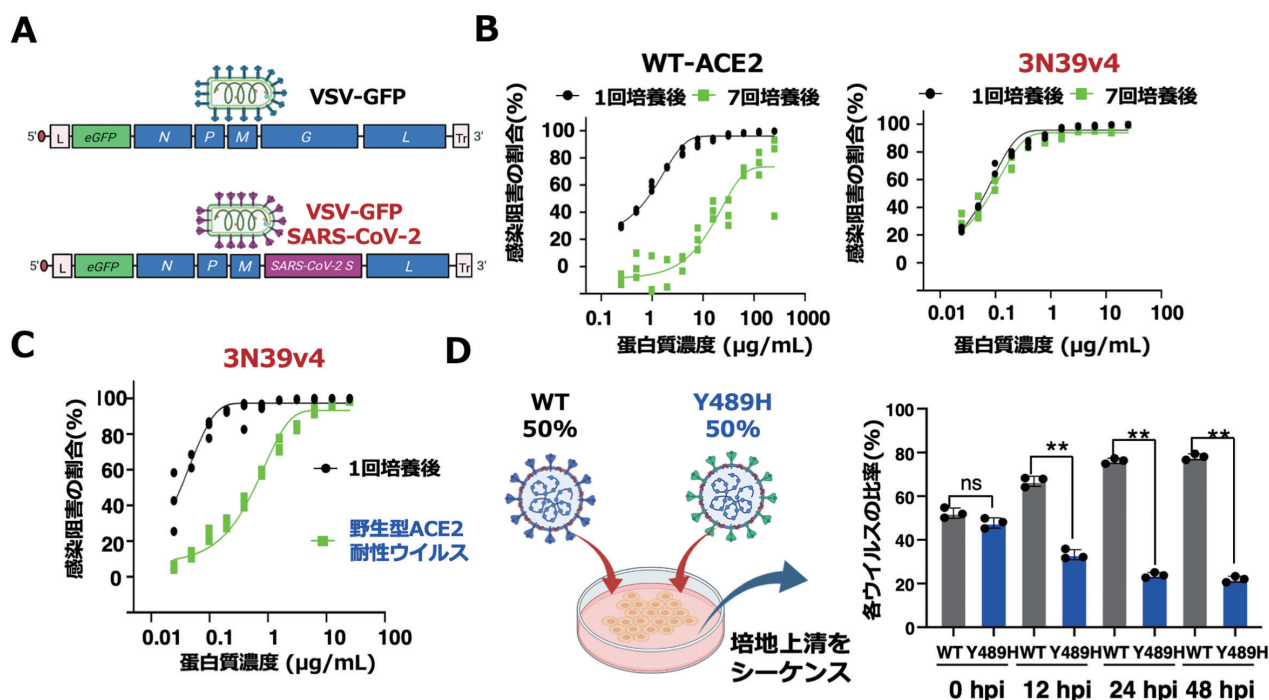


図4 ACE2 デコイに対する耐性ウイルス出現の検討

(A) 使用したウイルスの構造. GFP 遺伝子を持つ VSV の G 遺伝子を SARS-CoV-2 のスパイク遺伝子に入れ替えた組換え VSV (VSV-SARS) を使用した. ウイルスは BEI Resources から入手. (B) VSV-SARS を WT-ACE2 あるいは 3N39v4 と混ぜて培養細胞に感染させることを繰り返した結果, WT-ACE2 は 7 回継代後には中和活性が低下した耐性ウイルスが生じたが, 3N39v4 では感受性に差が認められなかった. (C) WT-ACE2 に対して生じた耐性ウイルスは 3N39v4 に対しても感受性が低下することが分かった. (D) WT-ACE2 に耐性のウイルスには Y489H の変異が導入されていたため, Y489H を持つ SARS-CoV-2 の組換えウイルスを作製し, その増殖性を野生型ウイルスとの競合試験を行ったところ, Y489H を持つ組換えウイルスの比率は, 経時的に減少することから増殖性が低下することが示唆された.

