

運営評議会

霊長類医科学研究センター・保富康宏

霊長類医科学研究センターのミッション

我が国唯一の医学実験用霊長類センターとして霊長類を用いた個体レベルから遺伝子レベルまでの医科学研究を推進し、さらに霊長類研究リソースを総合的に整備・維持・供給するシステムを構築することにより、創薬・医科学研究に貢献する。

高品質医科学研究用霊長類

多目的/高品質サルの供給

- ・SPF以上にクリーンかつ年齢、履歴、家系、検査値などの個体情報が明らかなサルの供給
- ・妊娠ザル、胎児、高齢ザルなど特殊なサルの供給

技術と情報の提供

- ・繁殖育成技術
- ・高品質化技術
- ・個体情報データベース

霊長類を用いた医科学研究

自然発症疾患モデル開発

- ・網膜黄斑変性症、高脂血症などの家族性(遺伝性)疾患モデル
- ・アルツハイマー病、子宮内膜症、心疾患、などの疾患モデル

実験誘発疾患モデル開発

- ・感染症、循環器疾患等

基盤技術開発

- ・幹細胞研究、生殖工学技術等



動物福祉への配慮



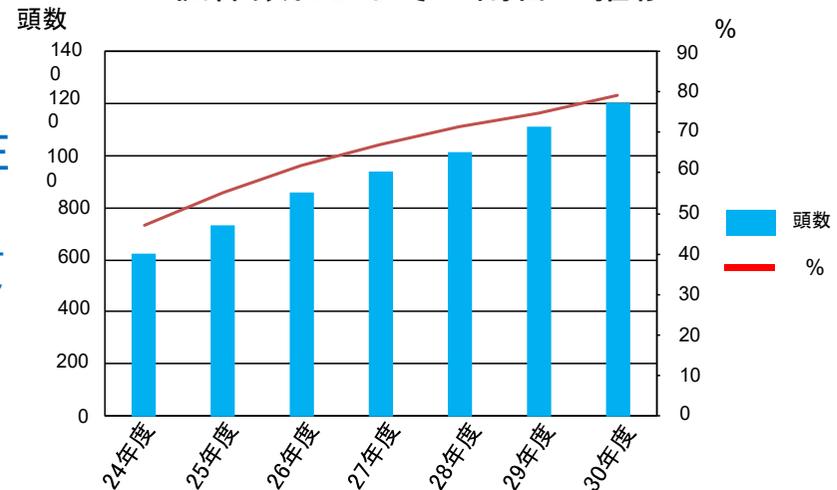
高品質カニクイザルの生産

SPF個体数の推移

24年度	25年度	26年度	27年度	28年度	29年度	30年度
624頭	732頭	852頭	939頭	1013頭	1109頭	1205頭

妊娠個体のうちSPF個体が占める割合は、平成27～30年度でそれぞれ38.8、50.4、54.1、56.5%と徐々に上昇している。現在は**68.1%**であり、当センターのカニクイザルコロニーはSPF化が進んでおり高品質霊長類を提供する体制が強化されていると言える。

SPF個体数およびその割合の推移



- ・ SPFサルの収容割合は、19年度で14.0%であったが、30年度3月時点には79.3%に達した。

各年度別のカニクイザル生産頭数およびサル類供給頭数

	区分	25年度	26年度	27年度	28年度	29年度	30年度
生産頭数		157	181	180	210	219	214
供給頭数	正常ザル	96	94	195	189	187	143
	特殊ザル*	59	23	3	8	24	15
	計	155	117	198	197	211	158

* 特殊ザル：妊娠個体、胎児、高齢、新生児、黄斑変性、心疾患、糖尿病など

幼若カニクイザルの精巣のマウスへの移植

【目的】雄カニクイザルの性成熟には約5年が必要である。そこで幼若カニクイザルの精巣をマウスの精巣に移植することで、受精可能な成熟した細胞が得られないか検討した。

【方法】幼若カニクイザルの精巣に減数分裂を終えた円形精子細胞や精子がないことを確認し(図1)、その精巣をマウス精巣に移植し(図2)た。経時的に移植した精巣の状態を観察した。

【結果】移植した幼若カニクイザルの精巣がマウスの精巣に定着し(図3)、精巣内に円形精子細胞が存在することを認めた(図4)。

【結語】幼若カニクイザルの精巣をマウス精巣に移植することで、円形精子細胞が得られることが確認された。マウスの内分泌の影響を受けて早期成熟したと思われる。本技術を駆使することで、カニクイザルの継代を短縮できる可能性がでてきた。

