

## ヒト肺モデルの作製と COVID-19 研究への応用

京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門  
高山 和雄

### 背景

大規模かつ高精度にCOVID-19創薬研究を実施するためには、ヒト呼吸器を忠実に再現した *in vitro*呼吸器モデルが不可欠である。気道オルガノイドおよび肺泡オルガノイドは、生体の呼吸器を忠実に模倣できる優れたツールであるため、COVID-19創薬研究への応用が期待されている。気道オルガノイドは生体の気管支と同様に、線毛細胞、クラブ細胞、ゴブレット細胞、基底細胞から構成されている。しかし、マトリゲルのようなゲルの中で培養されている気道オルガノイドに SARS-CoV-2を感染させても、気管支の管腔側が球体のオルガノイドの内側に沈み込んでいるため、十分な感染効率が達成できない。そこで、気液界面培養 (ALI) を行うことにより、管腔側からのウイルス感染を行うことが可能になる。そこで本研究では、気道オルガノイドを作製したのち、気道オルガノイド由来のALIモデルを開発し、様々なCOVID-19創薬研究が実施できるか検討した。

### 結果

#### 1) 気道オルガノイドはSARS-CoV-2にほとんど感染しない

気道オルガノイドを正常なヒト気管支上皮細胞注6)から分化させた。50  $\mu$ Lのマトリゲルの中には約100個の気道オルガノイドがあり、気道オルガノイドの直径は約100~200  $\mu$ mであった(図1; Commun Biol. 2022 May 30;5(1):516.を改変して掲載)。電子顕微鏡や免疫染色により、作製した気道オルガノイドは生体の気道と同様に、基底細胞、線毛細胞、ゴブレット細胞、クラブ細胞で構成されていた。以上の結果から、ヒト気管支上皮細胞から気道オルガノイドが作製できることが分かった。

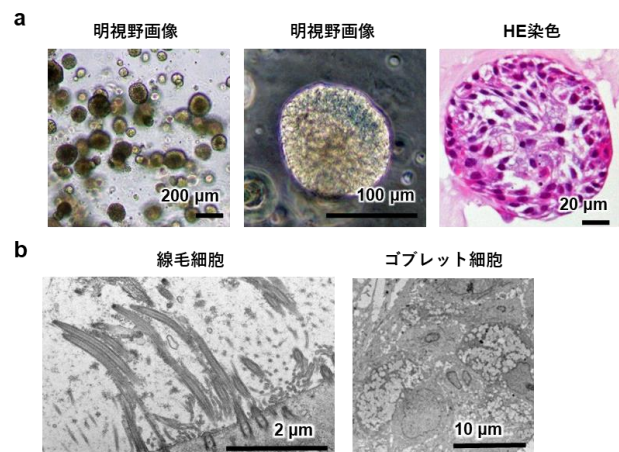


図1：気管支オルガノイド (BO)  
a) BOの明視野画像およびHE染色画像  
b) BOにおける線毛細胞およびゴブレット細胞の電子顕微鏡画像

次に、気道オルガノイドをSARS-CoV-2に感染させたのち、5日間培養した。球状の気道オルガノイドにSARS-CoV-2を感染させた場合と比べて、単細胞にまで分散させた気道オルガノイドにSARS-CoV-2を感染させた方が、ウイルス感染効率が高いことを確認した(図2; Commun Biol. 2022 May 30;5(1):516.を改変して掲載)。球状気道オルガノイドの感染効率が低いのは、SARS-CoV-2が気道オルガノイド内腔にある線毛細胞にアクセスできないためだと予想される。

