



2022年6月24日 12:05-12:45 @WEB
文科省と国立大学附置研・センターとの定例ランチミーティング

ヒトiPS細胞を用いた 新型コロナウイルス研究

京都大学iPS細胞研究所
増殖分化機構研究部門
高山和雄

高山研究室の紹介



2020年3月～ 高山研究室発足
(@京都大学iPS細胞研究所)

メンバー (11名)

講師 (主任研究者) : 高山 (35歳)

研究員 : 橋本

技術員 : 三村、坂本、小杉、野辺、安原

学生 : 出口、Yi、He、横井

研究内容

- iPS細胞、オルガノイド、臓器チップ技術を用いた呼吸器モデルの開発
- 上記モデルの感染症創薬などへの応用

CiRAでの研究業績 (2020年3月以降)

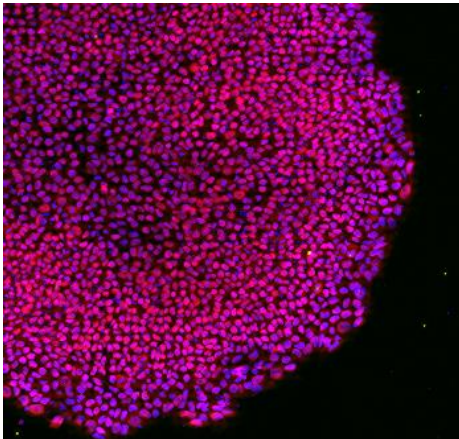
- 英文学術論文35報
- 特許出願4件

COVID-19治療薬開発の現状

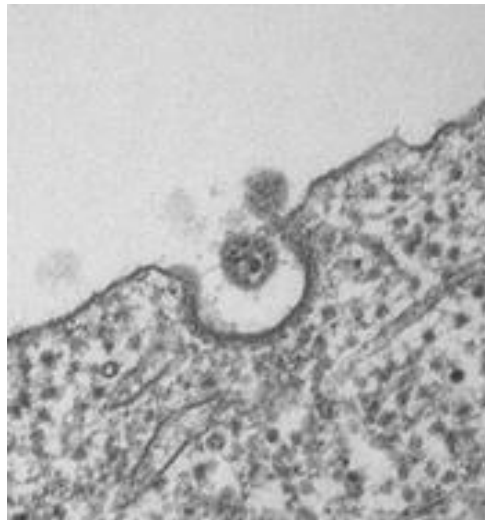
レムデシビル、モルヌピラビル、パキロビッド、デキサメタゾン、バリシチニブなどの薬が承認されているが、いまだにCOVID-19特效薬と呼べる薬は開発されていない。

幹細胞生物学の技術を駆使して、感染症創薬を加速化できるモデル開発&応用研究を行う。

幹細胞生物学



ウイルス学

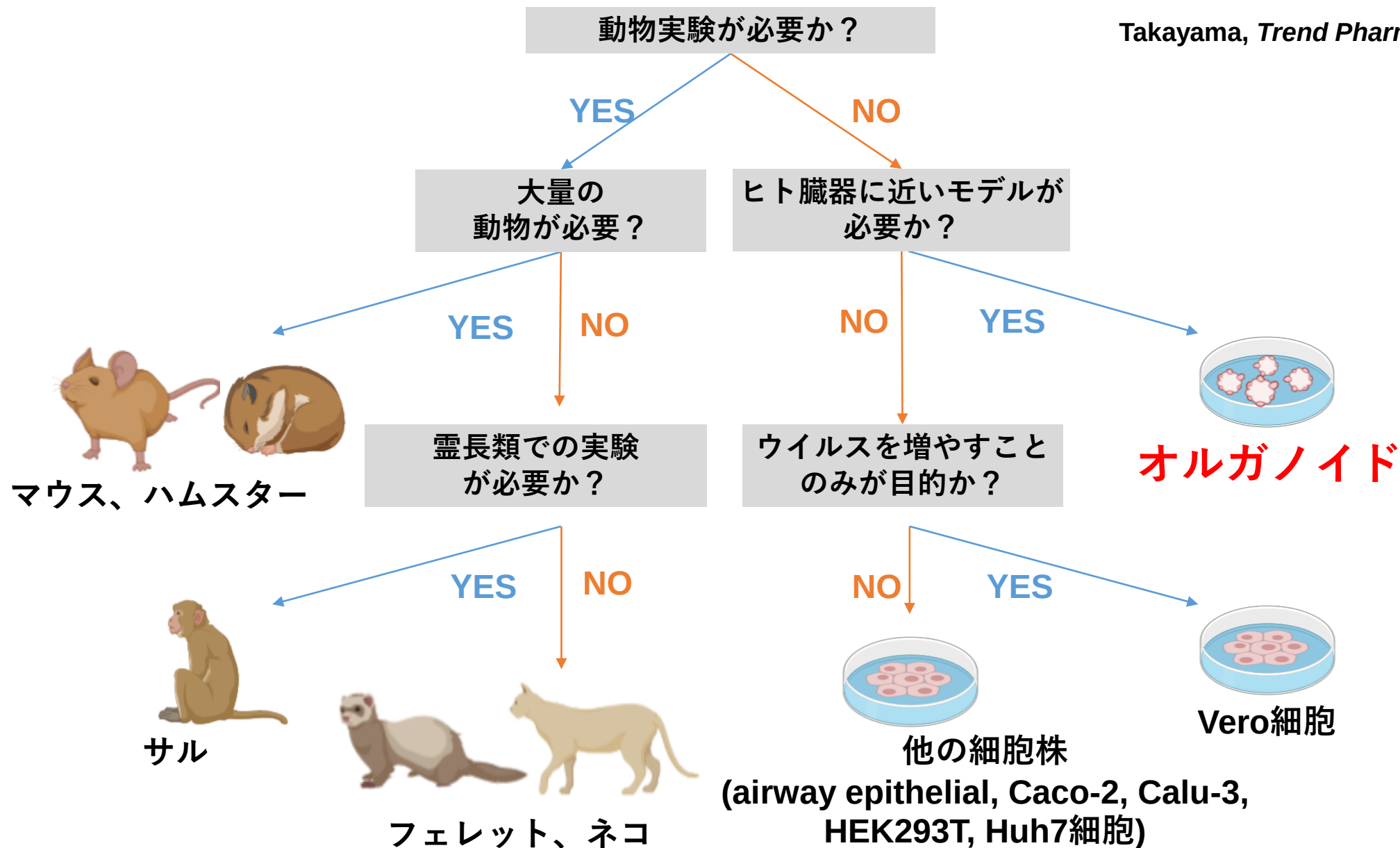


薬学



SARS-CoV-2研究に使用できる細胞と動物

Takayama, *Trend Pharm Sci.*, 2020



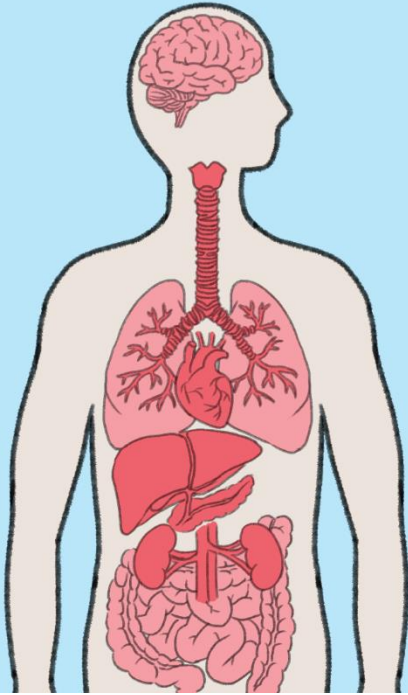
オルガノイドを用いたSARS-CoV-2研究

Type	Origin	Key points	References
ヒト気道上皮細胞	Commercially available from various vendors (Lonza, PromoCell, etc.)	Human airway epithelial cells can isolate SARS-CoV-2 and mimic infected human lung cells. After SARS-CoV-2 infection, cytopathic effects were observed.	[5]
ヒト気管支オルガノイド	Generated from commercially available human bronchial epithelial cells	After SARS-CoV-2 infection, not only the intracellular viral genome, but also progeny virus, cytotoxicity, pyknotic cells, and moderate increases of the type I interferon signal can be observed.	[17]
ヒト肺オルガノイド	Generated from human embryonic stem cells	The lung organoids, particularly alveolar type II cells, are permissive to SARS-CoV-2 infection.	[18]
ヒト腎臓オルガノイド	Generated from human embryonic stem cells	Human kidney organoids produce infectious progeny virus.	[19]
ヒト肝臓オルガノイド	Generated from primary bile ducts isolated from human liver biopsies	Human liver ductal organoids are permissive to SARS-CoV-2 infection, and SARS-CoV-2 infection impairs the bile acid transporting functions of cholangiocytes.	[20]
ヒト腸管オルガノイド	Generated from primary gut epithelial stem cells	Human intestinal organoids were readily infected by SARS-CoV-2 as demonstrated by confocal- and electron-microscopy. Significant titers of infectious viral particles were detected.	[22, 23]
ヒト血管オルガノイド	Generated from human induced pluripotent stem cells	SARS-CoV-2 can directly infect human blood vessel organoids.	[19]