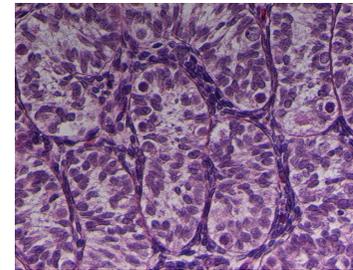


図1 幼若カニクイザルの精巣
円形精子細胞や精子が存在していないことがわかる。

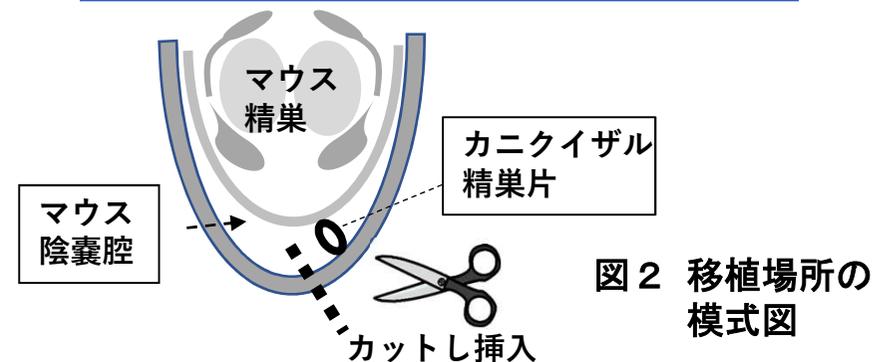


図2 移植場所の模式図

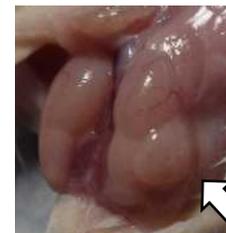


図3 マウスに移植し定着した幼若カニクイザルの精巣
移植時17.5ヵ月齢(上)と21.0ヵ月齢(下)のカニクイザル精巣



図4 マウスに移植したカニクイザルの精巣から採取した円形精子細胞

霊長類を用いた医学科学研究による 疾患モデル開発・整備、基盤技術開発、 病態解析

霊長類を用いた医学科学研究

疾患モデル開発
疾患の病態解析
基盤技術開発

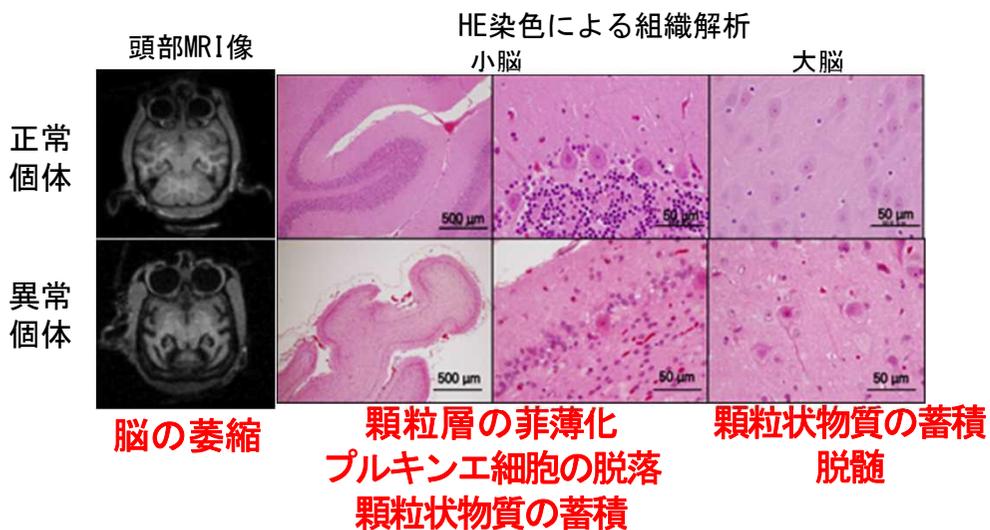


神経セロイドリポフスチノーシスを発症したカニクイザル

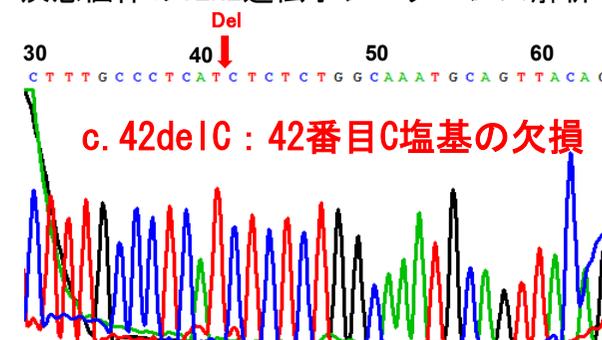
兄弟2頭の臨床症状

- 2歳1~6カ月齢より四肢の振戦・易転倒を確認。
- 摂餌が困難。
- 約3歳（1400gと1830g）で予後不良として安楽殺。

正常♂の3歳時体重は約2300g



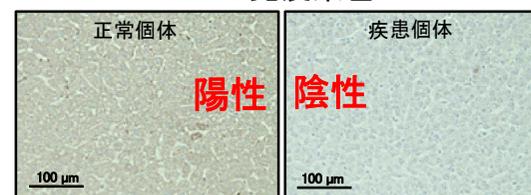
疾患個体のCLN2遺伝子シーケンス解析



フレームシフト変異によるCLN2遺伝子の翻訳異常(TPP1の欠損)と推察

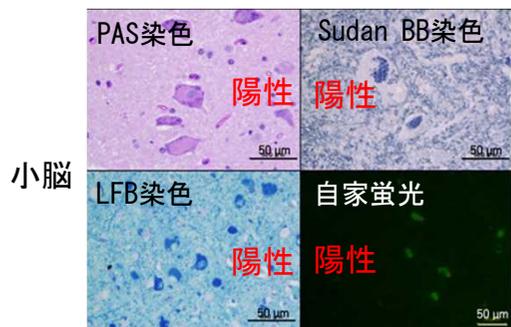
タイプ
の
特定

TPP1の免疫染色



TPP1タンパク質の欠損

CLN2 (TPP1) 遺伝子の変異=NCLの2型



臨床症状、MRI像、組織標本、各種染色により「神経セロイドリポフスチノーシス (NCL)」と診断
「ライソゾーム病(指定難病19)の一つ」

ヒトNCLには14タイプあり

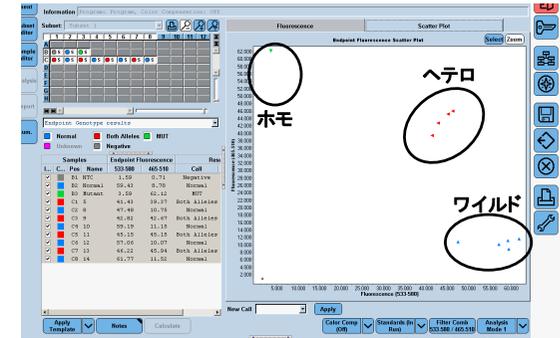
- ・ ヒトのライソゾーム病の一つである神経セロイドリポフスチノーシスの2型 (CLN2) を発症したカニクイザルを発見した。
- ・ ヒトCLN2の有効なモデル動物になることが期待できる。

