

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14580

研究課題名(和文) 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肺における免疫動態の研究

研究課題名(英文) in vivo imaging of immune responses to influenza virus in mouse lung by using two-photon excitation microscopy

研究代表者

植木 紘史(Ueki, Hiroshi)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：70794907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスの病原性には、宿主免疫応答によって惹起される肺の炎症が関与すると考えられているが、その詳細については十分に明らかになっていない。本研究では、肺の呼吸運動を抑える吸引保定装置を独自に開発することで、2光子励起顕微鏡下で生きた細胞の動きや形態変化を高解像度で観察できるウイルス感染肺の生体イメージング法を確立した。さらに、生体イメージング解析に適した蛍光レポーターマウスならびに蛍光標識抗体のスクリーニングを完了させ生体肺の多重蛍光標識イメージングの方法論を確立させた。本イメージング法を用いて、インフルエンザウイルスに感染した肺における免疫系の細胞動態について新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸のために拡張と収縮を繰り返す肺は、視野の固定が難しくこれまでいくつかの方法論が試されてきたが生体イメージングには不向きと考えられており、インフルエンザに代表される重度の炎症を伴う肺を顕微鏡下で観測することは困難であった。本研究において、2光子励起顕微鏡を用いた感染肺の生体イメージング法を確立し、インフルエンザウイルスに対する免疫細胞応答を解析することが可能となった。インフルエンザの病原性発現メカニズムの解明に役立ち、ワクチンや新規抗ウイルス薬の動物実験における評価にも応用できることから、ウイルス学や免疫学などの基礎的な研究からワクチンや薬剤開発に至るまで、幅広く利用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The in vivo pathophysiology and dynamics of immune cells in influenza virus-infected lungs are not fully understood. Here, we established an in vivo imaging system that employs two-photon excitation microscopy and fluorescent influenza viruses of different pathogenicity. This approach allowed us to monitor and correlate several parameters and pathophysiological changes including the spread of infection, pulmonary permeability, speed of pulmonary perfusion, the number of pulmonary vascular neutrophils, and neutrophil motion in the lungs of live mice. Several pathophysiological changes were larger and occurred earlier in mice infected with a highly pathogenic H5N1 influenza virus compared with those in mice infected with a PR8 strain. These findings demonstrate the potential of our in vivo imaging system to provide novel information about the pathophysiological consequences of virus infection and the immune response to influenza virus.

研究分野：インフルエンザ

キーワード：インフルエンザ 生体イメージング 2光子励起顕微鏡 免疫

## 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは世界各地で毎年のように流行を繰り返す呼吸器感染症である。インフルエンザウイルスは大きく4種類(A, B, C, D)の型に分類され、A型はウイルス粒子の表面に発現するタンパク質である Hemagglutinin (HA) と Neuraminidase (NA) の抗原性によって亜型に細分化される。季節性インフルエンザはA型ウイルスの H1N1 亜型および H3N2 亜型、並びに B 型ウイルスによって引き起こされ、急性の発熱症状を主徴とするが多くの場合で自然に治癒する。一方で、H5 ならびに H7N9 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスは通常は鳥類にしか感染しないが稀にヒトに感染し、その致死率は 40~50%と高率であることが知られている。インフルエンザウイルスが異なる病原性を示す理由として宿主免疫応答によって誘導される肺の炎症が関与していると考えられるが不明な点が多く残されている。インフルエンザウイルスに対する宿主応答メカニズムを解明するためには、感染した肺を実際に観察し病態生理学的な情報を得ることが重要である。

2 光子励起顕微鏡を用いた生体イメージング法は、生細胞へのダメージが少なく組織深部の高解像度での観察が可能のため、生きた動物の体内における細胞の動きを観察する方法として有用であることが知られている。しかしながら、呼吸のために拡張と収縮運動を繰り返す肺は、視野を固定することが難しく生体での観察は困難であると考えられている。また、感染動物を生きたまま実験に用いるということは、感染能を持ったウイルスも扱うということであり、病原ウイルスが外部へと拡散しないように封じ込める専門の設備や施設も必要である。さらに、細胞の挙動を追跡する生体イメージング法では、観察対象である免疫細胞や感染細胞を動物の生体内において蛍光標識する必要がある。世界中で精力的な研究や開発が進められているが、インフルエンザウイルスに代表される感染動物の体内、特に肺を顕微鏡下で観察することは困難とされてきた。