Takayama, *Trend in Phar Sci.*, 2020 (2020年5月時点の情報)

オルガノイドとiPS細胞を用いたSARS-CoV-2研究 (2021年7月時点の情報)

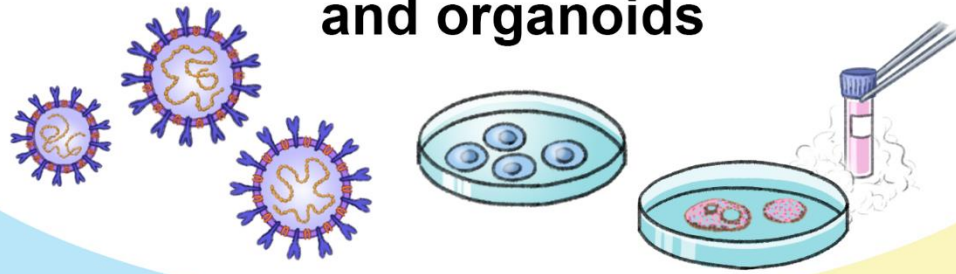
The research for SARS-CoV-2
organ tropism and organ damages



The development of
COVID-19 therapeutic agents



SARS-CoV-2 research
using human pluripotent stem cells
and organoids



The research for
individual differences in COVID-19 pathophysiology



合計50本のコロナ論文をtableにして紹介

Deguchi et al., *STEM CELLS Transl Med.* 2021

研究成果の紹介

1. **iPS細胞を用いたCOVID-19個人差再現**
2. **気道オルガノイドを用いたSARS-CoV-2研究**

iPS細胞バンクを用いたSARS-CoV-2研究



500名以上の個人から
樹立されたiPS細胞

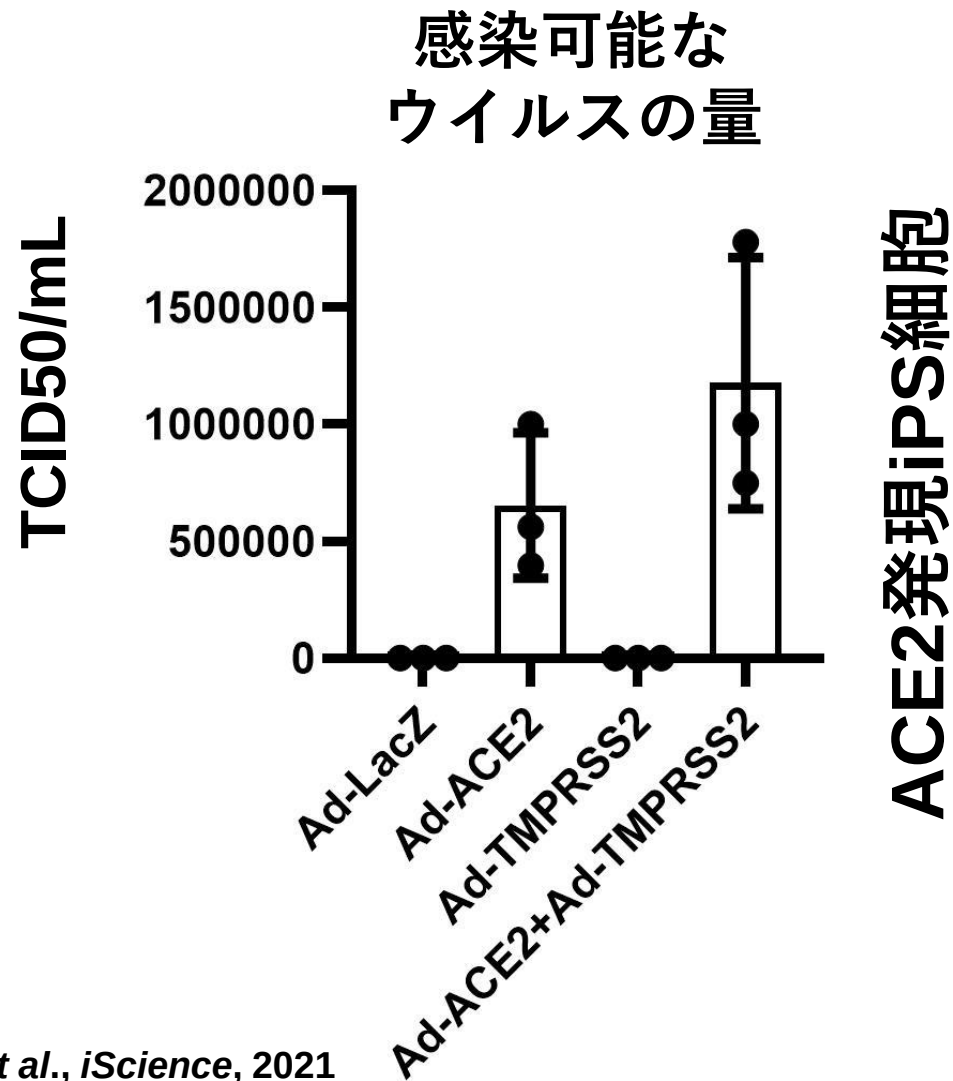
SARS-CoV-2



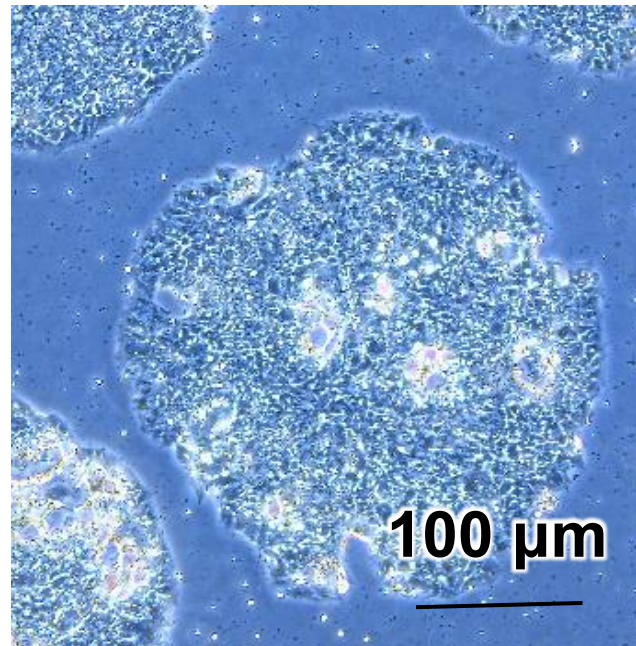
iPS細胞はほぼあらゆる個人から
樹立可能。ドナーバリエーション
の豊富さがCiRAの強みの一つ。

COVID-19の個人差をiPS細胞を
用いて再現可能か検討する。

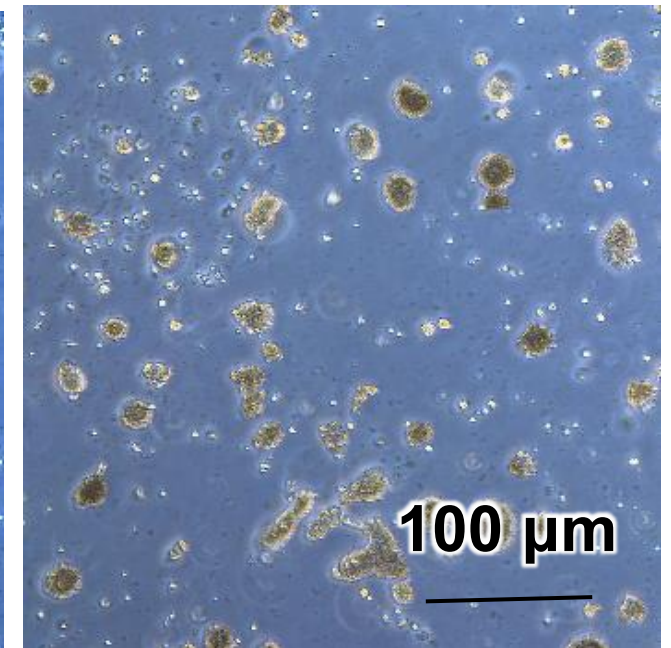
SARS-CoV-2がヒトiPS細胞に 感染するためにはACE2発現が必要



SARS-CoV-2
(感染2日目)

