

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「異分野融合による新型コロナウイルスを
はじめとした感染症との共生に資する技術基盤の
創生」
研究課題「オルガノイドを用いた呼吸器チップの開
発とウイルス病態解析への応用」

研究終了報告書

研究期間 2021年02月～2024年03月

研究代表者：野田 岳志
(京都大学 医生物学研究所 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

本研究では、ヒトの呼吸器を再現した気道チップおよび肺胞チップを開発した。永楽グループと後藤グループがオルガノイドを作製し、横川グループがデバイスを作製後、野田グループがウイルス感染を実施した。開発した呼吸器チップを用いて、ヒトの上気道や下気道における SARS-CoV-2 の増殖機構や宿主応答を解明した。また、ヒトの鼻腔上皮、気道上皮、肺胞上皮オルガノイドを用いて、SARS-CoV-2 の増殖機構を解明した。さらに、ヒト呼吸器上皮オルガノイドを用いた新規ウイルス培養系を開発した。

a. 気道チップおよび肺胞チップを用いた SARS-CoV-2 の増殖機構および宿主応答機構の解明 (横川グループ、後藤グループ、野田グループ) (in preparation)

後藤グループが作製する肺前駆細胞を横川グループが作製するマイクロ流体デバイスで培養し、気道上皮あるいは肺胞上皮へ分化誘導後、血管内皮細胞とともに共培養することで生体模倣システムを構築した。本デバイスを用いて、野田グループが上皮側に SARS-CoV-2 を感染させ、上皮および血管内皮でのウイルス増殖を評価した。横川グループがウイルス応答を解析した。

b. 気道チップおよび肺胞チップを用いたインフルエンザウイルスの増殖機構および宿主応答機構の解明 (横川グループ、後藤グループ、野田グループ) (in preparation)

後藤グループが作製する肺前駆細胞を横川グループが作製するマイクロ流体デバイスで培養し、気道上皮あるいは肺胞上皮へ分化誘導後、血管内皮細胞とともに共培養することで生体模倣システムを構築した。本デバイスを用いて、野田グループが上皮側に SARS-CoV-2 を感染させ、上皮および血管内皮でのウイルス増殖を評価した。横川グループがウイルス応答を解析した。

c. 鼻腔オルガノイドを用いた SARS-CoV-2 の増殖機構および長期的な嗅覚障害発症機構の解明 (永楽グループ、野田グループ) (Muramoto et al., Nat Commun, in revision)

永楽グループが作製した 3 次元の鼻腔オルガノイドに野田グループが SARS-CoV-2 を感染させ、ウイルス増殖能を評価した。永楽グループがシングルセル解析を実施し、宿主応答を解析した。

d. 鼻腔上皮シートを用いた新規呼吸器ウイルス培養系の確立 (永楽グループ、野田グループ) (in preparation)

永楽グループが作製した鼻腔上皮シートに野田グループが SARS-CoV-2、ヒト風邪コロナウイルス 4 種類 (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1)、季節性インフルエンザウイルス (A/H1N1, A/H3N2, B/Victoria, B/Yamagata) を感染させ、ウイルス増殖能を評価した。永楽グループがシングルセル解析を実施し、感染細胞を解析した。

e. 肺胞オルガノイドを用いた SARS-CoV-2 変異株の増殖能の解析 (後藤グループ、野田グループ) (Muramoto et al., Lancet Microbe, 2023) (Masui et al., Stem Cell Reports, in revision)

後藤グループが作製した肺胞上皮オルガノイドを用いて、野田グループが SARS-CoV-2 変異株を感染させ、ウイルス増殖能を評価した。

(2)顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. SARS-CoV-2 オミクロン株の新たな性状を解明

概要: デルタ株とオミクロン株 (BA.5 および BQ.1.1) を iPS 細胞由来の肺胞上皮に感染させ、37℃あるいは 40℃で培養したところ、37℃においてはどのウイルス株も効率よく増殖したが、40℃においてはオミクロン株で増殖能が大きく減弱した。従って、発熱応答はオミクロン感染において重要な生体防御反応を担っており、オミクロン株がデルタ株よりも弱い病原性を示す理由の一端が明らかになった。

