

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21666

研究課題名（和文）ウイルス感染モデルを用いた嗅覚神経系の免疫機構の解明

研究課題名（英文）Study on immunological mechanisms of the olfactory nervous system using viral infection models

研究代表者

永田 典代（Nagata, Noriyo）

国立感染症研究所・感染病理部・室長

研究者番号：30270648

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：呼吸器感染症ウイルスの嗅覚神経系や中枢神経系における感染病変と宿主応答について病理学的に明らかにすることを目的とした。具体的には、コクサッキーウイルスB2とSARS-CoV-2感染動物の上気道、嗅覚神経系や中枢神経系におけるウイルス感染動態や免疫応答について病理学的に比較解析した。まず、マウス上気道において二つのウイルスのレセプター分子の局在は、免疫組織化学的に大きく異なることが明らかとなった。これに相関して二つのウイルス感染局在と動態は相違した。嗅球組織内に侵入したコクサッキーウイルスB2は、組織学的には主にミクログリアとアストログリアによってその拡大が阻止されていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトに上気道炎を引き起こすウイルスの中にはコクサッキーウイルス、エコーウイルス、あるいはH5N1インフルエンザなど神経向性を潜在的に持つウイルスが多く存在し、その機構の解明は重要な課題であった。また、COVID-19の急性期のみならず罹患後の後遺症として嗅覚異常を訴える者は多いとされている。それぞれのウイルスの嗅覚組織におけるウイルス感染動態と免疫応答を明らかにすることで治療法・予防法の開発に貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the pathological lesions and host responses in the olfactory and central nervous systems after infection with respiratory viruses. We performed pathological comparative analysis of viral infection dynamics and immune responses in the upper respiratory tract, olfactory nervous system, and central nervous system of mice experimentally infected with coxsackievirus B2 and SARS-CoV-2. The immunohistochemical analysis revealed that each receptor molecule of the viruses in the murine upper respiratory tract was detected to be very different. Correspondingly, the localization and viral kinetics were different between two viruses. Coxsackievirus B2 invaded the murine olfactory bulb tissue, and histopathological examination clarified that viral spread was mainly prevented by microglia and astroglia cells.

研究分野：感染症の病理学

キーワード：コクサッキーウイルス SARS-CoV-2 嗅覚神経系 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、小児に重篤な疾患を引き起こすエンテロウイルスの病原性について研究をおこなってきた。2013年に西日本でのコクサッキーウイルス B2 (CVB2) 重症例の報告が増加したため、国内の流行株の病原性を明らかにする目的で、感受性動物であるマウスを用いて病原性評価を行った。新生仔マウスに対して特に強い神経親和性を有した患者由来株を選択し、7週齢の雌 BALB/c に経鼻接種 (自然感染モデル) したところ、感染1週間程度ですべてのマウスは攻撃性が高まり、お互いの尾を咬むなどの行動異常が見られるようになったが、病理組織学解析によって、これらの動物はウイルス感染に伴う嗅球炎を発症していたことが判明した。また、感染早期には鼻腔内の嗅細胞、嗅球内の房飾細胞 (tufted cell) と僧帽細胞 (mitral cell) にウイルス抗原陽性細胞が認められた (図1参照)。しかしながら病変は、嗅球に限局しており、マウス脳実質への拡大は認められなかった。

一方、2019年末に発生し急激に世界中に拡大した新型肺炎 COVID-19 感染症では、不顕性感染から重症肺炎、致死と多様な臨床症状を示した。軽症にもかかわらず、嗅覚・味覚障害を発症する症例も多く報告された。申請者らは、COVID-19 疾患モデルの確立のため、COVID-19 の原因ウイルスである SARS-CoV-2 をマウスに経鼻接種したところ、急性期の鼻腔洗浄液においてウイルス増殖を確認できた。

そこで本研究では、CVB2 および SARS-CoV-2 感染動物の組織像を比較し、それぞれのウイルス感染後の嗅覚神経系や中枢神経系における病変と宿主応答について病理学的に明らかにすることとした。

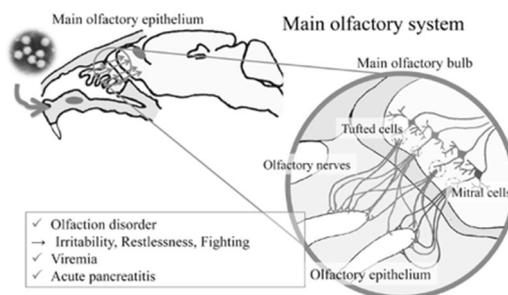


図1 成マウスを用いた上気道感染モデルと嗅覚神経系

2. 研究の目的

本研究では、経気道感染症ウイルス感染後の嗅覚神経系や中枢神経系における病変と宿主応答について病理学的に明らかにすることを目的とした。具体的には、CVB2 および SARS-CoV-2 感染動物の上気道、嗅覚神経系や中枢神経系におけるウイルス感染動態や免疫応答について比較解析した。