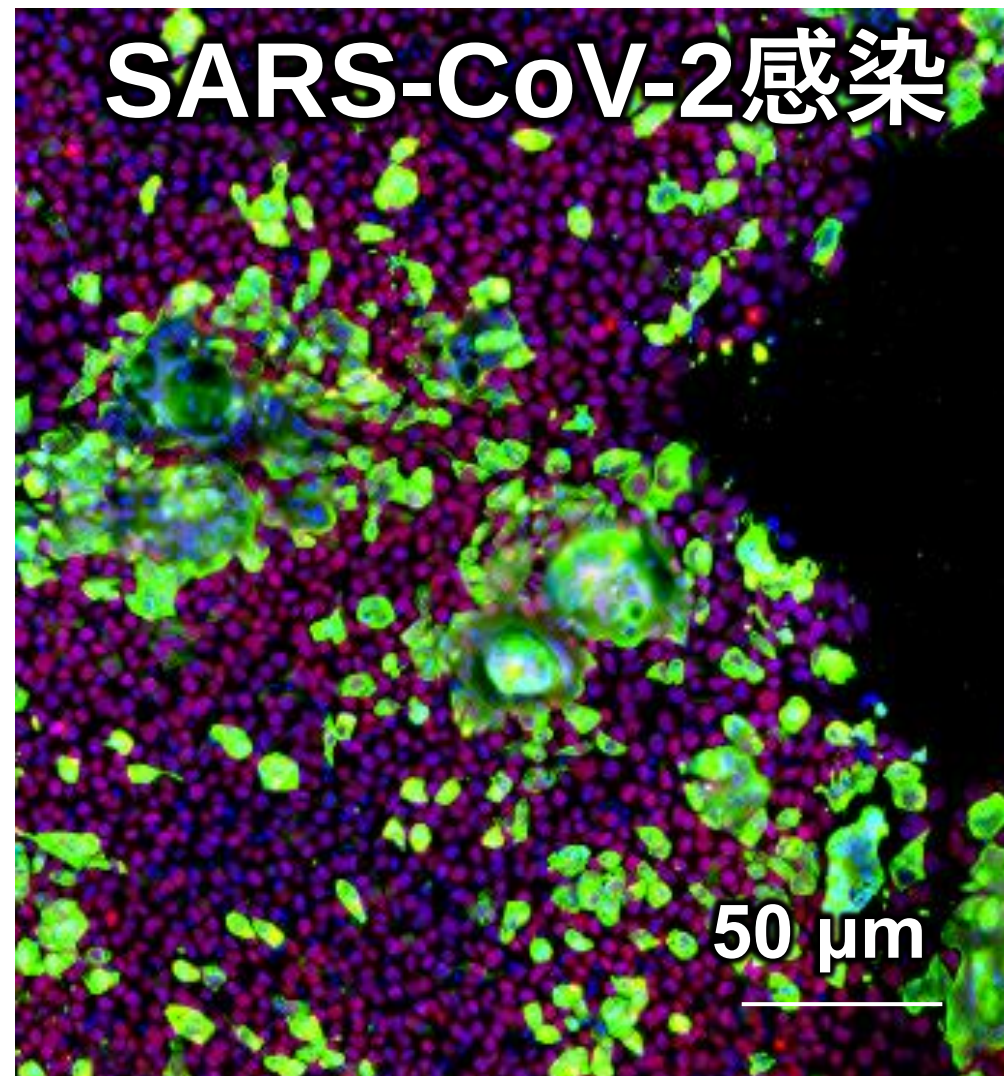
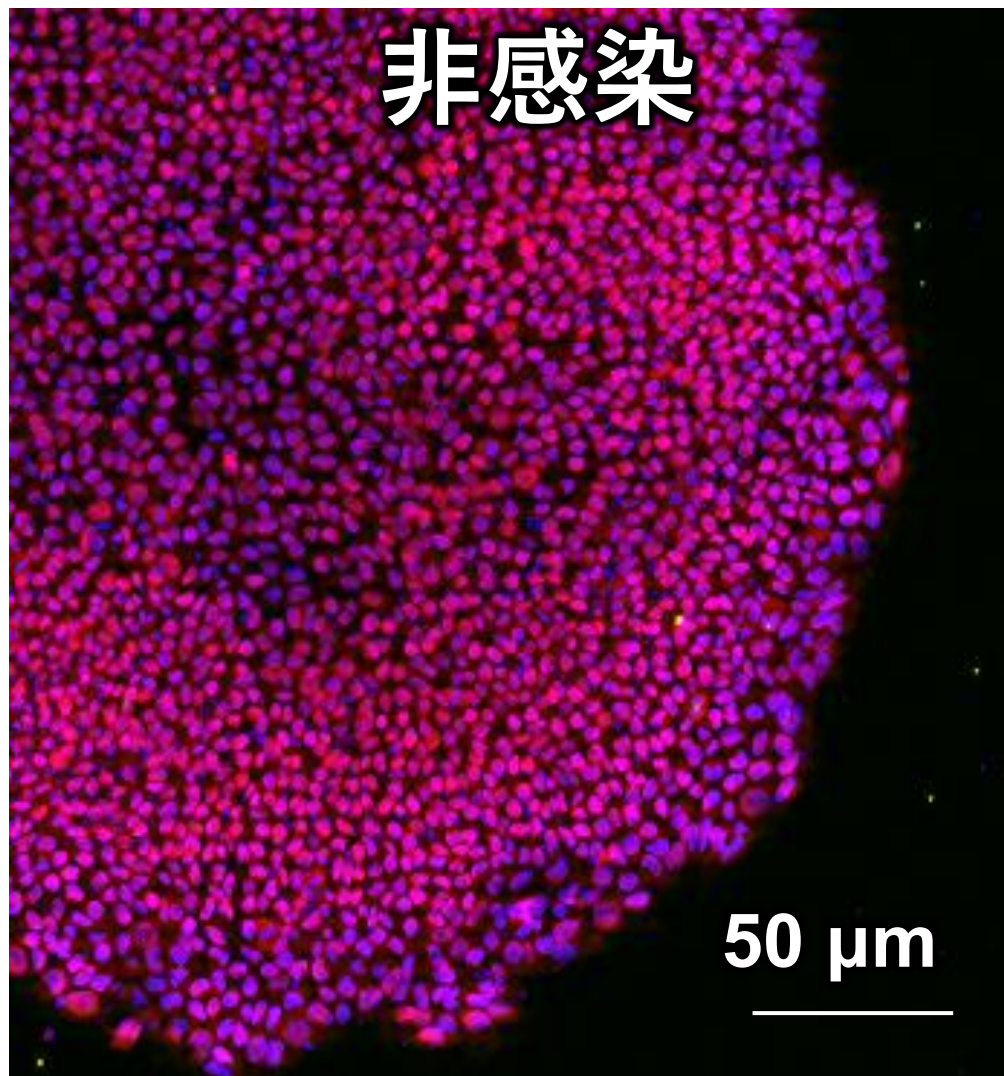


SARS-CoV-2
(感染4日目)



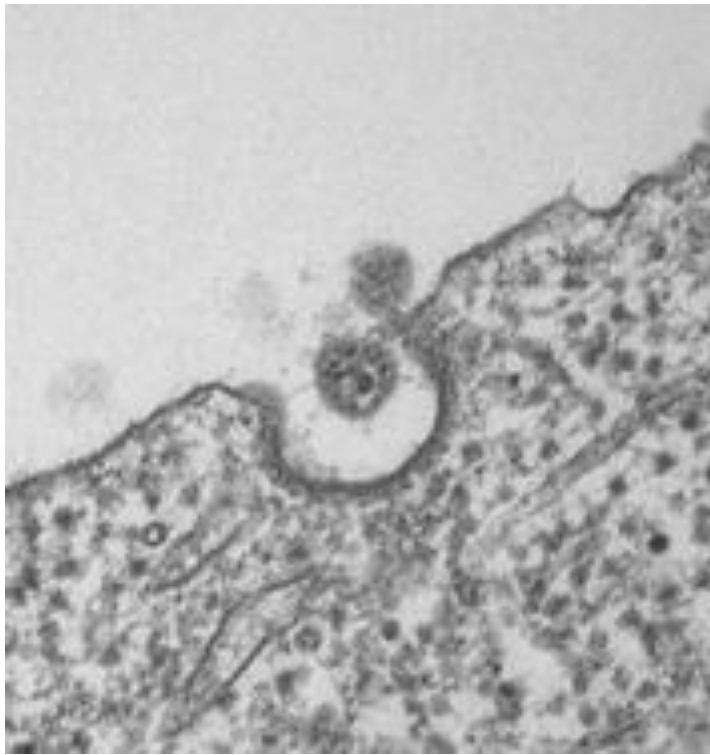
感染したACE2発現iPS細胞における SARS-CoV-2 N蛋白質の染色画像

