

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19567

研究課題名（和文）CRISPR/Cas系による新型コロナウイルス感染と気道上皮バリア破壊機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of SARS-CoV-2 infection and airway epithelial barrier disruption

研究代表者

大森 孝一（Omori, Koichi）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：10233272

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、新規メカニズムに基づく創薬ターゲットとなりうるタンパク質の同定を目的とし、SARS-CoV-2感染と上皮細胞間バリアの破綻に關与するタンパク質の網羅的探索及び、それを検証するための動物モデルの確立を目指した。しかし、網羅的スクリーニングはほぼ同様の研究が報告された。そこで、より有用で申請者らが得意とする、ヒトiPS細胞由来気道上皮移植ヌードラットを用いたin vivo感染モデルの確立に注力し、結果を論文報告した。また、イメージングマスペクトロメトリー解析によるラット気管及び鼻腔上皮の各組織で特異的に発現するタンパク質の同定をおこない、検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SARS-CoV-2感染のパンデミックは落ち着いたが、変異株による再流行の可能性や同じコロナ属のウイルスによるパンデミックの可能性も考えられる。このようなヒト特異的呼吸器感染症の気道感染モデルとして、ヒト細胞での反応が声帯同様呼吸の気流下で検証できる気管ヒト化動物モデルを用いた感染症モデルは強力なツールとなる。本研究ではその基盤技術を確立した。気管ヒト化動物による感染モデルが確立されれば、感染メカニズムの解析に用いることができ学術的意義は高く、また治療法や治療薬の開発に寄与すると考えられ、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, with the aim of identifying proteins that have potential as drug targets based on novel mechanisms, we aimed to perform the comprehensive screening for proteins involved in SARS-CoV-2 infection and/or in the epithelial barrier disruption, and to establish an animal model to examine the function of proteins discovered in our comprehensive screening. However, a similar study was reported after the start of this project, so we focused on establishing an in vivo infection model using nude rats transplanted with human iPS cell-derived airway epithelium into the trachea. As a result, we generated the infection model using pseudoviruses carrying SARS-CoV-2 spike proteins that express GFP in infected cells. We reported the results of this study as research article. In addition, we identified proteins that show the specific expression in rat tracheal or nasal epithelium by imaging mass spectrometry analysis.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：新型コロナウイルス シュードウイルス ヒトiPS細胞由来気道上皮 免疫不全ラット Spikeタンパク質 COVID-19 モデル動物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

当時、世界的規模で COVID-19 が流行していた。申請者が専門とする耳鼻咽喉科の領域はウイルス感染時の主要な入り口の一つであり、喉頭気管のバリア機能に関する研究を含め、気道上皮の細胞や組織に関する知見や研究経験を豊富に持っている。ウイルス感染には宿主特異性があり、研究にヒト細胞モデルが必要となるが、申請者はすでにヒト iPS 細胞由来気道上皮細胞及びラットへの移植法を確立している。そこで、これらを COVID-19 抑制につなげられればとの発想から本研究構想に至った。

COVID-19 に対し、ワクチンは個々のウイルスにのみ有効であり、突然変異による無効化や、同属ウイルスによる新興感染症には対応できない。そこで適応範囲の広い治療薬の開発が必要であるが、現在試用されている RNA 阻害薬等で確立されたものはない。気道上皮細胞は感染の入り口であり、気道上皮細胞へのウイルス侵入と気道上皮細胞間バリア破綻をブロックすることは重要で、感染や重症化を防御できるのではないかと考えた。そこで感染と上皮細胞間バリアの破綻に関するタンパク質の網羅的探索に挑戦することを考えた。

SARS-CoV-2 の感染過程として、ウイルス外膜の Spike タンパク質が宿主細胞の Furin に切断され、S1 が ACE2 と結合した後、S2 が TMPRSS2 により切断されて膜融合する経路、エンドサイトーシスされ、カテプシンの S2 切断によりエンドソーム膜と融合する経路が報告されている。タンパク質分解酵素阻害剤等も治療薬として研究されているが、様々な組織で TMPRSS2 等の発現量と感染頻度が一致せず co-factor の存在が示唆されるが解明されていない。また SARS-CoV-2 感染による気道上皮細胞間バリア破綻が報告され (Zhu et al., 2020)、E タンパク質 C 末端の PDZ ドメイン結合モチーフと Tight Junction 構成タンパク質 Pals1 の結合の報告もある (Teoh, 2010) が、このモチーフに結合するタンパク質の網羅的解析の報告はなく、本研究でこれらの過程に参与する新規タンパク質同定を目指したいと考えた。

そこで、本研究では近年確立された CRISPR/Cas9 システムによるゲノムワイドなハイスループットノックアウト法等により、SARS-CoV-2 感染の入り口である気道上皮細胞へのウイルス侵入と気道上皮細胞間バリア破綻に関するタンパク質の網羅的探索と機能解析を行い、新たな創薬ターゲットの同定を目指そうと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、新規メカニズムに基づく創薬ターゲットとなりうるタンパク質の同定を目的とし、SARS-CoV-2 感染と上皮細胞間バリアの破綻に関するタンパク質の網羅的探索及び、それを検証するための動物モデルの確立を目指した。具体的には以下の 4 つの項目を研究目的とした。

