

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16333

研究課題名（和文）治療戦略創出を目指したSARS-CoV-2経肺感染モデルマウスに関する基盤研究

研究課題名（英文）Fundamental research on SARS-CoV-2 pulmonary infection model mice aiming to create therapeutic strategies

研究代表者

内海 大知（Utsumi, Daichi）

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・プロジェクト研究員

研究者番号：70880871

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）：ヒトアンジオテンシン変換酵素2過剰発現（hACE2）マウスを用いて、経気道感染によりSARS-CoV-2（変異株を含む）に高感受性な動物モデルを確立した。本モデルは、急性肺傷害と経日的な体重減少が引き起こり、最終的に脳炎で死亡する。一方、血中の炎症性細胞の増加は認められたがサイトカインストームの様な全身性炎症応答は見られず、ヒトCOVID-19病態を完全に再現していないことから、医薬品評価系として利用することとした。結果、ワクチンの接種、中和抗体や抗ウイルス薬を治療的に投与することで、体重減少や死亡を防ぐことができた。さらに、医薬品候補品やバイオマーカーの探索評価にも有益であることも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヒトACE2を過剰発現するhACE2マウスを用いることで、SARS-CoV-2に高感受性な動物モデルの確立に成功した。本モデルマウスはヒトCOVID-19の病態を完全に再現できていないためその病態解明は難しい。しかし、医薬品候補の効果評価するための試験系として有用である。実際、ワクチン、既存抗ウイルス薬や中和抗体の投与により、感染後の致死を防ぐことを学会や論文をとして報告した。また、共同研究により医薬品候補の評価やバイオマーカー探索にも貢献した。加えて、コロナウイルスが再流行した際、本知見を基に速やかにモデル作成ができ、候補品の安全性評価や薬理試験の系として利用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Using human angiotensin converting enzyme 2 transgenic (hACE2) mice, I established an animal model highly susceptible to SARS-CoV-2 (including mutant strains) via intratracheally infection. This model causes acute lung injury, weight loss, and ultimately death due to encephalitis. While an increase in inflammatory cells was observed in PBMC, no systemic inflammatory response such as cytokine storm was elicited, and it was not a complete evaluation system that perfectly mimicked human COVID-19 pathology, so it was utilized as an evaluation system for pharmaceuticals. Indeed, by immunizing with SARS-CoV-2 antigens and therapeutically administering neutralizing antibodies or antiviral drugs, these were able to prevent weight loss and death after infection. Furthermore, we found that it was also useful for exploring and evaluating pharmaceutical candidates and biomarkers.

研究分野：Pharmacology

キーワード：SARS-CoV-2 variant of concern hACE2 Tg mouse

1. 研究開始当初の背景

2019年12月に中国湖で新規コロナウイルス関連肺炎症例が報告された。本疾患の病原体は、SARS コロナウイルス (SARS-CoV) と密接な関係があり、ゲノム解析により新規コロナウイルス重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) と同定された。その後、新型コロナウイルス感染症 2019 と命名された本疾患は、世界中へと急速に拡大し、世界保健機関よりパンデミックと宣言された。本疾患は公衆衛生上、非常に大きな問題として喫緊な対策が求められている。しかし、本疾患に対するワクチンや医薬品、感染により生じる合併症などの治療法は確立されていない。このように、SARS-CoV-2 は治療に対するアンメットニーズをもたらしており、病態理解、予防や治療法創出には動物モデルが不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、SARS-CoV-2 経肺感染モデルマウスの樹立と病態解析を行い、SARS-CoV-2 に対する治療戦略創出ツールとしての基盤づくりを目指す。

3. 研究の方法

(1) 動物

・野生型 (WT) の雌性 C57BL6 マウスおよび CAG-hACE2 Tg マウスを用いた。ヘテロ接合体 (hACE2Tg/+) hACE2 マウスを維持するために、WT とヘテロ接合体 (hACE2Tg/+) hACE2 マウスを交配させた。マウスの遺伝子型は、PCR により確認した。

(2) ウイルス

SARS-CoV-2 (Origin, α , β , γ , δ , σ : BA.1/BA.2/BA.5) は、国立国際医療研究センターから提供いただいた。ウイルスの増殖は、VeroE6/TMPRSS2 は NIBIOHN の JCRB Cell Bank を用いて、2% FBS 含有 DMEM で 37°C、3 日間培養した。培養液は -80°C で保存した。本実験は BSL3 と承認された施設で行った。