OCT3/4 / SARS-CoV-2 N蛋白質
/ 核

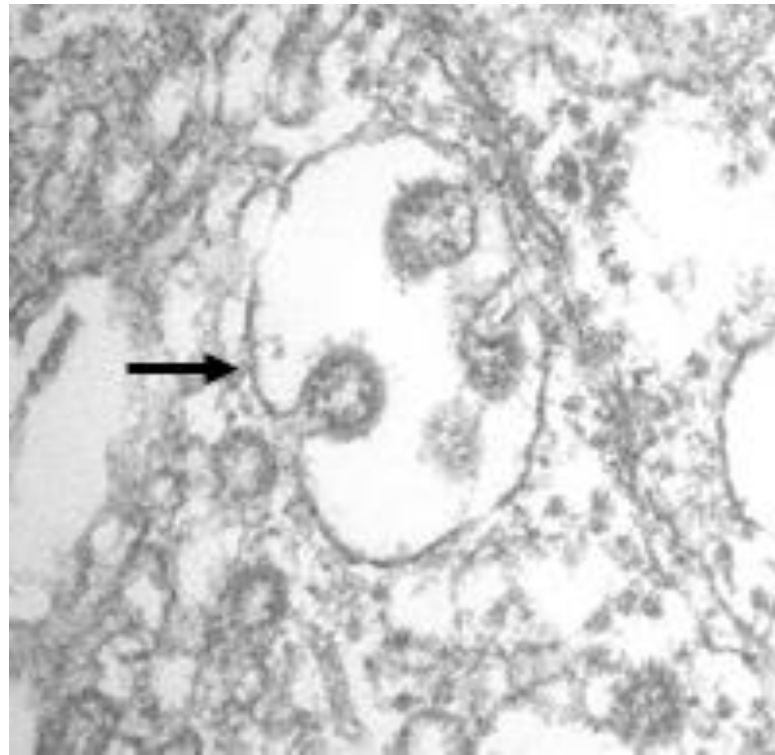


感染したACE2発現iPS細胞における電顕画像

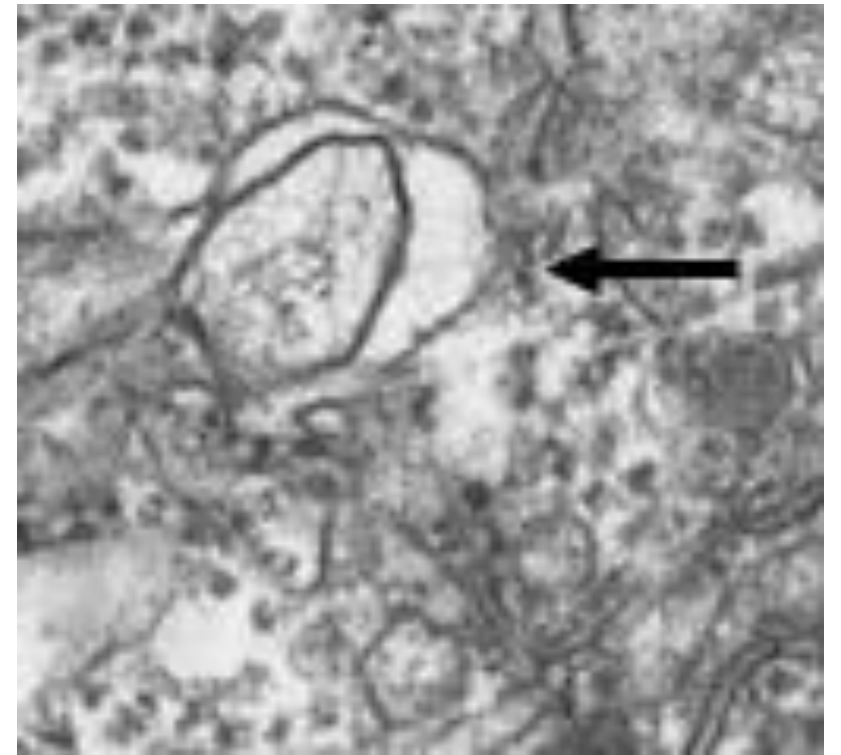
ヒトiPS細胞に侵入しようとするSARS-CoV-2



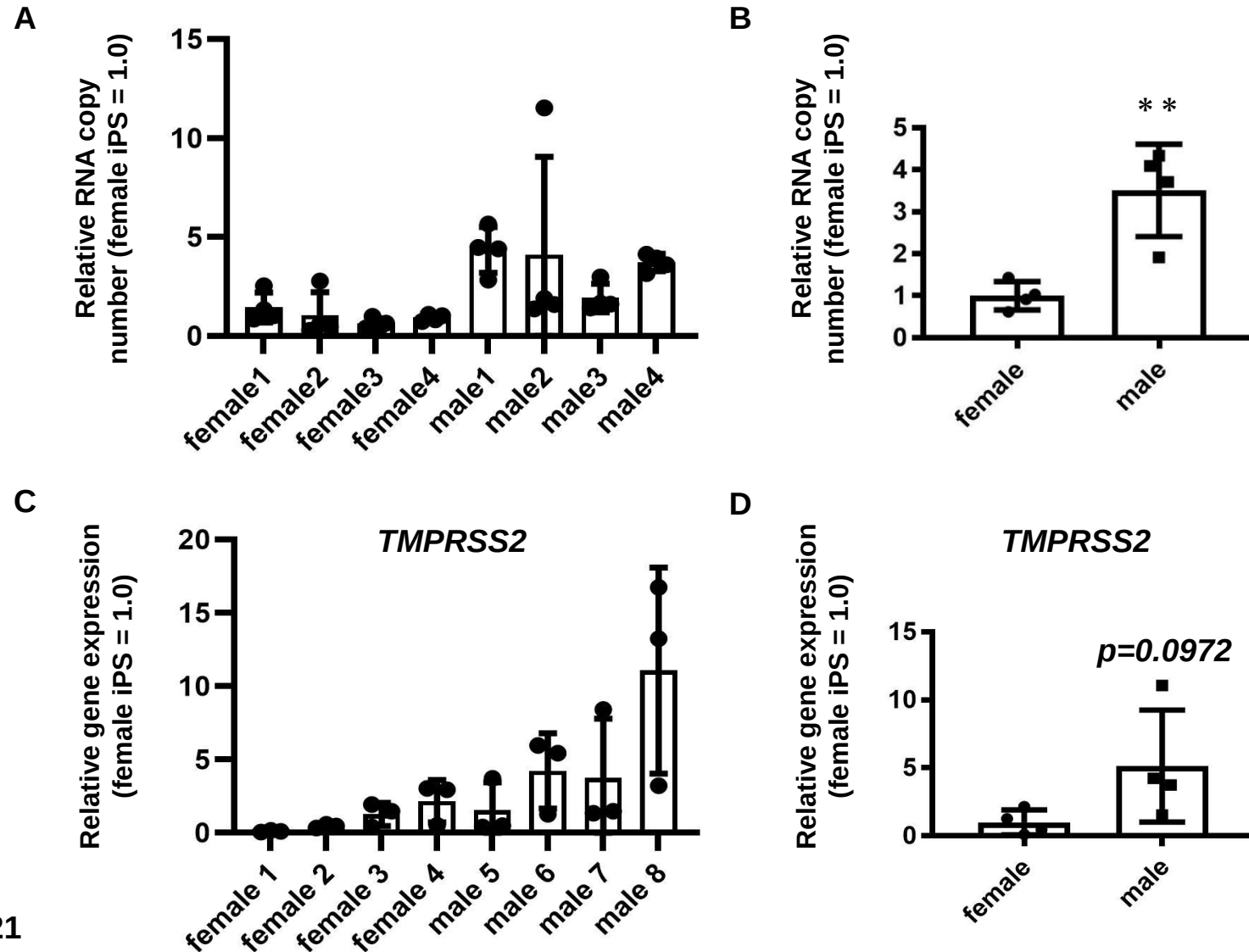
ERGICにおいて出芽しているSARS-CoV-2



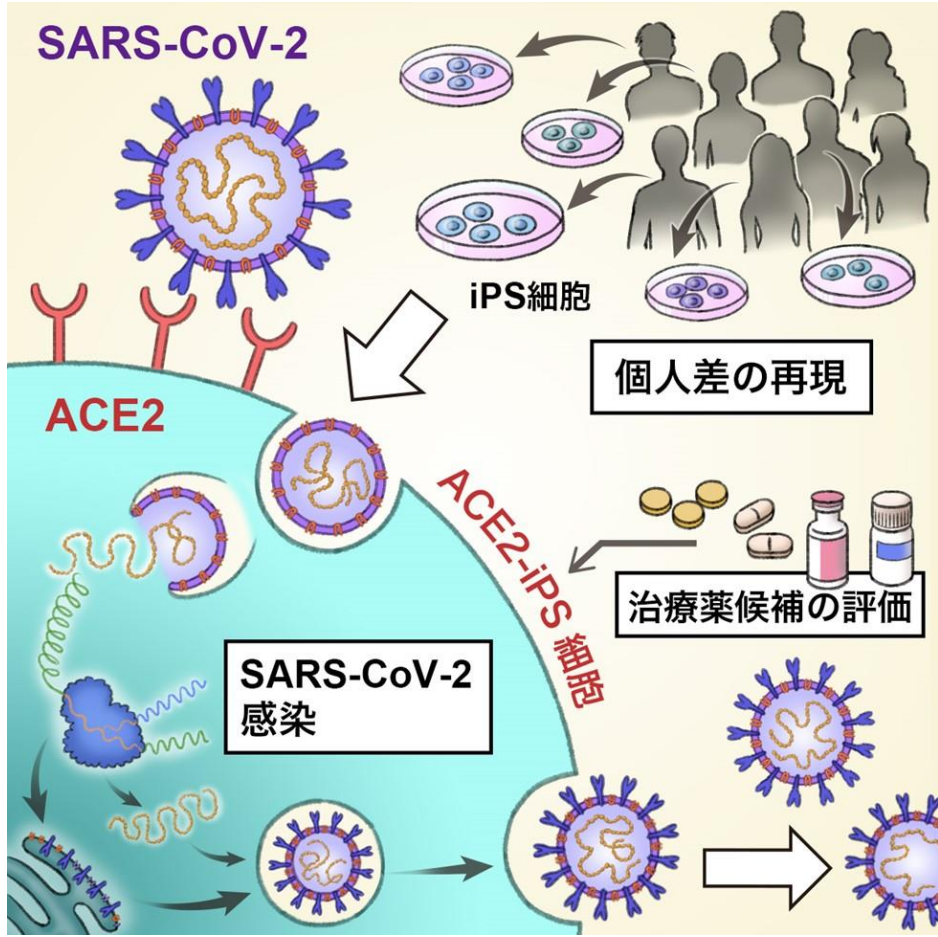
二重膜小胞



8名（女性4名、男性4名）のiPS細胞を用いたSARS-CoV-2感染実験



iPS細胞バンクを用いた新型コロナウイルス 感染の個人差の再現と原因究明



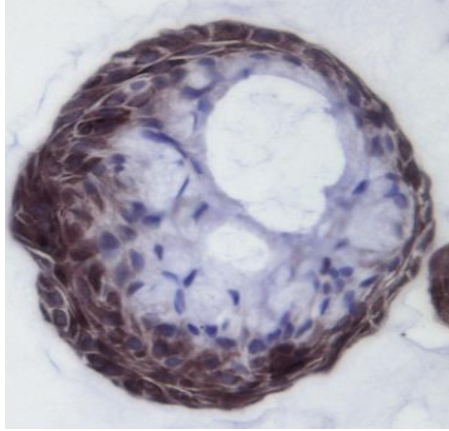
- ACE2発現iPS細胞に新型コロナウイルスは効率よく感染する。
