

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08496

研究課題名（和文）腸管オルガノイドのヒトノロウイルス感受性に関与する因子の同定

研究課題名（英文）Identification of host factors of intestinal organoids involved in human norovirus susceptibility

研究代表者

芳賀 慧（Haga, Kei）

北里大学・感染制御科学府・講師

研究者番号：80528373

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒトノロウイルスに感受性があるヒト腸管オルガノイド（HIO）の感染機構について調べた。フコース転移酵素2（FUT2）遺伝子を欠失すると感受性が消失することから、HIOの細胞表面上に特異的に発現している分子が感受性に関与していると推察した。そこで、ウイルス様中空粒子（VLP）に結合する分子を、HIOとFUT2遺伝子をノックアウトしたHIO（HIO-FUT2KO）で網羅的に比較した。また、ヒトノロウイルスが感染したHIOだけを集めて、それらの細胞群で特異的に発現しているタンパク質を網羅的に解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトノロウイルスは、その存在が発見されて以来半世紀ほど、ヒトの体内以外で増やすことができなかった。2016年にHIOを用いて感染複製することが見出されたが、HIOの培養は、取り扱いが通常の細胞培養株に比べ煩雑でありコストも高い。それに加え、ノロウイルスの増殖量も約1000倍程度と増えが悪く、ウイルス研究を行う上では不十分である。よって、HIOのヒトノロウイルス感受性の仕組みを理解することは、これらの問題を解決する糸口となり、より良い培養系の確立につながる。十分なヒトノロウイルスを確保することができる系を作製できれば、ワクチン研究や創薬研究などが可能となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the infectious mechanism of norovirus in human intestinal organoids (HIOs). Since the susceptibility was abolished when the fucosyltransferase 2 (FUT2) gene was deleted in HIOs, we speculated that a molecule specifically expressed on the cell surface of HIOs was responsible for the susceptibility. Therefore, we comprehensively compared the molecules that bind to virus-like particles (VLPs) between HIOs and HIOs with the FUT2 gene knocked out (HIO-FUT2KO). In addition, we collected only HIOs infected with human norovirus and comprehensively analyzed proteins specifically expressed in those cell groups.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ノロウイルス 腸管オルガノイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトノロウイルスは、ウイルス性胃腸炎の最たる原因の一つである。1972年にこのウイルスが発見されて以来、ヒトノロウイルスを細胞培養系で増殖させることは不可能であったが、2016年、腸管オルガノイドを用いた系によりヒトノロウイルスが増殖することが示された。ヒトの腸管の幹細胞由来であるヒト腸管オルガノイド(HI0s)は、多能性を維持したまま *in vitro* で複製増殖することが可能な細胞である。分化誘導した HI0s にヒトノロウイルスを含む便検体を投与することでヒトノロウイルスの感染が成立し、複製することが示されている。従来の培養細胞株では増えず、HI0s で増えることから、HI0s には特別な機構もしくは特異的なレセプターが発現しているものと予想される。

### 2. 研究の目的

ヒトノロウイルスは、細胞表面上に発現している糖鎖抗原、ヒト血液型抗原 (HBGA; Human Blood Group Antigen) に結合することが知られている。この HBGA の細胞表面への発現を決定している遺伝子が FUT2 (Fucosyltransferase 2) であり、この遺伝子が先天的に機能していないヒトは、ヒトノロウイルスによる胃腸炎に高い耐性があることが示されている。実際に FUT2 が機能していない HI0s はヒトノロウイルスに対し非感受性である。この FUT2 は細胞表面上に発現している糖鎖の末端にフコース分子を結合させ、ヒトノロウイルスはそれを認識し細胞表面に結合することができるようになる。しかしながら、FUT2 を非感受性の培養細胞株に発現させても感受性にはならない。これらのことから、HBGA はノロウイルスの細胞表面への接着に関与している分子であり、取り込みに必要な分子は別に存在すると予想される。そこで本研究では、ヒト腸管オルガノイド(HI0s)はなぜヒトノロウイルスに感受性なのかを調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) FUT2 が発現していない HI0s では、感染性が消失することから、糖鎖修飾された膜表面上の分子が感染に必須であると予想した。そこで、VLP を細胞に結合させ、その後 VLP に結合した分子を網羅的に解析した。