(3) 感染実験

WT の雌雄 C57BL6 マウスまたは CAG-hACE2 マウスを使用した。三種混合麻酔下でマウス用気管挿管器具を用いて気管チューブを挿管した。その後、マイクロピペットを用いて 25 μ L のウイルス液をチューブ介して投与した。非感染群には PBS を用いた。感染後、アチパメゾールを投与し、覚醒するまでヒートマット下で安置した。感染したマウスは、体重の記録と生存確認を行った。明らかに衰弱しているマウスは、体重を記録した後、安楽死させた。本実験は ABSL3 と承認された施設で行った。

(4) 病態評価

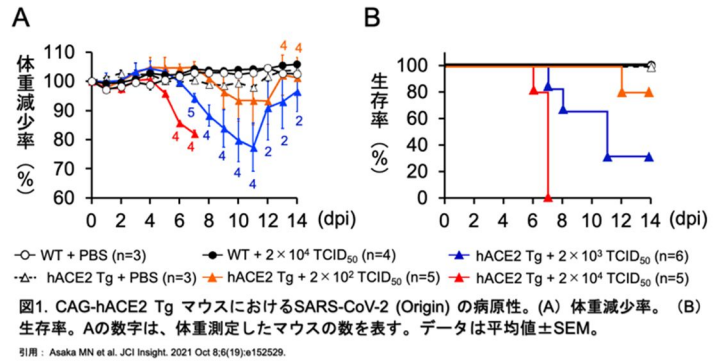
SARS-CoV-2 感染 CAG-hACE2 マウスを感染 0、2、4、7 日目に安楽殺し、主として肺と脳を採取した。これら臓器を用いて、ウイルスの複製およびウイルス遺伝子、臓器中の炎症性サイトカインの mRNA 発現、組織学的変化、免疫学的評価を行った。

(5) 投薬によるスクリーニング系としての有用性評価

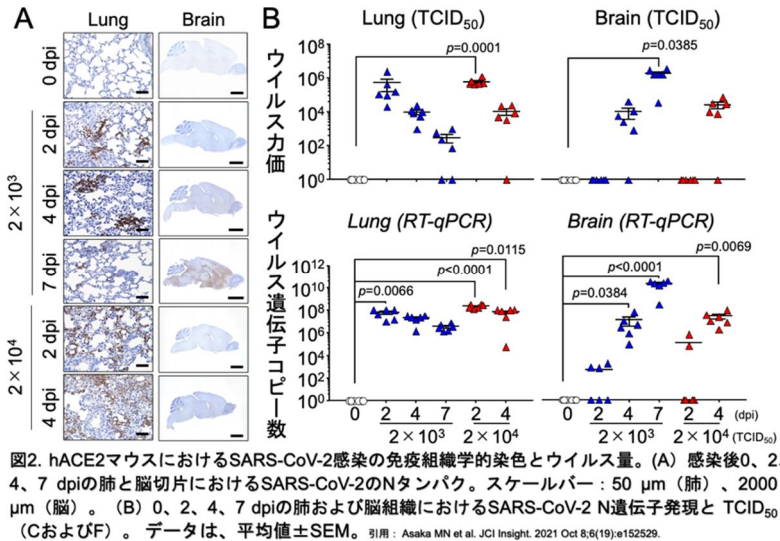
- ・中和抗体: 上記の混合物を WT マウスに 0 日目と 28 日目に皮下注射することで免疫した。35 日目に、免疫したマウスから血漿を回収し、中和抗体価を評価した。感染 1 日前に本中和抗体を静脈内から投与した。
- ・抗ウイルス薬: レムデシビル (5, 15, 50 mg/kg、溶媒: 12% SBECD) は腹腔内投与、モルヌピラビル (250 mg/kg, vehicle; 10% PEG400, 2.5% ethoxylated hydrogenated castor oil, 87.5% DW) は経口投与した。

