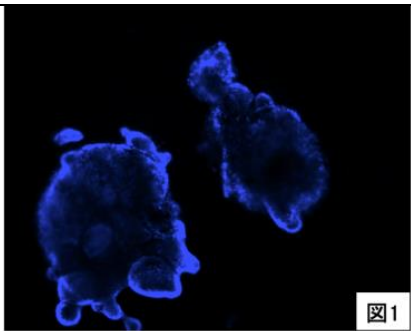


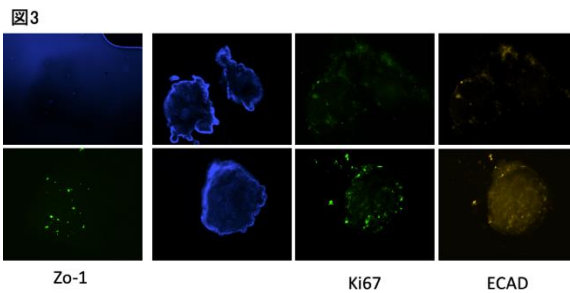
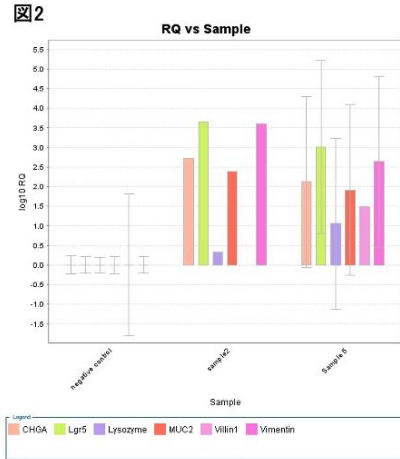
京都府公立大学法人若手研究者・地域未来づくり支援事業研究成果報告書

	(所 属)	(職名・学年)	(氏 名)
研究者 (研究代表者)	消化器内科学	大学院生4年	吉田拓馬
研究の名称	剖検体・内視鏡生検組織からのオルガノイド樹立とオルガノイドを用いた季節性インフルエンザ関連腸炎の発症メカニズム解明		
研究のキーワード	オルガノイド、季節性インフルエンザ、インフルエンザ関連腸炎		
研究の概要	<p>季節性インフルエンザA型/B型ウイルス (IAV/IBV) 感染症は上気道の感染を起こし、上気道症状・発熱・倦怠感などの症状が引き起こされる。一方で腹痛・嘔吐・下痢などの腹部症状を認める症例がみられ、IAV/IBVの腸管感染の可能性が示唆されている。以前にIAV/IBV感染者の便からウイルスRNAが検出されること、IAV感染後腸炎症例の大腸粘膜組織内にIAV抗原陽性細胞が認められることを報告した。ヒト結腸癌細胞株 (Caco2) とヒト小腸・大腸初代細胞を用いたIAV/IBVの感染実験では高効率での感染が示された。またシアル酸レセプターの解析も行い感染機序の解明を進めた。in vivoでの実験としてマウスにIAVを経口投与を行い感染実験を行なったが腸管感染はほぼ認めなかった。そこで腸管上皮細胞の三次元培養により腸オルガノイドを樹立した上で、IAV/IBVの感染実験とシアル酸解析を行うことを目的とした。</p>		
研究の背景	<p>米国疾病予防センター (CDC) によると、2019-20年の米国における季節性インフルエンザA型/B型ウイルス (IAV/IBV) 感染症での死亡者数は2020年3月末時点で2万3千人を超えており、猛威を奮っている感染症の一つである。IAB/IBV感染症患者で下痢や腹痛、嘔吐の症状を呈する症例がある。我々は、これまでにIAV/IBV患者の便の臨床検体からウイルスRNAを検出することを示しており、また大腸粘膜組織内にIAV抗原陽性細胞が認められることを示し、季節性インフルエンザが腸管粘膜に感染しうることを示した。そこで感染機序の解明を行うためにヒト結腸腺癌細胞とヒト小腸・大腸初代細胞を用いた感染実験と細胞のウイルスレセプターであるシアル酸の解析を行なった。マウスを用いたin vivoでの実験を行ったが感染を示すことはなかったために、よりヒトの生体環境に近い環境での感染実験を行うことが求められており、そのためオルガノイドを用いてIAB/IBVの腸管感染のメカニズムの解明を行うこととした。</p>		

