

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03795

研究課題名（和文）呼吸器疾患における基底細胞の役割解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of basal stem cells in respiratory diseases

研究代表者

高山 和雄（Takayama, Kazuo）

京都大学・iPS細胞研究所・講師

研究者番号：10759509

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：基底細胞は、気道に存在する幹細胞である。基底細胞は、気道を構成しているゴブレット細胞やクラブ細胞、線毛細胞への分化能を有する。そのため、基底細胞は、損傷を受けた気道の組織再生において重要な役割を担うと考えられている。しかし、ウイルス性呼吸器感染症により気道が損傷を受けた際の、基底細胞の役割は十分には明らかになっていない。本研究では、ウイルス性呼吸器感染症において、基底細胞が気道再生に寄与することを明らかにした。また、基底細胞の増殖と分化を司る因子を特定することで、基底細胞を標的とした気道損傷に対する新たな治療戦略を提示することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ウイルス性呼吸器感染症研究におけるオルガノイドの使用が活発に行われている。本研究では、オルガノイド技術を用いて呼吸器ウイルスの感染と宿主応答を評価するだけでなく、基底細胞の機能解明と制御に取り組むことによって、損傷を受けた気道組織再生に向けた基礎的検討を行った。本研究が今後さらに発展することにより、不可逆的な気道組織損傷に対する治療薬開発が可能になると期待される。このような取り組みにより、ウイルス性呼吸器感染症に対する新たな抗炎症薬や組織修復薬が開発できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Basal stem cells are stem cells that reside in the airways. Basal cells have the ability to differentiate into airway epithelial cells including goblet cells, club cells, and ciliated cells. Therefore, basal stem cells are thought to play an important role in tissue regeneration of damaged airways. However, the role of basal cells when the airways are damaged by viral respiratory infections is not fully understood. In this study, by using organoid technologies, we demonstrated that basal stem cells contribute to airway regeneration in viral respiratory infections. Furthermore, by identifying the factors that control the proliferation and differentiation of basal stem cells, we were able to present a new therapeutic strategy for airway injury that targets basal stem cells.

研究分野：再生医工学、幹細胞生物学、薬学、ウイルス学

キーワード：ウイルス 呼吸器 基底細胞 オルガノイド

## 1. 研究開始当初の背景

細胞系譜追跡実験により、二酸化硫黄吸入による気道損傷時に基底細胞がゴブレット細胞やクラブ細胞、線毛細胞へ分化することが示されている (Rock et al., PNAS, 2009)。インフルエンザによる重度の肺損傷時においても、基底細胞が肺上皮細胞へ分化することが報告されている (Kumar et al., Cell, 2011)。また、単一のマウス基底細胞がゴブレット細胞やクラブ細胞、線毛細胞などの気道上皮細胞に分化可能であることが知られている (Tata et al., Nature, 2013)。気道に低頻度しか観察されない神経内分泌細胞も基底細胞から分化できる (Watson et al., Cell Rep, 2015)。このように基底細胞は、in vivo でも ex vivo でも気道を再生するために必要な多分化能が証明されている。しかしながら、気道損傷の重症度が、基底細胞の組織再生能に影響を及ぼすか十分に検討されていない。また、気道損傷時での基底細胞の複製や分化のメカニズムも十分には明らかになっていない。このように、ウイルス性呼吸器感染症などによる気道損傷時における基底細胞の役割には未解明な部分が多く残されている。

呼吸器感染症は、ウイルス感染を原因とするものが数多く報告されている。COVID19 パンデミックの原因である SARS-CoV-2 をはじめとして、RS ウイルス、インフルエンザウイルスなどが呼吸器感染症の原因ウイルスとして知られている。これらのウイルスに対する抗ウイルス薬や予防薬の開発は近年急速に進められており、SARS-CoV-2 にはレムデシビル、RS ウイルスにはパリピズマブ、インフルエンザウイルスにはオセルタミビルとザナミビルが有効である。しかしながら、抗ウイルス薬により原因ウイルスを排除した後においても、細気管支炎などの症状が残ることが多い。そのため、ウイルス性呼吸器感染症を治療するためには、抗ウイルス薬だけでなく、損傷を受けた気道の再生を促す薬の開発も必須である。基底細胞は多分化能を有することから、基底細胞の増殖と分化を制御できれば、気道再生を促進する手段が見つかる可能性がある。大部分の線毛細胞が死滅するような損傷を受けた気道においても、基底細胞は残存し、組織修復を行うための起点となりうることを考えた。したがって、基底細胞の役割を解明することは、呼吸器感染症に治療薬開発の観点でも意義深いものであると考えた。