4. 研究成果

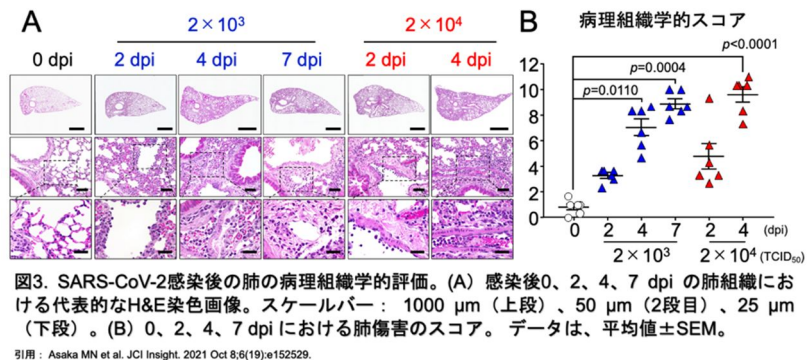
ロングリードシーケンスにより、15以上のhACE2遺伝子がタンデムに組み込まれていることが判明したCAG-hACE2マウスに、SARS-CoV-2 (Origin/Wuhan)を経気道感染すると、ウイルス感染力価依存的な体重減少と生存率低下を引き起こすことに成功した(図1Aおよび1B)。



予備試験において、経気道感染では他の臓器に比べて肺と脳でウイルス力価が高かったことから、肺と脳の感染0、2、4、7日目 (dpi) における SARS-CoV-2 のヌクレオカプシドタンパク (N タンパク質) を免疫組織化学的に検出し、ウイルス RNA コピー数と生ウイルスの力価を評価した(図2A)。SARS-CoV-2 N タンパク質の発現は肺では2dpi、脳では7dpiに増加していた(図2A)。免疫組織化学的結果と同様、肺におけるウイルス RNA コピー数とウイルス力価は2dpiで有意に上昇し、脳におけるウイルス RNA コピー数とウイルス力価は4-7dpiにかけて上昇が認められた(図2B)。



SARS-CoV-2 感染マウスの肺損傷の程度を H&E 染色で解析したところ、経日的に病理組織学的な変化が観察された(図3Aおよび3B)。2×10³ および 2×10⁴ TCID₅₀ で感染したマウスの肺では、いずれも2dpiで気管支周辺に好中球やリンパ球を中心とした炎症細胞の浸潤が観察された。4dpiでは肺胞壁の肥厚が観察され、炎症細胞は隣接する間質腔に浸潤していた。2×10³ TCID₅₀ で感染したマウスの肺の組織学的変化は、4および7dpiで同程度であった。さらに、2×10⁴ TCID₅₀ で感染した肺では、炎症細胞の浸潤を伴う重度の肺炎と肺胞壁の肥厚が観察された。病理組織学的な評価から、本TgマウスはSARS-CoV-2の経気道感染により、炎症性細胞の浸潤を伴った重篤な急性の肺炎を引き起こされることが示された。



SARS-CoV-2 感染 CAG-hACE2 マウスの炎症反応を示すために、RT-qPCR を用いて肺と脳における様々な炎症性サイトカインの mRNA レベルを評価した。感染初期の 2 dpi の肺では、*Il-1β* を除く各種炎症性サイトカイン(*Il-6*, *Tnf-α*, *Ifn-γ*, *Ifn-β*)の mRNA 発現が上昇した(図 4A)。一方、脳におけるこれら mRNA の発現は、ウイルス RNA の上昇に伴い、7 dpi で増加していた(図 4B)。

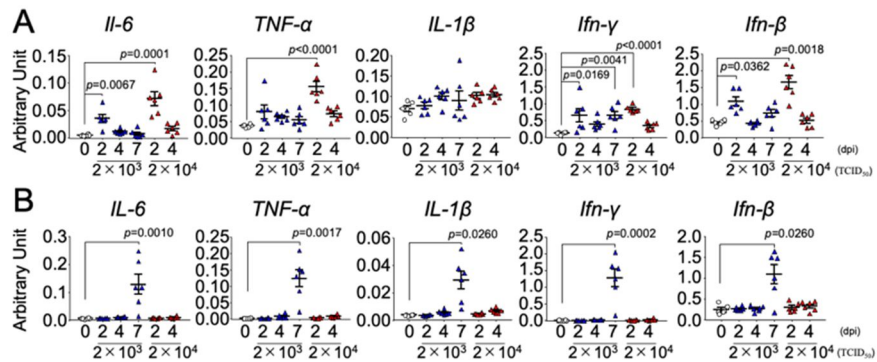


図4. SARS-CoV-2感染CAG-hACE2マウスの肺と脳におけるサイトカインmRNA発現レベル。感染後0、2、4、7 dpi の各種サイトカインmRNA発現をRT-qPCRにより測定し、βアクチンで正規化した。データは、平均値 ± SEM。引用: Asaka MN et al. JCI Insight. 2021 Oct 8;6(19):e152529.