ていた ACE2 の構造とは異なり, ACE2 の酵素活性中心の構造が open 型ではなく酵素活性中心が閉じた closed 型であることに着目した (図 3B). そこで closed 型 ACE2 の構造から, Ser128 と Val343 が最も近接していたことから, それぞれのアミノ酸を Cys に置換することで, 人工的にジスルフィド結合を生じさせ酵素活性を失活させることを検討した (図 3C). その結果, S128C/V343C を持つ ACE2 デコイはスパイク蛋白質との親和性は変わらず, 完全に酵素活性が消失することが分かった (図 3D)¹⁴⁾. また, ジスルフィド結合の導入により, 熱安定性が亢進した. この蛋白質工学を駆使した研究成果は高木先生の独創的なアイデアであり, 私たちでは思い至らないことであることをここに加筆したい.

② ACE2 デコイの抗原性の確認

検討中の ACE2 デコイ (3N39v2) は A25V, K31N, E35K, L79F のスパイク蛋白質との親和性を亢進させる変異 (図 3E) と, S128C, V343C の酵素活性を失活

させるための変異の合計 6 箇所の変異がある. このような変異により ACE2 デコイが異物として免疫細胞が認識することは, 何らかの副作用の原因となる可能性が考えられる. 3N39v2, 3J320v2, 3J113v2 それぞれの ACE2 デコイにおける変異がヒト免疫細胞の抗原性に及ぼす影響を検討するため, さまざまな HLA を持ったヒト末梢血 T 細胞による免疫原性を評価した. 導入された変異周辺のペプチドを重複するように合成し, CD4 陽性 T 細胞と反応させ活性化を評価したところ, 野生型のアミノ酸を持ったペプチドではいずれも反応しなかったが, 変異導入ペプチドにおいては L79F の変異を持ったペプチドにおいて CD4 陽性 T 細胞の活性化が認められた. したがって, L79F は免疫原性があることになり L79F の変異は使用できないことが分かった. そこで, 3N39v2 の L79F 変異を野生型の Leu に戻した 3N39v3 を準備し, L79F を代替できるアミノ酸変異を Deep-Mutational-Scanning (DMS) により探索した結果, T92Q を得た. T92Q は 3J320 に含まれている