3. 研究の方法

本研究では、*in vivo* で、CVB2 および SARS-CoV-2 の嗅覚神経系における侵入の有無やその阻止に関する宿主因子と免疫応答を組織学的に明らかにした。

- (1) マウスの上気道における各ウイルスのレセプタータンパク発現の局在を免疫組織化学法によって明らかにした。
- (2) 各ウイルスの上気道感染マウスモデルの上気道および嗅覚神経系におけるウイルスの経時的な動態を免疫組織学的に調べた。また、嗅覚神経系における感染に対する宿主応答について検索した。
- (3) 上記の結果からそれぞれのウイルスの上気道感染と嗅覚神経系における感染・免疫応答についての相違点を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ウイルスレセプターの発現

まず、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を用いて、マウスの上気道における各ウイルスのレセプタータンパク発現の局在を免疫組織化学法にて明らかにした。CVB2 の主要なレセプターである Cocksackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) はマウスの嗅粘膜上皮と軸索 (図2中の asterisk) に強く発現しており、嗅上皮から連続する軸索は固有層を通過し、嗅球組織内まで到達していた。

一方、SARS-CoV-2 の主要なレセプターの *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2) は呼吸部粘膜上皮の表層に強く発現が認められ、嗅粘膜においては非常に弱い発現であった (データは示さない)。よって、二つのウイルスのレセプター分子の局

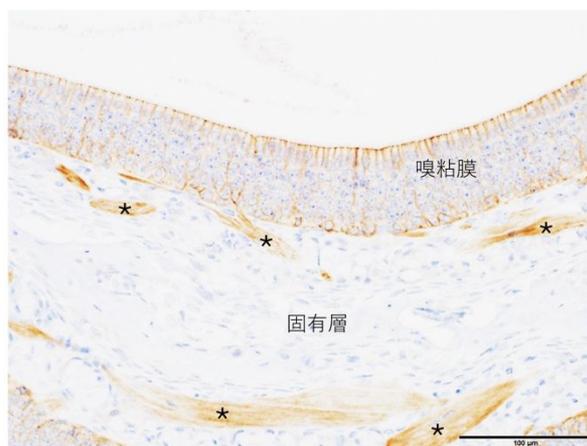


図2 マウス嗅上皮における Cocksackievirus and Adenovirus Receptor (CAR, 茶色) の発現。*, 嗅細胞軸索。免疫組織化学法。

在は、マウス上気道において大きく異なることが明らかとなった。

(2) ウイルス感染動態

CVB2 を経鼻接種したマウスでは、接種3日目に嗅粘膜上皮の壊死、脱落がみとめられ基底層側に残存する変性上皮にウイルス抗原がわずかに観察された(図3)。また、嗅球内の房飾細胞と僧帽細胞は変性・壊死、脱落しており、ウイルス抗原陽性細胞がわずかに認められた。また、嗅覚神経に発現しているOlfactory marker proteinをマーカーとして免疫組織化学法を実施したところ、嗅球内の細胞体の断片化が観察された(データは示さない)。さらに、ミクログリアマーカーである抗 Iba-1 抗体、アストログリアマーカーの抗 GFAP 抗体、あるいは T リンパ球マーカーの抗 CD3 抗体を用いて嗅神経系におけるそれぞれの細胞の活性化や浸潤について検討した。その結果、接種3日目の感染部位においてミクログリアの活性化が認められ、接種6日目にはアストログリアの活性化が加わった(図4)。接種6日目の髄膜下の血管内に CD3 陽性リンパ球の増加が認められたが、嗅神経系などの実質組織に CD3 陽性リンパ球の浸潤は認められなかった。接種14日目には活性化を示唆するミクログリアはほぼみられず、活性化アストログリアが残存した。なお、嗅覚神経系におけるミクログリアとアストログリアの活性化は構造的に連続している大脳皮質への波及はほぼ認められなかった。ただし、4匹に1匹程度の割合で、小脳水道近傍の実質にグリア細胞の活性化が認められ、一部の個体で脳幹側への感染の波及が示唆された。