中和抗体による防御効果を評価するために、RBD-mFc/AddaVax で免疫した WT マウスから血漿を回収し、CAG-hACE2 マウスに SARS-CoV-2 感染前日に静脈内注射した(図 5A)。

プール血漿中の中和抗体は、濃度依存的に RBD タンパク質と組換え ACE2 の結合を阻害し(図 5B) その中和抗体の IC₅₀ および IC₉₀ は、それぞれ 28.51 ng/mL と 88.73 ng/mL であった。PBS/AddaVax を免疫したマウスの血漿を投与した CAG-hACE2 マウスは、6 dpi から体重が減少し、9 dpi 以内に全滅した(図 5C-5D)。一方、RBD-mFc/AddaVax で免疫したマウスの血漿投与は、SARS-CoV-2 感染による体重減少および生存率低下を用量依存的に改善した。また、RBD-mFc/AddaVax の血漿を投与した CAG-hACE2 マウス 6 匹中 2 匹のみが死亡し、PBS/AddaVax の血漿投与したマウスと比較して、生存期間が延長した。

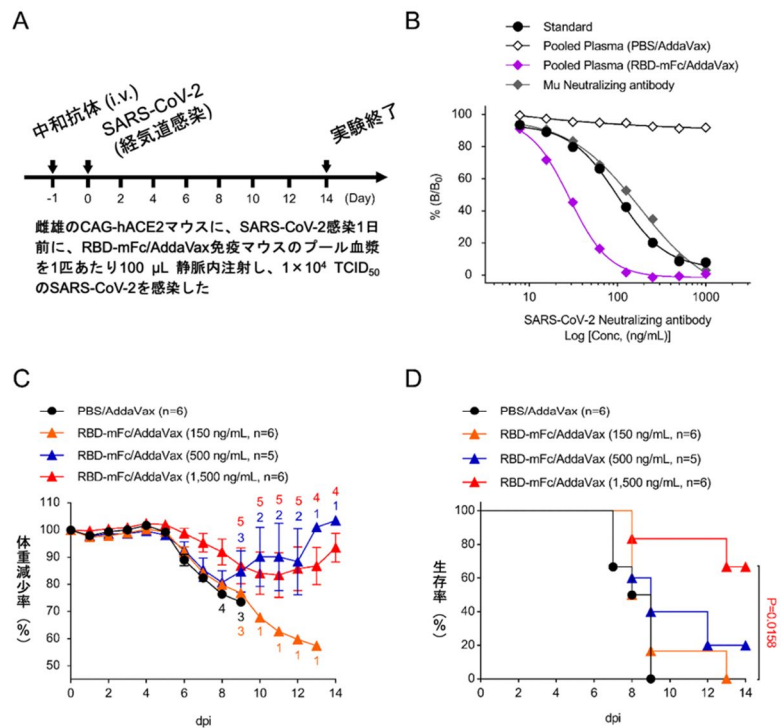


図5. 中和抗体前投与によるSARS-CoV-2感染に対する防御効果。(A) 実験スケジュール。(B) プール血漿中のSARS-CoV-2-中和抗体価の測定結果。(C) 体重減少率。(D) 生存率。Cの数字は、各時期の体重を測定したマウスの数を表す。データは、平均値 (B) および平均値 ± SEM (C)。

引用: Asaka MN et al. JCI Insight. 2021 Oct 8;6(19):e152529.

パンデミック下において、SARS-CoV-2 の変異株が多数出現した。そこで、SARS-CoV-2 に高い感受性を有する CAG-hACE2 Tg マウスにおける変異株の病原性の違いについて検討した(図 6A-6C)。アルファ、ベータおよびガンマ株においては、出現した順に CAG-hACE2 Tg マウスにおける病原性が高くなっており、Origin よりも早い日数で体重減少および生存率低下を示した。一方で、興味深いことにヒトで高い病原性を示したデルタ株の病原性は Origin と同程度であり、

同様の体重減少と生存率低下を示した。さらに、病原性は低いとされているオミクロン株の BA.1 および BA.2 株は Origin と比較して、体重減少と生存率低下の遅延がおり、一部のマウスは実験終了まで生き残った。BA.5 の病原性は、CAG-hACE2 Tg マウスでは、Origin と同程度であった。

