

## 新型コロナウイルス感染症の重症化に対する塩分制限の有用性

後藤 孔郎, 尾関 良則, 吉田 雄一, 岡本 光弘, 正木 孝幸, 柴田 洋孝

大分大学医学部内分泌代謝・膠原病・腎臓内科学講座

**概要** 肥満は新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)のヒト感染(COVID-19)の重症化リスクが高いとされている。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。

高ナトリウム負荷では腸管内に存在する樹状細胞が活性化し、炎症性サイトカインである IL-17 の合成が促進され、腸内細菌叢の悪化や腸管内での炎症性変化が惹起されるという報告がある。

今回、高塩飼料あるいは低塩飼料によって、1)各臓器内での ACE2 がどのように変化するか、2)SARS-CoV-2 のリコンビナント S1-receptor binding domain (S1-RBD)タンパクを投与すると、肺内への S1-RBD タンパクの侵入に変化がみられるか、について検討した。

塩分摂取量を通常の 2 倍以上にすると、*Allobaculum stercoricanis* という腸管内での酢酸生成に関与する腸内細菌の分布が有意に低下し、実際に血中酢酸濃度が低下していた。また、腸管バリア機能の保持に必要なタンパク質である ZO-1 の腸内発現が塩分過多によって低下していた。さらに血中 LPS 濃度が増加したことから、腸管内の LPS が腸管外へと漏出したことが考えられ、塩分過多は腸管バリア機能を低下させることが示唆された。血中 LPS 濃度の増加に伴い、肺、小腸および心臓において有意な炎症性変化の亢進が認められた。また、各臓器内での炎症性変化に伴って臓器内の ACE2 発現も増加した。S1-RBD タンパクを全身投与すると、肺において S1-RBD タンパク含有量の有意な増加がみられた。

塩分負荷は腸管バリア機能の低下による血中 LPS 濃度の増加が、各臓器での ACE2 発現を増加させ、SARS-CoV-2 の易感染性をもたらす可能性が推測された。今後 COVID-19 の重症化を回避するには、減量のみならず減塩も同時に指導する必要があることが示唆される。

### 1. 研究目的

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)のヒト感染(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、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、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

よる消化管に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。

SARS-CoV-2 には、ウイルス粒子表面に王冠様突起(Spike)タンパク質が存在し、その中の S1 receptor-binding domain(S1-RBD)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 S1-RBD 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。したがって、リコンビナント S1-RBD タンパクを SARS-CoV-2 に見立てて、S1-

RBD タンパクの全身投与によって S1-RBD タンパク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。

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。さらに、高ナトリウム負荷では腸管内に存在する樹状細胞が活性化し、炎症性サイトカインである IL-17 の合成が促進され、腸内細菌叢の悪化や腸管内での炎症性変化が惹起されるという報告がある<sup>1)</sup>。また、ACE2 自体は抗炎症性作用を有しており、炎症性変化が生じた場合には ACE2 発現が代償性に増加すると考えられている。上記のことを考慮すると、減塩することは腸管内で IL-17 といった炎症性サイトカインの発現を抑制させ、さらに腸管内の ACE2 発現も抑制させることで SARS-CoV-2 の感染の機会を軽減させるようなことが示唆されるが、はっきりとした見解は国内外を通じて得られていない。

今回、高塩飼料あるいは低塩飼料によって、1)各臓器内での ACE2 がどのように変化するか、2)リコンビナント S1-RBD タンパクを投与すると、肺への S1-RBD タンパクの侵入に変化がみられるか、について検討する。

## 2. 研究方法

### 2.1 モデル動物の作製

雄野生マウスに通常餌で以下のように低塩飼料および高塩飼料を与える合計 5 群を作製する。

- ① 0.3%(通常の 0.5 倍の塩分濃度)摂取群、
  - ② 0.6%(通常の塩分濃度)摂取群、
  - ③ 1.2%(通常の 2 倍の塩分濃度)摂取群
  - ④ 3.0%(通常の 5 倍の塩分濃度)摂取群
  - ⑤ 6.0%(通常の 10 倍の塩分濃度)摂取群
- 各々 4 週間飼育し、以下のような評価項目で検討する。