## 2. 研究の目的

2 光子励起顕微鏡を用いた生体イメージングシステムを構築することで、インフルエンザウイルスに感染したマウスの肺における免疫細胞の挙動や血液の流れを解析し、インフルエンザの病原性発現メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

本研究では、肺を吸引保持することで呼吸変動を抑える観察装置を開発し、2光子励起顕微鏡や動物の生命維持に必要な周辺機器を導入することで、インフルエンザウイルスに感染した動物の生体イメージングシステムを構築した(図1)。このイメージングシステムは高病原性鳥インフルエンザウイルスを含む病原性の高い感染動物を取り扱うことのできるバイオセーフティレベル3施設内に設置した。

野生型マウスに、感染細胞で蛍光タンパク質 Venus を発現する蛍光レポーターインフルエンザウイルス (Color-flu) を感染させ感染細胞を可視化した。本研究では、病原性の異なる2株の Color-flu [ 季節性インフルエンザウイルス (PR8 株) と高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1 株) ] を用いることで、ウイルスに感染した肺における病態生理学的な変化と病原性との関連についても比較した。肺の血流と免疫細胞の一種である好中球を可視化するために蛍光 Dextran と抗 Ly-6G 抗体を経静脈的に投与して蛍光標識した。感染マウスは麻酔下で管理し人工呼吸器で補助しながら開胸し、露出させた肺を肺吸引保定器で保持した。保定された感染肺を2光子励起顕微鏡で撮影すると、インフルエンザウイルスに感染した肺を流れる血液や遊走する好中球の姿を捉えることに成功した(図2)。タイムラプス像として撮影した肺の病態生理学的な変化は、画像解析ソフトを用いることで定量化して解析を行った。

## 4. 研究成果

生体イメージング法では観察臓器の循環血流が維持されるため、細胞遊走や血流動態など血流を介した現象を観察することが可能である。蛍光標識デキストランをマウスの血管内に投与すると血流が可視化され、さらにデキストランの分子量を選択することで血管の透過性を評価することができる。血中アルブミン(66k Da)とほぼ同程度の分子量の蛍光標識デキストラン(70k Da)を観察中に投与すると、高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したマウスの肺ではデキストランの肺胞腔への持続的な漏出が観察された(図3)。一方、非感染マウスや季節性インフルエンザウイルスに感染したマウスでは肺毛細血管からの漏出は認められなかった。高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染により血管内皮細胞の損傷や細胞間接着の減弱が生じることで肺毛細血管の透過性が大きく亢進していることが示唆された。続いて、血管内に投与された蛍光ビーズの移動速度から血流速度を算出すると、季節性インフルエンザウイルスならびに高病原性鳥インフルエンザウイルスの両方において肺毛細血管の血流速度が低下することが明らか