最後に、本モデルマウスの薬剤スクリーニング系としての有用性をさらに高めるため、変異株を感染し、抗ウイルス薬であるレムデシビルとモルヌピラビルの治療的投与による感染防御効果について検討した。オミクロン株 (BA.1) を 1×10^4 TCID₅₀ でマウスに感染し、その 12 時間後から感染 5 日目までレムデシビルは腹腔内投与、モルヌピラビルは経口投与した (図 7A-7E)。結果、レムデシビルおよびモルヌピラビルの両方において、緩やかな体重減少が認められたものの、実験期間中に死亡する個体はいなかった。これらの結果は、CAG-hACE2 Tg マウスを用いた SARS-CoV-2 感染モデルが抗ウイルス薬の薬効評価にも有用であることを示唆している。

明白な体重減少や生存率低下といった結果を伴う SARS-CoV-2 感染モデル動物は、COVID-19 に対する抗ウイルス薬やワクチン、中和抗体などの候補品の安全性と有効性を評価する上で非常に有用である。今回、CAG-hACE2 マウスを用いた SARS-CoV-2 に高感受性なマウスモデルを樹立した。CAG-hACE2 マウスに SARS-CoV-2 を気管内感染させると、ウイルス力価依存的に体重減少と生存率低下、急性の肺炎が惹起された。重要なことは、ウイルス抗原の免疫や中和抗体の投与、さらには抗ウイルス薬の投与により、SARS-CoV-2 感染マウスの体重減少や生存率低下が抑制されたことである。本モデルマウスは、COVID-19 に対する医薬品のスクリーニング系として有効であるということを示している。

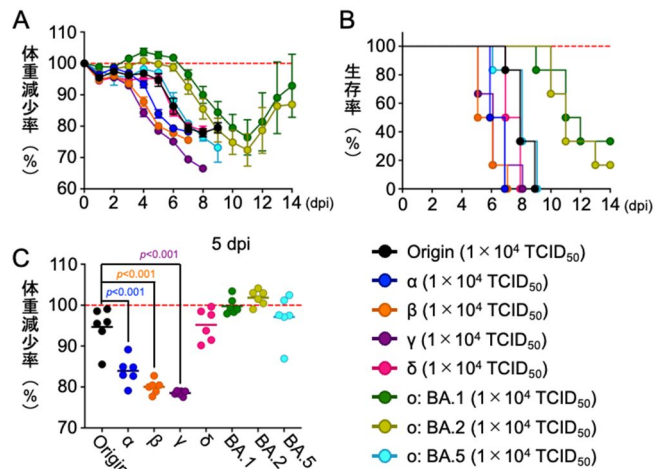


図6. CAG-hACE2 Tg マウスにおけるSARS-CoV-2変異株感染時の病原性。CAG-hACE2マウスにSARS-CoV-2を経気道感染させ、体重および生存率を記録した。(A) 経日的な体重減少率。(B) 生存率。(C) 5 dpiにおける体重減少率。データは、平均値±SEM (A) もしくは平均値 (C)。

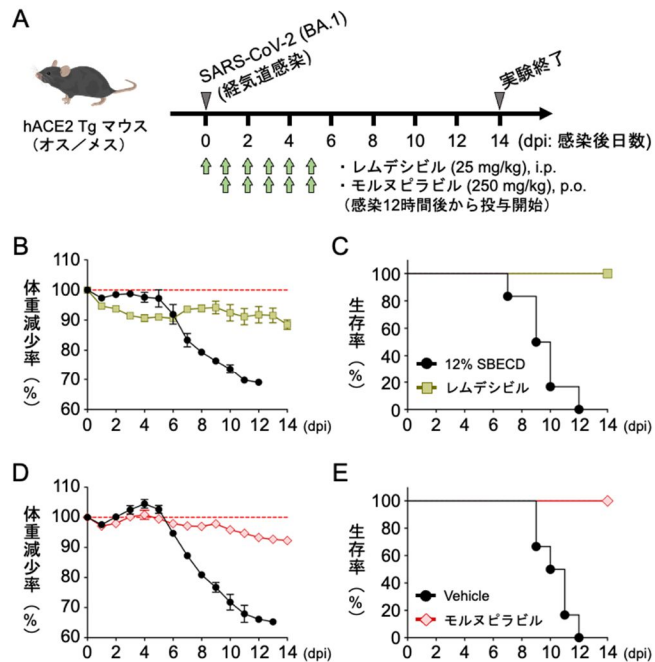


図7. レムデシビルまたはモルヌピラビルの治療的投与による感染防御効果。(A) 実験スケジュール。(B, D) 経日的な体重減少率。(C, E) 生存率。データは、平均値±SEM。