### 2.2 小腸, 肺, 心臓における評価

- 1) 各群の便を採取し、次世代シーケンサーを用いて、腸内細菌の分布を検討する。T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 法を用いて、腸内細菌解析を検討する。腸内細菌の構成菌種は、16SrDNA の塩基配列が異なるため、制限酵素による切断部位は菌種固有のものとなる。これらの処理によって得られる DNA 断片に対応したピークの位置(断片長)、面積(菌数)および数(菌種の多様性)を解析することで糞便中の構成菌種およびその割合を推定する方法である。前述の 4 群の糞便を採取し、上記方法で腸内環境を評価する。
- 2) 小腸, 肺および心臓における炎症性サイトカインである tumor-necrotizing factor (TNF)- $\alpha$  の発現を測定する。
- 3) 小腸内での炎症性マクロファージ (M1 マクロファージ) の浸潤度について、M1 マクロファージ抗原である CD11c を指標として免疫組織学的に検討する。また、腸管バリア機能に必要なタンパク質である ZO-1 の腸内発現を評価する。
- 4) 血中のエンドトキシンの 1 つである lipopolysaccharide (LPS) の血中濃度および短鎖脂肪酸の 1 つである酢酸の血中濃度を測定する。
- 5) 小腸, 肺および心臓内の ACE2 発現を評価する。

### 2.3 新型コロナウイルスのリコンビナント S1-receptor binding protein (S1-RBD) タンパクの全身投与による各臓器への分布に関する評価

上記 4 群に対して、S1-RBD タンパク (10  $\mu$ g) を腹腔内投与し、6 時間後に肺を採取した。その後、肺における S1-RBD タンパクの含有量を評価した。

## 3. 研究結果

- 1) 各群の摂食量や体重に有意な変化はみられなかった。
- 2) 塩分濃度を 2 倍以上にすると、*Allobaculum\_stercoricanis* という腸内細菌の分布が有意に低下した (Fig. 1)。
- 3) 塩分濃度を 2 倍以上にすると、肺 (Fig. 2-A)、小腸 (Fig. 2-B) および心臓 (Fig. 2-C) で TNF- $\alpha$  の発現が増加した。
- 4) 塩分濃度を 2 倍以上にすると、小腸内での炎症性マクロファージの浸潤が亢進し (Fig. 3-A)、小腸内のバリア機能の保持に必要なタンパク質である ZO-1 の発現が増加した (Fig. 3-B)。

- 5) 塩分濃度を 2 倍以上にすると, 血中 LPS 濃度が増加した (Fig. 4).
- 6) 塩分濃度を 2 倍以上にすると, 血中酢酸濃度が低下した (Fig. 5).
- 7) 塩分濃度を 2 倍以上にすると, 小腸, 肺および心臓で ACE2 の発現が増加した (Fig. 6).
- 8) 塩分濃度を 2 倍以上にすると, 肺での S1-RBD タンパクの含有量が増加した (Fig. 7).

