

## 人工知能ガイド指向性進化スクリーニングによるウイルス高親和性 ACE2 変異体創作

星野 温

京都府立医科大学 循環器腎臓内科

### 【研究の背景】

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は 2019 年末に出現してから、変異株の出現を伴って世界中で猛威を振るっている。これまでに新たに COVID-19 治療薬として開発され使用されているものは中和抗体製剤のみだが、抗体製剤ではウイルスが変異によって薬剤から逃れる逃避変異が問題となる。実際に、これまでに開発された抗体製剤のいくつかは効果が消失する変異株が存在するため、複数の抗体を混ぜてカクテル製剤として用いる対応が取られている。そのため、COVID-19 のような新興のウイルス感染症では、迅速に開発ができ、逃避変異が生じずに一度開発すれば感染症を克服するまで使用が可能な治療薬が求められている。

### 【目 的】

現在全世界で問題になっている新型コロナウイルス SARS-CoV-2 は ACE2 を主な受容体として細胞に感染する。そのためウイルスへの親和性を高めた可溶性 ACE2 変異体タンパク質は、ウイルス中和タンパク製剤やウイルスの抗原検査薬として応用が期待される。本研究では従来の PCR を用いたランダム変異導入による指向性進化法に人工知能 (AI) によるアミノ酸変異の最適化を組み合わせることで、抗体以上にウイルス親和性が高い ACE2 タンパク質を効率よくデザインし、新型コロナウイルスの中和製剤、診断薬の開発につなげる。

### 【方 法】

迅速に開発ができ逃避変異が生じない治療薬として、新型コロナウイルス感染受容体である ACE2 に着目して開発に取り組んだ。今回採用した、受容体の細胞外領域をヒト免疫グロブリン IgG1 の重鎖定常領域 (Fc 領域) と繋げた融合タンパク製剤は、既に関節リウマチ等の治療薬として実用化されている。しかし、ACE2 の場合は新型コロナウイルスとの結合力がそれほど強くなく、通常のタンパク製剤の血中濃度では有効な中和活性を示さなかった。そこで、指向性進化法と呼ばれるタンパク質工学的手法を用いて、ウイルスとの結合力を高めることに取り組んだ。まず、増幅エラーが入りやすい核酸増幅法で ACE2 遺伝子にランダム変異を導入し、約 10 万種類の ACE2 変異体ライブラリを作製し、このライブラリを発現した細胞に新型コロナウイルスのスパイク (S) タンパク質を反応させて、強く結合した ACE2 変異体発現細胞を回収し、高親和性 ACE2 変異体の遺伝子を抽出した。その後、この変異体遺伝子に再度 10 万種類のランダム変異を追加したライブラリを作製し、そこからさらに高親和性の変異体遺伝子を抽出した。今回はこのサイクルを 3 回繰り返すことで、野生型 ACE2 タンパク質よりウイルスとの結合力が約 100 倍亢進した高親和性 ACE2 を 3 種類取得することに成功した。

### 【結 果】

高親和性 ACE2 と新型コロナウイルスのスパイク (S) タンパク質の結合力を、表面プラズモン共鳴法により測定したところ、野生型 ACE2 の解離定数が 17.63 nM であるのに対して、3 種類の高親和性 ACE2 は 0.29~3.98 nM と最大で 100 倍近い結合力の向上を認めた。また、ACE2 をヒトの免疫グロブリン IgG1 の Fc 領域と結合させた改変 ACE2 受容体で疑似ウイルス

に対する中和活性を評価したところ、50%感染阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) が野生型では 24.8  $\mu$ g/ml であるのに対して、各種改変 ACE2 は 0.056~0.33  $\mu$ g/ml と最大で 100 分の1以下の濃度となった。また 2002 年に流行し、同じく ACE2 を受容体として感染する SARS コロナウイルスの疑似ウイルスに対しても同様に評価したところ、2 つの変異体で IC<sub>50</sub> が 0.022~0.027  $\mu$ g/ml と高い中和活性が維持され、幅広いウイルス変異株に中和活性が維持されることが示唆された。

COVID-19 モデル動物実験はハムスターを用いて行った。鼻粘膜にウイルスを感染させた後に改変 ACE2 受容体を投与し、体重変化と肺炎所見を評価したところ、ウイルス感染により対照群では体重が 4.3%低下したが、改変 ACE2 受容体投与治療群では 7.3%増加し、非ウイルス投与群 (非感染対照群) と同等まで回復した。また肺組織のウイルス量も 10 分の1程度まで抑制され、CT 画像でもウイルス投与により広範囲にすりガラス陰影が出現するのに対し、治療群では陰影が顕著に減少した。また、肺病理組織では治療群で肺胞出血や炎症細胞浸潤が少なく、肺炎の重症化も抑制された。

薬物の投与経路に関しては COVID-19 が呼吸器疾患ということで経静脈的投与に加えて、病変に直接薬剤を届ける吸入投与でより高い治療効果が期待される。実際に COVID-19 の治療薬として使われたレムデシビルや抗体製剤では吸入投与による高い治療効果が臨床試験や動物実験で報告されている。本製剤でも吸入投与による効果を検証するために、まずマウスで実験を行った。SARS-CoV-2 のマウス純化株を用いて、マウス致死量感染モデルにおいて経静脈投与の約 100 分の 1 の投与量である 0.25mg/kg 量を期間内にスプレーで直接投与を行った。コントロール群では 100%致死であったが治療群では 60%の生存が得られ、低用量での高い治療効果が得られた。ヒトでのネブライザーでの吸入では投与量の半分程度は気管・肺に届くと考えられており、実際の臨床でも高い治療効果と薬剤の使用量の低減が可能となる。また静脈路を確保する必要がないため、自宅や療養施設での使用も可能となり、より幅広い利用が可能となり、特に感染者数がピークを迎える際は病床の利用制限が問題となるが、本製剤の吸入療法を幅広く行うことで、入院必要患者数を効果的に減少できることが期待される。

