

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21520

研究課題名(和文) ウイルスの宿主特異性の変化を再現する流体デバイスシステム開発

研究課題名(英文) Development of microfluidic device for recapitulation of viral tropism change

研究代表者

田川 陽一 (Tagawa, Yoh-ichi)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：70262079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：進行性多巣性白質脳症(PML)は、原型JCウイルスがPML型へ変異し、アストロサイトやオリゴデンドロサイトに感染・増殖することにより発症するとされている。これまで、SV40T抗原が発現している細胞株のみにJCウイルスの感染・増殖が可能であったが、本研究では、ヒトiPS細胞からアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトを各々分化誘導し、PML型JCウイルスの感染・増殖に成功した。PML型JCウイルスは、アストロサイトよりもオリゴデンドロサイト内での増殖が非常に高いことが分かった。さらに、原型からPML型ウイルス変異をトラップできるウイルス感染のための流体デバイスの開発にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AIDSによる免疫不全や移植医療による免疫抑制剤投与の増加に伴い、JCウイルスの体内での増殖によるPML発症総数も上昇していることが問題となっており、抗JCウイルス薬の開発は喫緊の課題となっている。細胞培養系でのJCウイルス感染の細胞培養ではSV40 T抗原が必要であり、抗JCウイルス薬の候補薬剤はSV40のT抗原を阻害している可能性が強く疑われる。我々が開発したSV40 T抗原非依存である、ヒトiPS細胞からのアストロサイトやオリゴデンドロサイトにJCウイルスが効率よく感染・増殖することは抗JCウイルス薬のスクリーニングや発症抑制機序の解明に大いに有用である。

研究成果の概要(英文)：Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) is considered to be caused by the genome mutation of archetype to PML-type JC virus to acquire the potential to infect with astrocytes and oligodendrocytes in brain tissue. So far, SV40 T antigen-producing cell lines only have been infectable with JC viruses, but here we succeeded to be establish SV40 T antigen-independent culture system of JC virus infection by the differentiation of human iPS cells to astrocytes and oligodendrocytes. PML-type JC virus could infect human iPS cell-derived oligodendrocytes significantly higher than astrocytes. Furthermore, we succeeded to develop a microfluidic device for JC virus infection.

研究分野：ウイルス学、再生医学、流体デバイス

キーワード：JCウイルス iPS細胞 オリゴデンドロサイト アストロサイト 原型 PML

1. 研究開始当初の背景

JC ウイルス(JCV)は進行性多巣性白質脳症(PML)の原因ウイルスである。JCV は人間の 8 割以上で腎臓等に潜伏感染しているが、無症候のために注目されることがなく、JCV 研究は立ち遅れていた。しかしながら、最新医療である免疫抑制剤投与や抗体療法による免疫力低下が潜伏感染していた JCV の増殖を招き、近年、PML の発症率を上昇させる懸念が生じている。SV40 T 抗原産生細胞株のみで JCV の感染・増殖が可能であったため、抗 JCV 薬の作用機序において、JCV T 抗原ではなく SV40 T 抗原に作用している可能性が考えられていた。そこで、抗 JCV 薬の開発のために、SV40 T 抗原に依存しない JCV 感染増殖できる細胞培養系が望まれている。

また、ゲノム解析により、無症候型(原型)JCV と PML 型 JCV では調節領域に違いがあることが確認されている。つまり、PML 型への変異が腎臓から神経組織へとトロピズムの変化を引き起こしたと考えられるが、トロピズム変化のモデルが確立されていないために実証は困難であった。このトロピズム変化を細胞培養系で再現できることも PML 治療薬のスクリーニングには必須である。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、JCV が原型から PML 型変異によるグリア細胞群(アストロサイトやオリゴデンドロサイト)への感染トロピズム変化を培養系で実現し、PML 発症機序を明確にすることによる創薬へつなげることである。そこで、まずは、PML 型 JCV の SV40 T 抗原感染培養系を確立するために、ヒト iPS 細胞から効率よくアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトを各々個別に分化誘導し、JCV の感染・増殖系を確立する。さらには、JCV のゲノム変異とアストロサイトやオリゴデンドロサイトへの蓄積となるような動的な様子を観察できるマイクロ流体デバイスの開発をおこなう。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞から安定かつ効率的にグリア細胞群への分化誘導のために、ヒト iPS 細胞から神経幹細胞に一旦分化誘導し、凍結保存、解凍後に神経幹細胞としての分化能力を維持した再増殖を確認した上で、アストロサイトとオリゴデンドロサイトを個別に分化誘導する手法を増殖因子や細胞接着スキャフォールドについて検討した。分化誘導の確認は、アストロサイトまたはオリゴデンドロサイト特異的な形態、特異的抗原による免疫染色、RT-PCR 法による特異的遺伝子発現によりおこなった。

持続感染細胞である COS-1MRb 細胞から PML 型 JCV を調製し、ヒト赤血球凝集反応(HA)法によりウイルス力価(HA unit/mL)を計測した。一定のウイルス力価で PML 型 JCV をヒト iPS 細胞由来のアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトに感染させ、ウイルスゲノム DNA 量は TaqMan リアルタイム PCR により定量し、培地中のウイルス増殖は HA 法により計測した。また、ウイルスの感染状態は、抗 JCV VP1 モノクローナル抗体を用いて免疫染色法により確認をおこなった。