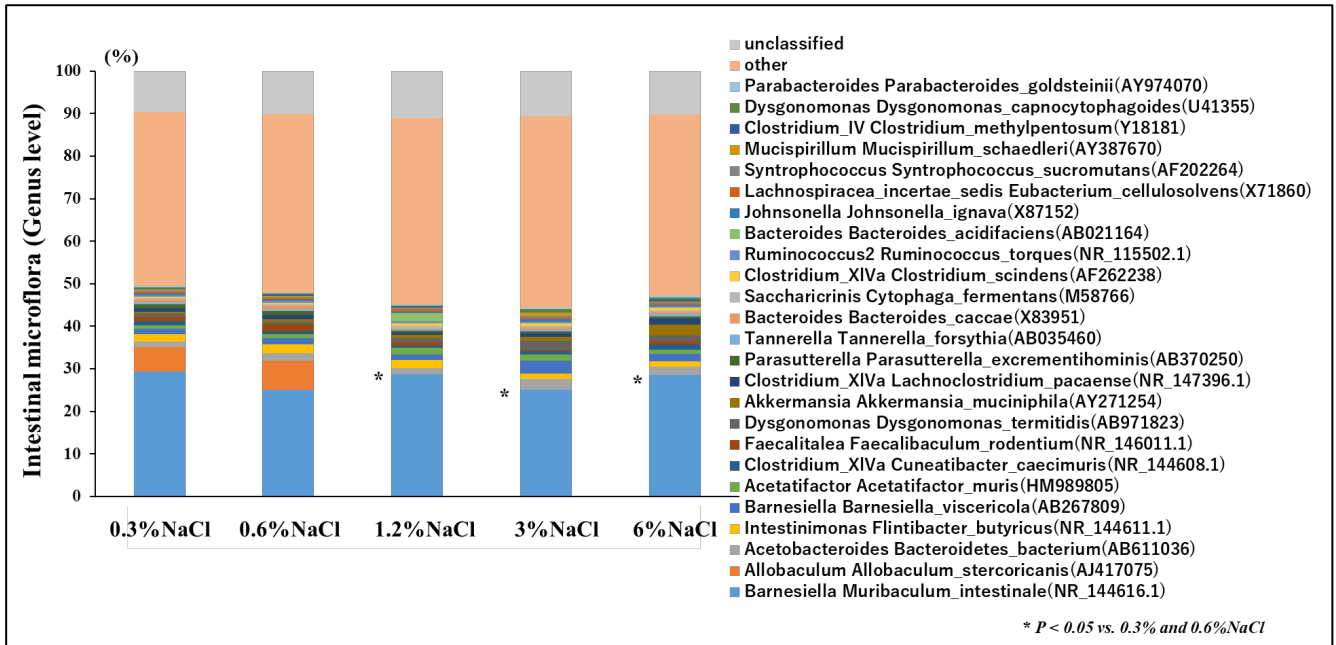


Fig. 1

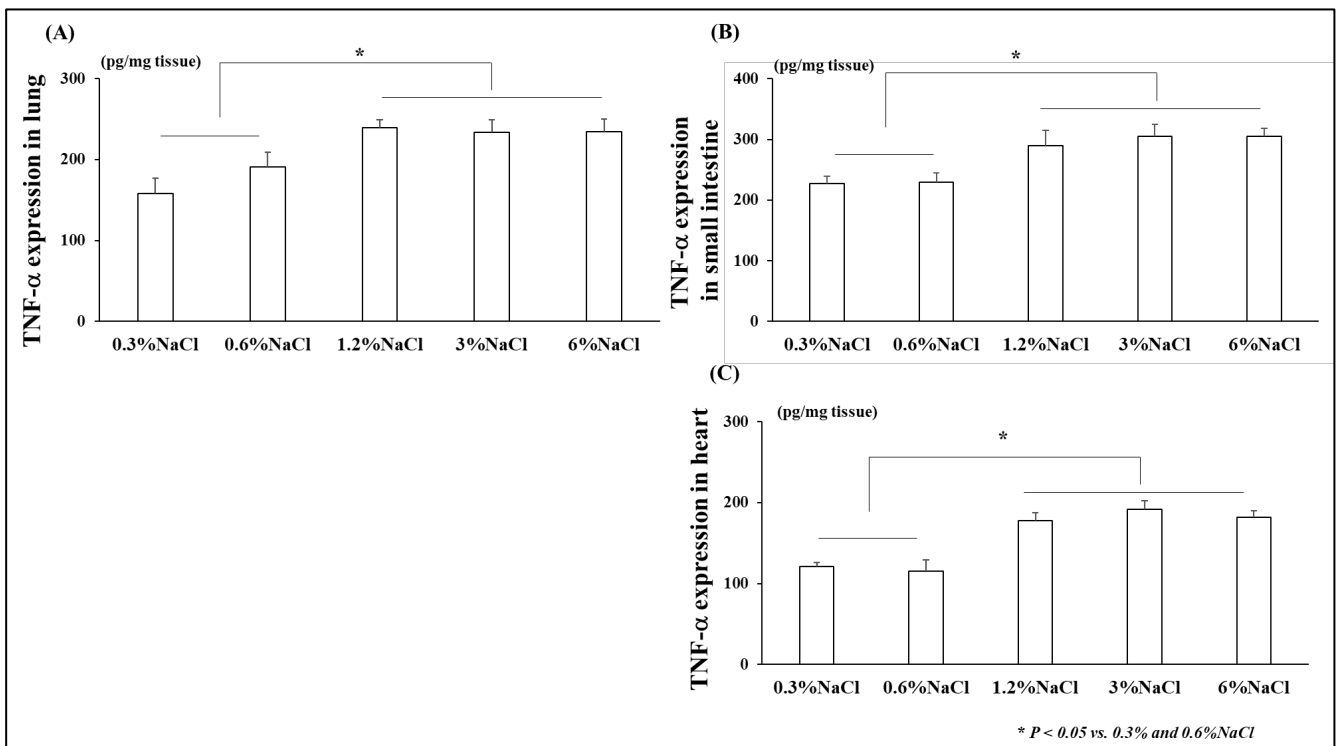
