

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08806

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス感染症の生体肺イメージング解析技術の開発とその応用

研究課題名(英文) Development and application of live imaging of lungs in influenza virus infection

研究代表者

福山 聡 (Fukuyama, Satoshi)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：00626517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺は、呼吸運動や心臓の拍動などの影響のため、観察する視野を固定することが難しい。申請者らはこれらの解剖学的な問題を克服するために、肺を対物レンズに固定するための新たな付属器具の開発・作製を行なった。申請者らが開発したレポーターインフルエンザウイルス(Color-flu)はマウスの気管支上皮や肺胞上皮に感染し、感染細胞内で蛍光タンパク質が産生される。Color-fluを用いて、生体肺の感染細胞の検出に成功した。さらに好中球やマクロファージ特異的に蛍光タンパク質を産生するレポーターマウスを用いる事で、これらの免疫細胞とインフルエンザ感染細胞との相互作用や動態を生体肺で解析することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、インフルエンザウイルスに感染した個体における細胞レベルでの生体肺のイメージング解析は、解剖学的・生理学的に困難だった。本研究で開発した生体肺のイメージング解析システムによって、初めてインフルエンザウイルス感染細胞と免疫細胞の動態や相互作用を可視化することに成功した。本システムはインフルエンザの新たな治療法やワクチン開発に有用である。さらに、インフルエンザだけでなく様々な気道感染症や呼吸器疾患の病態解明にも本研究で得られた技術は役立つと考えられる。本研究では、P3レベル施設内に本イメージングシステムの整備を行なった。したがって、高病原性ウイルス感染モデルも利用できる。

研究成果の概要(英文)：It is difficult to fix the field of view of the lungs due to the effects of respiratory movements and heart beats. In order to overcome these anatomical problems, this study developed and created a new accessory for fixing the lung to the objective lens. The reporter influenza virus (Color-flu) developed in this study infected the bronchial epithelium and alveolar epithelium in mice, and fluorescent proteins were produced in the infected cells. We succeeded in detecting infected cells in the lungs in live mice using Color-flu. Furthermore, we analyzed the interaction and kinetics of immune cells and influenza-infected cells in the lungs by using a reporter mouse that produced fluorescent proteins specifically in neutrophils and macrophages.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ 生体イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) インフルエンザウイルスゲノムは、それぞれ異なる分子量の8本の分節から構成されている。毎シーズン国内だけでもおよそ1千万人が感染すると考えられている季節性インフルエンザウイルスは、医学・公衆衛生上、最も対策が必要な病原体の1つである。季節性ウイルスの他に、通常は鳥類にしか感染しない鳥インフルエンザウイルスがまれにヒトに感染することがある。鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスの中には、ヒトにおいて致死率が約 60%になる高病原性の H5N1 亜型が存在する。2012 年には複数の研究グループによって高病原性 H5N1 ウイルスがヒトからヒトへの感染能を獲得する可能性があることが哺乳動物モデルで示された。従って、高病原性 H5N1 ウイルスは、次のパンデミックウイルスの候補として厳重な監視が求められている。さらに、2013 年から中国東部では、鳥 H7N9 ウイルスのヒト感染例が多発している。致死率は約 38%と季節性インフルエンザと比較して非常に病原性が高い。すでに一部の薬剤耐性も備えていることから、厳重な監視と予防や治療についての早急な対策が必要である。

