

ノロウイルスを用いた培養腸管上皮細胞感染系の確立

分担研究者 佐藤 俊朗 慶應義塾大学医学部 消化器内科 特任准教授

研究要旨 食中毒，下痢症，感染性胃腸炎の原因となるノロウイルスは，腸管上皮細胞に感染すると考えられているが，培養細胞感染系が確立されておらず，その感染メカニズムは明らかでない．我々はヒト腸管上皮細胞の培養技術を世界に先駆けて開発し，この培養技術を用いて，ノロウイルス培養細胞感染系の確立を目指す．

培養ヒト腸管上皮細胞は培養細胞株と異なり，細胞ストレス感受性が極めて高いため，ウイルス感染等の処置に対する抵抗性を示したが，我々は三種のウイルス（レンチ，アデノ，レトロウイルス）の GFP 発現ベクターを用いて，ヒト腸管上皮細胞に対するウイルス感染条件の最適化に成功した．また，ノロウイルス研究者の培養上皮細胞感染系開発のための基盤的な整備を行い，本年度は，ヒト腸管上皮細胞の供与に関する倫理申請の承認を得た上，腸管上皮細胞培養技術，ウイルス感染プロトコルの直接指導などを行った．今後，ノロウイルスの感染系確立への応用が期待される．

A．研究目的

本研究課題であるノロウイルスは，食中毒，下痢症，感染性胃腸炎の原因として有名だが，培養細胞や実験動物への感染がいまだに成功していないウイルスで，ヒトが唯一の感受性動物と考えられている．ヒトの空腸の上皮細胞に感染して繊毛の萎縮と扁平化，さらに剥離と脱落を引き起こして下痢を生じると考えられているが，このような現象がどのようなメカニズムによるものなのかは不明であり，感染拡大を防ぐ有効な手段がないのが現状である．腸管上皮細胞の培養が困難であったため，このようなメカニズムの解明はすすんでいなかった．我々は，2009年に世界で初めてマウス腸管上皮幹細胞培養系の確立を報告し，2011年にはヒト腸管上皮幹細胞の培養系を確立した．本研究では，このヒト腸管上皮幹細胞培養を用い，ノロウイルスの培養細胞感染系を確立することで，治療・予防につなげることを目的とする．

B．研究方法

ヒト腸管上皮粘膜より腸管上皮陰窩を採取し，マトリゲルに包埋し，ヒト腸管上皮幹細胞培養に最適化した培地（Advanced DMEM/F12, EGF, Noggin, R-spondin, A83-01, SB202190, Wnt-3A）により培養を行う．培養により腸管上皮細胞は三次元組織様構造体オルガノイドを形成し，永続的な培養が可能となる．

GFP 発現カセットを有する自己不活型第三世代レンチウイルスベクターより高力価ウイルス上清を作成し，ヒト腸管上皮幹細胞のウイルス感染システムを確立する．当研究室では病原性ウイルスの取り扱いが困難であるため，倫理申請を行った上で，ノロウイルス研究者への培養腸管上皮細胞の供与，培養指導を行い，感染プロトコルの構築に関して宿主側の培養条件のアドバイスを行っていく．

C. 研究結果

これまでにオルガノイドを樹立し、長期培養可能となったヒト腸管（小腸，大腸）上皮培養オルガノイドを用いて検討を行った。

培養に用いるマトリゲルはウイルス粒子の核酸を阻害するため，マトリゲルを酵素処理により除去する必要があった。また，トリプシン処理によって上皮細胞を単細胞化することにより，ウイルス感染効率の改善が確認された。培養ヒト腸管上皮細胞はこのような処置に対して細胞死が誘導されるため，培養培地を最適化を行い，感染細胞の長期培養に成功した。