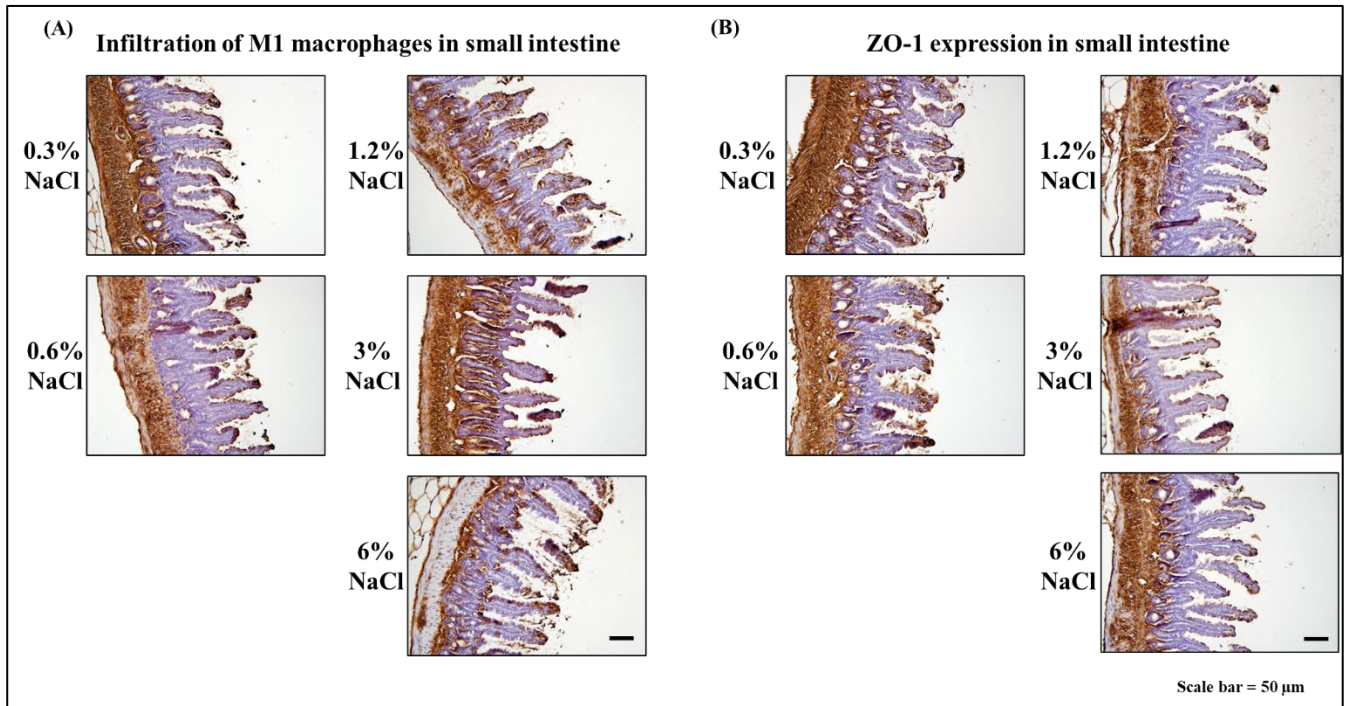
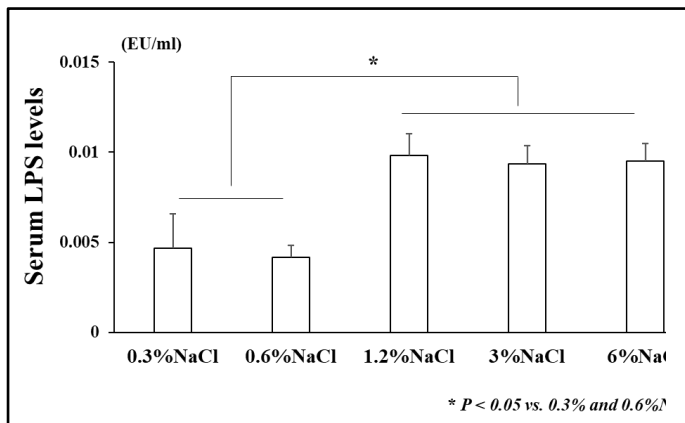


