

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14984

研究課題名（和文）ハムスターを用いたSARS-CoV-2感染肺の2光子生体イメージング解析

研究課題名（英文）In vivo imaging of the cellular pathophysiology in SARS-CoV-2-infected lung

研究代表者

植木 紘史（Ueki, Hiroshi）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・国際ウイルス感染症研究センター 上級研究員

研究者番号：70794907

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）感染症（COVID-19）の重症化メカニズムを明らかにすることを目的として、本研究ではまずC57BL6J系統で効率よく増殖するマウス馴化SARS-CoV-2を樹立した。続いてMA-SARS-CoV-2に高い感受性と致死性を示す基礎疾患を持つマウスモデルをスクリーニングし、重症COVID-19症例に類似した病理組織像を示すマウス系統を見出した。MA-SARS-CoV-2に感染したマウスの肺を生体イメージング法で解析することにより、SARS-CoV-2肺炎に伴う肺血流障害がCOVID-19重症化に関与している可能性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてSARS-CoV-2感染・重症化致死マウスモデルを用いてSARS-CoV-2肺炎の病態悪化に關するメカニズムの一端を明らかにしたことで、COVID-19の重症化メカニズムの解明、並びにCOVID-19の病態に応じた適切な治療法の確立や適切な治療薬の選択につながる事が期待される。また、生体イメージング法とSARS-CoV-2感染・重症化致死モデル動物を用いた一連の解析システムは、組織切片を用いた解析では得ることのできない新規の病理学的知見を得ることが可能であるため新規薬剤の薬効評価へ利用できる。

研究成果の概要（英文）：Microthrombus formation is associated with COVID-19 severity; however, the detailed mechanism remains unclear. In this study, we investigated mouse models with severe pneumonia caused by SARS-CoV-2 infection by using our in vivo two-photon imaging system. In the lungs of SARS-CoV-2-infected mice, increased expression of adhesion molecules in intravascular neutrophils prolonged adhesion time to the vessel wall, resulting in platelet aggregation and impaired lung perfusion. These findings suggest that pulmonary perfusion defects caused by neutrophil adhesion to pulmonary vessels contribute to COVID-19 severity.

研究分野：免疫学、ウイルス学、イメージング

キーワード：COVID-19 SARS-CoV-2 動物モデル 生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

2019 年末に発生した新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染症 (COVID-19) の世界的流行が続いている。COVID-19 症例の多くは、発熱、咳、鼻汁、咽頭熱などの軽い呼吸器症状でおさまるが、高齢者や基礎疾患を有する者などは重度のウイルス性肺炎を併発して重症化し、死に至ることも少なくない。重篤なウイルス性肺炎を呈した患者には呼吸器症状や全身症状に応じた対処療法が行われるが、有効な治療法は確立していない。COVID-19 重症例の肺では大量の免疫細胞の浸潤が認められ、病態の増悪に寄与することが示唆されているが詳細は不明であり、COVID-19 の病態解明は喫緊の課題である。我々はこれまでに、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開発したことで呼吸器系ウイルス感染動物の肺を高解像度で観察し定量化解析が可能な実験系を確立してきた。本イメージングシステムを活用して、感染から重症化に至るまでの感染個体の体内で起きている様々な生理学的事象を可視化して解析することにより、SARS-CoV-2 の感染部位における炎症進展ならびに組織障害のメカニズムの解明に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、SARS-CoV-2 感染肺における免疫細胞の役割について、生体肺イメージングシステムを用いて解析し、COVID-19 肺炎の病態を解明することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では SARS-CoV-2 に高い感受性を示す実験動物用ハムスター (Syrian hamster) あるいはヒトアンジオテンシン変換酵素 2 (hACE2) 発現トランスジェニック (Tg) マウスに蛍光レポーター SARS-CoV-2 を感染させ生体イメージング解析に供した。また、C57BL/6J 系統の呼吸器において効率よく増殖するマウス馴化型蛍光レポーター SARS-CoV-2 (MA-SARS-CoV-2) を樹立した。蛍光レポーター SARS-CoV-2 ならびに MA-SARS-CoV-2 は感染細胞において蛍光タンパク質 Venus を発現するため感染細胞を蛍光標識することが可能である。蛍光 Dextran、蛍光標識抗 Ly-6G 抗体ならびに抗 CD41 抗体を経静脈的に投与して肺の血流と免疫細胞の一種である好中球ならびに血小板を可視化した。感染ハムスターならびに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。感染肺の病態生理学的な変化を蛍光顕微鏡を用いてタイムラプス像として撮影し、画像解析ソフトを用いて定量化解析を行った。