となった。血流速度の減少は肺胞内に感染細胞が出現するよりも早期に起こっており、感染初期の宿主応答の一端を見出したものと考えられる。

免疫細胞の一種である好中球は感染初期に炎症部位に遊走し感染防御の最前線を担う。一方で、重度のインフルエンザウイルス感染症では感染肺に多量の好中球の浸潤が認められ、肺の組織傷害にも関与すると考えられている。そこで、感染肺における好中球の挙動を生体イメージング法で捉え、病原性の異なる2種類のインフルエンザウイルス株を用いて好中球の運動性について比較解析を試みた。まず、非感染マウスにおいて好中球の挙動を観測すると、低速(50  $\mu\text{m}/\text{s}$ )と高速(>50  $\mu\text{m}/\text{s}$ )の2種類の運動様式が存在することがわかった。好中球は、大半の時間20  $\mu\text{m}/\text{s}$ 以下の低速運動(平均移動速度4.86  $\mu\text{m}/\text{s}$ )を、時折50  $\mu\text{m}/\text{s}$ 以上の高速の運動(平均移動速度86.37  $\mu\text{m}/\text{s}$ )をおこなった(図4)。続いて、インフルエンザウイルスに感染したマウスにおいては、好中球の低速移動を示した時間が増加することで、好中球の平均移動速度が低下することが明らかとなった。感染微小環境における好中球の運動性の変化は、細胞膜表面に発現するインテグリンやセレクチンといった接着因子の発現変化に起因すると考えられる。さらに、インフルエンザウイルスに感染した肺に遊走してくる好中球を計測すると、高病原性鳥インフルエンザならびに季節性インフルエンザウイルスのどちらにおいても、血中の好中球の数が感染初期に一過性に増加することが明らかとなった。病原性の異なる2種類のウイルス株の病原性を比較解析した結果、高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染した肺では季節性インフルエンザウイルスに比べて好中球の運動性の変化が早期に起こり、また、好中球の遊走するタイミングも早くその数も有意に多いことから、高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したマウスの肺では早期に強い宿主応答が誘導されていることが明らかとなった。

本研究では2光子励起顕微鏡を用いて生体イメージングする手法を確立したことで、インフルエンザウイルスに対する宿主応答や免疫反応を細胞レベルで解析することが可能となった。インフルエンザの病原性発現メカニズムの解明に役立ち、ワクチンや新規抗ウイルス薬の実験動物における評価にも応用できることから、ウイルス学や免疫学などの基礎的な研究からワクチンや薬剤開発に至るまで、幅広く利用されることが期待される。

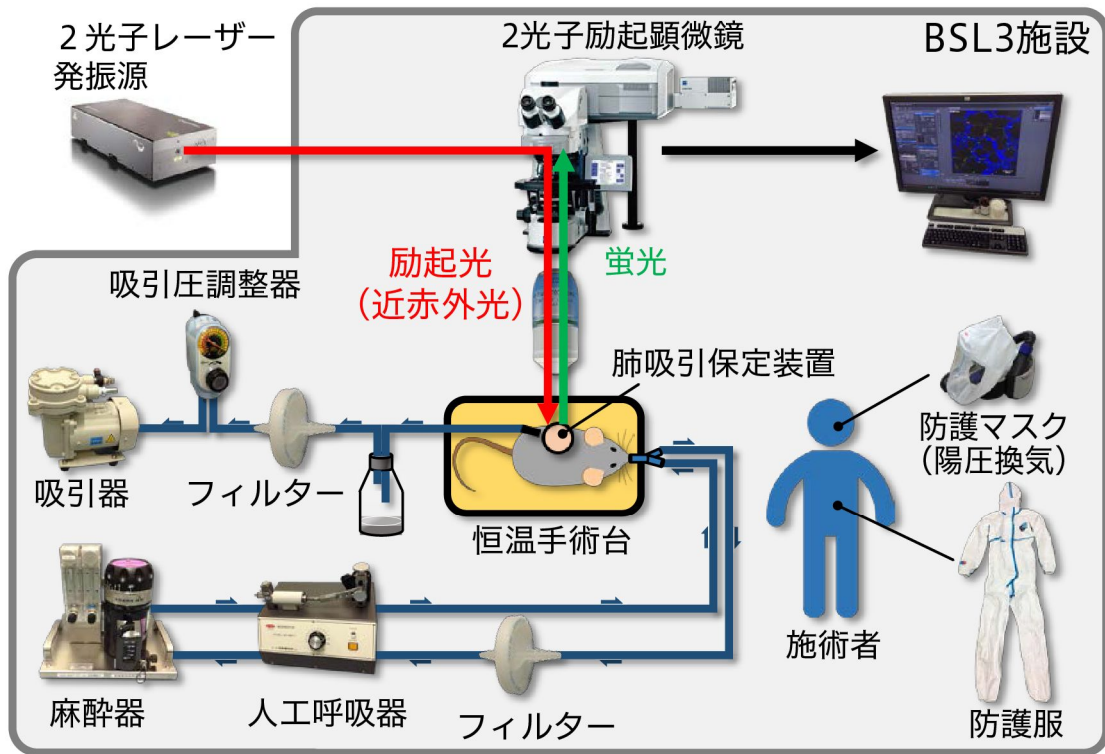


図1 生体イメージングシステムの模式図

P3 施設内に設置した生体イメージングシステム。肺の観察装置を開発し、2光子励起顕微鏡や動物の生命維持に必要な周辺機器を揃えることで、感染マウスの肺を観察することが可能となった。