同様の方法により，GFP 発現アデノウイルス・レトロウイルスの感染も確認し，ウイルス感染プロトコルを確立した。

ノロウイルス感染研究の確立するため，患者由来ヒト腸管上皮オルガノイドを他施設へ提供できるよう，慶應義塾大学医学部において倫理研究計画を申請し，承認を得た（承認番号：20140292）。また，培養技術，最適化されたウイルス感染プロトコルを実際に他施設の本研究事業研究分担者に直接指導を行った。他施設での倫理申請が承認を得て受け入れ基盤が整い次第，オルガノイドの提供を行い，感染系確立に向けた研究をすすめていく。継続的に，培養技術，ウイルス感染プロトコルに関する指導および，培養に必須となる培地成分の提供を行っていく。

D. 考察

ヒト腸管上皮オルガノイドは細胞株と異なり，一般的なウイルス感染処置に対して培養技術の最適化が必要であったが，異なる3種類のウイルスにおいて効率のよい感染が確認できている。今後，ノロウイルスの感染系確立への応用が期待される。

E. 結論

ヒト腸管上皮オルガノイドのウイルス感染系の基盤技術が開発され，実験可能施設への提供準備は整った。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. Modelling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature Medicine*. in press: doi: 10.1038/nm.3802 (2015)
- 2) Oshima H, Nakayama M, Han TS, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, Sato T, Sato H, Taketo MM, Oshima M. Suppressing TGF β Signaling in Regenerating Epithelia in an Inflammatory Microenvironment Is Sufficient to Cause Invasive Intestinal Cancer. *Cancer Res* 75: 766-76 (2015)
- 3) Pin C, Parker A, Gunning AP, Ohta Y, Johnson IT, Carding SR, Sato T. An individual based computational model of intestinal crypt fission and its application to predicting unrestricted growth of the intestinal epithelium. *Integr Biol (Camb)* 7: 213-28 (2015)
- 4) Simmini S, Bialecka M, Huch M, Kester L, van de Wetering M, Sato T, Beck F, van Oudenaarden A, Clevers H, Deschamps J. Transformation of intestinal stem cells into gastric stem cells on loss of transcription factor Cdx2. *Nat Commun* 5: 5728 (2014)
- 5) Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, Sato T, Taketo MM, Nakao K, Clevers H, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R. KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. *Cancer Res* 74: 2882-91 (2014)
- 6) Saigusa K, Hisamatsu T, Handa T, Sujino T, Mikami Y, Hayashi A, Mizuno S, Takeshita K, Sato T, Matsuoka K, Kanai T. Classical Th1 cells obtain colitogenicity by co-existence of ROR γ t-expressing T cells in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 20: 1820-7 (2014)

- 7) Mizuno S, Mikami Y, Kamada N, Handa T, Hayashi A, Sato T, Matsuoka K, Matano M, Ohta Y, Sugita A, Koganei K, Sahara R, Takazoe M, Hisamatsu T, Kanai T. Cross-talk between ROR γ t+ innate lymphoid cells and intestinal macrophages induces mucosal IL-22 production in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 20: 1426-34 (2014)
- 8) Mikami Y, Mizuno S, Nakamoto N, Hayashi A, Sujino T, Sato T, Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Hibi T, Yoshimura A, Kanai T. Macrophages and dendritic cells emerge in the liver during intestinal inflammation and predispose the liver to inflammation. *PLoS One* 9: e84619 (2014)
- 9) Takabayashi K, Kashiwagi K, Kawata T, Sato T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Hibi T, Ogata H, Yahagi N, Kitagawa Y, Shigematsu N, Kanai T. Continuous low-dose irradiation by I-125 seeds induces apoptosis of gastric cancer cells regardless of histological origin. *Cancer Biol Ther* 15: 81-8 (2014).
- 10) Fujii M, Sato T. Culturing intestinal stem cells: applications for colorectal cancer research. *Front Genet* 5:169 (2014)
- 11) Ohta Y, Sato T. Intestinal tumor in a dish. *Front Med (Lausanne)* 1: 14 (2014)

G . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし.
2. 実用新案登録
なし.
3. その他
なし.