

(海外・国内) インターンシップ報告書

2024年 7月 5日提出

氏名	川口 虹穂
所属	国際感染症学院
学年	博士課程 3年
活動先名	機関名、国名 1: The Peter Doherty Institute for Infection and Immunity, Division of Medicine, Dentistry and Health Sciences 2: The Monash Biomedicine Discovery Institute, Department of Microbiology メルボルン、オーストラリア
期間 ① (出発日—帰札日) ② (インターンシップ実施開始日—終了日)	① 2024年 5月 13日- 6月 3日 ② 2024年 5月 11日- 6月 5日

帰国後 2週間以内に提出してください (厳守) A4用紙 4枚以内 下記項目は変更しないでください。

・活動目的及びインターンシップ先を選択した理由

活動目的

1. 抗体作製、評価方法を中心としたワクチン開発技術
2. オルガノイドを用いた呼吸器感染症のモデルアッセイ
3. 狂犬病ウイルスの分子免疫学的実験技術

の3つの実験手技の習得を目的とする。また、これらの活動を通じて

4. 海外の研究者とのネットワークを構成すること
 5. 将来のキャリアパスを確認する機会を作ること
- を目指す。

インターンシップ先を選択した理由

「第 11 回人獣共通感染症克服のためのコンソーシアム会議」に招聘された Georgia Deliyannis 先生のお話を聞き、ワクチン開発研究やオルガノイドを用いた呼吸器感染症の実験に興味を持ち、自身の研究室で実施されていない新たな技術を学ぶ良い機会になると考え、活動先として The Peter Doherty Institute を選択した。

Moseley 研究室ではウイルスのリバースジェネティクス法と組み合わせた様々なイ

メーキング解析によるウイルス-宿主の相互関係の研究を長年行っており、さらに狂犬病ウイルスを用いた神経疾患の治療法の確立にも取り組んでいることから、Moseley 研究室で技術を習得し帰国後自身の研究に応用したいと考え、活動先として新たに選択した。

- ・ 活動内容・成果 (2,000 字程度、活動内容が判るような写真や図表を加えて下さい)

The Peter Doherty Institute では 3 週間にわたり、様々な血清学的診断法や初代培養細胞から作製したオルガノイドの培養法・実験方法を中心とした実験技術を教わった。また、講義やセミナーを傾聴すると共に、自身の研究内容を The Peter Doherty Institute の研究者に共有した。

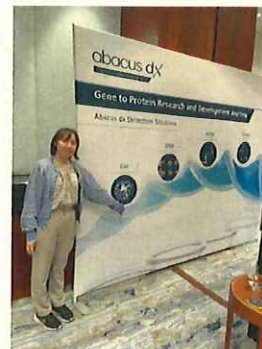
1. 血清学的診断法

Georgia Deliyannis 博士から酵素免疫測定法 (ELISA) の原理、プロトコール、必要な試薬の調製法を教わり、SARS-CoV-2 に対する様々なワクチンで免疫したマウスの血清で複数の ELISA を実施した。次に、同血清で、代用ウイルス中和 (Surrogate Virus Neutralisation : sVNT) アッセイを実施し、ELISA の結果と合わせてグラフ化・分析した。得られた結果の解釈の仕方および次の実験に何をすべきかを Georgia 博士、技術補佐員の Chin Yi Wong さんとディスカッションした。また、マウスの筋肉内ワクチン接種、顎下出血による血液の採材方法、採材したマウス血清の血清学的検査に向けた処理方法を学んだ。

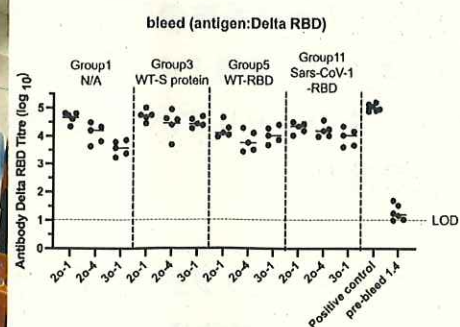
6 月 21 日には、マルチプレックスビーズ結合アッセイのシンポジウムに参加した。シンポジウムでは、マルチプレックスアッセイとその医学研究への応用に関する複数の口頭発表とポスターセッションが行われ、マルチプレックスアッセイの原理や活用方法について詳しく学んだ。