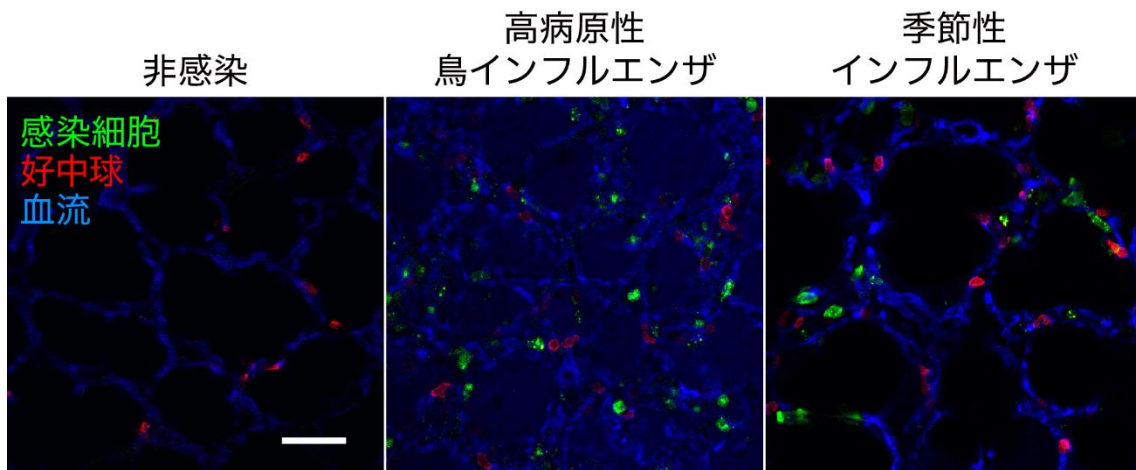


図2 インフルエンザウイルスに感染した肺の生体イメージング

インフルエンザウイルスに感染したマウスの肺を2光子励起顕微鏡で観察した様子。感染細胞（緑）と好中球（赤）の動態や血流（青）が観察できる。

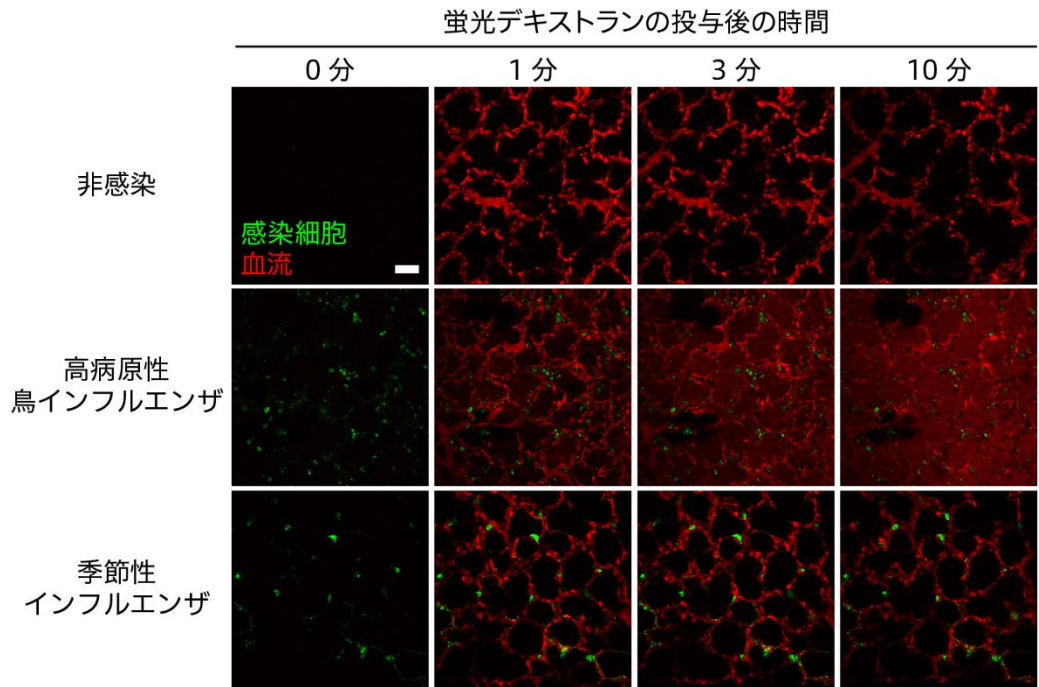


図3 インフルエンザウイルスに感染した肺における血管透過性  
 蛍光 Dextran を撮影中に投与し血管透過性を評価した。高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したマウスの肺では、蛍光 Dextran (赤) が時間の経過とともに血管から肺胞腔へと漏出する様子が認められる。

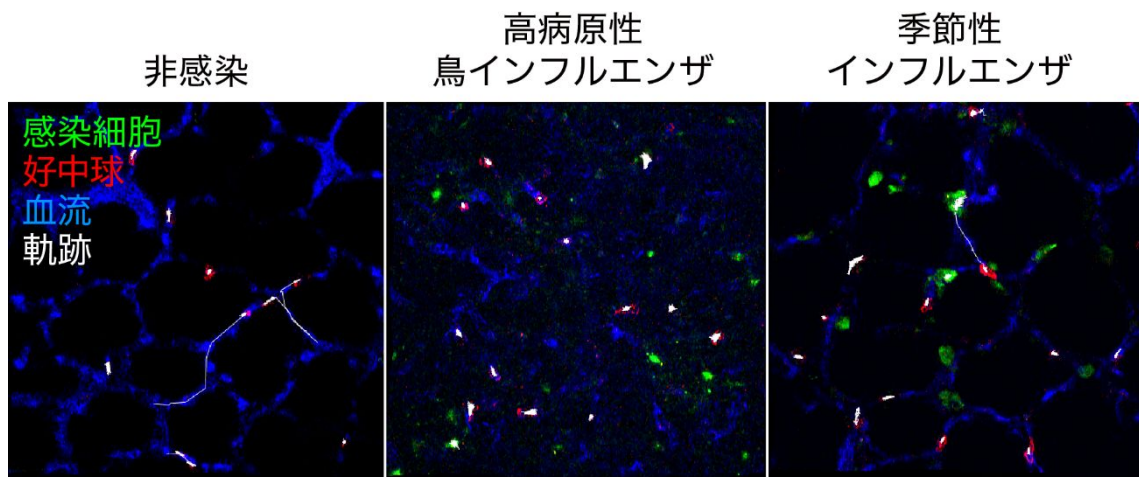


図4 インフルエンザウイルスに感染した肺における好中球の挙動  
 インフルエンザウイルスに感染したマウスでは、非感染個体と比べて好中球(赤)の軌跡(白線)が短いことから、好中球の運動性が低下していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ueki Hiroshi, Wang I-Hsuan, Zhao Dongming, Gunzer Matthias, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Multicolor two-photon imaging of in vivo cellular pathophysiology upon influenza virus infection using the two-photon IMPRESS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 1041～1065
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41596-019-0275-y	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 該当する