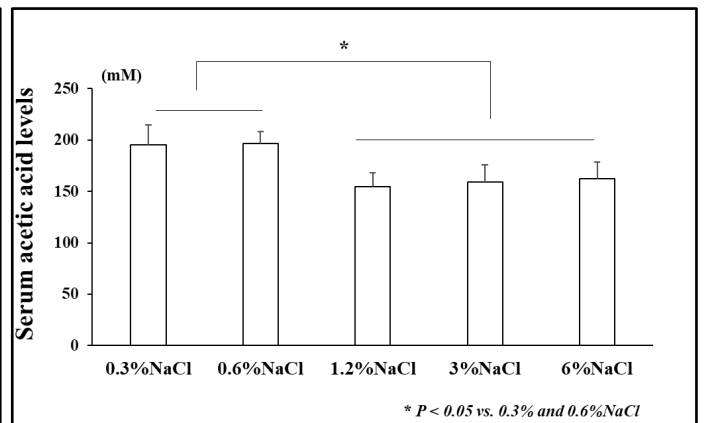
Fig. 2



**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**

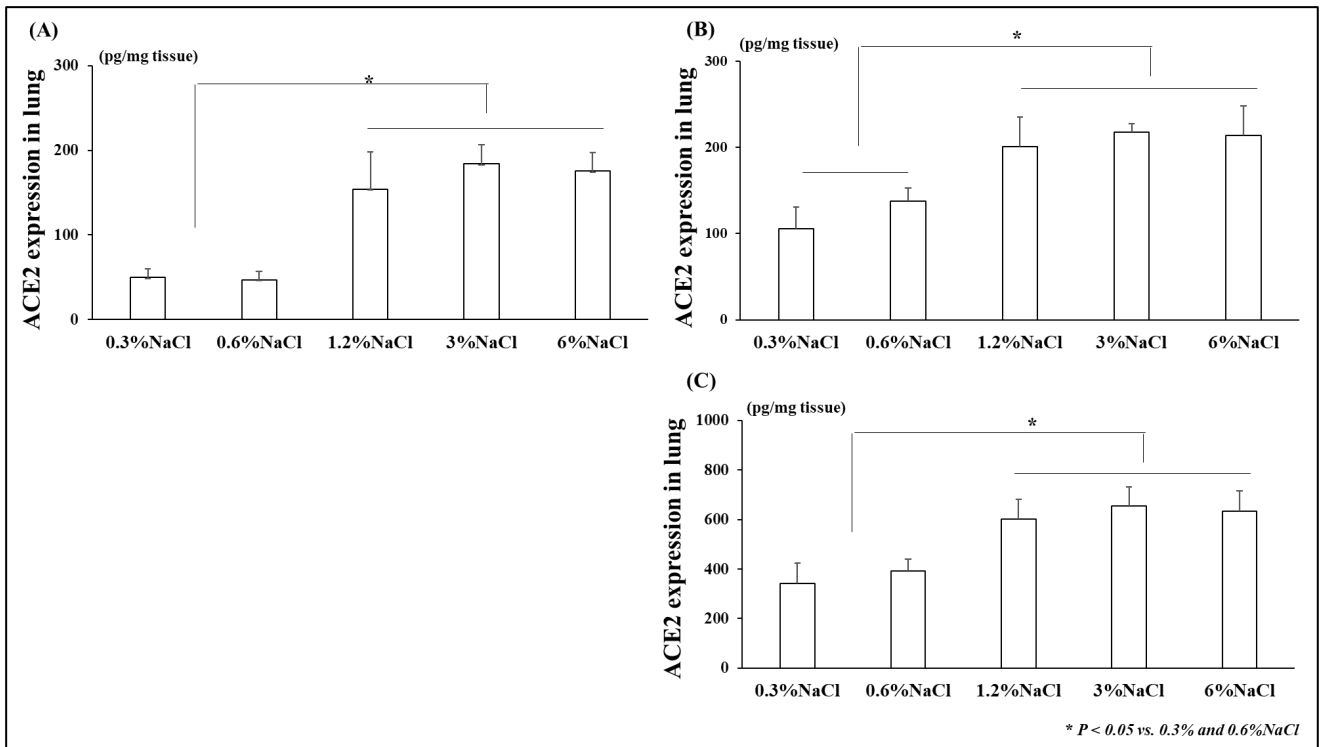


Fig. 6

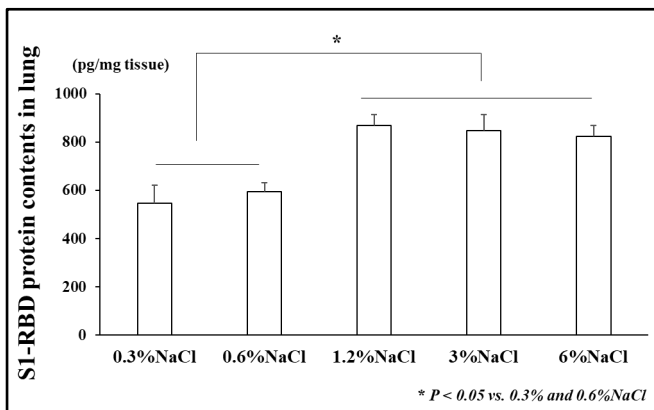


Fig. 7

#### 4. 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<sup>2)</sup>。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 による消化管に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<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>。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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>。しかしながら塩分負荷といった病態において、多臓器での ACE2 発現が増加するか、さらに SARS-CoV-2 の易感染性をもたらすかについての詳細な検討は、国内外を通じて皆無である。

本研究のなかで、通常の 2 倍以上の塩分負荷が腸内細菌叢の *Allobaculum stercoricanis* が有意に減少することが認められた。*Allobaculum stercoricanis* を含む *Allobaculum* 属は、酢酸を含む短鎖脂肪酸といった二次性代謝産物の生成に深く関与することが報告されている<sup>8)</sup>。