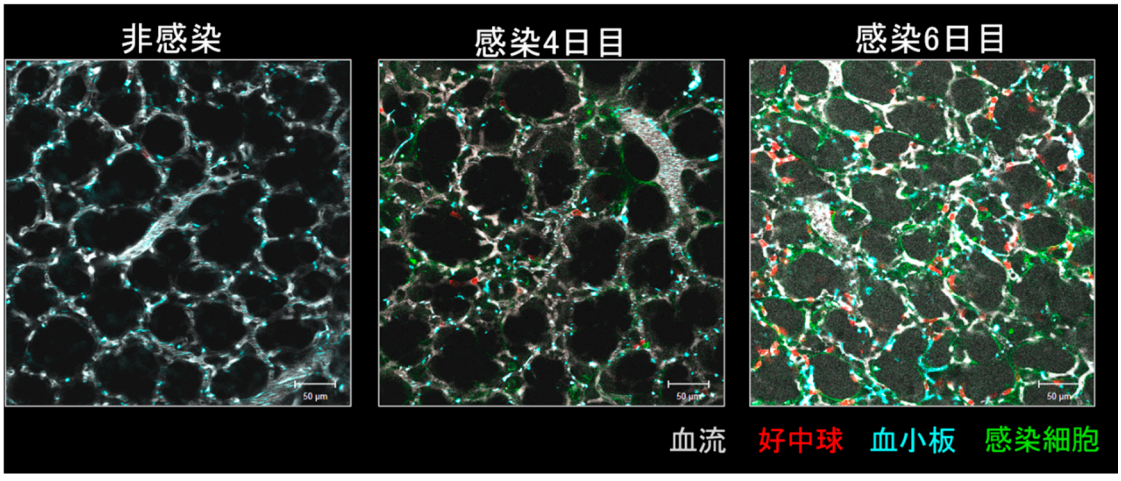
129　新型コロナウイルス肺炎の2光子生体イメージング解析	植木　紘史

【目的】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のが現状である。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については不明である。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を解明するためには、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必要がある。私たちはこれまでに、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。

【方法】本研究では SARS-CoV-2 に高い感受性を示す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。肺の血流と好中球ならびに血小板を可視化するために蛍光 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。感染肺の病態生理学的な変化を、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。

【結果】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。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（66 kDa）とほぼ同程度の分子量の蛍光標識 Dextran（70 kDa）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。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が形成されることが明らかとなった。

SARS-CoV-2 に感染したマウス肺の生体イメージング



129. 新型コロナウイルス肺炎の２光子生体イメージング解析

植木　紘史

東京大学 医科学研究所 ウイルス感染部門

Key words：SARS-CoV-2，新型コロナウイルス，COVID-19，生体イメージング，免疫

緒　言

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［1］、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。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は、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解明に繋がると考えられる。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［2，3］。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。

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。蛍光レポーター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 hACE2 Tg 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。

結　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 hACE2 Tg マウスを用いて実施した。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［3］。血中アルブミン（66 kDa）とほぼ同程度の分子量の蛍光標識 Dextran（70 kDa）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（図 2）。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）。