気道を構成する細胞の機能解析およびウイルス感染実験を行う上で、in vitro ヒト気道モデルは有用なツールである。オルガノイド技術を用いることで、生体内と同じようにヘテロな細胞集団からなる気道オルガノイドを in vitro で再現できることが報告されている (Tata et al., Nature, 2013)。我々も、ゴブレット細胞とクラブ細胞、線毛細胞、基底細胞からなる気道オルガノイドの開発を実施した。気道オルガノイド内腔には線毛構造およびこれらの断面 (9+2 構造) が観察された。これまでに気道オルガノイドを用いて、ウイルスの感染細胞を同定する試みが行われている。しかしながら、呼吸器ウイルスが感染した際の基底細胞の解析をオルガノイドを用いて実施した例はほぼ存在しない。そこで本研究では、気道オルガノイドを用いて、呼吸器ウイルス感染による気道損傷を再現したのち、基底細胞が再生の起点となりうることを証明する実験を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究では、呼吸器疾患を再現できるヒト気道モデルの開発し、基底細胞の役割解明を目指した。ウイルス性呼吸器感染症などにおける基底細胞の挙動を明らかにし、それを自在に制御するためのメカニズム解析を行った。基底細胞とその分化細胞の関係を調べるために、我々が開発した気道オルガノイドを用いた。また、本研究では、ウイルス性呼吸器感染症の撲滅研究において、ウイルス排除ではなく、組織損傷後の組織再生促進の観点で取り組んだ。基底細胞はウイルス非感染細胞であるためにウイルス性呼吸器感染症においてあまり大きな注目は集めてこなかったが、組織再生には大きく寄与できる細胞であると考えた。本研究では、ヒト気道オルガノイドを駆使し、基底細胞の役割を明らかにすることで、ウイルス性呼吸器感染症の理解と制御に貢献することを目指した。

## 3. 研究の方法

生体を忠実に模倣できるヒト気道モデルを開発するために、オルガノイド技術を用いた。基底細胞を豊富に含むヒト初代培養気道上皮細胞をマトリゲルに包埋し、fibroblast growth factor 2 (FGF2)、R-Spondin 1、Noggin 等を含む培地で培養することによって、線毛細胞とゴブレット細胞、クラブ細胞、基底細胞からなる気道オルガノイドを作製した。

作製したヒト気道オルガノイドを用いて、SARS-CoV-2 などによる呼吸器感染症のモデリングを行った。0.1 MOI で SARS-CoV-2 をヒト気道オルガノイドに感染させた。ウイルスの感染成立を確認するために、SARS-CoV-2 Spike 蛋白質の染色を行った。また、感染した細胞の種類を特定するために、線毛細胞 (acetyl- $\alpha$ -tubulin)、ゴブレット細胞 (MUC5AC)、クラブ細胞 (CC10)、基底細胞 (KRT5) のマーカー蛋白質との共染色を行った。さらに、ウイルス複製と子孫ウイルス放出を確認するために、培養上清中に放出されたウイルスゲノムの定量およびタイトレーションを行った。これらの実験によりウイルスの感染効率を評価した。