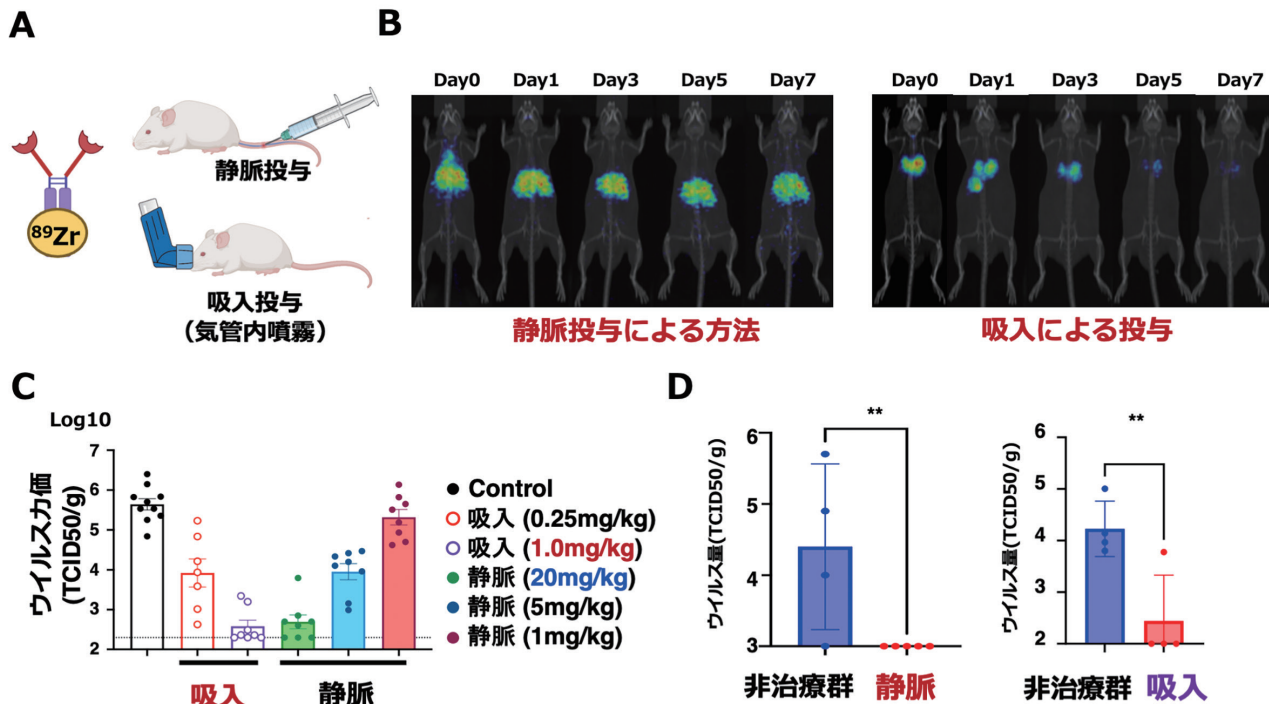


図5 ACE2 デコイの投与方法の検討とカンクイザルの感染モデルを用いた検証

(A) ACE2 デコイをジルコニウム -89 (^{89}Zr) でラベルし、マウスに投与し PET イメージングによって体内分布を観察した。(B) 静脈投与では ACE2 デコイのほとんどが肝臓に蓄積し、吸入投与では肺に薬剤が分布していた。(C) SARS-CoV-2 のマウス馴化株をマウス (Balb/c) に感染させ、静脈投与、あるいは吸入投与をさまざまな ACE2 デコイ量で検討した。(D) カンクイザルに SARS-CoV-2 (デルタ株) を感染させ、1 日後に静脈投与 (50mg/kg) を 1 回投与あるいは吸入投与 (1mg/kg) を 1 日 1 回 3 日間投与した。ウイルス感染後 7 日後に肺を回収し、ウイルス力価を測定した。

変異の 1 つであり、3N39v2 の L79F の変異は抗原性の認められない T92Q が代替できることが分かった。したがって、3N39v2 の L79F を T92Q に入れ替えた 3N39v4 を我々の研究を進める最終形態とすることにした (図 3E)^{15,16)}。本研究成果は星野先生の迅速な DMS による研究成果により 3N39v4 が得られたことを加筆する。

③ ACE2 デコイの体内での安定性

生体内での ACE2 デコイの安定性を評価したところ、半減期 ($T_{1/2}$) は 50 時間程度であることが分かり、現在使用されているヒト IgG を用いた抗体医薬とほぼ同定度であることが確認された。10ng/kg の投与量において、1 週間後でも有効濃度である 10 $\mu\text{g/mL}$ が血清中に残存していることから COVID-19 における治療薬としては 1 回投与で十分な治療効果が得られると考えられた¹⁴⁾。

④ 耐性ウイルス出現の可能性

抗ウイルス薬において薬剤の効果をエスケープするウイルスの出現を検討することは重要な課題であると考

える。これまでに ACE2 デコイと SARS-CoV-2 と混ぜて培養細胞に感染させることを繰り返す継代培養では、中和活性のあるモノクローナル抗体では 4 回の継代で中和活性が失活する耐性ウイルスが出現したが、ACE2 デコイでは 15 回継代後もウイルスが耐性化することがないことを確認した¹⁴⁾。さらにこれまでに出現している変異株での ACE2 デコイの感受性には差が認められなかった¹⁴⁾。また、水疱性口内炎ウイルス (VSV) の G 遺伝子を SARS-CoV-2 のスパイク遺伝子を入れ換えた VSV-SARS を用いて継代培養を再度検討した (図 4A)。また、今回では 3N39v4 だけでなく、野生型 ACE2 も同様に検討した結果、野生型 ACE2 と 7 回継代培養した VSV-SARS は野生型 ACE2 に耐性を示すことが分かったが、3N39v4 では 7 回継代した後もその感受性に変化はなく、ウイルスは耐性化していないことが分かった (図 4B)。3N39v4 では 20 回継代培養しても感受性に差が認められない (データ未発表)。野生型 ACE2 に耐性を示したウイルスは、3N39v4 においても、元のウイルスより感受性が低下していることから、

野生型 ACE2 に対して生じた耐性ウイルスは 3N39v4 に対しても耐性を示すことが分かった (図 4C)。すなわち、3N39v4 においては耐性となるウイルスが存在するにも関わらず、その出現が抑えられることを意味する。したがって、ACE2 デコイを高親和性とすることで耐性ウイルスの出現が抑えられることが分かった¹⁶⁾。

また、野生型 ACE2 に耐性を示した VSV-SARS におけるスパイク蛋白質の変異を検討したところ、Y489H が耐性化の責任変異であることが分かった。そこで、Y489H を持つ組換え SARS-CoV-2 を作製し、野生型ウイルスとの増殖性を比較したところ、Y489H を持つウイルスは増殖性が低下することが分かった (図 4D)。したがって、たとえ ACE2 デコイに耐性を持つウイルスができてその増殖性は低下しており、病原性の低下が予想された¹⁶⁾。