変異CLN2遺伝子の保因状況

変異遺伝子解析用に蛍光標識したプライマーでのqPCRの実行

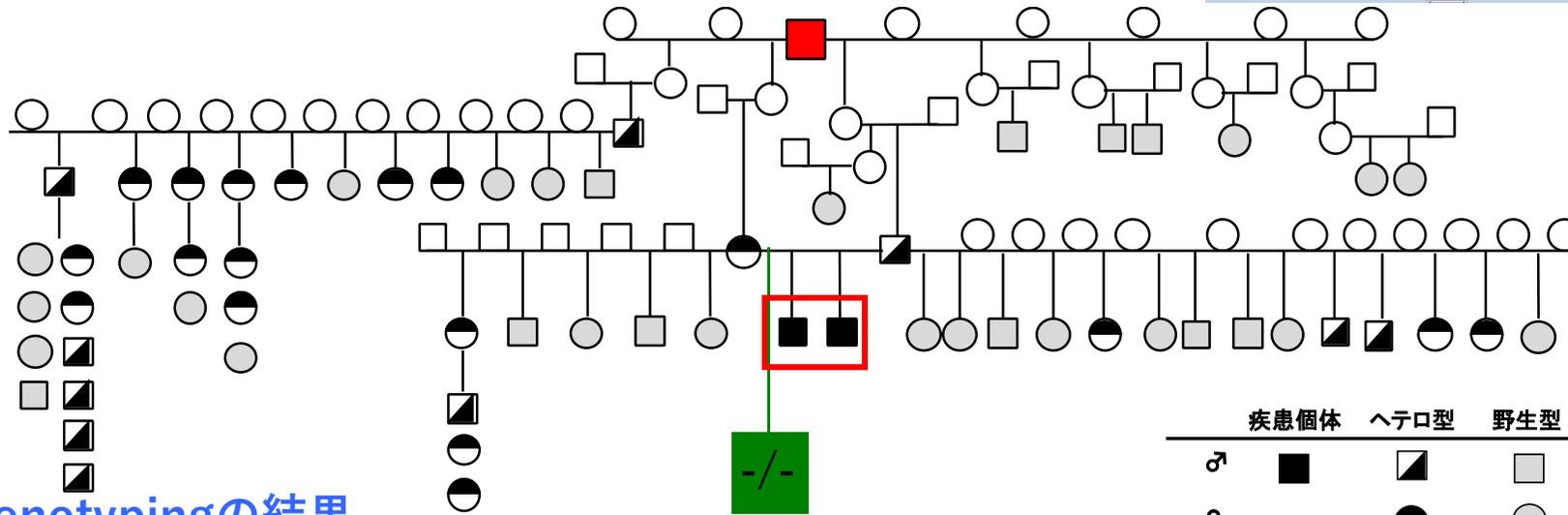
解析結果例

CLN2_WT_probe: /5HEX/CTC+AT+C+CT+CT+CTG/3IABkFQ/
 CLN2_INDEL_probe: /56-FAM/CC+TC+AT+C+T+CT+CTG/3IABkFQ/



LightCycler
(Roche)

変異CLN2家系



Genotypingの結果

2018年4月出生

	疾患個体	ヘテロ型	野生型	未検査
♂	■	◼	□	□
♀	●	◐	○	○

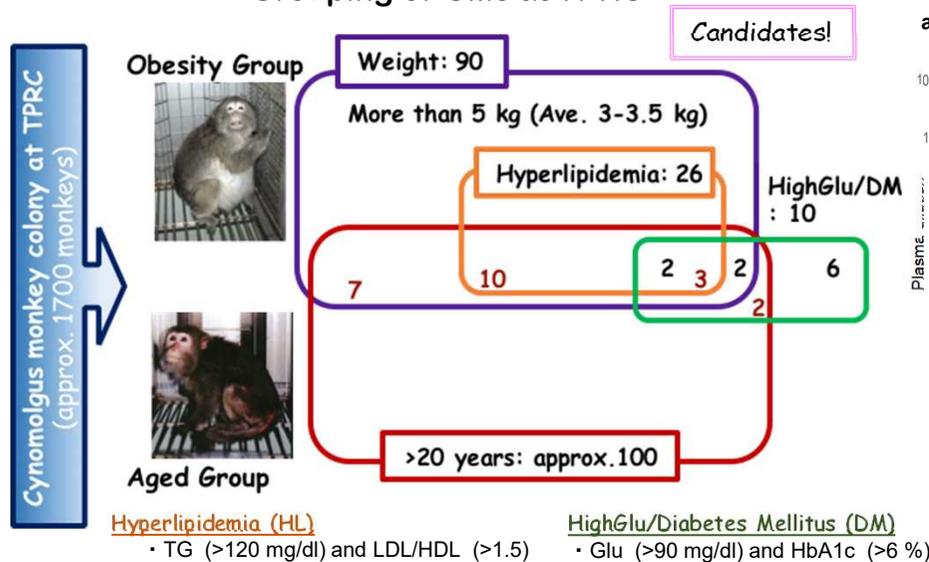
個体数	+/+	-/+	-/-
60	31	28	1

CLN2^{-/+}が複数個体確認され、CLN2^{-/-}の生産が可能な状況

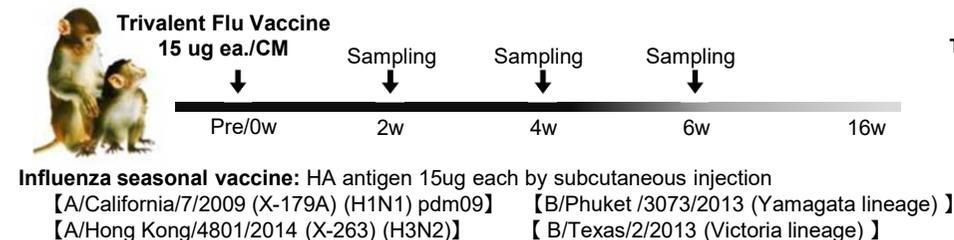
加齢・代謝性疾患に伴う免疫機能低下の解析

生涯にわたる健康維持や疾患に関係する生体の変化を知ることの重要性は周知であるが、これらの知見を得ることは、食生活や居住地、活動等が多様なヒトにおいて検討することは極めて困難である。加齢や代謝性疾患に伴う免疫機能低下の解析は、健康長寿社会実現のため極めて重要である。そこで、当センターの巨大カニクイザルコロニーを用いて、感染症高リスク群における効果的な免疫応答の誘導を目指し、Aged Groupおよび代謝性疾患カニクイザルにインフルエンザワクチンを投与し、免疫応答の解析を行い、その差異を検討した。

