

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：82603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20767

研究課題名（和文）新型コロナウイルスによる慢性呼吸機能障害の治療法開発に向けた肺再生障害機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of pulmonary regenerative disorder for the development of therapies for chronic respiratory dysfunction caused by the SARS-CoV-2

研究代表者

志和 希（Shiwa-Sudo, Nozomi）

国立感染症研究所・感染病理部・研究員

研究者番号：40902416

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：新型コロナウイルス感染症の後遺症（Long COVID）の1つの症状として慢性的な呼吸機能障害が報告されているが、その病態については不明な点が多い。本研究は、これまでに確立したSARS-CoV-2感染小動物モデルを用いて、細気管支のクラブ細胞がSARS-CoV-2感染動物の肺における主要な初期感染・複製部位であることを病理学的解析により明らかにした。クラブ細胞は、肺胞傷害後にガス交換を担う肺胞上皮細胞へと分化する組織幹細胞であることから、SARS-CoV-2がこのクラブ細胞に感染することで肺機能の再生に影響する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SARS-CoV-2感染が全世界で拡大を続ける今日、約3割の患者に感染後1ヶ月経過しても様々なLong COVIDの症状が報告されている。幅広い年齢層で慢性的な呼吸機能障害の症状を訴える患者が報告されているにも関わらず、その病態は未だ解明されていないため患者の治療は対症療法に頼らざるをえない。また、研究報告数もワクチンや治療薬開発と比較して少ないのが現状である。動物種を超えてSARS-CoV-2の感染および複製部位を明らかにし、組織幹細胞の発現動態にも着目した本研究は、SARS-CoV-2の感染動態を理解する上で有用であり、Long COVIDの治療法開発における基盤的研究と位置づけられる。

研究成果の概要（英文）：Chronic respiratory dysfunction has been reported as one of the symptoms of the aftereffects of the SARS-CoV-2 infection (Long COVID), but the pathogenesis is unclear. In this study, we used our previously established small animal models of SARS-CoV-2 infection to investigate the expression and distribution of viral proteins, lung tissue, and tissue stem cell markers in the early stage of infection in the lungs. Histopathological examination revealed that club cells in bronchioles were the main initial site of infection and replication in the lungs of SARS-CoV-2-infected animals. It was suggested that since club cells were tissue stem cells that differentiated into alveolar epithelial cells after alveolar injury, SARS-CoV-2 infection of club cells may affect the regeneration of lung function. These findings provide insights into the pathogenesis of SARS-CoV-2 and the development of treatment for Long COVID.

研究分野：ウイルス学、感染病理学

キーワード：SARS-CoV-2 動物モデル 後遺症（Long COVID）

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)のパンデミックから数年が経過した今日、COVID-19の罹患後症状、いわゆる後遺症 (Long COVID) が多数報告されている。この Long COVID の症状には、主に倦怠感や呼吸困難、関節痛、胸痛、咳、味覚・嗅覚異常などの症状が挙げられる。この Long COVID 症状の中に慢性的な呼吸機能障害が含まれるが、この呼吸機能障害がなぜ起こるのか、またなぜ完全に回復に至らないのか、その原因は明らかとなっていない。よって、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染における呼吸機能障害の病態の解明は、Long COVID 治療法開発における重要課題の1つである。

2. 研究の目的

本研究は、SARS-CoV-2 感染初期から後期に至るまでの肺におけるウイルス感染細胞と組織幹細胞の発現動態に着目し、SARS-CoV-2 感染による組織幹細胞応答の変化が肺の再生に与える影響を明らかにし、肺の再生障害機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 小動物モデルを用いた SARS-CoV-2 の感染および複製部位に関する病理学的研究

