

News Release



2024年3月29日

京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)

iPS 細胞から作った肺胞や気道の細胞により SARS-CoV-2 変異株の病原性を比較評価する

ポイント

- マイクロパターン培養^{注1)}により iPS 細胞から肺胞と気道の細胞を分化誘導する方法を確立した
- 新型コロナウイルスが肺胞や気道に感染するモデルを作ることができた
- 新型コロナウイルスの変異株など病原性を予測することができるかと期待される

1. 要旨

増井淳研究員(CiRA [臨床応用研究部門](#))、[高山和雄](#)講師(CiRA [増殖分化機構研究部門](#))、[後藤慎平](#)教授(CiRA [臨床応用研究部門](#))らの研究グループは、マイクロパターン培養プレートの上でヒト iPS 細胞から肺胞上皮細胞^{注2)}と気道上皮細胞^{注3)}を分化誘導し、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の変異株を見分けるモデル系を開発しました。

SARS-CoV-2 の感染拡大では、ウイルスの変異株が次々と出現し、その病原性を迅速に評価するシステムが必要でした。肺胞上皮細胞は SARS-CoV-2 が体内へと侵入する場の一つです。しかし、肺胞上皮細胞の入手や維持培養は困難であり、ウイルス侵入の評価を行うことができませんでした。研究チームでは、SARS-CoV-2 の変異株を高分解能で識別するためのモデルとして、マイクロパターン培養により iPS 細胞由来の肺胞上皮細胞と気道上皮細胞を別々に誘導したものを開発しました。コロニーの周辺部で II 型肺胞上皮(AT2)細胞が、中央部では多毛化した気道上皮細胞が誘導されました。肺胞上皮細胞と気道上皮細胞それぞれの感染実験により、SARS-CoV-2 変異株の感染効率や、感染した細胞の反応の違いなど、病原性の特徴を詳細に調べることができました。今回開発した培養系を使うことで SARS-CoV-2 の新しい変異株についても病原性を迅速に予測することができるかと考えられます。

この研究成果は 2023 年 3 月 29 日(日本時間)に「Stem Cell Reports」で公開されました。

2. 研究の背景

AT2 細胞は肺の損傷を修復するうえで重要な体性幹細胞です。実験室での培養が試みられてきましたが、生体から取り出した AT2 細胞を培養することは困難で、iPS 細胞を用いて AT2 細胞を作製する方法が開発されています。iPS 細胞由来の AT2 細胞は、マトリゲルを使用した特殊な3次元オルガノイド培養法が必要ですが、オルガノイドのサイズを制御するのが難しく、直接的な解析も困難でした。

COVID-19 パンデミックでは、ウイルスの変異とその影響を迅速に調べる必要がありました。AT2 細胞を含めた肺細胞の実験室モデルが必要でしたが、マトリゲルを使用した既存のモデルは、細胞がウイルスと接触する頂端膜(Apical 面)がオルガノイドの内側に向いており、COVID-19 の研究に適していませんでした。

近年、マイクロパターン培養技術を用いた新しいアプローチが開発されました。これにより、決まった形状とサイズのオルガノイドを作製することができるようになりました。今回の研究では、このマイクロパターン培養技術を用いてオルガノイドを作製し、アピカル面が外側に向けたウイルス感染実験に適したモデル系の構築を試みました。

3. 研究結果

1. iPS 細胞由来 肺胞上皮細胞の作製

マイクロパターン培養を利用して iPS 細胞由来の肺前駆細胞から AT2 細胞への分化誘導を行いました。今回利用した iPS 細胞には、AT2 細胞が産生するサーファクタントタンパク質 (SFTPC) が細胞内でできると、緑色に検出できるように GFP 遺伝子導入をした細胞を用いました。分化誘導後 14 日目に、AT2 細胞のマーカである SFTPC および AT2 細胞のアピカル面に存在する NaPi2b の発現を蛍光顕微鏡で観察しました。NaPi2b は細胞集団の表面に発現しており、アピカル面が外側にあることがわかりました (Fig. 1)。