(2) 感染感受性細胞に特異的に発現しているタンパク質を網羅的に探索した。GII.4 を感染させた HI0 から感染が成立した細胞のみをセルソーターで分離し、それらの細胞群と非感染細胞群とで発現しているタンパク質を網羅的に比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) VLP 結合タンパク質の網羅的解析

##### FUT2 ノックアウト HI0 細胞の樹立

ヒト小腸由来の腸管オルガノイドの FUT2 遺伝子を CRISPR/Cas9 によってノックアウトした細胞を樹立した(FUT2KO-HI0)。この細胞は、修飾されたフコースを特異的に認識するレクチン(UEA-1)の結合、VLP の結合(図1) GII.4 株の感受性が消失した(図2)。

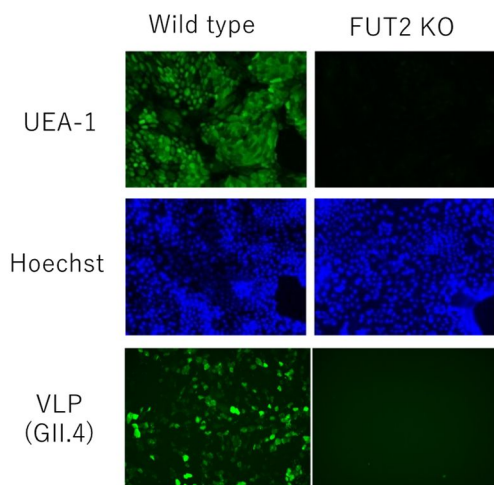


図1: FUT2 KO 細胞における UEA-1 の染色と VLP の結合

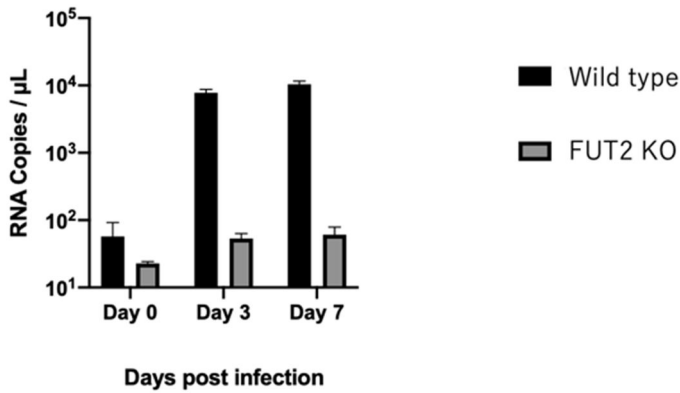


図2：FUT2 KO 細胞のヒトノロウイルス GII.4 株感染感受性の消失

H10 と FUT2KO-H10 に VLP を結合させ、トリプシンで処理することにより、VLP を遊離させ、その VLP を精製し、VLP に結合していたタンパク質を網羅的に質量分析により同定した。H10 から遊離した VLP に特異的に結合していたタンパク質のうち、細胞膜上で発現しており、腸管で特異的に発現しているタンパク質に絞ることで、4 種類の膜タンパク質に着目した。これら選択したタンパク質を、それぞれ CRISPR/Cas9 でノックアウトした H10 を樹立した。しかしながら、樹立した各ノックアウト H10 の GII.4 に対する感受性に変化はなかった。

## (2) 感染細胞の同定

先の結果より、VLP はほぼすべての H10 で結合が観察されたにもかかわらず、GII.4 を感染させると感染が成立している細胞の割合がとても低いことがわかった(図3)。そこで(1)の方法では、本研究の目的を達成することは困難であると判断し、感染が成立した細胞のみを集めて、それらの細胞で特異的に発現しているタンパク質を同定することを試みた。感染が成立した細胞のみを集め、それらの細胞で特異的に発現しているタンパク質を質量分析により同定した。今後同定したタンパク質が GII.4 の感受性に関与しているかどうか検討する。