流体デバイスは、培地流路の圧の上限に達するとマイクロペリスタポンプが停止するようにしたポリジメチルシロキサン(PDMS)の構造体によるデバイスを設計した。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞から神経幹細胞でいったん凍結保存し、解凍後に再増殖して、グリア細胞群へ分化誘導する系を確立した。この手法により、安定的にグリア細胞群を供給することが可能となった。さらに、このヒト iPS 細胞由来神経幹細胞から、増殖因子を含む適切な培地や細胞接着スキャフォールドを選定し、アストロサイトとオリゴデンドロサイトへ個別に分化誘導する系も確立した。分化細胞は形態、特異的抗原による免疫染色、RT-PCR 法による特異的遺伝子発現により確認を行った。

これまで、SV40T 抗原が発現している細胞株のみに JC ウイルスの感染・増殖が可能であったが、本研究では、SV40T 抗原を産生しないヒト iPS 細胞由来のアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトにおいて、PML 型 JC ウイルスの感染・増殖に成功した。PML 型 JC ウイルスは、アストロサイトよりもオリゴデンドロサイト内での増殖が非常に高いことが分かった。さらに、原型から PML 型ウイ

ルス変異をトラップできるウイルス感染のための流体デバイスの開発にも成功した。

AIDSによる免疫不全や移植医療による免疫抑制剤投与の増加に伴い、JCウイルスの体内での増殖によるPML発症総数も上昇していることが問題となっており、抗JCウイルス薬の開発は喫緊の課題となっている。細胞培養系でのJCウイルス感染の細胞培養ではSV40 T抗原が必要であり、抗JCウイルス薬の候補薬剤はSV40のT抗原を阻害している可能性が強く疑われる。我々が開発したSV40 T抗原非依存である、ヒトiPS細胞からのアストロサイトやオリゴデンドロサイトにJCウイルスが効率よく感染・増殖することは抗JCウイルス薬のスクリーニングや発症抑制機序の解明に大いに有用である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Emiko Shimbo, Souichi Nukuzuma, Yoh-ichi Tagawa	4. 巻 553
2. 論文標題 Human iPS cell-derived astrocytes support efficient replication of progressive multifocal leukoencephalopathy-type JC polyomavirus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 983-987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.09.117	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 Miho Tamai, Yoichi Fujiyama, Yoh-ichi Tagawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Hepatocytes and endothelial networks in a fluid-based in vitro model of liver drug metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Engineering part A	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEA.2020.0226	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14件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田川陽一
2. 発表標題 哺乳類の合成生物学を目指したマイクロ流体デバイス技術
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津田南美、進藤寛将、中澤杜浩、小島菜、藤山陽一、小関英一、玉井美保、長岡紀幸、田川陽一
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた細胞-細菌共培養系の構築
3. 学会等名 第6回デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 QI ZHEN, 玉井美保、今西未来、田川陽一
2. 発表標題 薬物スクリーニングのための“時計”をもつ肝組織モデルの構築
3. 学会等名 第6回デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚本昂大、佐藤敦紀、田川陽一
2. 発表標題 iPS細胞から分化誘導した肝細胞と類洞内皮細胞による肝組織構築の試み
3. 学会等名 第6回デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 JinHo Hong, Taiki Satoh, Yoh-ichi Tagawa
2. 発表標題 In vitro liver tissue model of human iPS cell derived hepatocytes and HUVEC networks
3. 学会等名 第6回デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小畑美貴、大田拓穂、玉井美保、田川陽一
2. 発表標題 マウスES細胞・TS細胞を用いた胚盤胞モデルの構築
3. 学会等名 第6回デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Muquan Qiu, Kazuma Takahashi, Zhen Qi, Emiko Shimbo, Yoh-ichi Tagawa
2. 発表標題 脱細胞材料を用いた 胚性幹細胞から神経組織への分化誘導法 の開発およびその生化学的応用
3. 学会等名 第6回デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田川陽一
2. 発表標題 組織工学とマイクロ流体デバイス技術を用いた哺乳類の合成生物学
3. 学会等名 免疫毒性学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島 菜 中澤杜浩 進藤寛将 玉井美保 藤山陽一 小関英一 米田恭子 長岡紀幸 田川陽一
2. 発表標題 腸内細菌と腸管上皮細胞の共培養マイクロ流体デバイスの開発
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奴久妻 聡一、真保 恵美子、田川 陽一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来のアストロサイトはPML型JCポリオーマウイルスを効率よく複製させる
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳 治平、真保 恵美子、奴久妻 聡一、田川陽一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からグリア細胞への分化誘導とPML型JCウイルスの感染
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陳 治平、真保 恵美子、奴久妻 聡一、田川陽一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からグリア細胞への分化誘導とPML型JCウイルスの感染
3. 学会等名 第7回デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田川陽一
2. 発表標題 ウイルスやバクテリアと共存できる組織マイクロチップ
3. 学会等名 第2回BVAバイオインターフェース
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 CHEN ZHIPING、奴久妻 聡一、小野木 博、田川 陽一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来オリゴデンドロサイト様細胞におけるPML型JCポリオーマウイルスの感染・増殖
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会
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
---------	---------