SARS-CoV-2 に暴露したヒト気道オルガノイドにおける基底細胞の挙動を解析した。まず、ウ

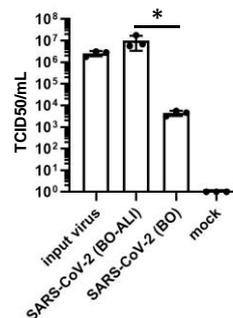
ウイルス感染後に KRT5 陽性率を測定し、基底細胞の残存率を評価した。基底細胞における Ki67 陽性率を測定することで増殖能を有する基底細胞の割合を評価した。レムデシビルなどの抗ウイルス薬を使用することにより、SARS-CoV-2 を排除したのち、経時的に基底細胞と分化細胞の割合を解析した。これにより、ウイルス排除後の組織修復が基底細胞の増殖と分化が中心となって行われていることを確かめた。以上の解析により、重度の気道損傷時に基底細胞が組織修復に重要な役割を担うことを明らかにすることを試みた。

基底細胞の増殖と分化が活性化する期間で産生量が増えるサイトカインや増殖因子の特定を行った。各種サイトカインや増殖因子の産生量や発現量の解析を通して、基底細胞の挙動と相関するサイトカインを同定することを試みた。基底細胞の増殖と分化を制御するサイトカインや増殖因子の機能解明を行うために、着目するサイトカインや増殖因子の組換え蛋白質を基底細胞に作用した。以上により、基底細胞の増殖と分化における着目するサイトカインや増殖因子の機能を解明した。その後、当該サイトカインや増殖因子を用いてウイルス排除後の気道組織再生を促進できるか検討した。SARS-CoV-2 を感染させたヒト気道オルガノイドにおいて、サイトカインおよび増殖因子による気道の組織修復効果を検証した。

#### 4. 研究成果

生体を模倣できるヒト気道モデルを開発するために、オルガノイド技術を用いた。基底細胞をマトリゲルに包埋し、FGF2、R-Spondin 1、Noggin 等を含む培地で培養することで、線毛細胞とゴブレット細胞、クラブ細胞、基底細胞からなるヒト気道オルガノイドを作製した。作製したヒト気道オルガノイドを用いて、COVID-19 のモデリングを行った。SARS-CoV-2 をヒト気道オルガノイドに感染させた。しかしながら、気道上皮細胞の頂端面がオルガノイドの内腔に配置された状態ではウイルスの感染効率が低かったため、気道オルガノイドの気液界面培養を行うことによって感染効率を改善させた (図 1)。その結果、SARS-CoV-2 Spike 蛋白質陽性となる細胞が多数確認されるようになった。したがって、ヒト気道オルガノイドを SARS-CoV-2 感染実験に用いるためには、気液界面培養などを行うことによって、気道上皮細胞の頂端面にウイルスが暴露されやすい状況を作る必要があることが示唆された。

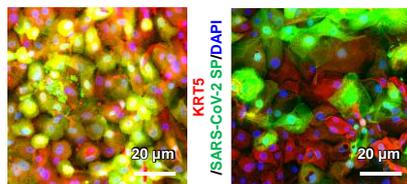
図 1



The amount of infectious virus in the supernatant of infected BO or BO-ALI was measured by the TCID50 assay. (Commun Biol. 2022 May 30;5(1):516.を改変して掲載。)

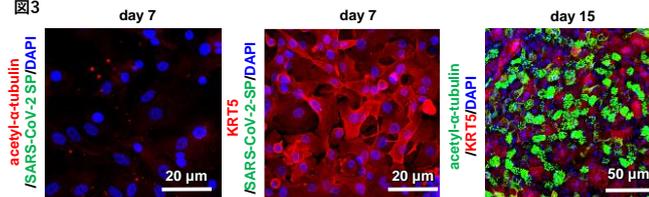
SARS-CoV-2 が感染した細胞の種類を特定するために、線毛細胞、ゴブレット細胞、クラブ細胞、基底細胞のマーカールとの共染色を行ったところ、ウイルスは acetylated  $\alpha$ -tubulin 陽性の線毛細胞に感染しやすいことを見出した (図 2)。一方で、KRT5 陽性の基底細胞にはほとんどウイルスは感染していなかった (図 2)。さらに、SARS-CoV-2 に暴露したヒト気道オルガノイドにおける基底細胞の挙動を解析した。SARS-CoV-2 感染後、線毛細胞はウイルス感染により死滅する一方で、KRT5 陽性の基底細胞が生存していた (図 3)。残存した基底細胞は acetylated  $\alpha$ -tubulin 陽性の線毛細胞を含む気道上皮細胞に分化可能であった (図 3)。したがって、ウイルス排除後の組織修復が基底細胞の増殖と分化が中心となって行われていると考えられる。