1. 著者名 Ueki H, Wang I-Hsuan, Fukuyama S, Katsura H, Lopes T, 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 Proc Natl Acad Sci USA	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 4件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hiroshi Ueki, I-Hsuan Wang, Satoshi Fukuyama, Hiroaki Katsura, Tiago Jose da Silva Lopes, Gabriele Neumann, and Yoshihiro Kawaoka
2. 発表標題 In vivo imaging of the pathophysiological changes and dynamics of immune cells in influenza virus-infected mouse lung
3. 学会等名 Focus on Microscopy 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植木紘史, 河岡義裕
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染個体における生体イメージング
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植木紘史, 河岡義裕
2. 発表標題 生体2光子イメージングでみるインフルエンザウイルス感染肺
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会, 獣医学会奨励賞受賞講演(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Ueki, I-Hsuan Wang, Satoshi Fukuyama, Hiroaki Katsura, Tiago Jose da Silva Lopes, Gabriele Neumann, and Yoshihiro Kawaoka
2. 発表標題 Two-photon imaging of the in vivo dynamics of immune cells and cellular pathophysiology in influenza virus-infected lung
3. 学会等名 17th International Congress of Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Ueki and Yoshihiro Kawaoka
2. 発表標題 Two-photon imaging of the in vivo dynamics of neutrophils in influenza virus-infected lung
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植木紘史, 河岡義裕
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染肺における免疫細胞応答の生体イメージング解析
3. 学会等名 9th Negative Strand Virus-Japan Symposium
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 H. Ueki, IH. Wang, S. Fukuyama, H. Katsura, T. Lopes, M. Gunzer, G. Neumann, and Y. Kawaoka
2. 発表標題 In vivo imaging captures the pathophysiological changes and dynamics of immune cells in influenza virus-infected mouse lung.
3. 学会等名 The 2018 Negative Strand RNA Virus (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植木 紘史, I-Hsuan Wang, 福山 聡, 桂 廣亮, Lopes TJS, Gabriele Neumann, 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肺における肺の生体イメージング.
3. 学会等名 第27回日本バイオイメージング学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植木紘史, J. IH. Wang, 福山聡, 桂廣亮, Lopes TJS, Gabriele Neumann, 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161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植木紘史, J. IH. Wang, 福山聡, 桂廣亮, Lopes TJS, Gabriele Neumann, 河岡義裕
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染肺の生体イメージング
3. 学会等名 第46回日本臨床免疫学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 植木紘史, I-Hsuan Wang, 福山聡, 桂廣亮, Lopes TJS, Gabriele Neumann, 河岡義裕
2. 発表標題 2光子励起顕微鏡法を用いたインフルエンザウイルス感染肺の病態生理学的変化の観察
3. 学会等名 第26回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Ueki, Satoshi Fukuyama, Gabriele Neumann, and Yoshihiro Kawaoka
2. 発表標題 In vivo imaging of the pathophysiological changes and dynamics of immune cells in influenza virus-infected mouse lung
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植木紘史
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染肺の生体イメージング
3. 学会等名 東京大学医科学研究所学友会セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植木紘史, I-Hsuan Wang, 福山聡, 桂廣亮, Lopes TJS, Gabriele Neumann, 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肺の生体イメージング
3. 学会等名 8th Negative Strand Virus-Japan Symposium
4. 発表年 2019年

## 〔図書〕 計3件

1. 著者名 植木紘史, 河岡義裕	4. 発行年 2019年
2. 出版社 鳥居薬品株式会社	5. 総ページ数 10
3. 書名 感染 炎症 免疫	

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 呼吸器内科	

1. 著者名 植木紘史, 河岡義裕	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本生物物理学会	5. 総ページ数 5
3. 書名 生物物理	

## 〔産業財産権〕

## 〔その他〕

<p>インフルエンザウイルスに感染した動物の体内を生きのまま観測  <a href="https://www.amed.go.jp/news/release_20180626.html">https://www.amed.go.jp/news/release_20180626.html</a>          東大, インフルエンザ感染肺の生体イメージングに成功  <a href="http://www.optronics-media.com/news/20180627/51795/">http://www.optronics-media.com/news/20180627/51795/</a>          Journey into an Influenza Infected Lung  <a href="https://www.technologynetworks.com/immunology/news/journey-into-an-influenza-infected-lung-305381">https://www.technologynetworks.com/immunology/news/journey-into-an-influenza-infected-lung-305381</a>          FluVision offers glimpse...  <a href="http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2018/06/news-scan-jun-26-2018">http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2018/06/news-scan-jun-26-2018</a>          Experts witness action of influenza infection...  <a href="https://www.news-medical.net/news/20180626/Experts-witness-action-of-influenza-infection-in-the-lungs-of-living-mice.aspx">https://www.news-medical.net/news/20180626/Experts-witness-action-of-influenza-infection-in-the-lungs-of-living-mice.aspx</a></p>
---

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
---------	---------