

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06421

研究課題名（和文）牛の動物実験に代わる画期的な研究ツールの開発

研究課題名（英文）Establishment of bovine intestinal organoid

研究代表者

鈴木 亨（SUZUKI, Tohru）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・上級研究員

研究者番号：10362188

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究で樹立した牛腸管オルガノイドは遺伝学的および組織形態学的解析を通じて生体の腸管構造と類似した3次元組織体を形成すると共に、連続継代しても自己複製能力が維持されていることを明らかにした。加えて、培養細胞での分離が困難であった牛コロナウイルスや牛ロタウイルスに対して、本来の自然宿主に由来する本オルガノイドを用いることで、それらを効率的に分離できることを明らかにした。これらの事実は、本オルガノイドが実施困難な動物実験に代わって消化器病ウイルスの感染・発病メカニズムを解明する上で有用な研究ツールとなることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で樹立した牛腸管オルガノイドは動物実験と異なり特殊な施設並びに多大な労力や時間を必要とせず、実験室内で牛消化器病ウイルスの感染動態を観察・解析することが可能である。そのため、他の動物種に比べて遅れている当該分野の研究を一気に加速化させる有用な研究ツールとなる。また、これまで適した培養細胞がないために困難であった牛消化器病ウイルスの分離を飛躍的に向上させる。さらに、本研究ツールの開発は社会的関心が高まる3Rの原則に合致しており、動物福祉などの社会一般の公共福祉に大きく貢献する。

研究成果の概要（英文）：This study attempted to establish a new system of experimental infection instead of infection of bovine enteroviruses into animals. For this aim, my work established bovine intestinal organoid that can be self-replicated throughout multiple passages and differentiated into various types of cells construct intestine. Subsequently, my work also demonstrated that bovine enteroviruses can be effectively cultivated and maintained in the bovine intestinal organoid originated from the natural host. The establishment of bovine intestinal organoid will provide an effective tool to elucidate infection mechanism of bovine enteroviruses and an advance of this research field.

研究分野：ウイルス学

キーワード：腸管オルガノイド 牛 消化器病ウイルス ウイルス分離

1. 研究開始当初の背景

家畜の下痢は発育や体調管理の阻害要因となっているばかりでなく、生産活動と直結するため看過することはできない。家畜に下痢などの消化器病を引き起こす原因の大半はウイルスであり、ウイルスを制御あるいは感染予防するためには、ウイルスの性状把握と感染・発病メカニズムなどを知ることが重要である。主要家畜である牛の消化器病ウイルスの感染・発病メカニズムを解明する上で動物実験は欠かせないが、コスト、労力および施設の問題に加え、社会環境の変化から牛を用いた動物実験の実施は困難であり、これに代わる研究ツールの開発が急務の課題である。

2. 研究の目的

他の動物種に比べて研究が遅れている牛の消化器病ウイルスについて、その研究を飛躍的に進展させるために、国内外でまだ報告がない牛腸管オルガノイドの樹立を試み、さらにそれを用いたウイルス実験感染系を確立することで牛の感染実験に代わる画期的な研究ツールを開発する。

3. 研究の方法

腸管オルガノイドを樹立するためには、腸管上皮幹細胞を *in vitro* で培養することが不可欠である。牛より採取した腸管上皮幹細胞に対して、4つの必須因子に別の制御因子を加えた組合せを検討して、牛腸管オルガノイドの培養に最適な条件を決定した。得られた牛腸管オルガノイドを最適条件下で連続して10代継代した後、それらを対象に遺伝学的および組織形態学的解析を通じて自己複製能並びに多分化能を検証した。

樹立した腸管オルガノイドに対して、牛消化器病ウイルス（牛コロナウイルスや牛ロタウイルスなど）を感染させた後、継時的に腸管オルガノイドを採取して、リアルタイム RT-PCR などを用いてウイルスの増殖を観察・解析し、*in vitro* 実験感染系としての有用性を検証した。

4. 研究成果

腸管オルガノイドを樹立するにあたり、腸管上皮幹細胞を *in vitro* で培養するためには従来の4つの必須因子に新たに3つの制御因子を加えた組合せが最適であることを明らかにした。

樹立した牛腸管オルガノイドはその最適培養条件下で連続して10代継代しても培養が維持されること、加えて連続継代の前後で各種マーカー遺伝子の発現プロファイルが同一であったことから、自己複製能が維持されていることを実証した。また、連続して10代継代した腸管オルガノイドについて、腸管上皮細胞を構成する細胞（吸収上皮細胞、杯細胞、内分泌細胞など）に対する特異抗体を用いて組織形態学的解析を実施した結果、すべての細胞の存在を確認したことから、樹立した牛腸管オルガノイドは多分化能を有していることを実証した。

牛腸管オルガノイドに対して牛コロナウイルスおよび牛ロタウイルス複数株（一部野外検出材料を含む）を接種した後、経時的に牛腸管オルガノイドを含む培養上清を回収して、リアルタイム RT-PCR を用いてウイルスの増殖を定量解析した。その結果、野外検出材料を含むほとんどすべての株が牛腸管オルガノイドにおいて顕著な増殖を示したことから、牛腸管オルガノイドは牛消化器病ウイルスを効率よく分離できることを明らかにした（図）。

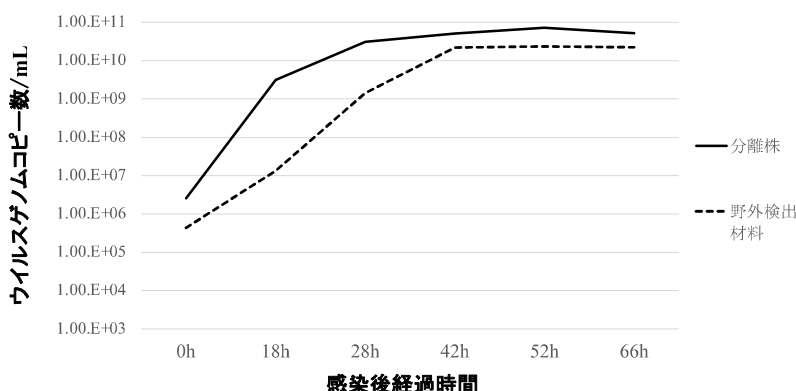


図 牛腸管オルガノイドにおける牛コロナウイルスの増殖

本研究を通じて樹立した自然宿主に由来する牛腸管オルガノイドは従来の培養細胞に代わって牛消化器病ウイルスの効率的な分離を可能とすると共に、今後実施が困難となる動物実験に代わって牛消化器病ウイルスの感染・発病メカニズムを解明する上で有用な研究ツールとなりうることを証明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 亨
2. 発表標題 牛消化器病ウイルスの新たなin vitro実験感染系の確立
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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