

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19431

研究課題名（和文）オルガノイドを用いた風邪コロナウイルスの新規分離培養系の確立

研究課題名（英文）Development of a new culture system for human coronaviruses using organoids

研究代表者

野田 岳志（Noda, Takeshi）

京都大学・医生物学研究所・教授

研究者番号：00422410

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：風邪コロナウイルスの研究を行うためには、それらを効率よく増殖させる必要がある。しかし4種すべての風邪コロナウイルスを培養できる細胞は存在しない。近年、我々はヒト鼻腔オルガノイドの作製に成功した。そこで本研究では2次元鼻腔オルガノイドを作出し、風邪コロナウイルスの新たな培養系を開発することを目指した。その結果、鼻腔オルガノイドにおいて、229E、OC43、NL63は各株化培養細胞と同程度もしくはそれ以上に増殖した。HKU1は株化培養細胞で増殖しなかったが、鼻腔オルガノイドでは増殖した。以上の結果から、我々が開発した2次元鼻腔オルガノイドは風邪コロナウイルスの新規培養系となると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス培養については、HCoV-229EはHeLa-ACE2-TMPRSS2細胞で、HCoV-NL63はLLC-MK2細胞で、HCoV-OC43の実験室株はHRT-18細胞で増殖可能であることが報告されているが、すべての風邪コロナウイルスの増殖をサポートする細胞はない。さらにHCoV-HKU1は培養できる細胞株が存在しない。本研究によりヒトに感染する全てのコロナウイルス（SARS-CoV-2含む）が増殖可能な培養系を確立できたことは、コロナウイルスの基礎研究を進展させるだけでなく、地方衛生研究所等における疫学調査の強化にも大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Efficient culturing of human coronaviruses poses a challenge due to the absence of cell lines capable of culturing all four types. Here, we aimed to establish human nasal organoids as a platform for studying these viruses. Initially, we established 2D nasal organoids as a novel culture system of human coronaviruses. Using this system, we demonstrated that 229E, OC43, and NL63 viruses replicated as effectively, if not more so, in nasal organoids compared to conventional cultured cell lines. Notably, HKU1 virus, which failed to replicate in conventional cultured cell lines, showed successful replication in nasal organoids. These results indicate the potential of our 2D nasal organoids as a novel culture system for human coronaviruses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：コロナウイルス オルガノイド

### 1. 研究開始当初の背景

現在、ヒトの世界に存在するコロナウイルスは、わずか6種類のみである。コロナウイルス属のHCoV-OC43とHCoV-HKU1、コロナウイルス属のHCoV-229EとHCoV-NL63の4種類は、ヒトに軽度の風邪(季節性の風邪)を引き起こす。一方、新型コロナウイルス感染症の原因であるSARS-CoV-2と中東呼吸器症候群の原因であるMERS-CoVの2種類は、コロナウイルス属に属し、ヒトに重篤な呼吸器疾患を引き起こす。

4種類の風邪コロナウイルスとSARS-CoV-2/MERS-CoVは、近縁のウイルスであるにも関わらず、その病原性は大きく異なる。SARS-CoV-2/MERS-CoVの高い病原性発現機構を明らかにするためには、近縁の低病原性ウイルスである風邪コロナウイルスとの比較解析が必須であるが、ピフォアコロナの時代には、風邪コロナウイルスは医学/公衆衛生的に重要度が低いと考えられてきたこともあり、その研究はほとんど行われていなかった。

風邪コロナウイルスの研究を行うためには、患者から風邪コロナウイルスを分離し効率よく増殖させる必要がある。これまで様々な培養細胞がウイルス分離に試されてきたが、風邪コロナウイルスを効率よく培養できる細胞が存在しないという大きな問題があり、研究の進展を妨げている。近年、正常ヒト気管支上皮初代培養細胞をトランスウェル上に播種後、air-liquid interface (ALI) で培養し粘膜繊毛細胞に分化させることで、風邪コロナウイルスを分離できることが報告された (Komabayashi et al., Jpn J Infect Dis, 2021)。しかし、ALI培養は作業が煩雑で手間がかかるため(準備に6週間ほど必要)、多数の検体をスクリーニングするには不向きであり、また、ウイルス産生効率も高くないため、ウイルス増殖機構の解析には不向きという問題がある。