4. 研究成果

蛍光レポーター SARS-CoV-2 に感染した hACE2 Tg マウスの肺を観察すると、Venus 陽性の I 型肺胞上皮細胞と II 型肺胞上皮細胞が観察され、これらの肺胞上皮細胞種が SARS-CoV-2 に感染することが示された (図 1)。一方で、蛍光レポーター SARS-CoV-2 に感染したハムスターの肺では顕微鏡観察視野においては感染細胞ならびに特徴的な病変は観察されなかった。ハムスターでは hACE2 Tg マウスと比べて病態の進行が緩やかであるため、顕微鏡での観察が可能な肺胞領域まで SARS-CoV-2 感染が広がらなかったためと考えられる。以降の病態学的な解析はマウスモ

デルを用いて実施した。蛍光標識 Dextran を hACE2 Tg マウスの血管内に投与すると血流が可視化され、Dextran 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可能である。血中アルブミン (66k Da) とほぼ同程度の分子量の蛍光標識 Dextran (70k Da) を投与すると、蛍光レポーター SARS-CoV-2 に感染した hACE2 Tg マウスの肺では Dextran の肺胞腔への漏出が認められた。その一方で、非感染マウスでは肺毛細血管からの蛍光標識 Dextran の漏出は認められなかった。また、SARS-CoV-2 に感染した hACE2 Tg マウスの肺では、肺毛細血管中の好中球の数が感染経過に従って増加し、その移動速度が低下することが示された (図 2)。さらに、SARS-CoV-2 感染肺において好中球は血小板との複合体からなる微小血栓様の凝集塊を形成することが明らかとなった (図 3)。続いて MA-SARS-CoV-2 に高い感受性と致死性を示す基礎疾患を持つマウスモデルをスクリーニングし、重症 COVID-19 症例に類似した病理組織像を示すマウス系統を見出した。MA-SARS-CoV-2 に感染した基礎疾患モデルマウスの肺を hACE2Tg マウスと同様に生体イメージング法で解析することにより、基礎疾患モデルマウスにおいても SARS-CoV-2 感染に伴う肺血流障害が SARS-CoV-2 肺炎の重症化に関与している知見を得た。

本研究では生体イメージング法を用いて SARS-CoV-2 感染肺における血流や遊走する好中球の挙動を捉えることに成功した。SARS-CoV-2 感染肺では肺胞腔への血液の漏出が起きていることが明らかとなり、SARS-CoV-2 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。さらに、タイムラプス像で撮影した SARS-CoV-2 感染肺では肺毛細血管中の好中球の数が増加し、その移動速度が低下することが明らかとなった。SARS-CoV-2 感染肺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。COVID-19 肺炎における肺毛細血管中の好中球の増加や、血小板との複合体形成による微小血栓が肺塞栓の原因となり病態の増悪に寄与している可能性が明らかとなった。生体イメージング法を用いて感染微小環境を高解像度で観察することで従来の組織学的な解析では見出すことのできなかった SARS-CoV-2 感染における免疫細胞応答の一端が明らかとなった。