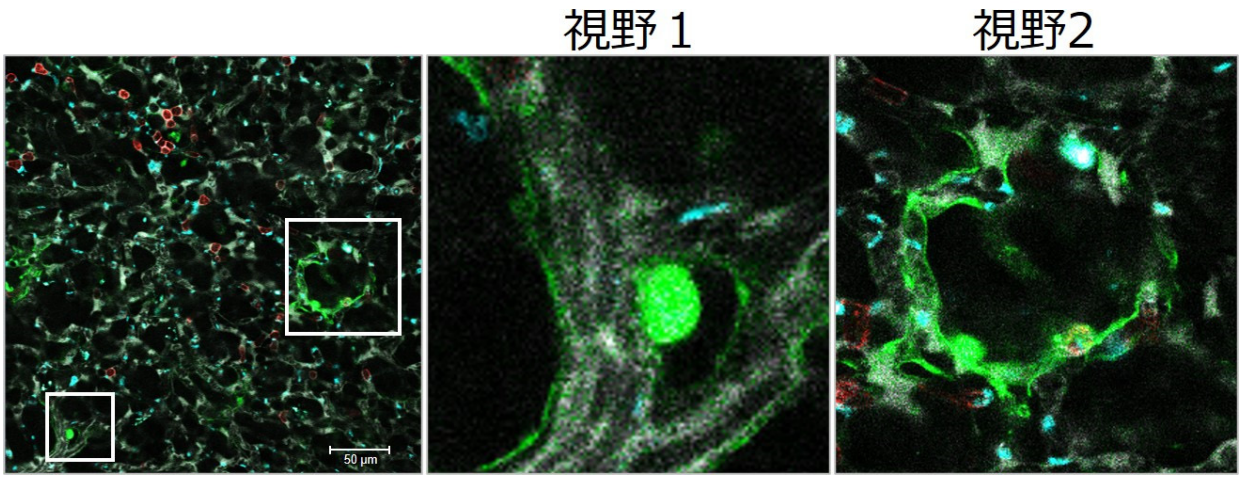


図 1. SARS-CoV-2 感染肺の生体イメージング

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。

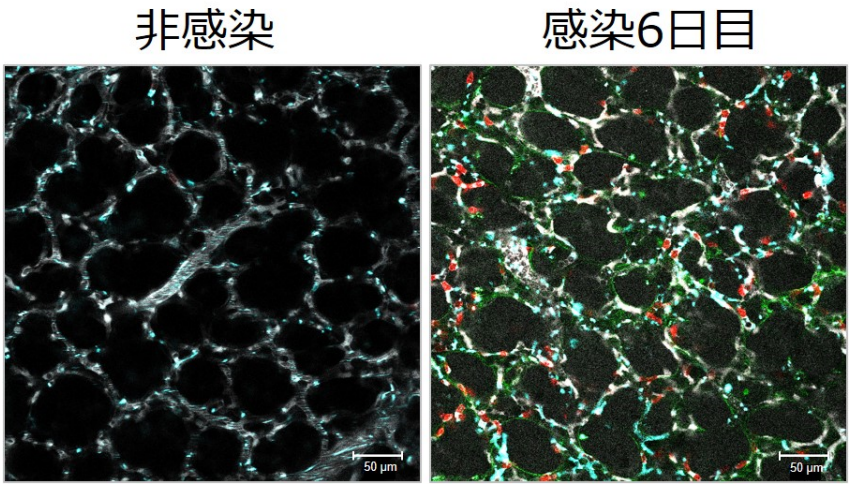


図 2. SARS-CoV-2 感染肺における血管透過性ならびに好中球の挙動

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。

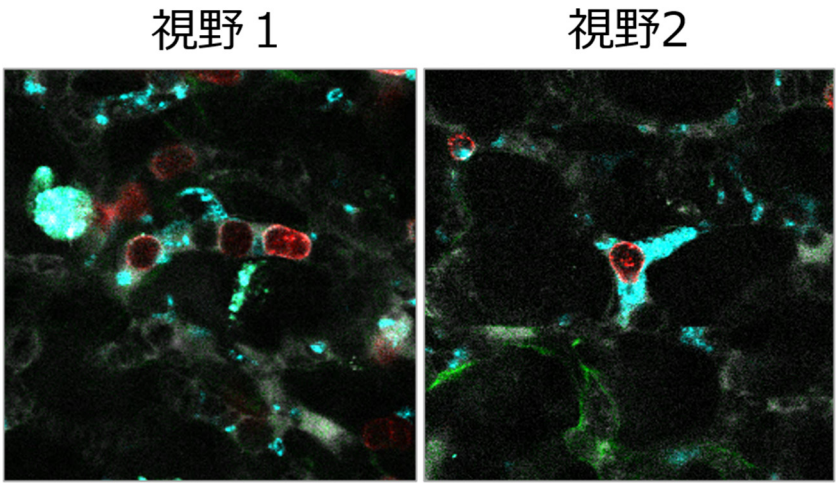


図 3. SARS-CoV-2 感染肺における好中球と血小板の複合体

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。

考　察

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［4〜6］。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。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者である東京大学医科学研究所の河岡義裕先生、ならびに群馬大学大学院医学系研究科の神谷亘先生に深く御礼申し上げます。

文　献

1） Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. Nature medicine. 2020;26(6):842-4. Epub 20200512. doi: 10.1038/s41591-020-0901-9. PubMed PMID: 32398875.

2） Ueki H, Wang IH, Fukuyama S, Katsura H, da Silva Lopes TJ, Neumann G, et al. In vivo imaging of the pathophysiological changes and neutrophil dynamics in influenza virus-infected mouse lungs. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018. Epub 2018/06/27. doi: 10.1073/pnas.1806265115. PubMed PMID: 29941581.

3) Ueki H, Wang IH, Zhao D, Gunzer M, Kawaoka Y. Multicolor two-photon imaging of in vivo cellular pathophysiology upon influenza virus infection using the two-photon IMPRESS. Nature protocols. 2020. doi: 10.1038/s41596-019-0275-y.
4) Yipp BG, Kim JH, Lima R, Zbytnuik LD, Petri B, Swanlund N, et al. The Lung is a Host Defense Niche for Immediate Neutrophil-Mediated Vascular Protection. Science immunology. 2017;2(10). Epub 2017/06/20. doi: 10.1126/sciimmunol.aam8929. PubMed PMID: 28626833; PubMed Central PMCID: PMC5472445.
5) Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nature reviews Immunology. 2007;7(9):678-89. Epub 2007/08/25. doi: 10.1038/nri2156. PubMed PMID: 17717539.
6) Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. The Journal of experimental medicine. 2006;203(12):2569-75. Epub 2006/11/23. doi: 10.1084/jem.20060925. PubMed PMID: 17116736; PubMed Central PMCID: PMC2118150.