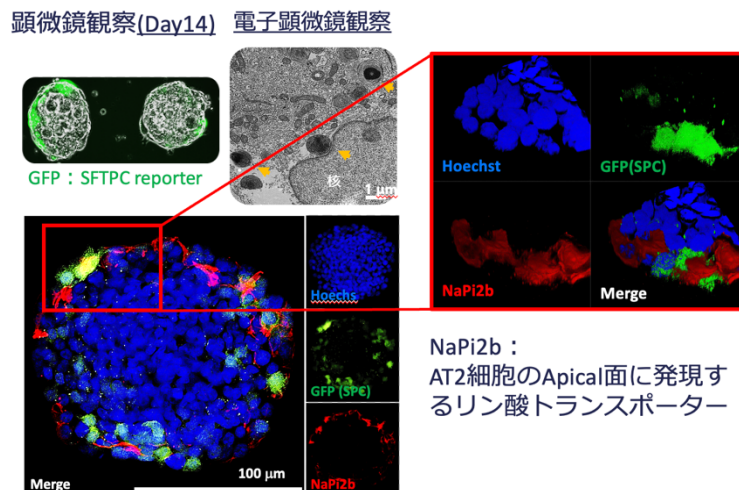


Fig. 1 AT2 細胞への分化誘導確認

黄色矢頭: 肺サーファクタントを貯めるラメラ体

Hoechst: 細胞核、GFP (SPC): AT2 細胞、NaPi2b: AT2 細胞のアピカル面

2. iPS 細胞由来 気道上皮細胞の作製

AT2 細胞と同様にマイクロパターン培養を利用して iPS 細胞由来肺前駆細胞から気道上皮を作製しました。分化誘導後 14 日目には、線毛が動いている様子が観察されたほか、線毛上皮細胞の線毛を表す Ac-Tub が細胞集団の表面に観察されました (Fig. 2)。

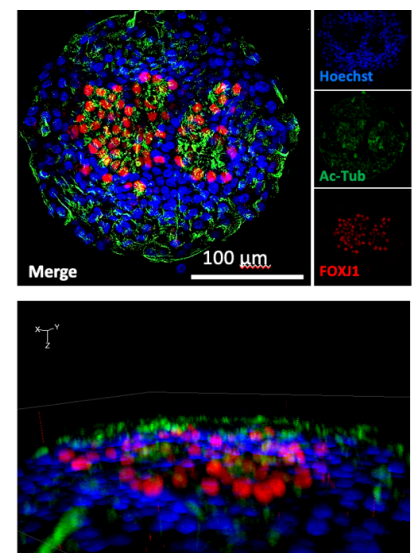


Fig.2 線毛上皮細胞への分化誘導

Hoechst: 細胞核、Ac-Tub: 線毛、FOXJ1: 線毛上皮細胞

3. SARS-CoV-2 感染実験

マイクロパターン培養により作製した、肺胞と気道の上皮細胞を利用して、それぞれ 5 種類の SARS-CoV-2 (B.1.1.214 株、B.1.617.2 株=Delta 株、BA.1 株、BA.2 株、BA.5 株) を感染させて、培養上清中の SARS-CoV-2 ゲノム量と細胞中遺伝子発現を調べました。すると、2 つの株 (B.1.1.214 株、B.1.617.2 株) ではウイルスゲノム量が多かったのに対して、BA 株=Omicron 株では少ない傾向が見られました。一方で、気道上皮細胞では BA.5 株が B.1.1.214 株と同等のウイルスゲノム量を示したこと、細胞中遺伝子発現量では BA.1 株が B.1.617.2 株と同等のウイルス遺伝子量だったことなど、変異株ごとのトロピズムの違いが定量的に示されました (Fig. 3)。