Grouping of CMs at TPRC

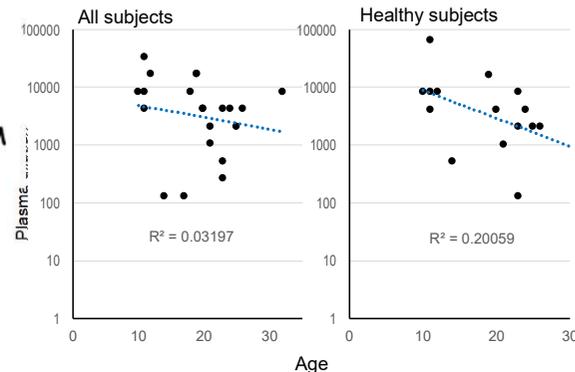


Regimen

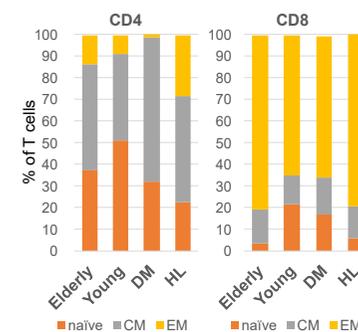


Immune response to Flu Vaccine

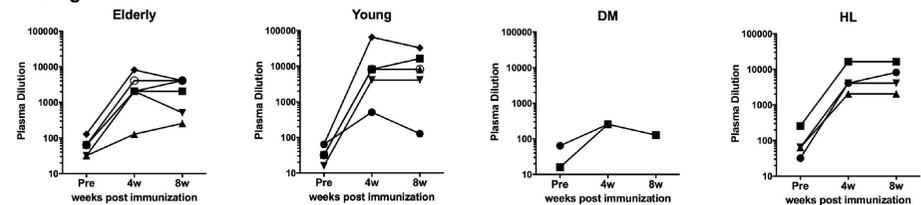
anti-HA IgG titer vs Age



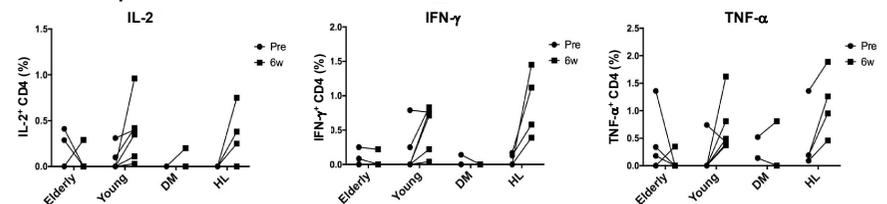
	n	Age (mean)	Age (range)	anti-HA IgG titer (mean)
Elderly	6	> 22	24.0 ± 1.27	
Young	6	10-14	11.5 ± 1.38	
DM	2	14	14.0 ± 0	
HL	4	18-21	19.5 ± 1.29	



anti-HA IgG titer



T-cell immune response

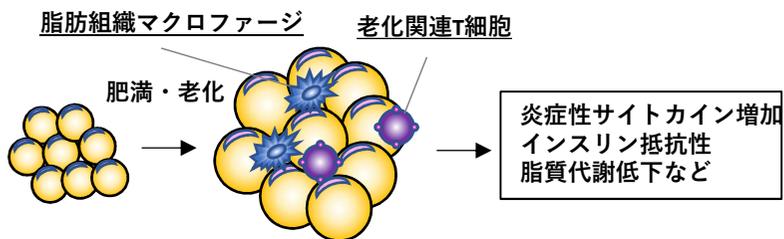


巨大カニクイザルコロニーより、Aged group, Obesity groupを選定し整備した。インフルエンザワクチン接種後に誘導された抗体価を解析したところ、Young群に比べElderly群では低く、抗体価と年齢での逆相関を示した。また、DM群ではその年齢にも関わらず、顕著に低かったが、HL群では観察されなかった。Elderly群およびDM群において同様の免疫反応の低下がインフルエンザウイルス特異的T細胞においても観察された。

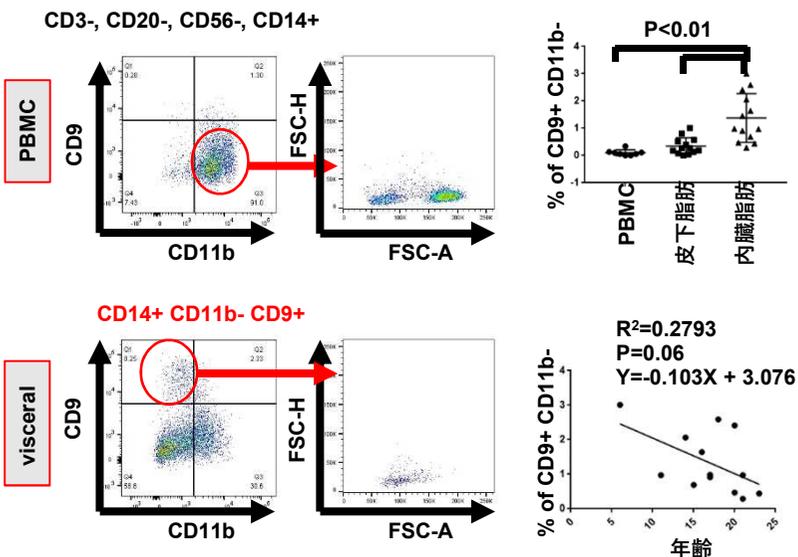
脂肪組織への新規免疫細胞浸潤と脂質代謝低下の関連



目的: 近年、老化や肥満に伴い、脂肪組織に特徴的な免疫細胞が浸潤することで、炎症性サイトカインの増加や脂質代謝低下、インスリン抵抗性を示すといわれている。しかし、研究のほとんどがマウスを用いて研究が行われている。本研究では、各世代のサルを用いて、老化と脂肪細胞に存在する免疫細胞が脂肪組織にどのような影響を与えているか解析を行う。

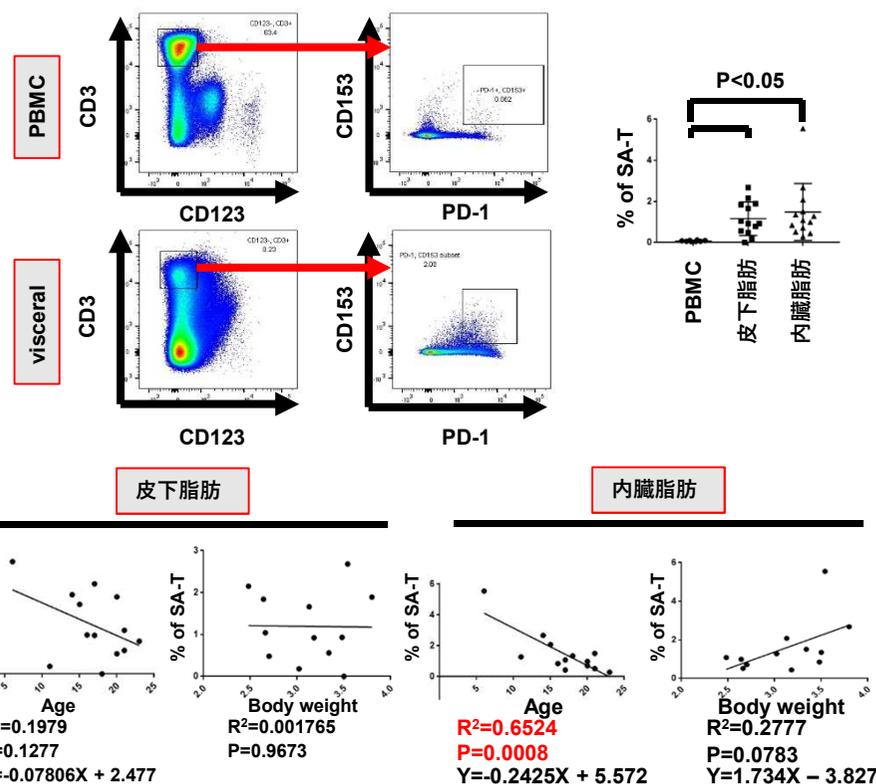


新規CD9+マクロファージ様細胞の発見と年齢との関連



脂肪組織にはCD14+, CD11b-, CD9+の新規マクロファージ様細胞の浸潤を確認した。この細胞は内臓脂肪に多く存在し、年齢とともに減少、この細胞は脂肪細胞での脂質代謝やインスリン抵抗性などに関与する可能性が考えられる。