(2) 2010 年より申請者は、インフルエンザウイルスの病原性メカニズムの解明を目指して、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染症における宿主応答解析に取り組んでいる。宿主応答メカニズムを解明するために、肺組織から感染細胞を同定する方法は、非常に重要な技術である。そこで、申請者は新しい可視化インフルエンザウイルスを作製し、生体内での感染細胞の同定に成功した。これまでに複数のインフルエンザウイルスの可視化モデルが報告されている。特に類似の研究として、Adolfo García-Sastre 博士 (Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA) らによって開発された GFP 発現インフルエンザウイルスがあげられる。彼らは、GFP 発現インフルエンザウイルスを用いてマウスのインフルエンザウイルス感染細胞を同定し解析した (*PNAS*, 2010, *J. Clin. Invest.*, 2012)。ところが、GFP 発現インフルエンザウイルスは、増殖している間に、GFP 発現性を高率で失うため、詳細な感染細胞の解析には適さない。一方で、申請者らの可視化インフルエンザウイルスモデルで用いるウイルス株は、蛍光タンパク質の発現性が安定しており、感染7日目のマウス体内でもほぼ100%のウイルスが蛍光タンパク質の発現能を維持している。

2. 研究の目的

(1) 2光子レーザー顕微鏡システムを用いた生体イメージング技術の開発

申請者らは、蛍光蛋白質を安定的に発現するインフルエンザウイルスの作製に成功した。これまでは生体マウスの肺の中のインフルエンザウイルス感染細胞や炎症細胞の観察困難であったが、このレポーターウイルスを用いれば、蛍光蛋白質の検出によって生きたまま感染細胞を同定する事が出来る。肺は、呼吸運動や心臓の拍動などの影響のため、観察する視野を固定することが難しい。さらに、マウスが生存するためには、胸腔の陰圧を維持する必要がある。2光子レーザー顕微鏡で観察するには、胸郭を展開し肺を露出するため、胸腔の陰圧を維持することは困難である。これらの解剖学的な問題は、顕微鏡デバイス製作企業と連携し、肺のイメージングのための新たな付属器具を開発・作製することで克服する。

(2) 生体イメージングを用いた宿主因子の機能解析

上記研究目標によって開発される生体イメージング技術を応用して、インフルエンザウイルス感染における宿主因子の機能解析を行なう。本研究ではインフルエンザウイルス感染時の宿主応答やウイルス増殖などに関連する遺伝子のノックアウトマウスの作製を行なう。ノックアウト

トマウスにレポーターウイルスを感染させて、生体イメージングをおこない、インフルエンザウイルス感染における遺伝子の機能を解析する。

3. 研究の方法

(1) 2光子レーザー顕微鏡システムを用いた生体イメージング技術の開発：顕微鏡メーカーや付属機器の製作会社と共同で2光子レーザー顕微鏡による生きたマウスの肺を長時間観察するための設備を開発する。マクロファージなど免疫細胞を蛍光標識したマウスにレポーターウイルスを感染させ、ウイルス感染細胞と免疫細胞の動態を解析する。2光子レーザー顕微鏡は平成26年度に東京大学医科学研究所ウイルス感染分野のP3動物実験施設に設置される。本研究では、生きているマウスの肺を長時間観察するために、顕微鏡メーカーや付属機器の製作会社と共同で2光子レーザー顕微鏡に付属する設備を開発する。具体的には、麻酔器や人工呼吸器の他に、観察視野を固定するために、対物レンズと肺の一部を連結する特殊な器具を作製する。これらの付属機器を組み込んだ2光子レーザー顕微鏡システムを用いてレポーターウイルスに感染したマウスの肺のインフルエンザウイルス感染細胞の動態を観察する。さらに、マクロファージもしくは好中球がeGFPを特異的に発現するレポーターマウスを用いて、ウイルス感染細胞とマクロファージや好中球との cell-to-cell interaction を解析する。

(2) 生体イメージングを用いた宿主因子の機能解析：インフルエンザウイルス感染時の宿主応答やウイルス増殖などに関連する遺伝子の機能を個体レベルで解析するために、CRISPR-Cas9システムなどを用いてKOマウスを作製する。KOマウスの作製では、東京大学医科学研究所システム疾患モデル研究センターの支援を受ける。レポーターウイルスをKOマウスに感染させて、本研究で開発する生体イメージング技術を用いて、遺伝子の機能を個体レベルで明らかにする。2光子レーザー顕微鏡システムを用いて、ウイルス感染マウスにおけるウイルス感染細胞とマクロファージなどの免疫細胞との相互作用を解析する。画像解析にはImaris (Zeiss)を用いて、データの三次元構築や免疫細胞の動態についての定量解析を行ない、野生型マウスと比較する。マイクロCTを用いてウイルス感染領域や炎症部位を経時的に測定する。実験動物用マイクロCTは、平成26年度に東京大学医科学研究所ウイルス感染分野のP3動物実験施設に設置される。経時的にマイクロCTで肺を観察し、炎症の広がりを測定し、KOマウスと野生型マウスの比較解析を行なう。