まず、SARS-CoV-2 感染小動物モデル (マウス・シリアンハムスター) を利用して感染初期の肺におけるウイルスタンパクや肺組織、組織幹細胞マーカーの発現・分布について基礎検討を行った。2020 年欧州由来 SARS-CoV-2 (QH-329-037 株) のマウス継代株である QHmusX 株を BALB/c マウスに経鼻接種し、接種 1 日目と 4 日目に肺組織を採取した。また、シリアンハムスターについては QH-329-037 株を経鼻接種し、接種 1 日目と 3 日目に肺組織を採取した。供試材料を 10% 緩衝ホルマリンあるいは 2.5% グルタルアルデヒド 4% パラホルムアルデヒドで固定し、病理組織化学的、免疫組織化学的及び超微形態学的検索を実施した。

(2) SARS-CoV-2 既感染ハムスターにおけるオミクロン株再感染後の肺の病理学的研究

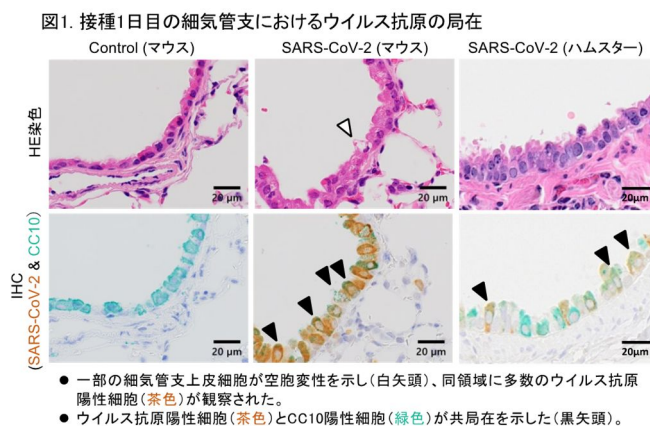
次に、従来株あるいはオミクロン株既感染個体へのオミクロン株再感染が肺組織に与える影響を病理組織化学的に精査した。シリアンハムスターに A 系統、B.1.1.7 系統 (アルファ株) B.1.351 系統 (ベータ株) B.1.617.2 系統 (デルタ株) オミクロン亜系統 (BA.1 株) を経鼻接種し、5 週間後に BA.1 株を再感染させた。体重変化と臨床症状を観察し、再感染 3 日目に全個体を解剖に供し、病理組織化学的及び免疫組織化学的検索を行った。

4. 研究成果

(1) 動物モデルを用いた SARS-CoV-2 の感染および複製部位に関する病理学的研究

マウスモデルを用いた病理学的解析の結果、細気管支内の変性を伴う Club cell 10-kDa protein (CC10) 陽性上皮細胞が多数観察され、これに一致してウイルス抗原陽性像が認められた。超微形態学的にもこれらはクラブ細胞であり、細胞表面と細胞質内に多数のウイルス粒子が観察された。細胞質内にはウイルスの複製過程を示す Double Membrane Vesicle が多数観察された。一方で、細気管支内の線毛細胞にはウイルス感染・増殖を示唆する像は認められなかった。肺泡領域では変性を伴う II 型肺泡上皮細胞が観察され、細胞表面と細胞質内にウイルス粒子が存在したが、その粒子数はクラブ細胞よりも比較的少数であった。また、シリアンハムスターモデルを用いた病理学的解析の結果、シリアンハムスターにおいても細気管支内に変性を伴う CC10 陽性を示すクラブ細胞が観察され、免疫二重染色の結果よりこの CC10 陽性細胞に一致してウイルス抗原陽性像が認められた (図 1)。

以上の結果から、細気管支のクラブ細胞が SARS-CoV-2 感染小動物モデルの肺における



主要な初期感染・複製部位であることが明らかとなった。クラブ細胞は、肺胞傷害後にガス交換を担う肺胞上皮細胞へと分化する組織幹細胞の1つであることから、SARS-CoV-2がこのクラブ細胞に感染することで肺機能の再生に影響する可能性が示唆された。