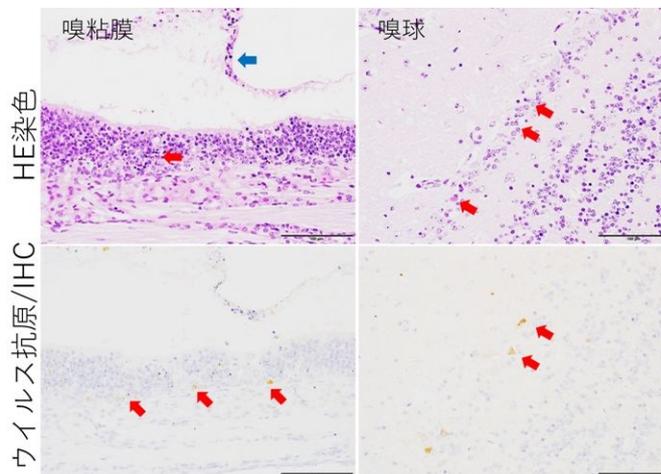


図3 接種3日目の嗅粘膜(左)と嗅球組織(右)のコクサッキーウイルスB2の感染像。嗅粘膜上皮の剥離(青矢印)、変性(赤矢印)がみられる。嗅球では神経細胞の変性(赤矢印)が認められる。病変に一致してウイルス抗原が検出された。

位においてミクログリアの活性化が認められ、接種6日目にはアストログリアの活性化が加わった(図4)。接種6日目の髄膜下の血管内に CD3 陽性リンパ球の増加が認められたが、嗅神経系などの実質組織に CD3 陽性リンパ球の浸潤は認められなかった。接種14日目には活性化を示唆するミクログリアはほぼみられず、活性化アストログリアが残存した。なお、嗅覚神経系におけるミクログリアとアストログリアの活性化は構造的に連続している大脳皮質への波及はほぼ認められなかった。ただし、4匹に1匹程度の割合で、小脳水道近傍の実質にグリア細胞の活性化が認められ、一部の個体で脳幹側への感染の波及が示唆された。

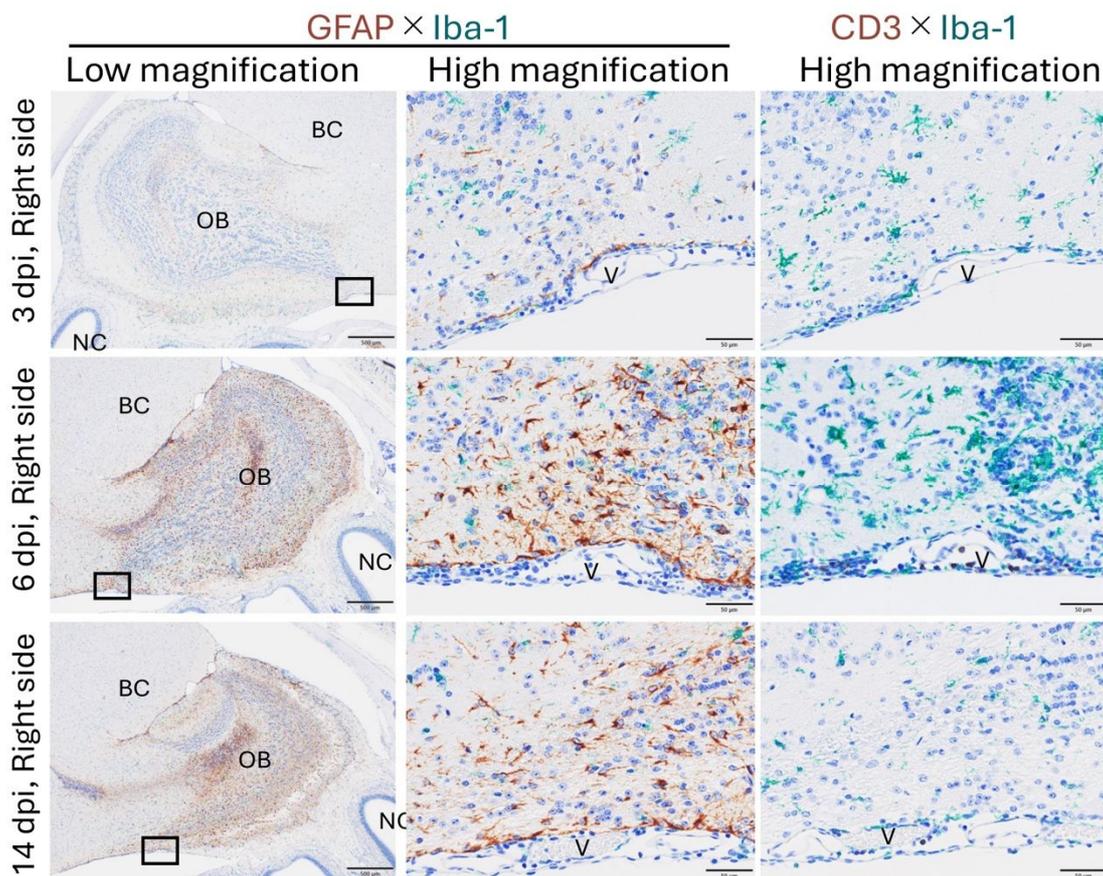


図4 CVB2経鼻接種後の嗅神経系におけるGFAP+アストログリア(茶)とIba-1+ミクログリア(緑色)の浸潤と活性化(左、中央)。右 連続切片のCD3+(茶)とIba-1+ミクログリア(緑色)。NC, 鼻腔; OB, 嗅球; BC, 大脳皮質; V, 血管。二重免疫組織化学法