本研究でも、*Allobaculum stercoricanis* の低下に伴い、血中酢酸濃度の低下を認めた。また、通常の 2 倍以上の塩分負荷によって小腸内炎症性変化の亢進や血中 LPS 濃度が増加したことから、塩分負荷は腸管バリア機能の低下をもたらすことが示唆された。さらに酢酸といった短鎖脂肪酸には腸管バリア機能を保持させることが知られていることから、塩分負荷による腸管バリア機能の低下には *Allobaculum stercoricanis* の低下による腸内での酢酸生成の低下も関与していることが推測された。また、塩分負荷は肺、小腸や心臓といった多臓器内での ACE2 発現が亢進することがみられたが、これには血中 LPS 濃度の増加が関与していることが考えられる。ACE2 には抗炎症作用を有することから、血中 LPS 濃度の増加に対しての代償性変化が ACE2 発現の増加として現れたことが推測される。さらには、塩分負荷による多臓器内での ACE2 発現の増加に伴い、S1-RBD タンパクの肺への侵入も増加することが認められた (Fig. 8)。本来であれば SARS-CoV-2 を用いるべきであるが、S1-RBD タンパクをウイルスの代替とし、S1-RBD タンパクが組織内に侵入すれば SARS-CoV-2 に感染したものとみなすことができる。このような実験系は、SARS-CoV-2 による重症度は評価できないが、ウイルス動態としては十分に評価できると考える。したがって、SARS-CoV-2 の易感染性についての評価が安全に行うことができる。

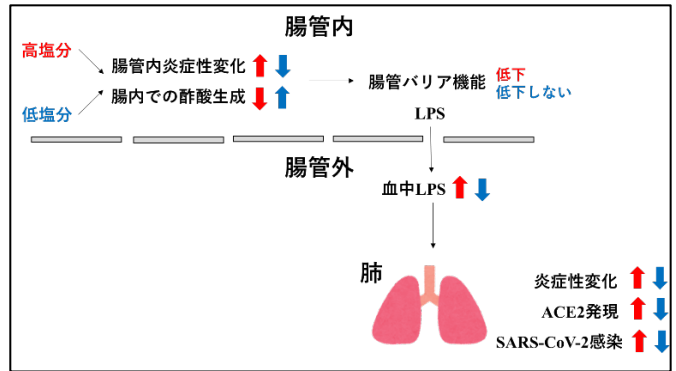


Fig. 8

肥満が COVID-19 の危険因子であるといわれているが、肥満者は摂取カロリーに加えて塩分も多く摂取している傾向にあり、いわゆる肥満高血圧症の発症に塩分過多も関与していると考えられている。したがって、COVID-19 を回避する際には、減量のみならず減塩も同時に指導する必要があることが示唆される。