2. SARS-CoV-2 感染による長期的な嗅覚障害発症機構の解明

概要: ヒト ES 細胞から分化誘導した鼻腔オルガノイドに SARS-CoV-2 を感染させ、ウイルス増殖や宿主応答を経時的に解析した。その結果、SARS-CoV-2 は初めに ACE2 を発現する呼吸上皮に感染し増殖した。その後、呼吸上皮で産生された IFN により嗅上皮で ACE2 が発現誘導されると、SARS-CoV-2 は嗅上皮にも感染し、嗅上皮に存在する嗅神経前駆細胞に効率よく感染し、細胞死を誘導した。これらの結果から、ヒト鼻腔上皮における SARS-CoV-2 の増殖機構が明らかになり、長期的な嗅覚障害を発症するメカニズムの一端が解明された。

3. SARS-CoV-2 変異株の特徴を評価可能な気道・肺胞オルガノイド培養法を開発

概要: ヒト多能性幹細胞から分化誘導した肺胞および気道オルガノイドの新しい培養方法を開発し、SARS-CoV-2 変異株毎に気道と肺胞での異なるトロピズムや感染後の細胞表現型を明らかにできた。ヒト多能性幹細胞はゲノム編集の手法も確立しており、ドナーの選択も可能なことから、ヒト由来の気道と肺胞の細胞を用いた呼吸器感染症モデルとして今後の波及効果が期待できる。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 呼吸器ウイルスの新規培養系となるヒト鼻腔上皮シートの開発

概要: ヒト ES 細胞を平面プレート上で 28 日間分化培養し、呼吸上皮や嗅上皮から構成されると考えられる鼻腔上皮シートの作出に成功した。本鼻腔上皮シートを用いることで、新型コロナウイルス、ヒト風邪コロナウイルス、A 型/B 型インフルエンザウイルスだけでなく、通常の株化培養細胞では培養することが困難な呼吸器ウイルス(ヒト風邪コロナウイルス NL63, ヒト風邪コロナウイルス HKU-1, 近年ヒトで流行する H3N2 インフルエンザウイルス)の培養も可能となり、多種多様な呼吸器ウイルスが増殖できる稀有な新規培養系となることが示唆された。

2. 生体模倣システム(気道チップおよび肺胞チップ)の開発

概要: マイクロ流体デバイスを用いた生体模倣システムにより、ヒト iPS 細胞由来の肺前駆細胞と血管内皮細胞を用いて実組織-血管界面を模倣した気道チップおよび肺胞チップを作製した。本システムにおいて、上皮組織側のみに SARS-CoV-2 およびインフルエンザウイルスを導入することで上皮あるいは血管内皮組織への感染とその影響を評価でき、感染時の免疫応答が気道と肺胞、あるいは SARS-CoV-2 とインフルエンザウイルスでどのように異なるかを実証することができた。これにより、将来のパンデミックにおいても生体模倣システムを用いることでウイルス病態解析やワクチン開発が加速することが期待される。

3. SARS-CoV-2 変異株に対して *in vitro* 試験での病原性評価方法を開発

概要: SARS-CoV-2 は現在も変異を続けており、新たに出現する変異株の病原性を *in vitro* で評価できる疾患モデル開発が必要だったが、株化細胞株では生体内と異なる性質を持つことや、初代細胞はドナーの選択や細胞供給源に限界があった。ヒト由来 iPS 細胞を用いた新しい気道と肺胞のオルガノイド培養法では SARS-CoV-2 変異株の細胞種による感染病態の違いを明らかにすることができ、今後の SARS-CoV-2 等の変異株の病原性予測にも迅速に適用できる可能性がある。

< 代表的な論文 >

1. Muramoto Y, Takahashi S, Halfmann PJ, Gotoh S, Noda T*, Kawaoka Y*. Replicative capacity of SARS-CoV-2 omicron variants BA.5 and BQ.1.1 at elevated temperatures. *Lancet Microbe* S2666-5247(23)00100-3. (2023)

概要: デルタ株とオミクロン株(BA.5 および BQ.1.1)を iPS 細胞由来の肺胞上皮に感染させ、37℃あるいは 40℃で培養したところ、37℃においてはどのウイルス株も効率よく増殖したが、40℃においてはオミクロン株で増殖能が大きく減弱した。従って、発熱応答はオミクロン感染

において重要な生体防御反応を担っており、オミクロン株がデルタ株よりも弱い病原性を示す理由の一端が明らかになった。

2. Muramoto Y[#], Suzuki K[#], Nakano T, Nakano M, Hirabayashi A, Ohgushi M, Hada S, Wagai F, Onishi C, Takahashi Y, Kitamoto S, Tomigahara Y, Eiraku M^{*}, Noda T^{*}. The mechanism underlying persistent olfactory dysfunction induced by SARS-CoV-2 infection. Nature Communications (in revision)