ACE2 デコイの投与方法の検討

多くの抗体医薬は、静脈投与による投与方法が取られている。ロナプリーブ等の COVID-19 治療で使用されていた中和抗体もその投与方法は静脈投与が行われていた。その一方で SARS-CoV-2 は呼吸器感染症を引き起こすウイルスであり、主に肺において感染が認められる。したがって、薬剤を肺に効率良く届けることが重要であると考えた。そこで静脈投与と吸入投与における薬剤の体内分布を検討することとした。岡山大学医歯薬学総合研究科の佐々木崇了先生のご協力により ACE2 デコイをジルコニウム-89 (89Zr) でラベルし、マウスに投与し positron emission tomography (PET) イメージングによって体内分布を観察した (図 5A) と、静脈投与では ACE2 デコイのほとんどが肝臓に蓄積し、吸入投与では肺に薬剤が分布していた (図 5B)。静脈投与での薬剤の肝臓での蓄積は抗体医薬でも報告されており、ほとんどの薬剤は呼吸器には届いていないことが分かった。そこで、静脈投与と吸入投与における薬剤投与量を検討した。その結果、静脈投与 20mg/kg での治療成績と、吸入投与による 1mg/kg での治療成績が同程度であり、吸入投与では薬剤量を 20 分の 1 に減らすことができることが分かった (図 5C)。このことから、呼吸器感染症において吸入投与の有用性が確認された¹⁶⁾。

ACE2 デコイの霊長類モデルでの検討

以上の成績から、非臨床レベルでの検討を行うため、カニクイザルを用いた SARS-CoV-2 の感染実験での ACE2 デコイの治療効果を検討した。医薬基盤・健康・栄養研究所、霊長類医科学研究センターの保富康宏先生、浦野恵美子先生、岡村智崇先生のご協力により検討することができたことを加筆する。

まず、静脈投与による治療効果を検討した。カニクイザ

ルに SARS-CoV-2 を感染 1 日後に、50mg/kg の ACE2 デコイを静脈投与し、感染後 1 週間後の肺を評価した。その結果、カニクイザルの肺炎症状、肺でのウイルス量は顕著に低下した。さらに、吸入投与による治療成績を検討するため、カニクイザルに SARS-CoV-2 を感染 1 日後に、1mg/kg の ACE2 デコイを 1 日 1 回の投与を 3 日間実施した。その結果、カニクイザルの肺炎症状、肺でのウイルス量は静脈投与と同様に顕著に低下した (図 5D)。以上の結果から、ACE2 デコイによる治療効果を霊長類モデルにおいても示すことができた¹⁶⁾。

まとめ

ACE2 デコイを治療薬として検討を開始した 3 年前では、レセプターデコイが感染症治療薬としての有用性はそれほど認知されておらず、「中和抗体があるため、不要だ」とのコメントをいただいたこともあった。しかしながら、さまざまな検討を行ってきた結果、レセプターデコイは感染症において、中和抗体に代わるべき治療薬であると確信している。しかしながら、SARS-CoV-2 によるパンデミックのような「感染症有事」において、レセプターデコイを新規に作製し、治療薬として用いるには開発日数がかかりすぎる欠点がある。この点において、検討できるウイルスレセプターにおいて前もってデコイを開発しておくことや、組換え蛋白質としてではなく、核酸を用いてレセプターデコイを投与する方法など検討すべき課題がある。さらには、呼吸器感染症においての吸入投与の有用性を示すことができた。しかしながら、レセプターデコイをインフルエンザの治療薬のようなリレンザやイナビルのような吸入薬として用いるには、蛋白質の 3 次元構造を維持したまま粉末化する必要がある。蛋白質の粉末化による吸入治療薬として承認されているものとしては、囊胞性線維症に対する組換えヒトデオキシリボヌクレアーゼ I である Dornase alpha のみであり、これまでの検討例も少ない。したがって、蛋白質の粉末化技術の開発も今後の課題となる。我々の ACE2 デコイは製品化されず COVID-19 で苦しむ患者を救うことはできなかったが、開発研究を進めることで多くの課題を見出すことができた。今後さらなる検討を進めることで、レセプターデコイをキーワードに将来の「感染症有事」に対応できる新規技術の確立を目指したい。