実験室の風景



マルチプレックスビーズ結合アッセイのシンポジウム



ELISA の結果

2. オルガノイドを用いた実験方法

Elizabeth Vincan 教授の研究室で Bang Tran 博士から肝臓オルガノイドと腸オルガノイドの培養法を学んだ。組織や細胞のドナーによってオルガノイドの成長速度が異なることや、継代時にチップのプレウェッティングが重要であることなど、実際にオル

ガノイドを維持する上で大切な知識を多く得ることができた。

さらに、ヒトドナー由来の ALI (Air-Liquid Interface) 培養気道上皮細胞の免疫蛍光染色及びその観察に携わった。ALI 培養で分化させた気道上皮細胞に SARS-CoV-2 の BA.4 株と Wildtype 株を感染させ、感染 7 日後に固定し、分化した気道上皮で形成される粘液線毛マーカー及び SARS-CoV-2 のマーカーを用いて免疫蛍光染色を行った。その後、共焦点顕微鏡を用いて感染細胞を観察した。カルチャーインサートの切り抜き方やマウンティングの仕方、共焦点顕微鏡を用いた細胞観察法を学んだ。



肝臓オルガノイド

カルチャーインサートの切り抜き

共焦点顕微鏡を用いて感染細胞を観察

3. 免疫学やオルガノイドに関する知識の習得

Georgia 博士から紹介された免疫学の基礎に関する本を読み、基礎知識を身につけた。次に、メルボルン大学のオンライン免疫学講義を 7 回に渡って受講し、各免疫細胞の機能や活性化方法といった、免疫学に関するより詳細な知識を身につけた。

さらに、Bang 博士から紹介された腸オルガノイドや肝臓オルガノイドに関するビデオシリーズ及び論文からオルガノイドに関する基礎知識を習得した。

4. プレゼンテーション

3 週間のインターンシップ期間において学んだことをパワーポイントにまとめ、Georgia 博士と Chin Yi Wong さんに発表し、フィードバックを得た。また、自身の狂犬病の研究内容を Georgia 先生、Chin Yi Wong さん、Bang Tran 博士を含む 10 人の The Doherty Institute のメンバーに発表し、ディスカッションを行なった。



研究内容発表後の集合写真



ディスカッション風景

5. セミナーの参加

Peter Doherty Institute で開催された以下のセミナーに参加した。

- 博士課程修了セミナー ~Sharanya Wijesinghe "Dissecting intra-tumoural CD8+ T cell heterogeneity and function"~
- 微生物学・免疫学研究セミナー ~Kenneth L. Roc 教授 (UMass Chan Medical School) "MHC I 抗原提示と癌免疫回避"~
- Doherty Seminar Series ~Jonathan Yewdell 教授 (NIH, Bethesda, USA) "50 Years of trying to understand MHC I Peptide Presentation"~
- ランチョンセミナー ~Jonathan Yewdell 教授のキャリアトーク~
- Abacus dx Multiplex シンポジウム~Multiple 技術とその医学研究への応用~

メルボルン大学でのインターンシップ後、モナーシュ大学の Moseley 研究室を 1 日訪問した。残念ながら受入先教授である Gregory Moseley 教授は新型コロナウイルス感染症感染により不在であったが、Moseley 研究室の博士学生から狂犬病ウイルス P タンパク作製のためのクローニング法や、共焦点顕微鏡を用いた細胞の観察法などの研究技術を学んだ。