- (1) CRISPR sgRNA ライブラリを用いた機能欠損スクリーニングによる SARS-CoV-2 感染時ウイルスの細胞内侵入に必要なタンパク質の探索・同定
- (2) Envelope タンパク質 C 末端ペプチド (E ペプチド) を用いた免疫沈降法による、ウイルス感染による上皮バリア破綻の際のターゲットとなるタンパク質の探索・同定
- (3) 網羅的に同定されたタンパク質が細胞内でどのように相互作用しウイルスの細胞内侵入とバリア破壊を実行するのか、ヒト iPS 細胞由来気道上皮の *in vitro*, *in vivo* 結合アッセイ系を用いた解析による新たな治療薬ターゲットの同定
- (4) (1), (2) の同定タンパク質からターゲット絞り込みのため、「気管気道上皮細胞より SARS-CoV-2 感染頻度が多い鼻腔気道上皮細胞でより発現が多く、気道構成細胞の中でも感染細胞種に多く発現している」事を指標とする。そのため、気管及び鼻腔上皮組織のイメージングマスマスペクトロメトリー解析を行い、それぞれの部位でのタンパク質発現データを得る。

### 3. 研究の方法

- (1) CRISPR sgRNA ライブラリを用いた機能欠損スクリーニングによる SARS-CoV-2 感染時ウイルスの細胞内侵入に必要なタンパク質の探索・同定
- (2) Envelope タンパク質 C 末端ペプチド (E ペプチド) を用いた免疫沈降法による、ウイルス感染による上皮バリア破綻の際のターゲットとなるタンパク質の探索・同定

上記 2 項に関しては、ホスト細胞の準備、必要機器の申請、数万遺伝子を対象とした機能欠失型スクリーニングに用いる CRISPR/Cas9 ライブラリを含む kit の選定などを行い、予備検討として各条件の検討などを行った。また、ヒト気道由来細胞であり、SARS-CoV-2 実験にしばしば用いられている Calu3 を入手し、培養条件を整えた。しかしながら、ほぼ同様の研究が報告されてしまい (Jackson CB et al., Nat Rev Mol. Cell Biol 2022)、進捗から言ってもそれを上回る結果を得るのは困難であると考えられた。そこで、より有用で申請者らが得意とする、(3) ヒト iPS 細胞由来気道上皮の *in vitro*, *in vivo* 結合アッセイ系を用いた解析と、(4) イメージングマスマスペクトロメトリー解析によるラット気管及び鼻腔上皮、両組織で特異的に発現す

るタンパク質の同定と検証 に注力することとした。

#### ヒト iPS 細胞由来気道上皮の *in vitro* SARS-CoV-2 感染モデルの確立

*in vivo* 感染モデル作製のための予備検討として、*in vitro* 感染モデルの作製を行った。Spike タンパク質を持ち、感染細胞で GFP を発現するレンチウイルスベースのシュードウイルスを作製したが、高濃度のウイルスを作製することが困難であったため、受託作製に切り替え、高濃度のウイルス液を得た。また、ウイルスが非特異的な感染を起こさないことを確認するため、CRISPR/Cas9 を用いた相同組換えにより、ヒト ACE2 を恒常的に発現する hACE2/HEK293T を作製した。この hACE2/HEK193T と HEK293T を混合した培養を用いてシュードウイルス感染実験を行い感染特異性につき検討した。また、ヒト iPS 細胞から気道上皮細胞を分化誘導し、カルチャーインサート内で ALI 培養した状態でシュードウイルスを用いた感染実験を行った。

#### ヒト iPS 細胞由来気道上皮の *in vivo* SARS-CoV-2 感染モデルの確立

申請者は、ヒト iPS 細胞由来気道上皮細胞をヌードラット気管に移植した気管ヒト化モデルを確立している。このラットを用い、移植後 2 週間後 で作製・使用したシュードウイルスを気道に噴霧する形で感染させた。感染一週間後に移植部組織を回収し、凍結切片を作製、免疫蛍光染色法にて、生着ヒト細胞であることを示す、抗ヒト核抗体ラベルと、それらの細胞でのシュードウイルスの感染を示す GFP の共陽性が確認されれば *in vivo* 感染成立とする。

イメージングマススペクトロメトリー解析によるラット気管及び鼻腔上皮、両組織で特異的に発現するタンパク質の同定と検証

当初は感染因子探索の際に出てきた候補遺伝子を絞り込む際に、「気管気道上皮細胞より SARS-CoV-2 感染頻度が多い鼻腔気道上皮細胞でより発現が多く、気道構成細胞の中でも感染細胞種に多く発現している」事を指標とするため、気管及び鼻腔上皮組織のイメージングマススペクトロメトリー解析により各上皮細胞でのタンパク質発現のデータを取得する予定であった。感染因子の探索は中止されたが、気道ヒト化モデルラットを用いた *in vivo* 感染モデル作製の際、感染部位に近い気道上皮を移植できれば有用であるため、鼻腔、気道それぞれの遺伝子発現データの取得を進めた。未固定、未包埋のラット鼻中隔及び気管の凍結切片を作製し、マススペクトロメトリー解析を行った。その後、鼻腔、気管の各粘膜で特異的に発現していると考えられるタンパク質につき、*in situ* hybridization と免疫蛍光染色でスクリーニングを行っている。