SARS-CoV-2 マウス継代株あるいはマウスに感染性を示すオミクロン株を経鼻接種したマウスにおいては鼻腔の呼吸部の粘膜上皮と嗅部の嗅上皮での感染・増殖が観察されたものの、接種 7 日以内にウイルス抗原は排除され、明らかな嗅球組織への侵入は確認されていない。なお、SARS-CoV-2 では変異株間においてマウス上気道、下気道での感染・増殖性に若干の違いが認められているものの、現在までに明らかな中枢神経系へのウイルスの侵入は観察されていない(データは示さない)。

(3) まとめと考察

マウスモデルにおいて、二つのウイルスのレセプター発現の違いやウイルス感染局在の相違が明らかとなった。このことから、CVB 感染患者と COVID-19 患者における嗅覚障害は異なる機序によるものと推察された。CVB2 はマウスの嗅球組織内の神経細胞に親和性があるが、組織学的には主にミクログリアとアストログリアの活性化によってその拡大が阻止されていることが示唆された。実質において、リンパ球の直接的な関与を示唆する所見は認められなかった。抗ウイルスに関わる分子の発現については引きつづき検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

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 1 - 21
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 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 -

1. 著者名 永田 典代	4. 巻 27
2. 論文標題 エンテロウイルスによる多様な神経感染症：動物モデルから得られた知見	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 神経感染症	6. 最初と最後の頁 90 - 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34397/jsnd.27.1_90	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Iwata-Yoshikawa Naoko, Kakizaki Masatoshi, Shiwa-Sudo Nozomi, Okura Takashi, Tahara Maino, Fukushi Shuetsu, Maeda Ken, Kawase Miyuki, Asanuma Hideki, Tomita Yuriko, Takayama Ikuyo, Matsuyama Shutoku, Shirato Kazuya, Suzuki Tadaki, Nagata Noriyo, Takeda Makoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Essential role of TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infection in murine airways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-33911-8	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 -

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 Research	6. 最初と最後の頁 105297 ~ 105297
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishii H, Nomura T, Yamamoto H, Nishizawa M, Thu Hau Trang Thi, Harada S, Seki S, Nakamura-Hoshi M, Okazaki M, Daigen S, Kawana-T, Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Shiwa N, Suzuki T, Park Eun-Sil, Maeda K, Onodera T, Takahashi Y, Kusano K, Shimazaki R, Suzaki Y, Ami Y, Matano T	4. 巻 3
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 Reports Medicine	6. 最初と最後の頁 100520 ~ 100520
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwata-Yoshikawa Naoko, Shiwa Nozomi, Sekizuka Tsuyoshi, Sano Kaori, Ainai Akira, Hemmi Takuya, Kataoka Michiyo, Kuroda Makoto, Hasegawa Hideki, Suzuki Tadaki, Nagata Noriyo	4. 巻 8
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 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abh3827	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 -

1. 著者名 Onodera T, Kita S, Adachi Y, Moriyama S, Sato A, Nomura T, Sakakibara S, Inoue T, Tadokoro T, Anraku Y, Yumoto K, Tian C, Fukuhara H, Sasaki M, Orba Y, Shiwa N, Iwata N, Nagata N, Suzuki T, others, and Takahashi Y	4. 巻 54
2. 論文標題 A SARS-CoV-2 antibody broadly neutralizes SARS-related coronaviruses and variants by coordinated recognition of a virus-vulnerable site	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 2385 ~ 2398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2021.08.025	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 -

1. 著者名 Nomura T, Yamamoto H, Nishizawa M, Hau Trang Thi Thu, Harada S, Ishii H, Seki S, Nakamura-Hoshi M, Okazaki M, Daigen S, Kawana-Tachikawa A, Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Shiwa N, Iida S, Katano H, Suzuki T, Park Eun-Sil, Maeda K, Suzaki Y, Ami Y, Matano T	4. 巻 17
2. 論文標題 Subacute SARS-CoV-2 replication can be controlled in the absence of CD8+T cells in?cynomolgus?macaques	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 1 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1009668	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永田典代
2. 発表標題 エンテロウイルスによる多様な神経感染症：動物モデルから得られた知見
3. 学会等名 第25回日本神経感染症学会総会・学術大会 基礎委員会セッション「神経感染症の基礎」（招待講演）
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
---------	---------