Senescence associated-T様細胞と年齢との関連

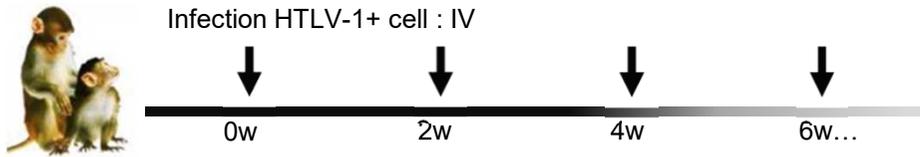


老化関連T様細胞 (SA-T様細胞) はPBMCでは検出されず、内臓脂肪および皮下脂肪で検出された。また、SA-T様細胞はも体重と相関する傾向にあった。一方、皮下脂肪では、体重との相関が全く見られなかった。

HTLV-1感染カニクイザルモデルの確立

ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)感染は、一部の感染者に成人T細胞白血病(ATL)、瘻性脊髄麻痺 (HAM/TSP)を引き起こすことが知られているが、その発症メカニズムについては未だ不明な点が多く、予防法も確立されていない。本研究では、HTLV-1感染疾患の病態解析および予防法の開発を目指し、その基盤となるHTLV-1感染カニクイザルの確立を試みた。

Infection Regimen



Expt. 1 (#001, #002)

Infection I (0w)

ATL-056i 2×10^7 cells/monkey
ATL-040 1×10^7 cells/monkey

Infection II (4w)

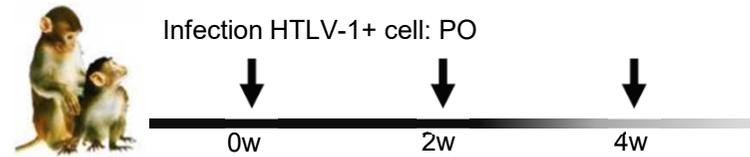
ATL-040 1×10^8 cells/monkey

Expt. 2 (#005, #006)

Infection I (0w)

ATL-040 1×10^8 cells/monkey (#005)
ATL-056i 1×10^8 cells/monkey (#006)

Infection Regimen



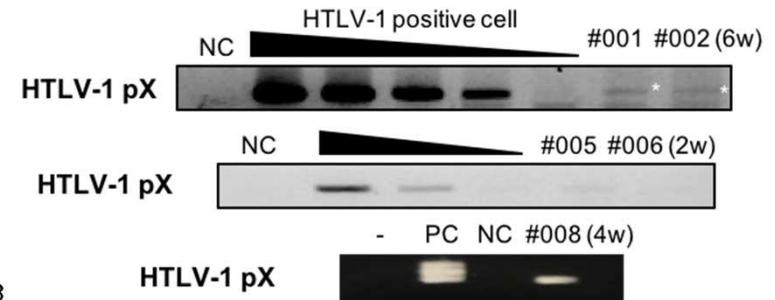
Juvenile CM (8 Mo)

Expt. 3 (#008)

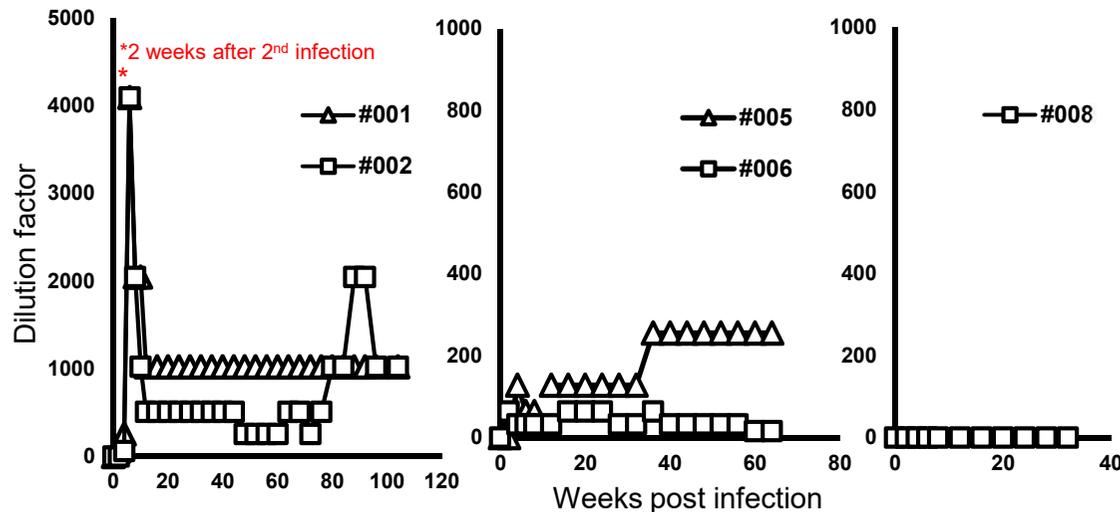
Oral Infection (0w)

ATL-040 5×10^8 cells/monkey

Detection of HTLV-1 provirus



Determination of anti-HTLV-1 Abs in plasma



- ATL患者由来HTLV-1感染細胞(ATL-040, ATL-056i)を接種したカニクイザルより、抗HTLV-1抗体、プロウイルスDNA、ウイルスタンパク質発現細胞が検出された。
- ATL患者由来HTLV-1感染細胞を用いることで、100%の確率でHTLV-1感染が認められ、HTLV-1感染カニクイザルが確立された。
- ATL-040の経口投与を行った幼齢個体よりプロウイルスDNAを検出したが、抗HTLV-1抗体は陽転しなかった。