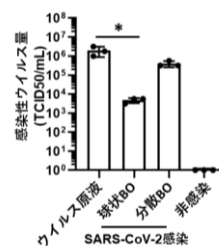


図2: BOを用いたSARS-CoV-2感染実験  
球状および分散させたBO培養上清中の感染性ウイルス量の比較 \* : p<0.05の有意差を示す。

## 2) 気道オルガノイド-ALIはSARS-CoV-2に高効率に感染する

気道の管腔側からのウイルス感染を模倣するために、気液界面培養を用いて、気道オルガノイドでは内側にもぐりこんでいた線毛細胞が外側に並んだ気管支オルガノイド由来の気液界面モデル(気道オルガノイド-ALI)を作製した。気道オルガノイド-ALIおよび気道オルガノイドにSARS-CoV-2を感染させたのち、培養上清中の感染性ウイルス量を測定したところ、気道オルガノイド-ALIの方が気道オルガノイドよりも2,000倍ほど多いことが分かった(図3a; Commun Biol. 2022 May 30;5(1):516.を改変して掲載)。このとき、SARS-CoV-2 Sタンパク質注7)は線毛細胞のみで確認され、基底細胞ではほとんど確認されなかった。これらの結果から、SARS-CoV-2は基底細胞よりも線毛細胞に優先的に感染することが分かった。

ウイルス感染から1週間培養を継続すると、acetylated  $\alpha$ -tubulin陽性線毛細胞およびSARS-CoV-2 Sタンパク質陽性細胞は観察されなかった(図3b; Commun Biol. 2022 May 30;5(1):516.を改変して掲載)。これは、ウイルス感染により線毛細胞が死滅したことを示唆している。一方で、KRT5陽性基底細胞はウイルス感染後1週間後でも生存していた(図3b)。ウイルス感染から15日後、生き残った基底細胞はacetylated  $\alpha$ -tubulin陽性の線毛細胞に分化し、再び気管支上皮細胞層を形成

していた(図3c; Commun Biol. 2022 May 30;5(1):516.を改変して掲載)。これらの結果は、ウイルス感染により破壊された気管支上皮細胞層の再生過程において、基底細胞が重要な役割を果たすことを示唆している。

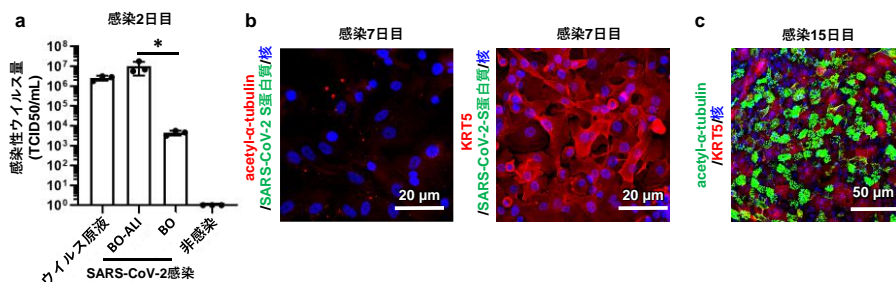


図3: BO-ALIを用いたSARS-CoV-2感染実験

- a) 感染2日後のBOおよびBO-ALI培養上清中の感染性ウイルス量の比較  
b) 感染7日後のBO-ALIにおけるSARS-CoV-2 Sタンパク質、acetylated  $\alpha$ -tubulin、KRT5の発現解析  
c) 感染15日後のBO-ALIにおけるacetylated  $\alpha$ -tubulinおよびKRT5の発現解析 \* : p<0.05の有意差を示す。

## 3) 気道オルガノイド-ALIを用いたCOVID-19治療薬の評価

次に、気道オルガノイド-ALIを使用してCOVID-19治療薬の有効性を評価した。感染した気道オルガノイド-ALIにカモスタット、レムデシビル、モルヌピラビルをそれぞれ作用させたところ、培養上清中の感染性ウイルス量の有意な減少が確認できた(図4a; Commun Biol. 2022 May 30;5(1):516.を改変して掲載)。また、気道オルガノイド-ALIに8種類のSARS-CoV-2のバリエント

(B, B.1, B.1.1.214, B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.1.529)注11)を感染させると、いずれのバリエントについても培養上清中のウイルスゲノム量が経時的に増加していた(図4b; Commun Biol. 2022 May 30;5(1):516. を改変して掲載)。したがって、気道オルガノイド-ALIは、COVID-19治療薬の有効性評価やSARS-CoV-2のバリエントごとの解析研究に使用できる。