引用文献: Asaka MN[#], Utsumi D[#], Kamada H, Nagata S, Nakachi Y, Yamaguchi T, Kawaoka Y, Kuba K, Yasutomi Y*. Highly susceptible SARS-CoV-2 model in CAG promoter-driven hACE2-transgenic mice. JCI Insight. 2021 Oct 8;6(19):e152529. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.152529> PMID: 34463644. (#, equal to work)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asaka Masamitsu N., Utsumi Daichi, Kamada Haruhiko, Nagata Satoshi, Nakachi Yutaka, Yamaguchi Tomokazu, Kawaoka Yoshihiro, Kuba Keiji, Yasutomi Yasuhiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Highly susceptible SARS-CoV-2 model in CAG promoter-driven hACE2-transgenic mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	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） 10.1172/jci.insight.152529	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 Nagata Kayoko, Utsumi Daichi, Asaka Masamitsu N., Maeda Ryota, Shirakawa Kotaro, Kazuma Yasuhiro, Nomura Ryosuke, Horisawa Yoshihito, Yanagida Yohei, Kawai Yugo, Sato Kei, Yamaoka Yutaro, Miyakawa Kei, Ryo Akihito, Yasutomi Yasuhiro, Imura Akihiro, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 2
2. 論文標題 Intratracheal trimerized nanobody cocktail administration suppresses weight loss and prolongs survival of SARS-CoV-2 infected mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Medicine	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） 10.1038/s43856-022-00213-5	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 -

1. 著者名 Kimura-Ohba Shihoko, Asaka Masamitsu N., Utsumi Daichi, Takabatake Yoshitsugu, Takahashi Atsushi, Yasutomi Yasuhiro, Isaka Yoshitaka, Kimura Tomonori	4. 巻 1869
2. 論文標題 d-Alanine as a biomarker and a therapeutic option for severe influenza virus infection and COVID-19	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 166584 ~ 166584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbadis.2022.166584	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内海大知、浅賀正充、鎌田春彦、永田諭志、仲地ゆたか、山口智和、河岡義裕、久場敬司、保富康宏
2. 発表標題 CAGプロモーター駆動 hACE2 トランスジェニックマウスを用いた高感受性のSARS-CoV-2感染マウスモデル
3. 学会等名 第17回豊長類医科学フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅賀正充、内海大知、鎌田春彦、永田諭志、仲地ゆたか、山口智和、小檜山康司、石井健、河岡義裕、久場敬司、保富康宏
2. 発表標題 CAGプロモーター駆動 hACE2 トランスジェニックマウスを用いた高感受性のSARS-CoV-2感染マウスモデル
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daichi Utsumi, Masamitsu Asaka, Haruhiko Kamada, Yoshihiro Kawaoka, Yasuhiro Yasutomi
2. 発表標題 High susceptible model of SARS-CoV2 in CAG promoter-driven hACE2 transgenic mice
3. 学会等名 第50回日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daichi Utsumi, Masamitsu Asaka, Haruhiko Kamada, Satoshi Nagata, Yutaka Nakachi, Tomokazu Yamaguchi, Yoshihiro Kawaoka, Keiji Kuba, Yasuhiro Yasutomi
2. 発表標題 Establishment of SARS-CoV-2 respiratory tract infection model in CAG promoter-driven hACE2 transgenic mice
3. 学会等名 第95回薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 智和、星崎 みどり、湊 隆文、蕨澤 悟、浅賀 正充、新山 真由美、安 健博、内海 大知、永田 諭志、鎌田 春彦、神谷 亘、河岡 義裕、保富 康宏、今井 由美子、久場 敬司
2. 発表標題 アンジオテンシン変換酵素2(ACE2) 酵素活性によるCOVID-19急性肺傷害の治療効果
3. 学会等名 第95回薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内海大知、浅賀正充、鎌田春彦、永田諭志、仲地ゆたか、山口智和、河岡義裕、久場敬司、保富康宏
2. 発表標題 CAG-hACE2 Tg マウスを用いたSARS-CoV-2経気道感染モデルの樹立
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
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
---------	---------