4. 研究成果

(1) 本研究に必要な2光子レーザー顕微鏡実験の整備をするために、以下の実験を行った。野生型マウスにVenusをレポーターにしたインフルエンザウイルスColor-flu(PR8)を感染させた。人工呼吸器による吸入麻酔の下で、生きたマウスにおける肺のインフルエンザウイルス感染細胞を2光子レーザー顕微鏡を用いて観察した。肺は、呼吸運動や心臓の拍動などの影響のため、観察する視野を固定することが難しい。申請者らはこれらの解剖学的な問題を克服するために、顕微鏡デバイス製作企業と連携し、肺を対物レンズに固定するための新たな付属器具の開発・作製した。本研究では、マクロファージや好中球特異的に蛍光を発するレポーターマウスは2光子顕微鏡でマクロファージや好中球を観察するために有用である。マクロファージ特異的にeGFPを発現するレポーターマウス{B6N.Cg-Tg (Csf1r-EGFP)1Hume/J (Macgreen mice), The Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME, USA)}を導入し、2光子顕微鏡でマクロファージの観察に成功した。

(2) レポーターインフルエンザウイルス (Color-flu) を感染させたマウスに好中球特異的な抗体 Ly-6G を経静脈投与して、インフルエンザウイルス感染細胞と好中球の動態を本研究で開発したイメージングシステムを用いて詳細に観察した。その結果、高病原性鳥 H5N1 インフルエンザウイルスに感染したマウスでは、季節性インフルエンザウイルス由来 H1N1 ウイルスである PR8 株に感染したマウスと比較して肺への好中球の遊走が感染早期に見られることが分かった。また、好中球やマクロファージ特異的なレポーターマウスを用いて、それぞれの免疫細胞の動態を観察することに成功した。インフルエンザウイルスに感染した肺では、血管透過性が増加することが知られている。そこで、蛍光標識したデキストランを経静脈的に投与して、2光子顕微鏡でデキストランの肺胞腔への漏出を観察した。その結果、H5N1 ウイルスに感染した肺では顕著な血管透過性の亢進を認めた。本研究で構築したインフルエンザウイルス感染マウスの肺イメージングシステムを用いて、インフルエンザレポーターウイルス (Color-flu) に感染した野生型マウスの肺における組織障害や免疫細胞の動態を定量的に解析した。レポーターウイルスは季節性ウイルス由来の PR8 と高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 の2種類を用いた。病原性の異なる2種類のインフルエンザウイルスを用いることで、組織障害や免疫細胞の動態を比較解析することが出来た。

(3) インフルエンザウイルスの増殖やウイルス感染に対する宿主応答に関連する宿主因子の肺の恒常性やインフルエンザの病態への関与を個体レベルで明らかにするために、ノックアウトマウスを複数作出した。ノックアウトマウスの作出には CRISPR-Cas9 システムを用いた。また全身で遺伝子発現を抑制すると胎生致死の宿主因子の場合、クララ細胞やII型肺胞上皮特異的タモキシフェン誘導性のコンディショナルノックアウトマウスを作出した。これらのノックアウトマウスにインフルエンザウイルスを感染させ、肺の組織障害のレベルをマイクロ CT や病理学的手法を用いて経時的に解析した。KO マウスの中には、インフルエンザウイルス感染に対して肺の組織障害が減弱している系統も認められた。上記 (1~3) の研究は、東京大学医科学研究所の植木紘史氏博士、Wang I-Hsuan 博士らと共同で行なった。