実験室風景



博士課程の学生とディスカッション

インターンシップ前まで血清学的診断法やオルガノイドに携わったことがなく、全てが未知であったが、免疫学講座の受講、Georgia Deliyannis 博士及び Bang Tran 博士から頂いた資料により、免疫学やオルガノイドの基礎知識から学ぶことができた。さらに、実際に自分の手で ELISA や sVNT アッセイを実施し、結果の解析・ディスカッションをしたことで、これらの手法を身につけ、自分のみで実施することが可能になった。残念ながらワクチン作製、ワクチン接種からの流れを直接見ることはできなかったが、Georgia Deliyannis 博士が実験の流れを全て説明して下さったおかげで、ワクチン研究の全体像を掴むことができた。マウスの免疫からウイルス感染、採材までは時に半年もかかることから念入りに計画を立てる必要があることを学んだ。

また、Bang Tran 博士からはマトリゲルを用いたオルガノイドの培養法だけでなく、ALI 培養細胞を用いた SARS-CoV-2 感染細胞の免疫染色、共焦点顕微鏡を用いた観察まで学ぶことができた。

3 週間のインターンシップ期間において、滞在していた研究室以外の様々な研究室の研究者とも交流した。Georgia Deliyannis 博士の計らいで最終日にはこれまで交流した研究者を呼び、自身の博士課程の研究内容を発表した。発表後には様々な質問が飛び交い、ディスカッションを行なった。海外の研究者に対して英語で自分の研究内容をプレゼンし、さらにディスカッションする貴重な経験が得られた。

Doherty Institute ではほぼ毎日免疫学に関する様々なセミナーが開催され、これらのセミナーに参加することで最新の知見を得ることができた。特に、Jonathan Yewdell 教授のインフルエンザウイルスと免疫についての講義、さらに科学者のキャリアパスセミナーがとても興味深く、講義終了後に直接会話し、メールでのやり取りを行なった。可能であれば次年度の WISE/LP セミナーに招待したいと考える。

Monash 大学では、Gregory Moseley 教授が不在であったため分子学的解析法についての話を伺うことはできなかったが、Moseley 研究室の博士課程の学生から普段行っている実験内容について聞くことができた。また、Gregory Moseley 教授からオーストラリアで開催されるウイルス学会を紹介され、新たなネットワークを広げる手がかりを得た。以上のことから、このインターンシップを通して、海外の研究者とのネットワークを構成することができたと考える。

・今後のキャリアパスを考える上でどのようにプラスになったか。

私は、将来製薬企業の研究者として、海外の研究者と連携し創薬やワクチン開発研究を実施することを計画している。本インターンシップを通してワクチン開発研究に携わることで、ワクチン開発法やその流れ、評価方法を学ぶことができた。また、Georgia Deliyannis 博士が元々アメリカの製薬会社の研究員であったことから、製薬企業の研究者としての仕事内容について伺うことができ、イメージを持つことができた。さら

に、オルガノイドの培養法や ALI 培養細胞を用いた実験法は将来治療薬のスクリーニングを行う際の一つのアイデアとなった。以上のことから、製薬企業で行う研究に役立つ知識や技術を手に入れることができたと考える。

また、本インターンシップを通して様々な国の研究者と出会うことができ、コネクションを広げることができた。今回得られたネットワークを活用して将来創薬に携わることになった際に共同研究などに繋がりたいと考える。

・ One Health Approach 実践報告（該当する場合）

OH onsite training（Ally Module4）をあわせて実施した場合、今回の活動で実践した One Health Approach の例をいくつか挙げてください。もしくは、この活動を今後どのように One Health Approach に繋げることができるか、その可能性を説明してください。

・ 後輩へのアドバイス

研究室の 1 日訪問はできることが限られ、思わぬ事態が発生する可能性もあるので避けた方がいいです。少なくとも 1 週間は同じ研究室に通った方がそれぞれの研究室の雰囲気や実験内容を理解できると思いました。

指導教員確認欄	所属・職・氏名 ワクチン研究開発拠点・教授・澤 洋文
---------	-------------------------------

※1 受入先評価書をあわせて提出してください。

※2 本報告書はキャリアパス支援委員会で内容を確認します。その後、教務委員会で単位認定を受けることとなります。