- ACE2発現iPS細胞を用いて、新型コロナウイルス感染症のための治療薬を評価できる。
- iPS細胞バンクを用いて、新型コロナウイルス感染症の個人差を再現できる。

研究成果の紹介

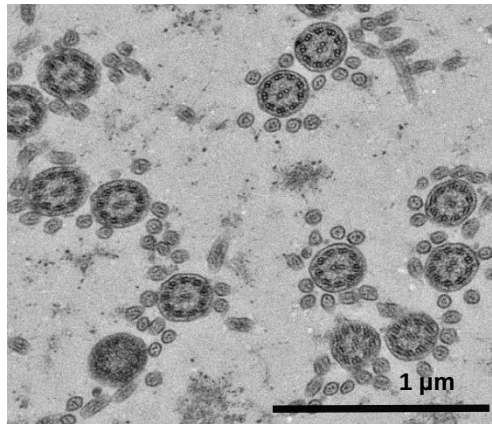
1. iPS細胞を用いたCOVID-19個人差再現
2. 気道オルガノイドを用いたSARS-CoV-2研究

ヒト気道オルガノイド

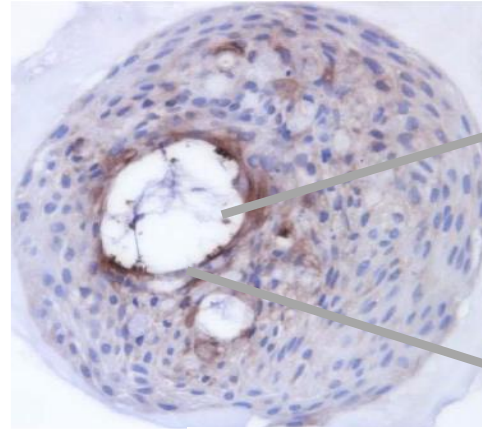
基底細胞
(KRT5陽性)



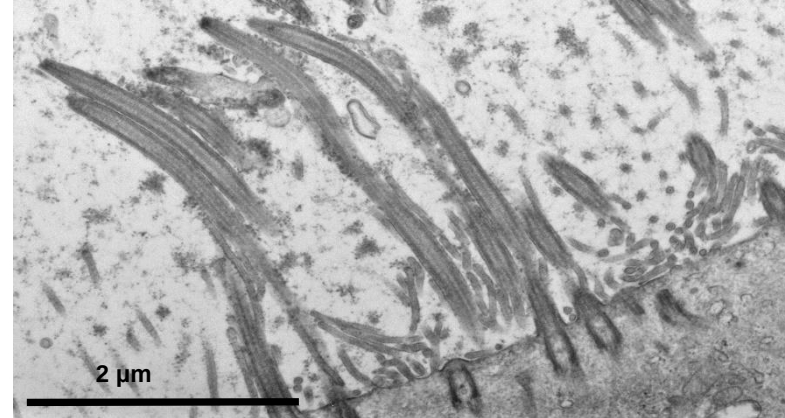
9 + 2構造



線毛細胞
(acetylated α -tubulin+)



線毛構造



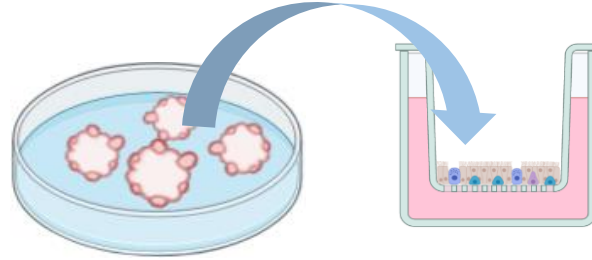
SARS-CoV-2の初期感染部位である気道のモデルを作製することから着手。
基底細胞から気道オルガノイドを作製する方法を開発。