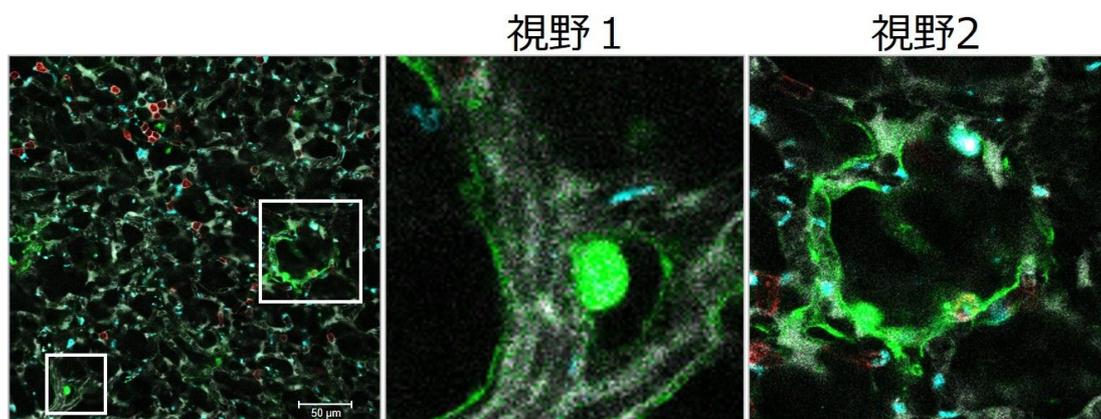


図 1 SARS-CoV-2 感染肺の生体イメージング

ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウスに蛍光レポーター SARS-CoV-2 を感染させ蛍光顕微鏡で肺を撮影した。ウイルスに感染し蛍光蛋白質を発現する感染細胞 (緑) が多数認められた。

非感染

感染6日目

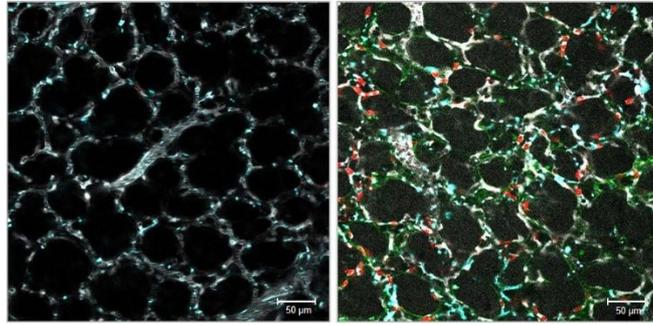


図2 SARS-CoV-2 感染肺における血管透過性ならびに好中球の挙動

ヒトACE2発現トランスジェニックマウスに蛍光レポーターSARS-CoV-2を感染させ蛍光顕微鏡で肺を撮影した。蛍光Dextran、蛍光標識抗Ly-6G抗体ならびに抗CD41抗体を経静脈投与して肺の血流、好中球ならびに血小板を可視化した。感染肺では肺胞腔へ蛍光標識Dextran（灰色）の漏出が認められた。肺血管の中に好中球（赤）と血小板（シアン）が詰まっている様子が観察された。

視野1

視野2

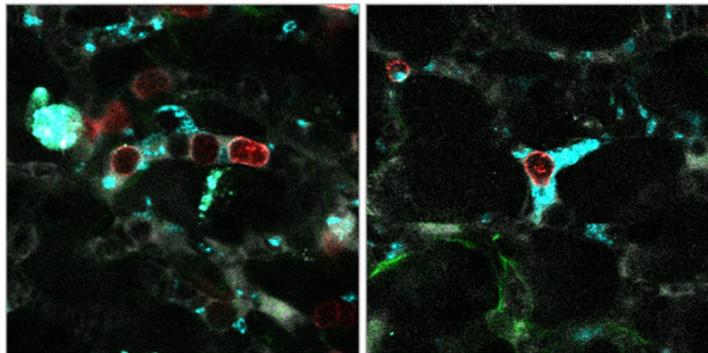


図3 SARS-CoV-2 感染肺における好中球と血小板の複合体

ヒトACE2発現トランスジェニックマウスに蛍光レポーターSARS-CoV-2を感染させ蛍光顕微鏡で肺を撮影した。蛍光Dextran、蛍光標識抗Ly-6G抗体ならびに抗CD41抗体を経静脈投与して肺の血流、好中球ならびに血小板を可視化した。好中球（赤）と血小板（シアン）が凝集している様子が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 0件）