(4) ヒトの場合、インフルエンザウイルスの初期感染部位は上気道が主体で、病態が進行し悪化すると肺炎を引き起こし重症化する。そこで、上気道も含めた気道全体のインフルエンザの病態を解析するために、上気道におけるインフルエンザウイルスイメージングの開発を目指した。マウスの鼻腔内は、繊毛上皮、杯細胞、嗅上皮に覆われている。両側の鼻腔底には粘膜関連リンパ組織の一つである鼻咽頭関連リンパ組織 (nasopharynx-associated lymphoid tissue: NALT) が存在し、その粘膜面には抗原取り込み細胞 (M 細胞) が多くみられる。また、M 細胞は NALT 以外の鼻腔上皮にも存在する。これらの上気道上皮を生体マウスを用いてイメージング解析するために技術的な検討を行なった。鼻腔組織は骨組織で構成されている呼吸器官であるため、解剖学的に生体イメージングを行う事は容易ではなく、顕微鏡システム、心肺機能維持システム等の更なる術開発が必要である事が分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ueki H, Wang IH, Fukuyama S, Katsura H, da Silva Lopes TJ, Neumann G, Kawaoka Y	4. 巻 115
2. 論文標題 In vivo imaging of the pathophysiological changes and neutrophil dynamics in influenza virus-infected mouse lungs.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 E6622, E6629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1806265115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 植木紘史, Jessica I-Hsuan Wang, 福山聡, 河岡義裕
2. 発表標題 2光子励起顕微鏡を用いたインフルエンザウイルス感染マウスにおける肺の生体イメージングの試み
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wang I-H, Ueki H, Fukuyama S, and Kawaoka Y.
2. 発表標題 Quantitative in vivo two-photon microscopy reveals the dynamics of the immune responses to influenza virus infection in the lung.
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ueki H, Fukuyama S, and Kawaoka Y.
2. 発表標題 Visualization of immune responses to influenza virus in mouse lung by using two-photon microscopy.
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福山聡, 植木紘史, 仲尾朋美, 三竹博道, Dongming Zhao, 桂廣亮, 今井正樹, 野田岳志, 河岡義裕.
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染マウスの生体イメージング研究
3. 学会等名 第 32 回中国四国ウイルス研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福山聡
2. 発表標題 体の中のインフルエンザを見る
3. 学会等名 免疫ふしぎ未来2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福山聡
2. 発表標題 インフルエンザ生体イメージングの試み
3. 学会等名 AETワークショップ2017 先端医療技術オープンイノベーション (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fukuyama S, Ueki H, Nakao T, Mitake H, Zhao D, Katsura H, Ando T, Imai M, Noda T, Kawaoka Y.
2. 発表標題 Development of in vivo imaging systems for the study of influenza A virus infection
3. 学会等名 第64回日本ウイルス学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ueki H, Fukuyama S, Kawaoka Y
2. 発表標題 Visualizing immune responses to influenza virus in mouse lung by using two-photon microscopy
3. 学会等名 第45回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ueki H, Zhao D, Wang J. IH, Fukuyama S, Kawaoka Y
2. 発表標題 Visualizing immune responses to influenza virus in mouse lung by using two-photon microscopy
3. 学会等名 6th NIF (Network of Immunology Frontier) Winter School on Advanced Immunology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 植木紘史, 福山聡, 河岡義裕.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 インフルエンザ感染症：病態解明の最前線. 呼吸器内科	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 吸引型保定器具及び体内組織の観察方法	発明者 植木紘史、福山聡、 河岡義裕、平野義行	権利者 東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-032409	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	植木 紘史 (Ueki Hiroshi)		2 光子レーザー顕微鏡実験など
研究協力者	ワン イーシュエン (Wang I-Hsuan)		2 光子レーザー顕微鏡データ解析など