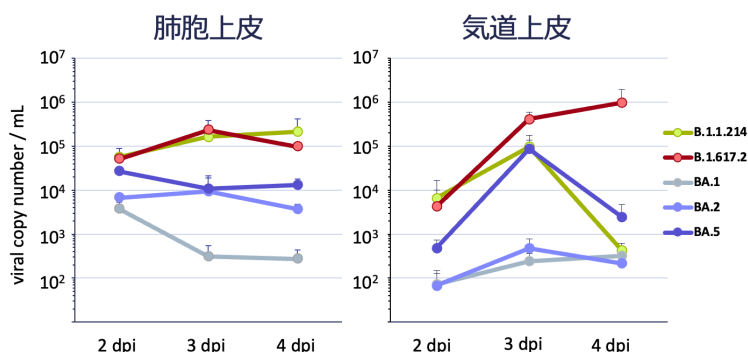


Fig.3 培養上清中の SARS-CoV-2 ゲノム量

つぎに、蛍光免疫染色画像を解析することで、SARS-CoV-2 感染をタンパク質レベルでの定量化を試みました。肺胞および気道の細胞マーカータンパク質と、SARS-CoV-2 のヌクレオカプシドタンパク質 (SARS-CoV-2 NP) ^{注4)} を染色し測定しました。SARS-CoV-2 NP は肺胞上皮細胞および気道上皮細胞で検出されました (Fig. 4)。また、肺胞上皮細胞における SARS-CoV-2 NP が検出されたコロニーの割合は、B.1.1.214 株および B.1.617.2 株で高く (それぞれ $63.0 \pm 29.7\%$ および $71.2 \pm 14.1\%$)、Omicron 株では低い割合を示しました: $9.4 \pm 2.4\%$ (BA.1)、 $9.3 \pm 1.0\%$ (BA.2)。一方、気道上皮細胞では BA.1 株が B.1.617.2 株と同等の割合を示し、遺伝子解析と相関した結果をタンパク質レベルでも定量化出来ました。

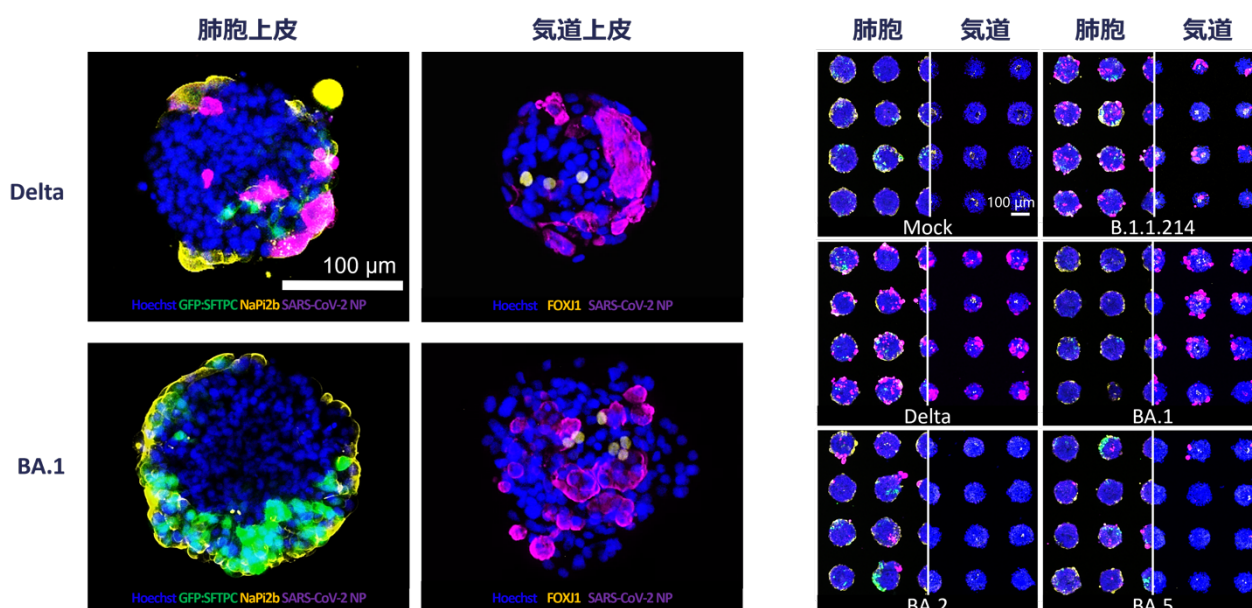


Fig. 4 蛍光免疫染色による SARS-CoV-2 感染評価

4. まとめと展望

マイクロパターン培養を用いることで、ウイルス感染実験に利用可能なヒト iPS 細胞から肺胞および気道上皮細胞を作製することができました。それぞれの感染実験により、SARS-CoV-2 変異株のトロピズムや感染効率、感染した細胞の反応の違いなど、病原性の特徴を詳細に調べることができました。今回開発した培養系を使うことで新たに出現する SARS-CoV-2 変異株をはじめ、新規ウイルスの感染メカニズムの解明や、病原性を予測することができると考えられます。