図 2



(left) Immunofluorescence analysis of SARS-CoV-2 Spike protein (SP) (green) and acetylated  $\alpha$ -tubulin (red) in uninfected BO-ALI 2 days after the infection. (right) Immunofluorescence analysis of SARS-CoV-2 SP (green) and KRT5 (red) in uninfected BO-ALI 2 days after the infection. (Commun Biol. 2022 May 30;5(1):516.を改変して掲載。)

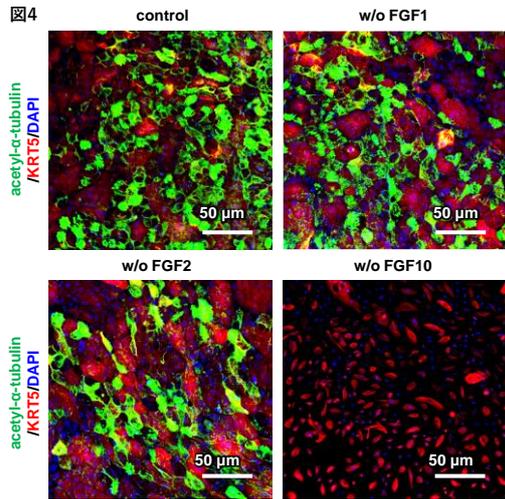
図 3



(right) Immunofluorescence analysis of SARS-CoV-2 SP (green) and acetylated  $\alpha$ -tubulin (red) in infected BO-ALI 7 days after the infection. (middle) Immunofluorescence analysis of SARS-CoV-2 SP (green) and KRT5 (red) in infected BO-ALI 7 days after the infection. (left) Immunofluorescence analysis of KRT5 (red) and acetylated  $\alpha$ -tubulin (green) in BO-ALI 15 days after the infection. (Commun Biol. 2022 May 30;5(1):516.を改変して掲載。)

基底細胞の増殖と分化が活性化する期間で産生量が増えるサイトカインあるいは増殖因子を探索したところ、FGF10 を候補因子として選定することが出来た。基底細胞の増殖と分化における FGF10 の機能解明を行うために、FGF10 を含まない培地で感染したヒト気道オルガノイドの培養を行った。FGF10 を除去することにより、気道上皮細胞の再生が障害されることを確認した (図 4・次項)。したがって、FGF10 を用いた気道組織再生は、重症呼吸器感染症の治療法の一つになる可能性を秘めていることが分かった。