アジュバント抗原組み込み弱毒エイズウイルスの霊長類を用いた評価

研究目的

・Ag85B発現弱毒エイズウイルス(SHIV-Ag85B)を構築し、強毒株SHIV89.6Pに対する防御効果を長期間検討した

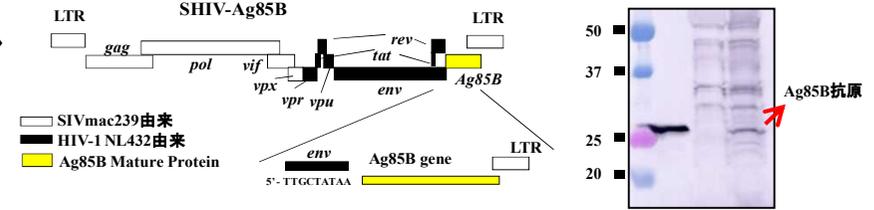
抗酸菌分泌抗原; Antigen85B (Ag85B)

- 抗酸菌が分泌する主要な蛋白(325aa)
- 結核菌に対し、ワクチン効果(*Vaccine* 2014)
- マウス喘息モデルに対する治療効果. (*PLoS One* 2014)
- HIVDNAワクチンのTh1指向性アジュバント効果(*J.Immunol.* 2005)
- アトピー性皮膚炎の治療効果. (*Arch. Dermatol. Res.*2008)

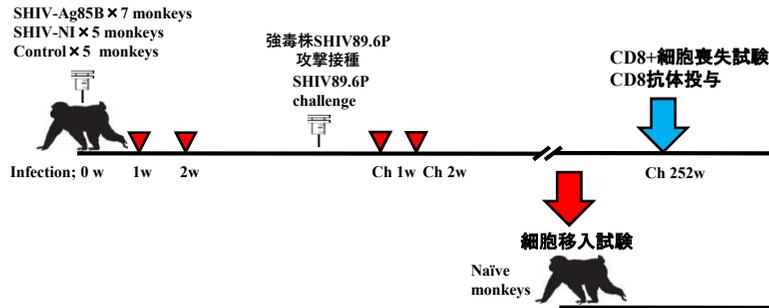
アジュバント発現弱毒ウイルス作製

Ag85B発現弱毒エイズウイルス作製(SHIV-Ag85B)

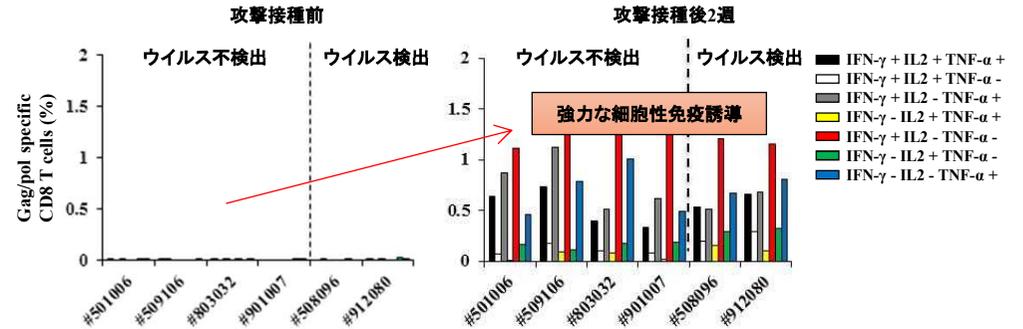
SHIV-Ag85B構造遺伝子設計図



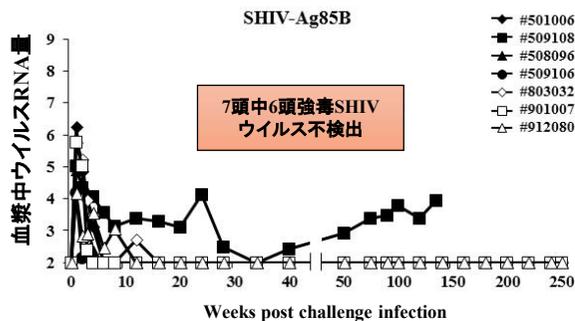
実験スケジュール



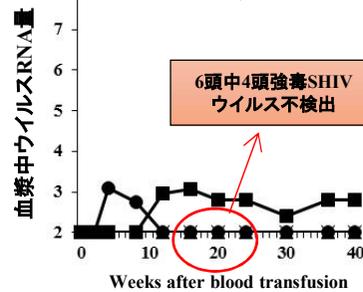
強毒株SHIVを制御した6頭における攻撃接種後の細胞性免疫(マルチサイトカイン産生細胞)の解析



SHIV-Ag85B接種サルにおける強毒株SHIV89.6P攻撃接種試験

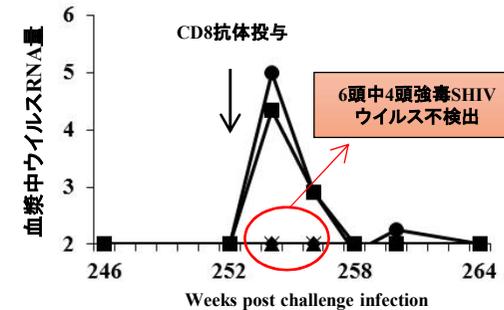


Naïveサルを用いた細胞移入試験 レシピエント(ドナー;SHIV-Ag85B接種サル)



SHIV-Ag85B接種サル6頭中4頭で、強毒株SHIVのウイルス量を完全に抑える。

SHIV-Ag85B接種サルにおけるCD8+細胞喪失後の強毒株SHIVウイルス量



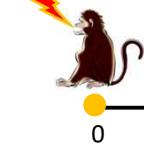
SHIV-Ag85B接種サルは強毒株SHIVを長期間、完全制御することを明らかにした

サルを用いた結核感染後に誘導される免疫応答の解析

目的: 結核感染後の肺および末梢血中への自然免疫担当細胞の浸潤や免疫応答の確認

結核菌感染(経気道投与)