## 考察と将来展望

本研究では、SARS-CoV-2研究に使用可能な気道オルガノイドと気道オルガノイド-ALIを開発した。今回開発した気道オルガノイドと気道オルガノイド-ALIは静止した状態で培養されているが、ヒトの体内の呼吸器は、気流によるせん断応力や呼吸による伸縮刺激に常に晒されている。せん断応力や伸縮刺激を人工的に作り出せる臓器チップ(Organs-on-a-chip)技術を用いることにより、気道オルガノイドや気道オルガノイド-ALIの機能をさらに生体に近づけることが可能だと期待される。したがって、本研究で用いたオルガノイド技術に加えて、臓器チップ技術も用いたモデル開発を行うことで、より高度な感染症創薬が実施できるようになると想定される。

本研究では、基底細胞がウイルス感染後の破壊された気管支上皮細胞層の再生に重要な役割を担うことを明らかにし、そのプロセスでFGF10が必須であることも確認した。したがって、FGF10はウイルス感染によって損傷した気管支の再生に有効であることが期待される。また、基底細胞そのものを移植することで、ウイルス感染によって損傷した気管支の再生を促進する可能性が示唆される。しかし、FGF10や基底細胞を用いたCOVID-19の治療法を開発するためには、今後動物モデルを用いたin vivo解析も必須である。

気道オルガノイド-ALIを用いた検討では、気管支上皮細胞層の破壊と再生を再現できたが、気管支炎や炎症細胞浸潤などは模倣できていない。炎症を再現するには、免疫細胞を含むモデルを新規に開発する必要がある。今後、気道オルガノイドや気道オルガノイド-ALIに加えて免疫細胞を含むモデルを構築することにより、炎症の再現および抗炎症薬の開発も可能になると期待される。

## 謝辞

貴研究会のご支援により、研究を迅速かつ効率的に進めることができました。厚く御礼申し上げます。また、本研究遂行にあたりまして、多大なるご支援ご指導を頂きました京都大学iPS細胞研究所・増殖分化機構研究部門・高山研究室のスタッフおよび学生一同、共同研究者の皆様にも重ね重ね御礼申し上げます。

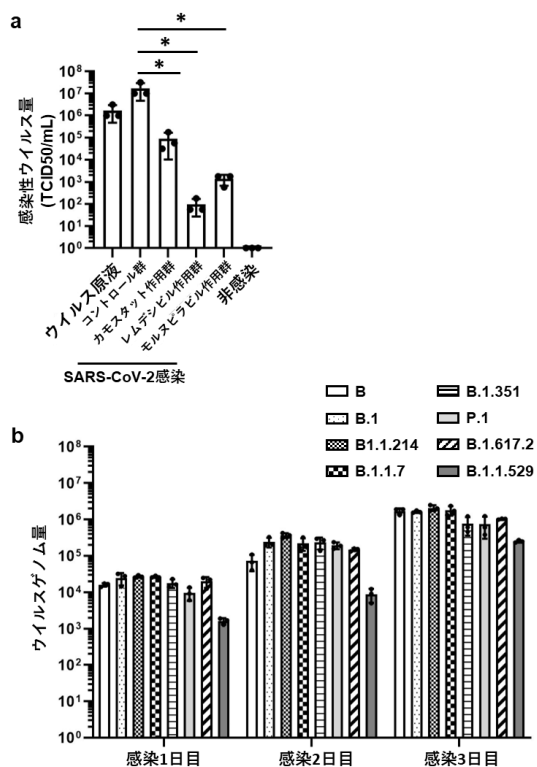


図4：BO-ALIを用いたCOVID-19治療薬の評価  
 a) カモスタット、レムデシビル、モルヌピラビル作用時における感染2日後のBO-ALI培養上清中の感染性ウイルス量の比較 b) 8種類のバリエントのSARS-CoV-2感染時におけるBO-ALI培養上清中のウイルスゲノム量の経時的変化\*：p<0.05の有意差を示す。