### 2. 研究の目的

ヒト体内での風邪コロナウイルスの増殖部位は、鼻腔などの上気道である。従って、ヒト鼻腔組織を再現し培養することができれば、風邪コロナウイルスを効率よく分離培養できる系を確立できると予想され、風邪コロナウイルスや分離培養が難しい呼吸器ウイルスの研究を飛躍的に進展させることが期待できる。近年、研究代表者(ウイルス学)は分担研究者(発生学)とともに異分野融合研究を開始し、ヒトES細胞を分化誘導して作出したヒト鼻腔オルガノイドにおけるSARS-CoV-2の増殖機構の解析を行った。そこで本研究では、これまでに確立したヒト鼻腔オルガノイド実験系を改変し、風邪コロナウイルスの新たな培養系を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ヒト鼻腔オルガノイドは、分担研究者が独自の手法でヒトES細胞から作製したものであり(特願2021-108806)、3次元的に配置された複数種の鼻腔上皮細胞・嗅上皮細胞から構成される(図1)。従って、組織学的ならびに生理学的に生体内の器官と極めて近い特徴を示す。申請者はこれまでに、研究分担者が作出した鼻腔オルガノイドを用いて、HCoV-229E(コロナウイルス)とHCoV-OC43(コロナウイルス)の増殖をサポートするかどうかを解析した。コントロールとして、季節性インフルエンザウイルスを用いた。その結果、すべてのウイルスの増殖をサポートするものの、おそらくオルガノイドの個体差(鼻腔上皮の量)により、ウイルス増殖をサポートできないものも一定の割合で認められた。

この問題を解決するために、分担研究者は鼻腔オルガノイドの培養法を再検討し、ES細胞から2次元平面培養しながら安定的に鼻腔上皮と嗅上皮を分化誘導する方法を開発した。そこで本2次元鼻腔オルガノイドを用いて、風邪コロナウイルスの増殖機構の解析を行い、新規コロナウイルス培養系となるか否か、その可能性を評価した。

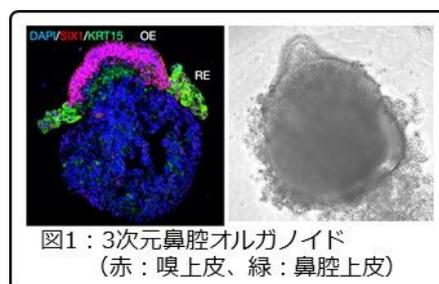


図1: 3次元鼻腔オルガノイド  
(赤: 嗅上皮、緑: 鼻腔上皮)

#### 4. 研究成果

本研究では、2次元平面培養したヒト鼻腔オルガノイドを用いて、風邪コロナウイルスの培養系の構築を目指した。初めに、96wellプレートに培養した2次元鼻腔オルガノイドに、HCoV-229EあるいはHCoV-OC43を1000感染性粒子/wellで感染させたところ、どのウイルスも短時間(2-3日)で効率よく増殖することが確認された(図2:HCoV-229Eのみ結果を示す)。そこでHCoV-229Eを培養可能な株化培養細胞として知られているMRC5細胞と、HCoV-OC43を培養可能な株化細胞として知られているHCT-8細胞をコントロールとし、同じ感染条件でHCoV-229EおよびHCoV-OC43を2次元鼻腔オルガノイドに感染させ(図3)、1週間、上清中のウイルス量を測定し株化培養細胞における増殖能と比較した。その結果、これまでに用いられてきた株化培養細胞と同程度に、両風邪コロナウイルスが増殖することを確認した(図4)。

そこで今度は、株化培養細胞であるLLC-MK2-N細胞で緩慢に増えることが知られているHCoV-NL63と、株化培養細胞では増殖する株化培養が存在しないHCoV-HKU1を2次元鼻腔オルガノイドに同じ感染条件で感染させ、ウイルス増殖を経時的に解析した。その結果、HCoV-NL63はLLC-MK2-N細胞と比較して早く増殖することが確認された。また、HCoV-HKU1はVeroE6-TMPRSS2細胞では全く増殖しなかったが、本2次元鼻腔オルガノイドでは力価は低いもののウイルス増殖が認められた。