40 CFU

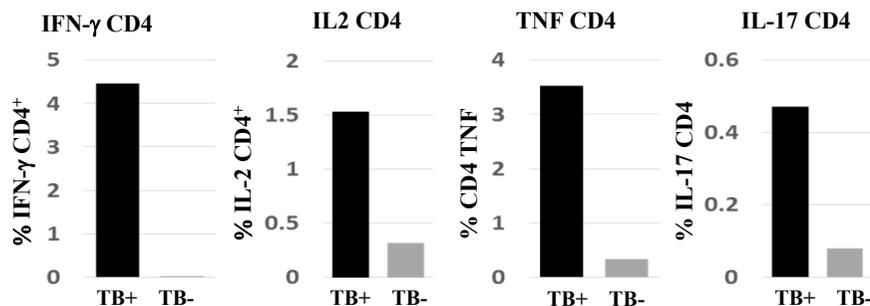


8 週

PBMC・BALの回収 → フローサイトメーター解析

図1 サル結核実験スケジュール

(a) BAL



(b) PBMC

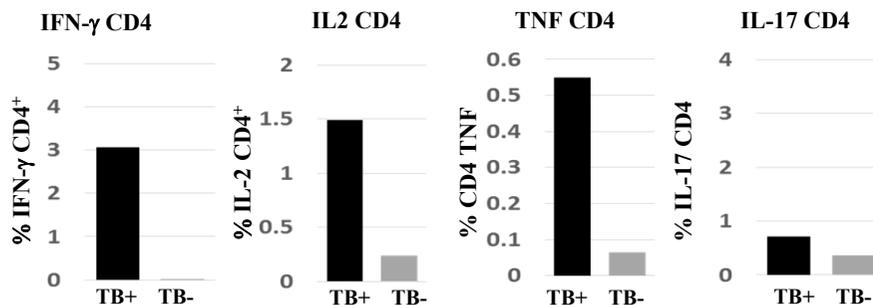
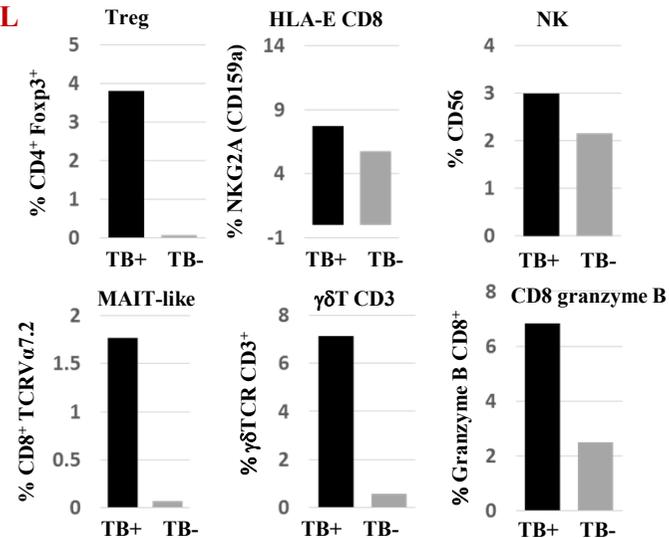


図2 結核感染8週間後のCD4T細胞免疫応答

結核感染8週後のBAL細胞(a)およびPBMC(b)をPPDで刺激し、各サイトカインを産生するCD4T細胞を確認した。

(a) BAL



(b) PBMC

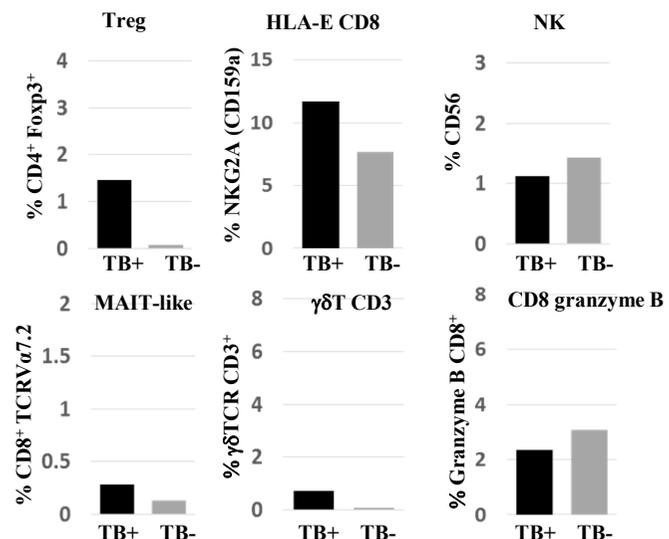


図3 結核感染8週間後の自然免疫担当細胞

結核感染8週後の肺胞洗浄液(a)および末梢血中(b)への浸潤細胞の解析

rHPIV2結核ワクチンの効果とブースターワクチンとしての可能性の検討

目的 カニクイサルを用いた結核感染モデルにてrHPIV2ワクチンの防御効果を検討する。またBCGとのブースター効果の可能性も検討する。

(a) ワクチン抗原



ワクチンベクター

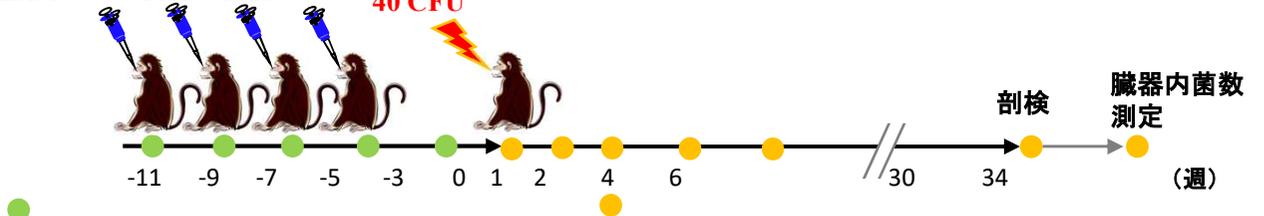
ΔHN-rHPIV2

- 複製：不能（2次粒子の感染不可）
- アジュバント活性（++）

(b) ΔHN-rHPIV2(経鼻投与)

Ag85B: 1.7×10^8 TCID50/head
EM: 1.7×10^9 TCID50/head

結核菌感染(経気道投与)
40 CFU



- 臨床診断 (CT検査, 体重, 体温, 等)
- PBMC・BAL細胞回収 (免疫応答確認、保存用)

- 臨床診断 (CT検査, 体重, 体温, 等)
- 血液検査 (赤血球沈降速度, 血球算定, C反応性蛋白等)

図1 rHPIV2ワクチン(a)とサル結核実験スケジュール(b)