新型コロナウイルスの感染受容体 ACE2 に基づく改変 ACE2 受容体では、ウイルスが変異により改変 ACE2 受容体に結合しなくなった場合、細胞表面の ACE2 とも結合できずに感染力を失うため実質的に逃避変異が生じないと考えられる。この仮説を、ウイルスに対する耐性株が出現しやすくなる評価系を用いて確認したところ、コントロールとして用いたモノクローナル抗体では、4 継代目で完全に耐性株に置換されたが、改変 ACE2 受容体では 15 継代を経ても耐性株は出現せず、実際に逃避変異が出現しないことが確認された。また現在脅威となっているウイルス変異株に関しては、感染力が強い N501Y 変異をもつ  $\alpha$  株に対しても有効で、ワクチンや一部のモノクローナル抗体が効きにくい免疫逃避型 E484K 変異をもつ南ア  $\beta$  株に対しては、現在米国で使用が許可されているリジェネロン社の REGN10933 抗体は中和活性の大きな低下を認めたが、改変 ACE2 受容体では中和活性が良好に維持されていた<sup>1)</sup>。

また本研究開発期間中にはスパイクタンパク質に多数の変異を有するオミクロン株が出現したが、それにより本製剤の優位性が実際に証明されることとなった。オミクロン株はスパイクタンパク質に約 30 種類の変異を持ち、伝搬力が上がるとともにワクチン血漿や実臨床や臨床試験中の多くの抗体製剤に対して逃避性を示した。実際私たちのグループでも BNT162b2 を 2 回接種後 3 か月の血清とアルファ株感染患者、デルタ株感染患者の血漿を用いて評価を行ったところ、オミクロン株 (BA.1) に対して中和活性が 20-50 分の 1 に低下しているのを確認した。さらに日本ではロナプリーブとして販売されているイムデビマブとカシリビマブのカクテル抗体も中和活性が消失していたが、ACE2 製剤はオミクロン株に対して武漢株と同等の中和活性が維持されているのが確認された。さらにオミクロン株の感染実験としてハムスターではオミクロン株感染 2 時間後に 20mg/kg の腹腔内投与を行うと、もともと肺病変が軽度のため病理的な評価は難しいものの肺組織におけるウイルスコピー数が優位に減少し、CAG-hACE2 過剰発現マウスでは全身性の hACE2 発現よりオミクロン株でも致死性を示したが、こちらでも感染 2 時間後の 20mg/kg 腹腔内投与にて有意な生存率の改善が得られ、感染動物実験でもオミクロン株に対する有効性が確認された。幅広い有効性が期待できることから ACE2 を利用する他のサルベコウイルスに対する中和活性の評価も行った。これまでに SARS-CoV-1 に対しては SARS-CoV-2 以上に強い中和活性を確認していたが、RBD のアミノ酸配列が CoV-1 に近い WIV1 や CoV-2 に近い GD-1 に対しても強い中和活性が維持されていた。また他の RaTG13、GX-P5L、RsSHO014、Rs4231 に関してもある程度中和活性が確認された<sup>2)</sup>。

## 【考 察】

新型コロナウイルスの受容体である ACE2 タンパク質のウイルス親和性を高めることで、抗体製剤と同等の中和活性を有

し、かつ逃避変異問題を克服する中和蛋白製剤の開発を行った。ハムスターやマウスの感染モデルで治療効果が確認され、またオミクロン株を含むこれまでに問題となった変異株に対して有効であり、さらに将来のコロナウイルス感染症の原因となりうるサルベコウイルスにも有効なため現在の COVID-19 治療薬だけでなく将来のパンデミックに対する備蓄薬としても期待される<sup>3)</sup>。

#### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

オミクロン株の出現により懸念されていた治療薬やワクチンに対する逃避変異が現実のものとなり、薬剤耐性問題を克服する治療薬開発が求められている。これまでの結果から高親和性 ACE2 はウイルス変異による薬剤耐性を克服する新たなモダリティであり、ヒトでの高い有効性や安全性が期待されるため、早期に治験薬として開発され、感染症対策強化に繋がることが期待されている。またウイルス感染受容体に基づく中和タンパク質製剤“受容体デコイ”のコンセプトは、感染受容体が明らかとなっている他のウイルス感染症への応用も期待される。

#### 【参考・引用文献】

1. Higuchi Y, Suzuki T, Arimori T, Ikemura N, Mihara E, Kirita Y, Ohgitani E, Mazda O, Motooka D, Nakamura S, Sakai Y, Itoh Y, Sugihara F, Matsuura Y, Matoba S, Okamoto T\*, Takagi J\*, Hoshino A\*. Engineered ACE2 receptor therapy overcomes mutational escape of SARS-CoV-2 Nat Commun. 2021 Jun 21;12(1):3802.
2. Ikemura N, Taminishi S, Inaba T, Arimori T, Motooka D, Katoh K, Kirita Y, Higuchi Y, Li S, Suzuki T, Itoh Y, Ozaki Y, Nakamura S, Matoba S, Standley DM\*, Okamoto T\*, Takagi J\*, Hoshino A\*. An engineered ACE2 decoy neutralizes the SARS-CoV-2 Omicron variant and confers protection against infection in vivo. Sci Transl Med. 2022 Apr 26;eabn7737.
3. Arimori T, Ikemura N, Okamoto T, Takagi J, Standley DM, Hoshino A\*. Engineering ACE2 decoy receptors to combat viral escapability. Trends Pharmacol Sci. 2022 Oct;43(10):838-851.