概要: ヒト ES 細胞から分化誘導した鼻腔オルガノイドに SARS-CoV-2 を感染させ、ウイルス増殖や宿主応答を経時的に解析した。その結果、SARS-CoV-2 は初めに ACE2 を発現する呼吸上皮に感染し増殖した。その後、呼吸上皮で産生された IFN により嗅上皮で ACE2 が発現誘導されると、SARS-CoV-2 は嗅上皮にも感染し、嗅上皮に存在する嗅神経前駆細胞に効率よく感染し、細胞死を誘導した。これらの結果から、ヒト鼻腔上皮における SARS-CoV-2 の増殖機構が明らかになり、長期的な嗅覚障害を発症するメカニズムの一端が解明された。

3. Masui A, Hashimoto R, Matsumura Y, Yamamoto T, Nagao M, Noda T, Takayama K, Gotoh S. Micro-patterned culture of iPSC-derived alveolar and airway cells distinguishes SARS-CoV-2 variants. Stem Cell Reports (in revision)

概要: ヒト iPS 細胞から分化誘導した肺前駆細胞をマイクロパターン加工された培養プレートに播種すると、気道と肺胞のオルガノイドをアピカルアウトした状態で「2.5 次元」に培養できるようになった。SARS-CoV-2 を感染させるとウイルス変異株毎に気道と肺胞で異なる変化が現れ、ウイルス性肺炎の引き金になると考えられる II 型肺胞上皮細胞への感染は変異株間で大きく異なった。特に Delta 株では肺胞・気道のいずれにも感染し、ウイルスを放出したが、BA1.1 は肺胞にはほとんど感染せず、気道にはよく感染するものウイルスをほとんど放出しないこと等が明らかとなった。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「野田」グループ

研究代表者: 野田岳志 (京都大学医生物学研究所 教授)

研究項目

- ・鼻腔オルガノイドを用いたSARS-CoV-2の増殖機構の解析
- ・気道/肺胞オルガノイドを用いたSARS-CoV-2変異株の増殖能の解析
- ・気道/肺胞チップを用いたSARS-CoV-2の増殖機構および宿主応答の解析
- ・鼻腔上皮シートを用いた新規呼吸器ウイルス培養系の開発

② 「永楽」グループ

主たる共同研究者: 推進 太郎 (京都大学医生物学研究所 教授)

研究項目

- ・鼻腔オルガノイドを用いたSARS-CoV-2の増殖機構の解析
- ・気道/肺胞オルガノイドを用いたSARS-CoV-2変異株の増殖能の解析
- ・鼻腔上皮シートを用いた新規呼吸器ウイルス培養系の開発

③ 「後藤」グループ

主たる共同研究者: 後藤慎平 (京都大学iPS細胞研究所 教授)

研究項目

- ・ヒト多能性幹細胞由来気道・肺胞オルガノイドの供給システムの構築
- ・SARS-CoV-2変異株の病原性解析に適した気道・肺胞オルガノイド培養法の確立
- ・新しい培養法を用いたSARS-CoV-2変異株の病原性評価方法の開発

④ 「横川」グループ

主たる共同研究者:横川 隆司(京都大学工学研究科 教授)

研究項目

- 呼吸器チップの開発と評価
 - a) 単一のhiPSC由来肺前駆細胞を用いた気道チップ、肺胞チップの開発
 - b) SARS-CoV-2感染モニタリング技術の開発
- アレイ型臓器チップの開発
 - a) オルガノイド培養チップのアレイ化

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- 東京大学/国立国際医療センター/University of Wisconsin Madison (河岡義裕教授)
SARS-CoV-2 変異株の解析
- 京都大学 iPS 細胞研究所/AMED CREST (高山和雄講師)
呼吸器チップの開発、多様なオルガノイドの開発
- 国立感染症研究所 (酒井宏治主任研究員)
SARS-CoV-2 変異株の解析
- 京都大学 iPS 細胞研究所 (Woltjen Knut 准教授)
SARS-CoV-2 の増殖機構の解析
- 住友化学株式会社 (中野重徳博士)
鼻腔オルガノイドの開発
- 理化学研究所 (渡邊力也主任研究員)
SARS-CoV-2 の遺伝子解析
- 杏林製薬株式会社 (中尾一久博士)
新しい気道・肺胞オルガノイド培養法を用いた共同研究の可能性について意見交換
- HiLung 株式会社 (山本佑樹博士)
気道・肺胞オルガノイドを用いた感染症モデルの事業への利用可能性について意見交換
- 東ソー株式会社 (牧田健一博士)
マイクロパターン加工プレートを用いた共同研究の可能性について意見交換