5. 論文名と著者

○ 論文名

“Micro-patterned culture of iPSC-derived alveolar and airway cells distinguishes SARS-CoV-2 variants”
DOI: 10.1016/j.stemcr.2024.02.011

○ ジャーナル名

Stem Cell Reports

○ 著者

Atsushi Masui^{1,2}, Rina Hashimoto¹, Yasufumi Matsumura³, Takuya Yamamoto^{1,4,5}, Miki Nagao³, Takeshi Noda^{6,7}, Kazuo Takayama^{1,*}, Shimpei Gotoh^{1,2,*}

*責任著者

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
2. 京都大学大学院医学研究科 呼吸器疾患創薬講座
3. 京都大学大学院医学研究科 臨床病態検査学
4. 理化学研究所革新知能統合研究センター iPS 細胞連携医学的リスク回避チーム
5. 京都大学ヒト生物学高等研究拠点 (WPI-ASHBi)
6. 京都大学医生物学研究所 微細構造ウイルス学分野
7. 京都大学大学院生命科学研究所 微細構造ウイルス学研究室

6. 本研究への支援

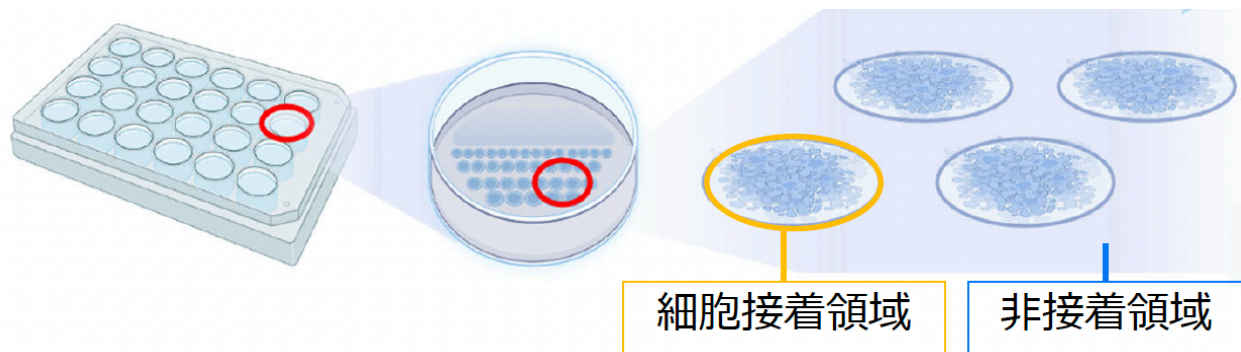
本研究は、以下の支援を受けて実施されました。

- 京都大学 iPS 細胞研究所山中伸弥研究室への新型コロナウイルス特別研究助成
- 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (JP21gm1610005, JP17bm0804007, JP22bm1123013, JP23bm1323001)
- 国立研究開発法人科学技術振興機構 (JPMJCR20HA),
- 京都大学医生物学研究所 ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点
- 京都大学 iPS 細胞研究基金
- 杏林製薬株式会社 呼吸器疾患創薬講座研究費
- 日本学術振興会 科研費 (JP22K19525, JP22H03077)
- 東ソー株式会社 (培養プレートの提供)

7. 用語説明

注 1) マイクロパターン培養

1つのウェルのなかに、細胞が接着する領域と接着しない領域が並んだ培養プレートを使って細胞培養をする。今回使用した培養プレートは、東ソー株式会社 開発品 (2.5次元培養器材®)。



注 2) 肺胞上皮細胞

薄くて平坦な形をした 1 型(AT1)と、立方体の形態を持ち、界面活性剤成分(サーファクタントタンパク質)を分泌する 2 型(AT2)がある。

注 3) 気道上皮細胞

線毛上皮細胞、基底細胞、クラブ細胞、分泌細胞などからなる。外界と内部を隔てるバリアーとして存在している。線毛上皮細胞は空気が通る側(アピカル面)に線毛が多数存在している。

注 4)ヌクレオカプシドタンパク質(NP)

ウイルスの遺伝子を収容している殻を構成するタンパク質。