## 4. 研究成果

#### ヒト iPS 細胞由来気道上皮の *in vitro* SARS-CoV-2 感染モデルの確立

SARS-CoV-2 の Spike タンパク質を持ち感染細胞で GFP を発現するシュードウイルスを、hACE2/HEK293T と HEK293T を混合した培養に感染させ、シュードウイルスの特異性を調べた結果、hACE2 特異的な感染が確認できた。このシュードウイルスをヒト iPS 細胞由来気道上皮細胞を分化誘導し、カルチャーインサート内で ALI 培養した状態で呼吸による感染時と同じく、apical 面からの投与によりシュードウイルスを用いた感染実験を行い、感染細胞を確認した。以上、*in vitro* での感染条件を検討し、*in vitro* SARS-CoV-2 感染モデルを確立した。

#### ヒト iPS 細胞由来気道上皮の *in vivo* SARS-CoV-2 感染モデルの確立

ヒト iPS 細胞由来気道上皮細胞を移植したヌードラット気管に移植後 2 週間後 で作製・使用したシュードウイルスを気道に噴霧する形で感染させた。感染一週間後に移植部組織を回収し、凍結切片を免疫蛍光染色法にて検討した結果、シュードウイルス感染ヒト細胞が確認された。SARS-CoV-2 感染 *in vivo* モデルとして用いるには感染効率はかなり低く、将来的には感染動物内での増殖・感染が可能な、SARS-CoV-2 そのものでの感染実験を試み、より感染効率が高く薬剤効果の検討を行える *in vivo* モデルを確立したいと考えている。

以上の結果をまとめて投稿し、Tissue Engineering PartA に受理された。

イメージングマススペクトロメトリー解析によるラット気管及び鼻腔上皮、両組織で特異的に発現するタンパク質の同定と検証

気管及び鼻腔上皮組織のイメージングマススペクトロメトリー解析により気管、鼻腔の上皮細胞でそれぞれ特異的に発現しているタンパク質を 500 以上同定した。この結果を検証するために免疫蛍光染色を行うと、抗体代が莫大にかかってしまうので、*in situ* hybridization により、RNA レベルでスクリーニングを行うことにした。先行文献なども参考に、20 種類ほどのプローブを作製し、スクリーニングを行っている。本研究終了後は結果を無駄にしないよう、他のプロジェクトにてスクリーニングを続け、将来的には気道上皮の部位別マーカーとしての利用を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashi Yasuyuki, Ohnishi Hiroe, Kitano Masayuki, Kishimoto Yo, Takezawa Toshiaki, Okuyama Hideaki, Yoshimatsu Masayoshi, Kuwata Fumihiko, Tada Takeshi, Mizuno Keisuke, Omori Koichi	4. 巻 30
2. 論文標題 Comparative Study of Immunodeficient Rat Strains in Engraftment of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Airway Epithelia	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 144 ~ 153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEA.2023.0214	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 Kitano Masayuki, Hayashi Yasuyuki, Ohnishi Hiroe, Okuyama Hideaki, Yoshimatsu Masayoshi, Mizuno Keisuke, Kuwata Fumihiko, Tada Takeshi, Kishimoto Yo, Morita Satoshi, Omori Koichi	4. 巻 33
2. 論文標題 Changes in the Proportion of Each Cell Type After hiPSC-Derived Airway Epithelia Transplantation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	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） 10.1177/09636897241228026	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 該当する

1. 著者名 Kitano M, Ohnishi H, Makino A, Miyamoto T, Hayashi Y, Mizuno K, Yamamoto N, Kawai Y, Kaba S, Kojima T, Kishimoto Y, Tomonaga K, Omori K	4. 巻 -
2. 論文標題 An infection model for SARS-CoV-2 using rat transplanted with hiPSC-airway epithelial cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Tissue Eng 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） なし	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	朝長 啓造 (Tomonaga Keizo)  (10301920)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授  (14301)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	水田 匡信 (Mizuta Masanobu) (20777875)	京都大学・医学研究科・助教  (14301)	
研究分担者	宮本 達雄 (Miyamoto Tatsuo) (40452627)	山口大学・大学院医学系研究科・教授  (15501)	
研究分担者	大西 弘恵 (Ohnishi Hiroe) (50397634)	京都大学・医学研究科・研究員  (14301)	
研究分担者	池川 雅哉 (Ikekawa Masaya) (60381943)	同志社大学・生命医科学部・教授  (34310)	
研究分担者	山本 典生 (Yamamoto Norio) (70378644)	京都大学・医学研究科・准教授  (14301)	
研究分担者	岸本 曜 (Kishimoto Yo) (80700517)	京都大学・医学研究科・助教  (14301)	
研究分担者	竹澤 俊明 (Takezawa Toshiaki) (50301297)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・グループ長  (82111)	

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