SARS-CoV-2は線毛細胞に感染するが、 基底細胞にはほとんど感染しない

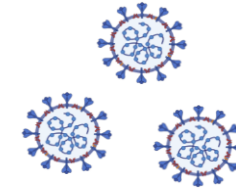
分散後、トランスウェル上に播種

新型コロナウイルス
感染実験

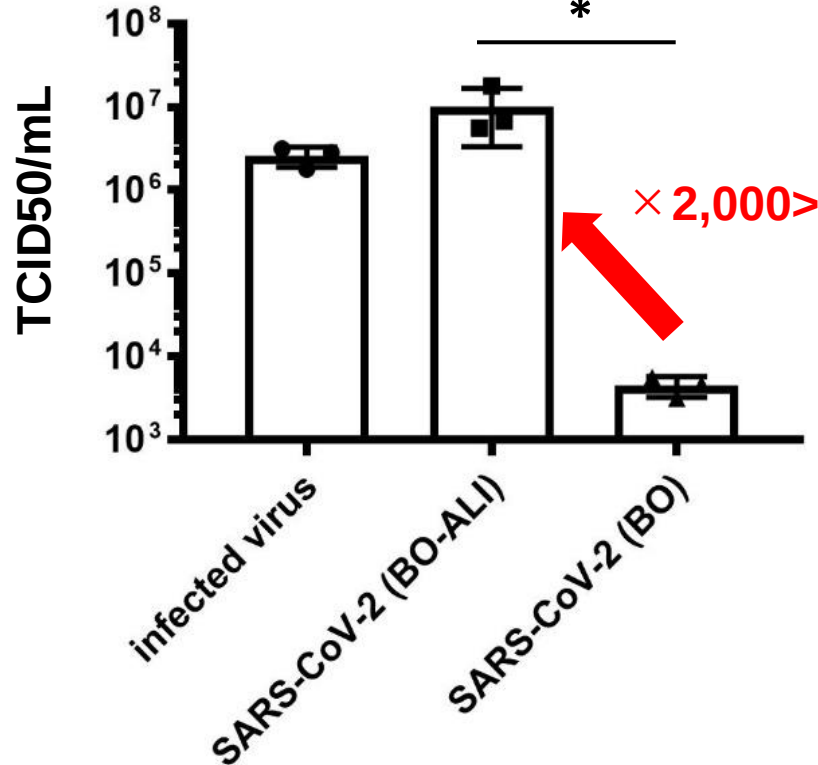
ヒト気道
オルガノイド



気液界面培養

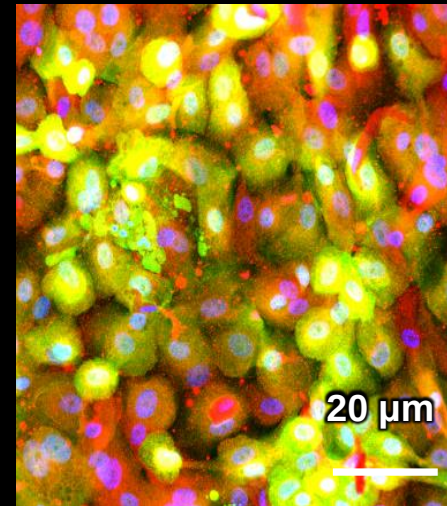


感染2日目
*



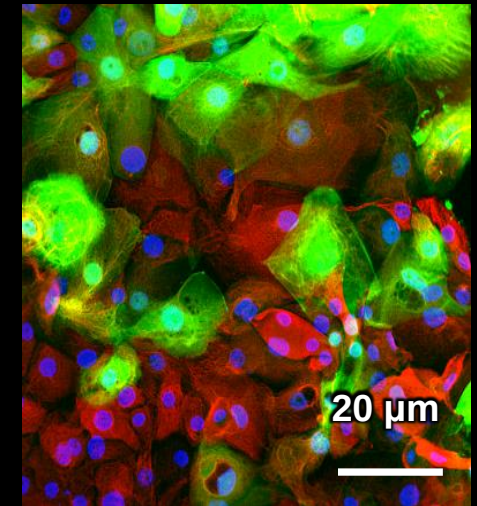
感染2日目

acetyl- α -tubulin/SARS-CoV-2 S蛋白質/核

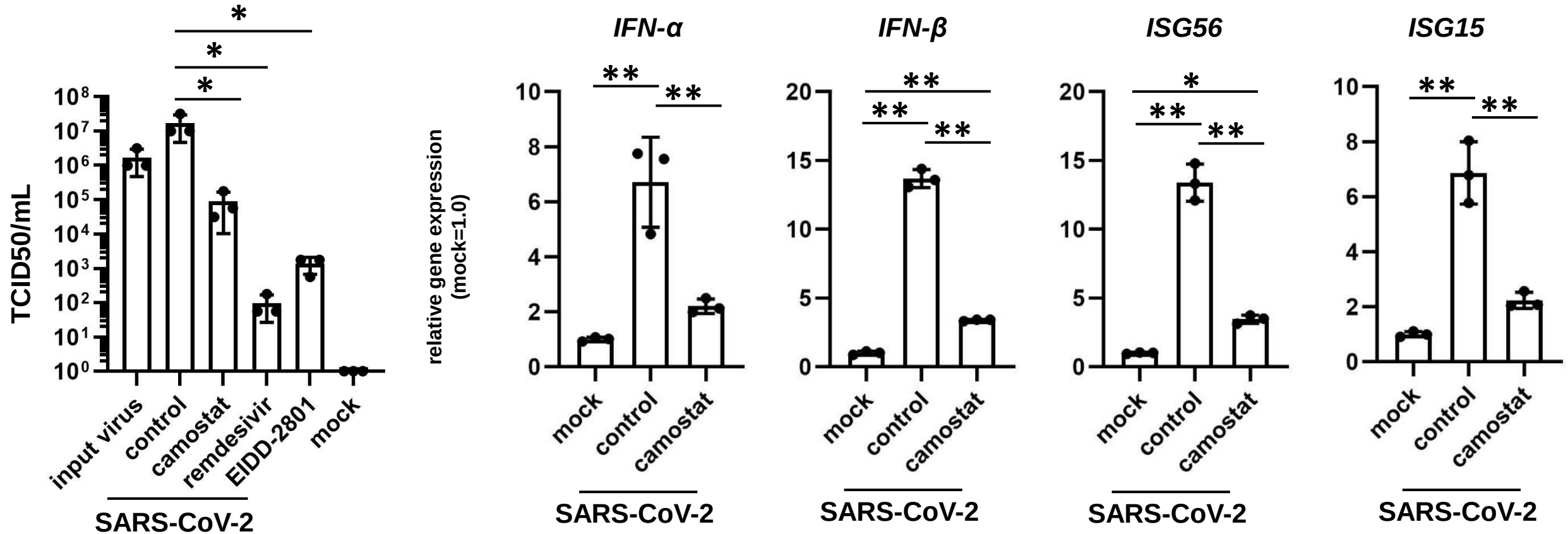


感染2日目

KRT5/SARS-CoV-2 S蛋白質/核



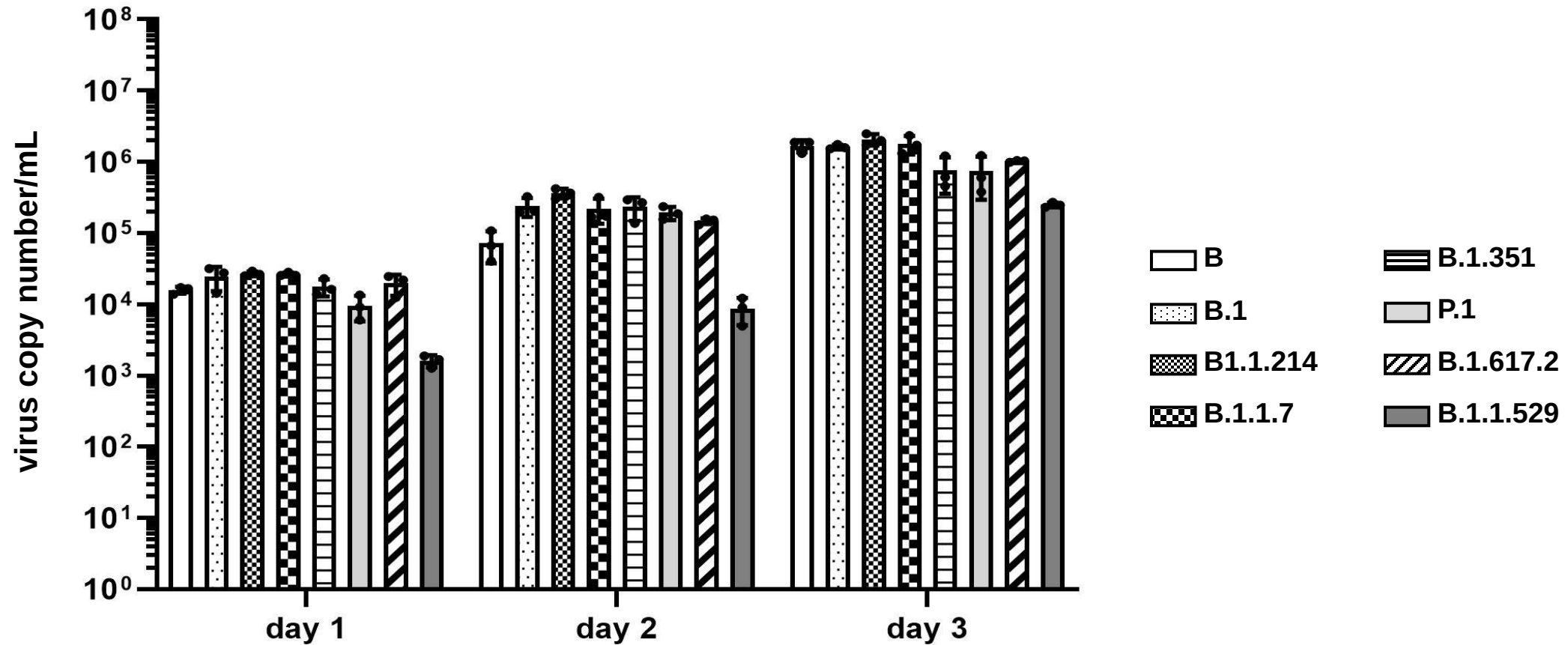
COVID-19治療薬の評価



COVID-19治療薬の抗ウイルス効果を評価できる。

ウイルス作用後に、強い自然免疫誘導効果が確認できる。
また、その誘導はCOVID-19治療薬によって消失する。

8種類の変異株を用いた感染実験



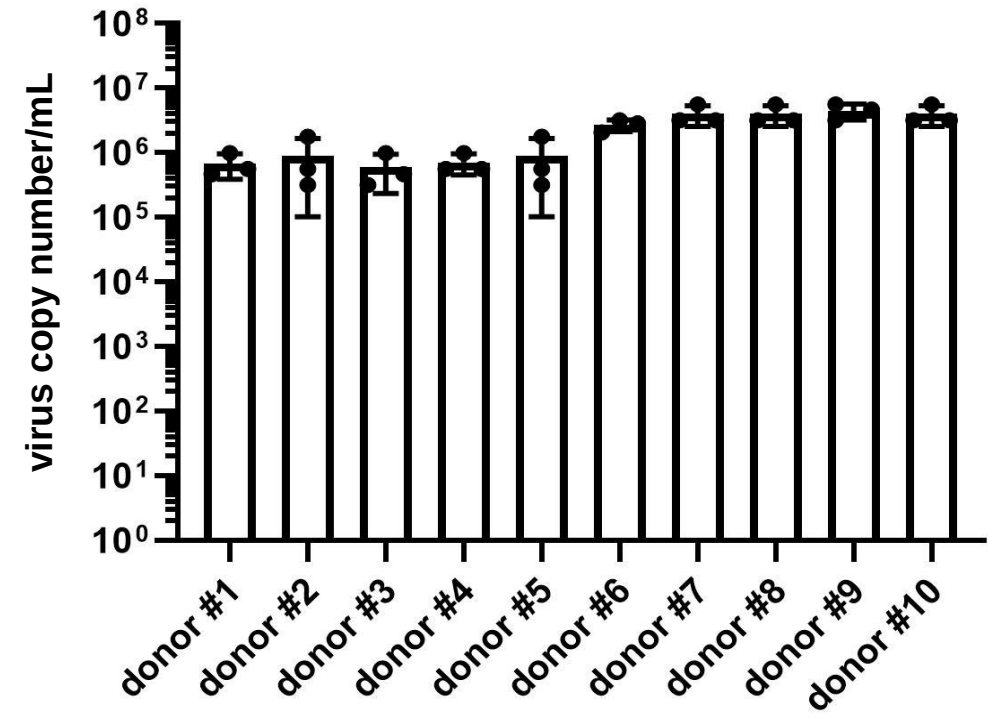
どのバリエーションも効率よく複製するが、オミクロン株（B.1.1.529）の複製力はやや弱い。
（参考：10バリエーション、36種類のSARS-CoV-2を保有。）

10名の個人の細胞を用いた感染実験

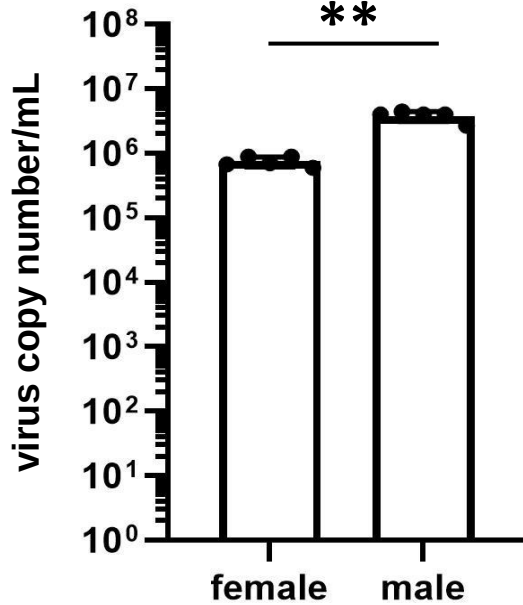
A

	Age	Sex	Race	Cell type
donor #1	65Y	Female	Caucasian	Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells
donor #2	43Y	Female	Caucasian	Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells
donor #3	65Y	Female	Caucasian	Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells
donor #4	71Y	Female	Caucasian	Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells
donor #5	41Y	Female	Caucasian	Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells
donor #6	70Y	Male	Caucasian	Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells
donor #7	36Y	Male	Caucasian	Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells
donor #8	40Y	Male	Caucasian	Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells
donor #9	29Y	Male	Caucasian	Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells
donor #10	49Y	Male	Caucasian	Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells

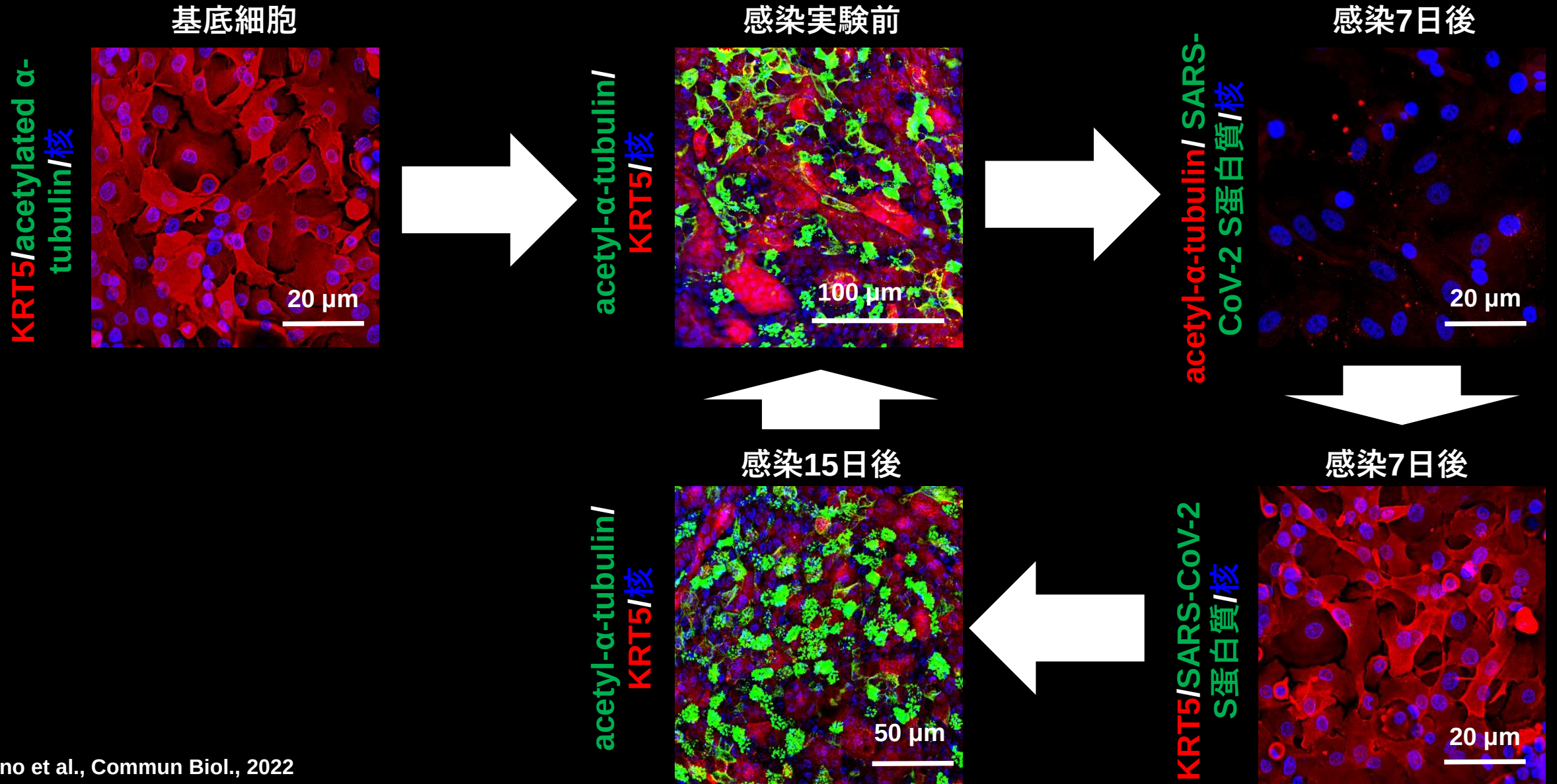
B



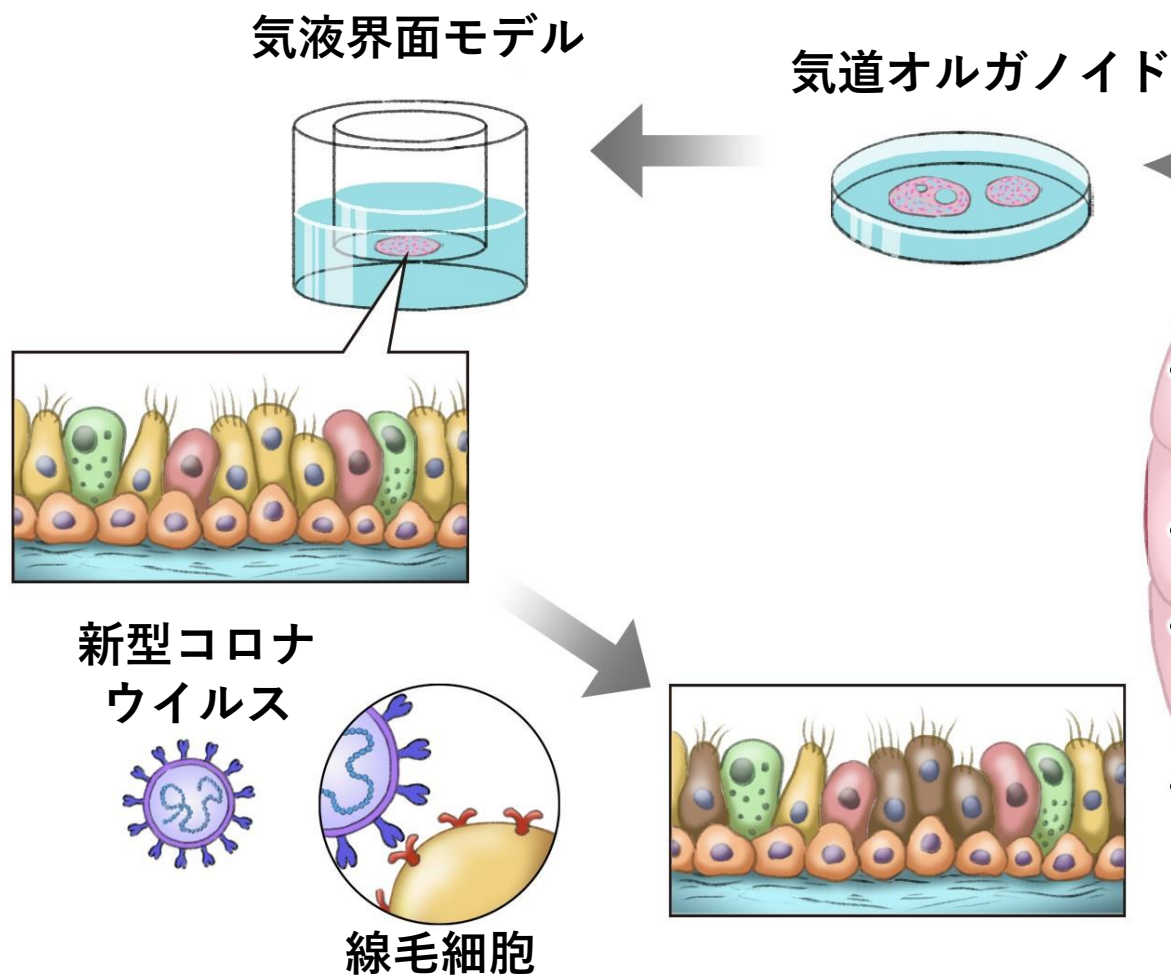
C



ウイルス感染後、生存した基底細胞によって 気道上皮細胞層が再生される

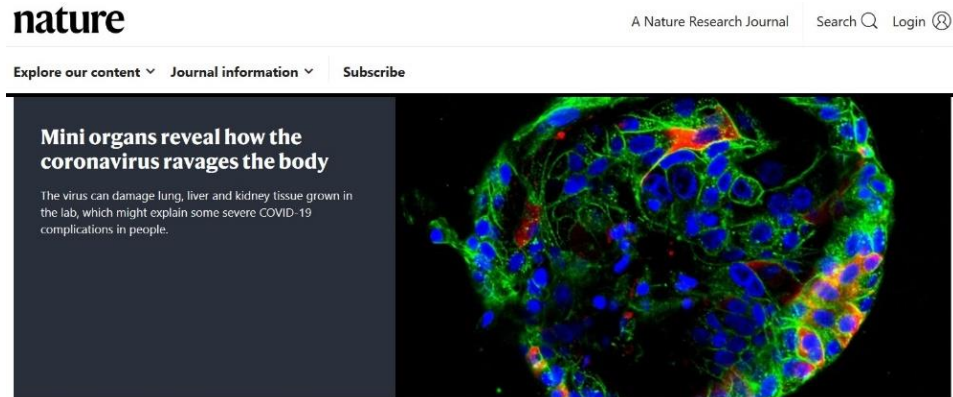


気道オルガノイドを用いた新型コロナウイルス研究



- 気道オルガノイド由来の気液界面モデルは新型コロナウイルスの感染・複製を評価可能
- 新型コロナウイルスは線毛細胞に感染する
- 生き残った基底細胞は、破壊された気道上皮細胞層を再生する
- 基底細胞による再生能はFGF10に依存している

SARS-CoV-2の研究成果



Cell Stem Cell

Voices
Introductions to the
Researchers in the

COVID-19 has unfortunately halted detrimental to researchers just started met some early-career stem cell in and their research to our readers.

COVID-19 papers (17 papers)

Commun Biol 2022, Polymers 2022, PeerJ 2022, Antiviral Res 2022, Arch Biochem Biophys 2022, Nature Aging 2022, Mol Ther Nuc Acid 2021, Int J Biol Macromol 2021a, Int J Mol Sci 2021, Environ Res 2021, ACS Omega 2021, Int J Mol Sci 2021, iScience 2021, Int J Biol Macromol 2021b, Comput Biol Med 2021, Polymers 2021, Molecules 2020

COVID-19 review papers (12 papers)

Epidemiologia 2022, ACS Appl Mater Interfaces 2021, Viruses 2021, Autoimmun Rev 2021a, Mater Lett 2021, Stem Cells Transl Med 2021, Autoimmun Rev 2021b, Biomolecules 2021, ACS Nano 2021, FEBS J 2021, Cell Stem Cell 2020, Trends Pharmacol Sci 2020



Kazuo Takayama
CiRA, Kyoto University

謝辞

- Takayama Lab Member (S. Deguchi, E. Sano, R. Hashimoto, N. Mimura, A. Sakamoto, K. Kosugi, T. Nobe, R. Yi, S. He, N. Yasuhara)
- T. Yamamoto, M. Nagao, Y. Matsumura, M. Yamamoto, S. Yamanaka, K. Takahashi, MK Saito, M. Nakawawa, A. Hotta, P. Karagiannis, Y. Torisawa, Y. Koyanagi, K. Shimura, N. Misawa, T. Noda, Y. Muramoto, A. Hirabayashi, R. Yokokawa, K. Fujimoto, R. Kameda, H. Saito, H. Ono (Kyoto University)
- A. Serrano-Aroca (Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir)
- M. Tambuwala (Ulster University)
- Y. Mishra, P. Panda (University of Southern Denmark)
- B. Uhal (Michigan State University)
- T. Okamoto, T. Suzuki, Y. Itoh, D Motooka, D. Okuzaki, S. Minami, T. Kobayashi, E. Hara, S. Tsuji, Y. Okada, Y. Fujio, Y. Matsuura (Osaka University)
- A. Saito (Miyazaki University)
- A. Brufsky (UPMC Hillman Cancer Center)
- K. Watashi, H. Ohashi, Y. Sakai (Yamaguchi University)
- N. Morone (University of Cambridge)
- S. Hassan (Pingla Thana Mahavidyalaya)
- T. Takebe, N. Saiki (TMDU)
- T. Takasaki, J. Sakuragi (Kanagawa Prefectural Institute of Public Health)
- Many companies