1. 著者名 Uraki Ryuta, Ito Mutsumi, Furusawa Yuri, Yamayoshi Seiya, Iwatsuki-Horimoto Kiyoko, Adachi Eisuke, Saito Makoto, Koga Michiko, Tsutsumi Takeya, Yamamoto Shinya, Otani Amato, Kiso Maki, Sakai-Tagawa Yuko, Ueki Hiroshi, Yotsuyanagi Hiroshi, Imai Masaki, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Humoral immune evasion of the omicron subvariants BQ.1.1 and XBB	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Lancet Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 30 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S1473-3099(22)00816-7	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 Iwatsuki-Horimoto Kiyoko, Ueki Hiroshi, Ito Mutsumi, Nagasawa Sayaka, Hirata Yuichiro, Hashizume Kenichiro, Ushiwata Kazuho, Iwase Hirotarō, Makino Yohsuke, Ushiku Tetsuo, Akitomi Shinji, Imai Masaki, Saitoh Hisako, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 8
2. 論文標題 SARS-CoV-2 Transmission from Virus-Infected Dead Hamsters	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/msphere.00411-22	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 Uraki Ryuta, ..., Ueki Hiroshi, Li Rong, Liu Yanan, Larson Deanna, Fukushi Shuetsu, Watanabe Shinji, Maeda Ken, Pekosz Andrew, Kandeil Ahmed, Webby Richard J., Wang Zhongde, Imai Masaki, Suzuki Tadaki, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 612
2. 論文標題 Characterization of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 and BA.5 isolates in rodents	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 540 ~ 545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-05482-7	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 Takeshita Masaru, ..., Ueki Hiroshi, Iwatsuki-Horimoto Kiyoko, Ito Mutsumi, Yamayoshi Seiya, Kawaoka Yoshihiro, Shirouzu Mikako, Ishii Makoto, Saya Hideyuki, Kondo Yasushi, Kaneko Yuko, Suzuki Katsuya, Fukunaga Koichi, Takeuchi Tsutomu	4. 巻 25
2. 論文標題 Potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies with therapeutic effects in two animal models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105596 ~ 105596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105596	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 Ueki Hiroshi, Ujie Michiko, Komori Yosuke, Kato Tatsuo, Imai Masaki, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Effectiveness of HEPA Filters at Removing Infectious SARS-CoV-2 from the Air	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/msphere.00086-22	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 Uraki Ryuta, ..., Ueki Hiroshi, ..., Kawaoka Yoshihiro, IASO study team	4. 巻 607
2. 論文標題 Characterization and antiviral susceptibility of SARS-CoV-2 Omicron BA.2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 119 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-04856-1	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 Ueki Hiroshi, Kiso Maki, Furusawa Yuri, Iida Shun, Yamayoshi Seiya, Nakajima Noriko, Imai Masaki, Suzuki Tadaki, Kawaoka Yoshihiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Development of a Mouse-Adapted Reporter SARS-CoV-2 as a Tool for Two-Photon In Vivo Imaging	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 537 ~ 537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v16040537	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植木 紘史
2. 発表標題 動物モデルを用いた新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の病態メカニズムの解明
3. 学会等名 2022 NCGM 夏季リトリート
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植木 紘史
2. 発表標題 新型コロナウイルスのエアロゾル感染の制御に資する研究
3. 学会等名 2022 NCGM 夏季リトリート
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植木紘史、Wang I-Hsuan、神谷亘、河岡義裕
2. 発表標題 SARS-CoV-2感染肺の2光子生体肺イメージング解析
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植木 紘史
2. 発表標題 2光子生体イメージングでみるウイルス感染肺
3. 学会等名 第4回B6JAged研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植木 紘史
2. 発表標題 2光子生体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34回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021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における免疫細胞応答の2光子生体イメージング解析
3. 学会等名 第68回 日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 植木 紘史	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 7
3. 書名 医学のあゆみ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>HEPAフィルターによる エアロゾル中の感染性新型コロナウイルスの除去効果 https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/about/press/page_00189.html</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
---------	---------