図4



Immunofluorescence analysis of acetylated  $\alpha$ -tubulin (green) and KRT5 (red) 15 days after the infection.  
(Commun Biol. 2022 May 30;5(1):516.を改変して掲載。)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Sano E, Suzuki T, Hashimoto R, Itoh Y, Sakamoto A, Sakai Y, Saito A, Okuzaki D, Motooka D, Muramoto Y, Noda T, Takasaki T, Sakuragi JI, Minami S, Kobayashi T, Yamamoto T, Matsumura Y, Nagao M, Okamoto T, Takayama K.	4. 巻 30
2. 論文標題 Cell response analysis in SARS-CoV-2 infected bronchial organoids.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun Biol.	6. 最初と最後の頁 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03499-2	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 Hashimoto R, Tamura T, Watanabe Y, Sakamoto A, Yasuhara N, Ito H, Nakano M, Fuse H, Ohta A, Noda T, Matsumura Y, Nagao M, Yamamoto T, Fukuhara T, Takayama K.	4. 巻 20
2. 論文標題 Evaluation of Broad Anti-Coronavirus Activity of Autophagy-Related Compounds Using Human Airway Organoids.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mol Pharm.	6. 最初と最後の頁 2276-2287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.3c00114	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 Hashimoto R., Sakamoto A., Deguchi S., Yi R., Sano E., Hotta A., Takahashi K., Yamanaka S., Takayama K.	4. 巻 26
2. 論文標題 Dual inhibition of TMPRSS2 and Cathepsin B prevents SARS-CoV-2 infection in iPS cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Ther Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 1107-1114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2021.10.016.	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 Sano E., Deguchi S., Sakamoto A., Mimura N., Hirabayashi A., Muramoto Y., Noda T., Yamamoto T., Takayama K.	4. 巻 24
2. 論文標題 Modeling SARS-CoV-2 infection and its individual differences with ACE2-expressing human iPS cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102428.	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15件（うち招待講演 15件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高山和雄
2. 発表標題 オルガノイドと臓器チップを用いた感染症研究のためのモデル開発
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高山和雄
2. 発表標題 呼吸器オルガノイドを用いたCOVID-19の病態解明と創薬
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高山和雄
2. 発表標題 臓器チップ技術を用いた機能性細胞の開発と感染症創薬研究への応用
3. 学会等名 日本組織培養学会 第94回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山和雄
2. 発表標題 オルガノイド技術や臓器チップ技術を用いた感染症創薬研究
3. 学会等名 iSeminar（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山和雄
2. 発表標題 オルガノイドおよび臓器チップを用いた感染症研究の最前線
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山和雄
2. 発表標題 感染症創薬のための仮想人体モデルの開発
3. 学会等名 大阪大学微生物病研究所アドバンスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山和雄
2. 発表標題 気道オルガノイドを用いたCOVID-19における炎症と組織再生の理解と制御
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山和雄
2. 発表標題 呼吸器感染症研究への応用を目指した気道オルガノイドやiPS細胞を用いたin vitro評価系の構築
3. 学会等名 日本動物細胞工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山和雄
2. 発表標題 感染症創薬のための呼吸器オルガノイドの開発研究の現状と課題
3. 学会等名 第59回日本人工臓器学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山和雄
2. 発表標題 幹細胞と臓器チップを用いた新型コロナウイルス研究
3. 学会等名 日本薬理学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山和雄
2. 発表標題 呼吸器オルガノイドの開発とCOVID-19創薬への応用
3. 学会等名 第40回サイトプロテクション研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山和雄
2. 発表標題 オルガノイドや臓器チップを用いた高次in vitro評価系の構築と感染症創薬への応用
3. 学会等名 第97回日本感染症学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高山和雄
2. 発表標題 オルガノイドと臓器チップを用いた新型コロナウイルス研究
3. 学会等名 日本遺伝学会第95回大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高山和雄
2. 発表標題 MPSを活用した新興再興感染症の病態解明研究と創薬研究
3. 学会等名 CBI学会2023年大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高山和雄
2. 発表標題 MPS技術の活用による感染症創薬の新展開
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会 第36回大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 出口清香、高山和雄	4. 発行年 2023年
2. 出版社 日本薬理学雑誌	5. 総ページ数 6
3. 書名 オルガノイドを用いた呼吸器疾患研究の最前線	

1. 著者名 出口清香、高山和雄	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 141
3. 書名 いま知りたい!!!「真の生理学性に挑む organ-on-a-chip」実験医学2021年10月号	

1. 著者名 出口清香、高山和雄	4. 発行年 2021年
2. 出版社 和光純薬時報 Vol.89 No. 4	5. 総ページ数 3
3. 書名 ヒトiPS細胞やオルガノイドを用いたSARS-CoV-2研究	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 呼吸器オルガノイドの製造方法	発明者 高山和雄、岡本徹	権利者 国立大学法人京都大学、国立大学法人大阪大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/ 19593	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 呼吸器オルガノイドの製造方法	発明者 高山和雄、岡本徹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/ 19593	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

気管支オルガノイドを用いた新型コロナウイルス研究とその創薬応用 <a href="https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/220530-180000.html">https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/220530-180000.html</a> COVID-19治療薬開発のためのオートファジー関連化合物スクリーニング <a href="https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/230324-090000.html">https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/230324-090000.html</a>
---

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------