これからの結果から、ES細胞から2次元的に分化培養した鼻腔オルガノイドは、すべての風邪コロナウイルスの増殖をサポートできる新規コロナウイルス培養系となると考えられた。

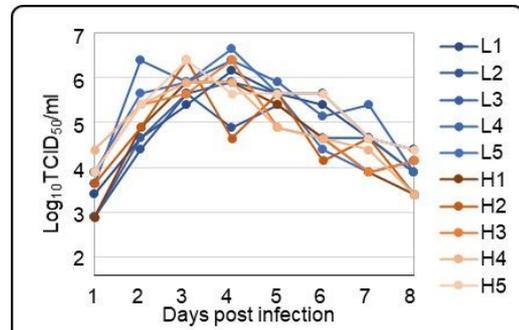


図2: 10wellの2次元鼻腔オルガノイドを用いたHCoV-229Eの増殖能の解析 (L:1000粒子/well感染, H:10000粒子/well感染)

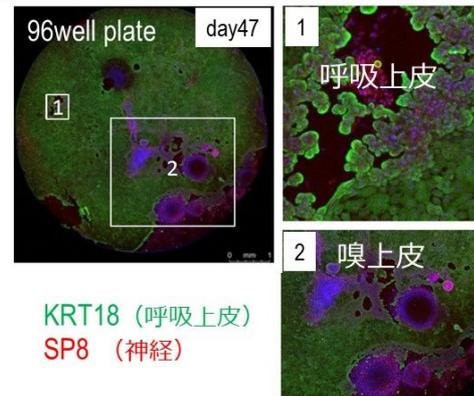


図3: 2次元鼻腔オルガノイドの蛍光染色像

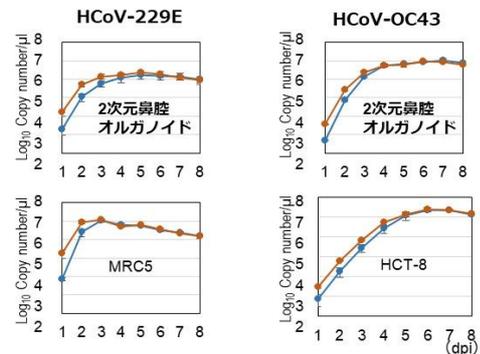


図4: 2次元鼻腔オルガノイドと株化培養を用いた風邪コロナウイルス(HCoV-229EとHCoV-OC43)の増殖能の比較

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takamatsu Y, Yoshikawa T, Kurosu T, Fukushi S, Nagata N, Shimojima M, Ebihara H, Saijo M, Noda T	4. 巻 96
2. 論文標題 Role of VP30 Phosphorylation in Ebola Virus Nucleocapsid Assembly and Transport.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 e0108322.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jvi.01083-22.	査読の有無 有
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 Fujita-Fujiharu Y, Sugita Y, Takamatsu Y, Houru K, Igarashi M, Muramoto Y, Nakano M, Tsunoda Y, Taniguchi I, Becker S, Noda T	4. 巻 13
2. 論文標題 Structural insight into Marburg virus nucleoprotein-RNA complex formation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 1191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-28802-x.	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 Miyamoto S, Muramoto Y, Shindo K, Fujita-Fujiharu Y, Morikawa T, Tamura R, Gilmore JL, Nakano M, Noda T*	4. 巻 96
2. 論文標題 Contribution of RNA-RNA interactions mediated by the genome packaging signals for the selective genome packaging of influenza A virus.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 e0164121.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01641-21.	査読の有無 有
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 Miyamoto S, Nakano M, Morikawa T, Hirabayashi A, Tamura R, Fujita-Fujiharu Y, Hirose N, Muramoto Y, Noda T*	4. 巻 13
2. 論文標題 Migration of influenza virus nucleoprotein into the nucleolus is essential for ribonucleoprotein complex formation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e03315-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mbio.03315-21	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 Hu S, Noda T.	4. 巻 Oct15
2. 論文標題 Filovirus helical nucleocapsid structures.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy (Oxf)	6. 最初と最後の頁 dfac049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfac049.	査読の有無 有
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0件

〔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
研究分担者	永樂 元次  (Eiraku Mototsugu)  (40415097)	京都大学・医生物学研究所・教授    (14301)	

#### 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
---------	---------