謝辞

本研究は筆者がすべてのデータを出したわけではなく、コロナ禍の中、多くの共同研究者との出会いと協力を得て実施することができました。未だ、直接お会いしたことのない先生もおり、新しい研究スタイルの象徴とも考えられるかもしれません。この場を借りて多くの共同研究者に御礼申し上げます。また、当時所属していた大阪大学微生物病研究所の教授陣には新型コロナ研究を奨励してくださ

り、多くのアドバイスとサポートによって本研究が遂行できたことを感謝いたします。また、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の長きにわたるサポートによって本研究が遂行できたことにも御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B. & Choe, H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 3–20 (2022).
- 2) Weinreich, D. M. *et al.* REGN-COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **384**, 238–251 (2020).
- 3) Ledford, H. COVID antibody treatments show promise for preventing severe disease. *Nature* **591**, 513–514 (2021).
- 4) Gupta, A. *et al.* Early Treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab. *N. Engl. J. Med.* **385**, 1941–1950 (2021).
- 5) Montgomery, H. *et al.* Efficacy and safety of intramuscular administration of tixagevimab–cilgavimab for early outpatient treatment of COVID-19 (TACKLE): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Respir. Med.* **10**, 985–996 (2022).
- 6) Levin, M. J. *et al.* Intramuscular AZD7442 (Tixagevimab–Cilgavimab) for Prevention of Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **386**, 2188–2200 (2022).
- 7) Ragonnet-Cronin, M. *et al.* Generation of SARS-CoV-2 escape mutations by monoclonal antibody therapy. *Nat. Commun.* **14**, 3334 (2023).
- 8) VanBlargan, L. A. *et al.* An infectious SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron virus escapes neutralization by therapeutic monoclonal antibodies. *Nat. Med.* **28**, 490–495 (2022).
- 9) Ocaranza, M. P. *et al.* Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **17**, 116–129 (2020).
- 10) Imai, Y. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* **436**, 112–116 (2005).
- 11) Khan, A. *et al.* A pilot clinical trial of recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care* **21**, 234 (2017).
- 12) Haschke, M. *et al.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Recombinant Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Healthy Human Subjects. *Clin. Pharmacokinet.* **52**, 783–792 (2013).
- 13) Monteil, V. *et al.* Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell* **181**, 905–913.e7 (2020).
- 14) Higuchi, Y. *et al.* Engineered ACE2 receptor therapy overcomes mutational escape of SARS-CoV-2. *Nat Commun* **12**, 3802 (2021).
- 15) Ikemura, N. *et al.* An engineered ACE2 decoy neutralizes the SARS-CoV-2 Omicron variant and confers protection against infection in vivo. *Sci Transl Med* **14**, eabn7737 (2022).
- 16) Urano, E. *et al.* An inhaled ACE2 decoy confers protection against SARS-CoV-2 infection in preclinical models. *Sci. Transl. Med.* **15**, eadi2623 (2023).
- 17) Arimori, T. *et al.* Engineering ACE2 decoy receptors to combat viral escapability. *Trends Pharmacol Sci* (2022) doi:10.1016/j.tips.2022.06.011.
- 18) Zhang, L. *et al.* An ACE2 decoy can be administered by inhalation and potentially targets omicron variants of SARS - CoV - 2. *Embo Mol Med* e16109 (2022) doi:10.15252/emmm.202216109.

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

Development of an engineered ACE2 decoy for COVID-19 therapy.

Toru OKAMOTO, Yumi ITOH, Tatsuya SUZUKI

Department of Microbiology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

It has been passed four years since the pandemic caused by the severe acute respiratory syndrome-2 (SARS-CoV-2) that began in 2019. Since June 2020, we have been working on a project to develop a therapeutic drug using receptor decoys, even though we cannot predict how long the pandemic will last or how long our daily lives will be restricted. This receptor decoy utilizes Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), which is the receptor for SARS-CoV-2, and involves introducing mutations that enhance its binding ability with the spike protein of SARS-CoV-2. This high-affinity ACE2, acting as a decoy protein, is a strategy to inhibit viral infection and to expect therapeutic effects by replacing the endogeneous ACE2 that SARS-CoV-2 binds to with ACE2 decoy. This paper introduces the development of ACE2 decoys that have progressed through collaborative research with many researchers outside the field of virology.