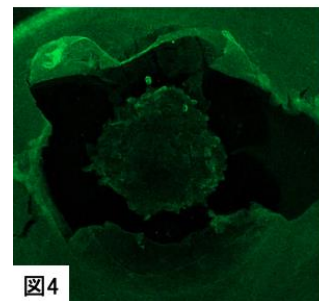
<p>研究手法</p>	<p>ヒトの腸管上皮細胞からのオルガノイドの樹立に先立って、マウスを用いてオルガノイドの樹立を行うこととした。BALB/cマウスを用いて安楽死後、小腸を切り出し陰窩を回収したのちに採取した組織をリン酸緩衝食塩水で洗浄後0.5-1mm角に細切する。細切片をさらに洗浄して2.5mMのエチレンジアミン四酢酸条件下で60分攪拌を行い、上清を回収する、陰窩が回収できていることを確認したのち、マトリゲルと混合し特殊培地下に三次元培養を行い、オルガノイドを樹立し、培養後7日目のオルガノイドを回収し実験を行なった。</p> <p>培養した細胞塊がオルガノイドとしての性質をもつかどうかを確認するために、分化細胞の確認と樹立したオルガノイド腸管上皮細胞の特徴の有無の確認を行なった。</p> <p>分化細胞の確認としては腸管のLgr5陽性幹細胞から分化した細胞に特異的なRNAをreal time PCRで確認した。</p> <p>次に樹立したオルガノイド腸管上皮細胞の特徴の有無の確認としては細胞の配列の極性や細胞間密接結合や細胞の局在の評価するために免疫蛍光染色を行なった。まずはマウス腸管オルガノイドを用いて、ZO-1(タイトジャンクションの確認)、ECAD(細胞間密接結合の確認)、Ki67(細胞増殖能、幹細胞の局在の確認)を標識に染色を行なった。</p> <p>三次元培養を行なった細胞の免疫蛍光染色をする際には共焦点内視鏡による観察が必要となった。そこで今回はヒト結腸腺癌細胞であるHCT116細胞を用いてマトリゲル内で培養して作成したスフェロイドにインフルエンザウイルスを曝露させ、感染実験を行い共焦点内視鏡で観察を行なった。</p>
<p>研究の成果 (実現できた研究の質の向上又は地域振興の内容等)</p>	<p>腸管から回収した陰窩をマトリゲル内に混和してオルガノイド用の特殊培地下で7日間培養し回収した細胞はオルガノイドの様相を呈しており組織特異的な幹細胞からの細胞の増殖が確認された(図1)。</p> <p>培養した細胞がオルガノイドとしての性質をもつかどうかを評価するためにLgr5陽性幹細胞から分化した各種細胞の存在を確認するためにrealtime PCRを行なった。その結果では幹細胞(Lgr5)、吸収上皮細胞(Villin-1)、内分泌細胞(Chromogranin A)、杯細胞(Mucin-2)、パネート細胞(Lysozyme)、間葉系幹細胞(Vimentin)のそれぞれのRNAの発現は確認されたものの、今回のddCT法での比較をする上でのpositive</p>



controlを置く条件としては解剖したマウス腸管とするか、添加因子を加えずに培養した細胞とするかは今後の検証課題とした(図2)。培養したオルガノイドの特徴の有無の確認として細胞の配列の極性や細胞間密接結合や細胞の局在の評価するために免疫蛍光染色を行なった結果では蛍光免疫染色は可能であったが、マトリゲルを解除した後でもオルガノイドの形態を保ったままでの染色の手技の習得ができておらず、局在や細胞骨格のイメージングには課題が残った(図3)。



マトリゲルを使用して三次元培養を行なったのちに共焦点内視鏡を使用して培養細胞の蛍光免疫染色を行うことが必要となり、その一環として、ヒト結腸腺癌細胞であるHCT116細胞をマトリゲル内で培養することで作成したスフェロイドにインフルエンザウイルスを曝露させ感染実験を行なった。H1N1型インフルエンザウイルス (PR8株) を使用して感染実験を行なった結果、スフェロイドを構成する細胞への感染を共焦点内視鏡を用いて観察しえた(図4)。



今後の期待	今後、この方法を用いてオルガノイドでの感染実験と感染機序解明へ向けた糖鎖解析を行う予定である。
研究発表	上記の内容や、オルガノイドを使用しての感染実験と感染機序の解明へ向けた糖鎖解析を行い、今後論文化を予定している。