以上より、本研究によって塩分負荷は腸内細菌叢の悪化や腸管バリア機能の低下による血中 LPS 濃度の増加をもたらすこと、肺、小腸および心臓での 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た。

## 5. 今後の課題

日本高血圧学会では、1 日の塩分摂取を 6 g 以下にすることが推奨されているが、実際には非常に困難である。今回の研究で塩分の過剰摂取が SARS-CoV-2 の易感染性もしくは COVID-19 の重症化をもたらす可能性を示唆する結果が得られた。このような病態の根本には血中 LPS 濃度の増加が大きく関わっていると推測される。したがって、薬理的に LPS を失活させるような薬剤の投与が有効である可能性がある。そのような薬剤の 1 つにポリミキシン B がある。したがって、塩分負荷でもポリミキシン B を経口投与することによって、血中 LPS 濃度が低下しそれに伴い多臓器内での ACE2 発現も低下すれば、SARS-CoV-2 の易感染性を抑制させることが可能となるかもしれない。今後、上記のような検討を行っていきたいと考えている。

## 6. 文献

1. Eljovitch F, Laffer CL, Sahinoz M, et al. The Gut Microbiome, Inflammation, and Salt-Sensitive Hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 22(10):79. (2020)
2. 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)
3. Camargo SMR, Vuille-Dit-Bille RN, Meier CF, et al. ACE2 and gut amino acid transport. *Clin Sci (Lond).* 134(21):2823-2833. (2020)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. Wu M, Tian T, Mao Q, et al. Associations between disordered gut microbiota and changes of neurotransmitters and short-chain fatty acids in depressed mice. *Transl Psychiatry.* 10(1):350. (2020)

## Effects of Salt Restriction for the Severity of Novel Coronavirus Infection

Koro Gotoh, Yoshinori Ozeki, Yuichi Yoshida, Mitsuhiro Okamoto, Takayuki Masaki and  
Hirotaaka Shibata

Department of Endocrinology, Metabolism, Rheumatology and Nephrology, Faculty of Medicine,  
Oita University

### Summary

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Obesity is a major risk factor for the development of COVID-19. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is an essential receptor for cell entry of SARS-CoV-2. The receptor binding domain of the S1 subunit (S1-RBD protein) in the SARS-CoV-2 spike glycoprotein binds to ACE2 on host cells, through which the virus enters several organs, including the lungs. When the relationship between severe COVID-19 and serum ACE2 concentration was examined, it was reported that serum ACE2 concentration increased as obesity and blood glucose control worsened, and that it may be due to an increase in ACE2 expression derived from multiple organs. It has been reported that high sodium load activates dendritic cells present in the intestinal tract and promotes the synthesis of IL-17, an inflammatory cytokine, which induces deterioration of intestinal flora and inflammatory changes in the intestinal tract. In this study, we investigate whether high- or low-salt diets 1) change ACE2 in each organ and 2) whether administration of the SARS-CoV-2 recombinant S1-receptor binding domain (S1-RBD) protein changes the entry of S1-RBD protein into the lungs. When salt intake was more than twice the normal intake, the distribution of intestinal bacteria involved in acetic acid production in the intestinal tract called *Allobaculum\_stercoricanis* was significantly reduced, and the serum acetic acid concentration actually decreased. In addition, the intestinal expression of ZO-1, a protein necessary for maintaining intestinal barrier function, was decreased by excessive salt. Furthermore, considering the increase in serum LPS concentration, LPS in the intestinal tract leaked out of the intestinal tract, suggesting that excessive salt reduces intestinal barrier function. With an increase in the concentration of LPS in the blood, significant increased inflammatory changes were noted in the lungs, small intestine and heart. In addition, ACE2 expression in organs increased with inflammatory changes within each organ. Systemic administration of S1-RBD protein significantly increased S1-RBD protein content in the lungs. It was speculated that an increase in serum LPS concentration due to a decrease in intestinal barrier function may increase ACE2 expression in each organ and lead to SARS-CoV-2 susceptibility to infection. In order to avoid the severity of COVID-19 in the future, it is suggested that salt reduction, which is only necessary for weight loss, needs to be instructed at the same time.