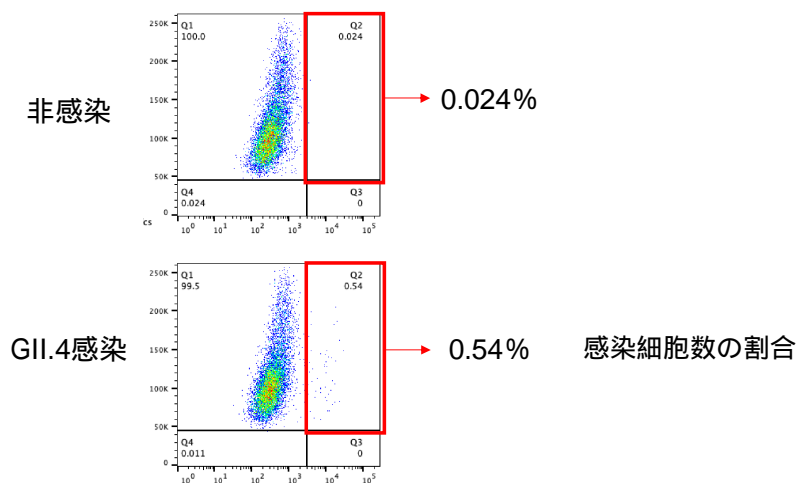


図3：腸管オルガノイドにおける GII.4 株感染感受性を示す細胞の割合

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Lin Shih-Ching, Haga Kei, Zeng Xi-Lei, Estes Mary K.	4. 巻 17
2. 論文標題 Generation of CRISPR-Cas9-mediated genetic knockout human intestinal tissue-derived enteroid lines by lentivirus transduction and single-cell cloning	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 1004 ~ 1027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41596-021-00669-0	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 該当する
1. 著者名 Torii Shotaro, Miura Fuminari, Itamochi Masae, Haga Kei, Katayama Kazuhiko, Katayama Hiroyuki	4. 巻 55
2. 論文標題 Impact of the Heterogeneity in Free Chlorine, UV254, and Ozone Susceptibilities Among Coxsackievirus B5 on the Prediction of the Overall Inactivation Efficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 3156 ~ 3164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.0c07796	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 芳賀慧 戸高玲子 片山和彦	4. 巻 50
2. 論文標題 腸管由来オルガノイドを用いたヒトノロウイルス研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床とウイルス	6. 最初と最後の頁 60-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Ishiyama Ryoka, Yoshida Kazuhiro, Oikawa Kazuki, Takai-Todaka Reiko, Kato Akiko, Kanamori Kumiko, Nakanishi Akira, Haga Kei, Katayama Kazuhiko	4. 巻 98
2. 論文標題 Production of infectious reporter murine norovirus by VP2 trans-complementation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Virology	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) 10.1128/jvi.01261-23	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 芳賀 慧
2. 発表標題 Genome wide knockout by CRISPR-Cas9 revealed Human Astrovirus receptor
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 工藤菜 芳賀慧 戸高玲子 中西章 片山和彦
2. 発表標題 The exploration of astrovirus receptor
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 Ryoka Ishiyama, Oikawa Kazuki, Haga Kei, Reiko Takai-Todaka, Kazuhiko Katayama, Nakanishi Akira
2. 発表標題 Production of murine norovirus-based reporter virus.
3. 学会等名 International Calicivirus meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kei Haga, Reiko Takai-Todaka, Ryoka Ishiyama, Azusa Ishikawa, Kana Miyamaoto, Akiko Kato, Kazuhiko Katayama, Akira Nakanishi
2. 発表標題 Neonatal Fc receptor is a functional receptor for human astrovirus
3. 学会等名 International Calicivirus meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kei Haga
2. 発表標題 Neonatal Fc receptor works as a classical human astrovirus receptor
3. 学会等名 The Joint 24th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim of the U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 石川梓、戸高玲子、石山涼翔、芳賀慧、片山和彦
2. 発表標題 ヒトサボウイルス増殖培養系の検討
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮本 華奈, 石山 涼翔, 戸高 玲子, 芳賀 慧, 片山 和彦
2. 発表標題 ヒトアストロウイルス遺伝子型による抗原性とレセプター親和性の比較
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松永 健太郎, 石山 涼翔, 戸高 玲子, 芳賀 慧, 片山 和彦
2. 発表標題 MNV複製増殖機構におけるMNVゲノム上のステムループ構造の機能解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 海田梓乃、三木元博、戸高玲子、石山涼翔、芳賀慧、片山和彦
2. 発表標題 ノロウイルス感染患者の腸管粘膜免疫応答の研究
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会
4. 発表年 2023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
---------	---------