

No.	25-3151	
Project Title	次世代パンデミックに備えたヒト気道部位特異的分子基盤の創出	
Principal Investigator	TAKANORI ASAKURA (Keio University・Assistant professor)	
Project Member(s)	IMSUT Host Researcher	Kei Sato (The Institute of Medical Science, The University of Tokyo・Professor)
	Project Member (s)	佐藤 佳 (システムウイルス学分野・教授)
	Project Member (s)	南宮 湖 (慶應義塾大学医学部・感染症学教室・教授)

東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業
共同研究報告書（年次終了・研究完了）【国内】

共同研究報告（年次終了）

本研究では、ヒト肺組織、鼻腔・中枢・末梢気道上皮細胞のライブラリー作製・集積・解析を基盤として、気道部位特異的な上皮応答および感染症病態の分子基盤を明らかにすることを目的とした。申請時に計画した、ヒト気道上皮細胞培養系の構築、感染モデルへの応用、ヒト肺組織および臨床検体を用いた検証に向けて、以下の研究基盤と成果を得た。

1. ヒト鼻腔・中枢・末梢気道上皮細胞ライブラリーと ALI 培養系の構築

申請者は、ヒト肺組織、気道検体、鼻腔上皮、末梢血、喀痰などの臨床検体を継続的に収集する国内多施設研究体制を構築した。特に、肺 NTM 症に対する外科手術を多く実施する施設を含むネットワークを形成することで、世界的にも希少な肺 NTM 症切除肺および気道上皮細胞を定期的に取得できる体制を整備した。

下鼻甲介擦過により得られる鼻腔上皮細胞に加え、外科切除肺から中枢気道および末梢気道由来の上皮細胞を単離し、初代ヒト気道上皮細胞として樹立した。PneumaCult™-Ex Plus Medium および CRC-Y 法を用いた拡大培養、凍結保存、再融解後の培養条件を最適化し、健常者および疾患患者由来の鼻腔・中枢・末梢気道上皮細胞を継続的に利用可能な細胞ライブラリーとして保存した。

さらに、これらの細胞を気相液相界面培養、すなわち ALI 培養により 3~4 週間分化誘導することで、線毛細胞、分泌細胞、基底細胞などを含む分化気道上皮モデルを構築した。鼻腔・中枢・末梢気道という異なる部位由来の上皮細胞を同一の培養プラットフォーム上で比較可能とし、部位特異的な分子マーカーや細胞分化状態を評価できる基盤を確立した。

2. 気道上皮培養系の分子・形態・機能評価系の確立

構築した初代ヒト気道上皮細胞培養系について、部位特異的なマーカーを定量 PCR で評価し、鼻腔・中枢・末梢気道上皮細胞の特徴が培養後にも保持されることを確認した。また、whole mount 標本および FFPE 標本を用いた HE 染色、免疫染色により、線毛細胞、分泌細胞、基底細胞、細胞間結合などを評価する組織学的解析系を確立した。さらに、高速ビデオカメラによる線毛運動解析、および電子顕微鏡による線毛微細構造評価を導入し、分子発現のみならず、気道上皮の形態および機能を包括的に評価できる体制を整えた。この評価系により、原発性線毛機能不全症候群（PCD）疑い症例において、鼻腔上皮細胞の線毛運動低下や電子顕微鏡上の構造異常を確認することが可能となった。これにより、本培養・評価系が、肺 NTM 症や気管支拡張症の背景にある上皮機能異常の解析にも応用可能であることが示された。

また、ヒトで構築した評価系をマウス気管支上皮細胞にも応用し、ヒト末梢気道上皮細胞およびマウス気管支上皮細胞を線毛細胞へ分化させた上で、各種サイトカイン刺激に対する応答を検討した。その結果、インターフェロン刺激により細菌応答に関わる *Sectm1a* が誘導されることを明らかにし、気道上皮細胞における感染防御応答を解析するモデルとして有用であることを示した。

3. ヒト肺組織を用いた scMultiome 解析と気道部位特異的病態の検討

ヒト肺組織を用いた検討として、健常者および肺 NTM 症患者由来の中枢気道・末梢肺を対象に、scRNA 解析と scATAC 解析を同時に行う scMultiome 解析を実施した。中枢気道および末梢肺から細胞を取得し、核抽出条件を最適化したうえで解析を行い、上皮細胞、免疫細胞を含む多様な細胞集団を同定した。

肺 NTM 症の上皮細胞では、MUC5B 産生分泌細胞の増加、特定の線毛細胞集団の減少、基底細胞におけるインターフェロン誘導遺伝子群（ISGs）の発現上昇を認めた。これらの結果は、肺 NTM 症における気道病変が単なる構造破壊ではなく、ムチン産生異常、線毛細胞障害、慢性炎症・IFN 応答を伴う複合的な上皮リモデリングであることを示唆する。

さらに、末梢気道のリンパ球集簇に沿って分布する、HLA 関連遺伝子、ISGs、MUC5B を高発現する新規上皮細胞集団を同定した。この細胞集団は、気管支随伴リンパ組織（BALT）近傍に局在し、過去にマウス気道で同定した M 細胞様細胞と類似した分布を示すことから、病原体取り込み、局所免疫応答、慢性炎症の維持に関与する可能性が示唆された。現在、これらの細胞集団について、scMultiome 解析、空間的解析、in vitro 培養系を組み合わせた機能検証を進めている。

4. 感染モデルおよび今後の新規病原体研究への展開

BSL3 環境下での SARS-CoV-2 および新規病原体ウイルス感染モデルの構築、ならびに 1 細胞レベルでのウイルス感染細胞検出を重要な目的としていた。今回構築した鼻腔・中枢・末梢気道上皮細胞ライブラリーおよび ALI 培養系は、この感染モデルの基盤となるものである。

特に、部位特異性を保持したヒト初代気道上皮細胞を継続的に利用できる体制が整ったことで、今後、SARS-CoV-2 や新規呼吸器病原体に対する感染性、細胞種特異的な応答、宿主防御応答の違いを、Bulk RNA-seq、scRNA-seq、Fixed scRNA-seq などの解析と組み合わせることで評価することが可能となった。また、重要な受容体や炎症関連分子については、CRISPR-Cas9 によるノックアウトやレンチウイルスによる過剰発現を行い、感染性や宿主応答への機能的関与を検証できる体制を整えた。