(2) SARS-CoV-2 既感染ハムスターにおけるオミクロン株再感染後の肺の病理学的研究

感染後期(再感染前)及び再感染後の肺の病理学的解析の結果、感染後期の肺には細気管支上皮細胞や肺胞上皮細胞の再生像(過形成)やフィブリン沈着など初感染時の影響と考えられる病変が軽度に残るものの、再感染後の肺に急性炎症やウイルス抗原、再感染による疾患増悪を示唆する所見は認められなかった。以上の結果から、シリアンハムスターにおいて初感染により獲得した免疫は再感染後の肺炎発症を抑制する可能性が示唆された(Shiwa-Sudo N, et al. J Virol. 2023)。

小動物モデルを用いた本研究によって、①SARS-CoV-2 感染初期に組織幹細胞の1つであるクラブ細胞に影響を与える可能性があること、②初感染により獲得した免疫は再感染後の肺炎発症を抑制する可能性が示唆された。今後、その他の呼吸器感染症の病態との比較解析を進めることでより詳細な肺の再生障害機序が明らかとなり、Long COVID の治療法開発に新たな展開をもたらすことができると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwata-Yoshikawa N, Shiwa N, Sekizuka T, Sano K, Ainai A, Hemmi T, Kataoka M, Kuroda M, Hasegawa H, Suzuki T, Nagata N	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 A lethal mouse model for evaluating vaccine-associated enhanced respiratory disease during SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Adv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abh3827. Epub 2022 Jan 7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishii H, Nomura T, Yamamoto H, Nishizawa M, Thu Hau TT, Harada S, Seki S, Nakamura-Hoshi M, Okazaki M, Daigen S, Kawana-Tachikawa A, Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Shiwa N, Suzuki T, Park ES, Ken M, Onodera T, Takahashi Y, Kusano K, Shimazaki R, Suzaki Y, Ami Y, Matano T	4. 巻 3(2)
2. 論文標題 Neutralizing-antibody-independent SARS-CoV-2 control correlated with intranasal-vaccine-induced CD8/T cell responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Rep Med	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xcrm.2022.100520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyamoto S, Arashiro T, Adachi Y, Moriyama S, Kinoshita H, Kanno T, Saito S, Katano H, Iida S, Ainai A, Kotaki R, Yamada S, Kuroda Y, Yamamoto T, Ishijima K, Park ES, Inoue Y, Kaku Y, Tobiume M, Iwata-Yoshikawa N, Shiwa-Sudo N, et al	4. 巻 3(4)
2. 論文標題 Vaccination-infection interval determines cross-neutralization potency to SARS-CoV-2 Omicron after breakthrough infection by other variants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Med (N Y)	6. 最初と最後の頁 249-261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.medj.2022.02.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ueno M, Iwata-Yoshikawa N, Matsunaga A, Okamura T, Saito S, Ashida S, Yoshida I, Nagashima M, Asakura H, Yaoita Y, Suzuki J, Sadamasu K, Yoshimura K, Kutsuna S, Shiwa-Sudo N, Nagata N, Suzuki T, Suzuki A, Okamoto M, Kimura M, Ohmagari N, Miura R, Ishizaka Y	4. 巻 201
2. 論文標題 Isolation of human monoclonal antibodies with neutralizing activity to a broad spectrum of SARS-CoV-2 viruses including the Omicron variants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antiviral Res	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.antiviral.2022.105297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiwa-Sudo Nozomi, Sakai Yusuke, Iwata-Yoshikawa Naoko, Watanabe Shinji, Yamada Souichi, Kuroda Yudai, Yamamoto Tsukasa, Shirakura Masayuki, Fujisaki Seiichiro, Miyazaki Kaya, Miura Hideka, Nagata Shiho, Fukushi Shuetsu, Maeda Ken, Hasegawa Hideki, Suzuki Tadaki, Nagata Noriyo	4. 巻 97
2. 論文標題 Impact of Reinfection with SARS-CoV-2 Omicron Variants in Previously Infected Hamsters	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.01366-22	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 志和希、岩田 (吉河) 奈織子、片岡紀代、長谷川秀樹、鈴木忠樹、永田典代
2. 発表標題 動物モデルを用いたSARS-CoV-2の感染および複製部位に関する病理学的研究
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------