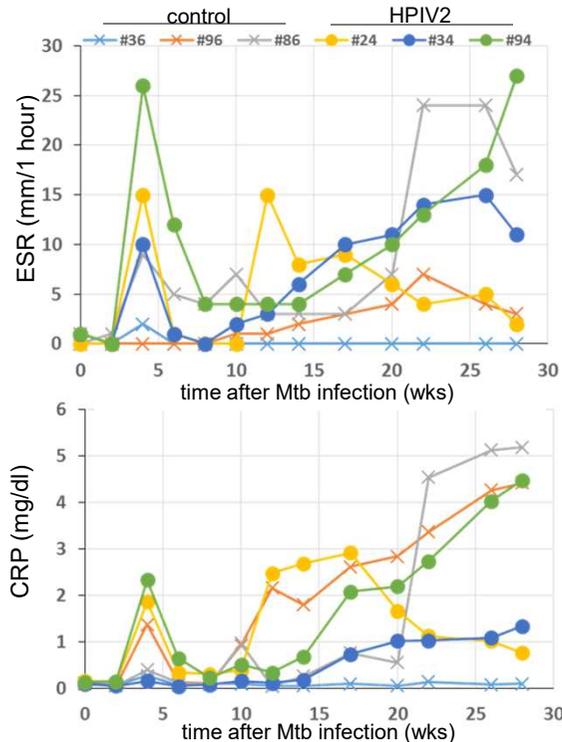


図2 赤血球沈降速度(上)とC反応性蛋白(下)

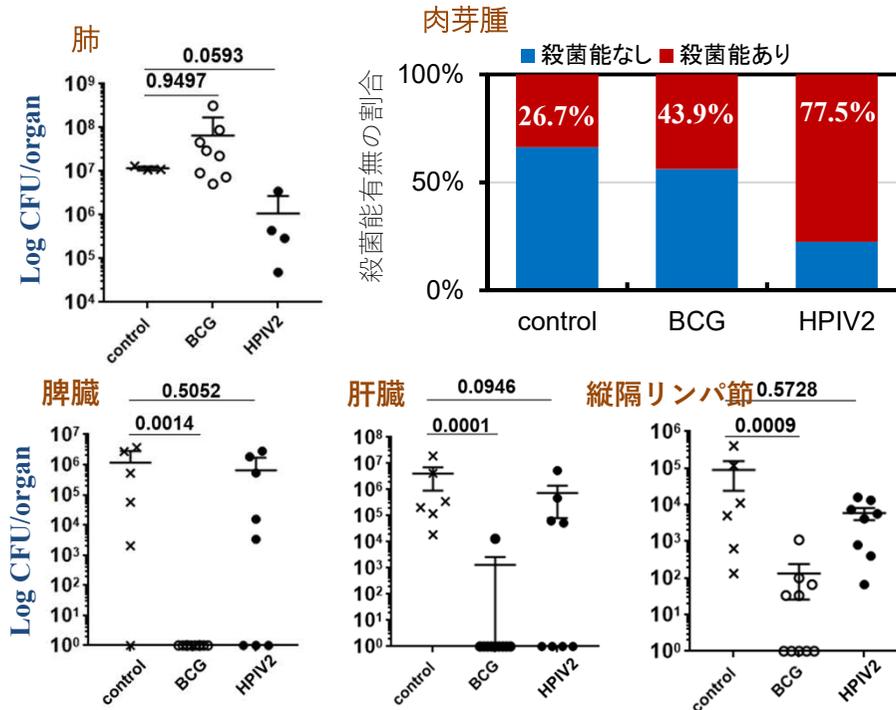


図3 臓器内菌数と肉芽腫の殺菌能

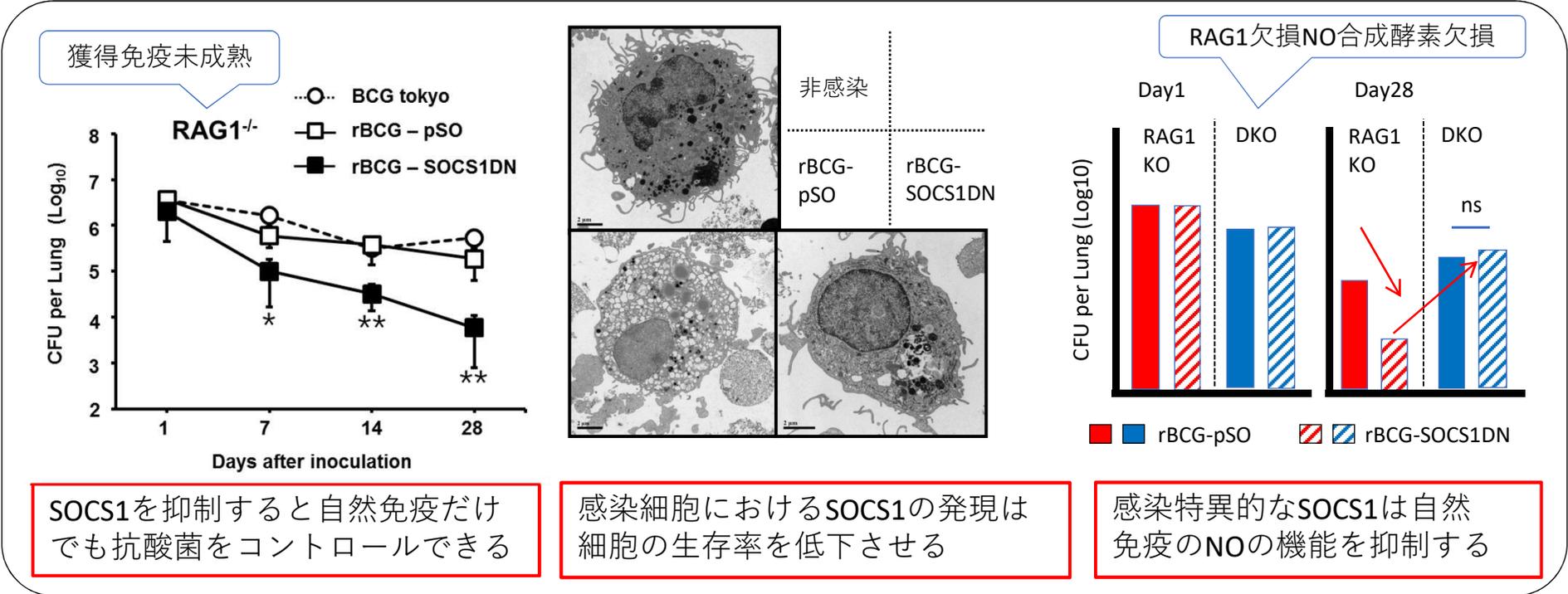
HPIV2は肺結核に対して、BCGは全身性結核に対してワクチン効果を示した。

SOCS1アンタゴニスト発現型組換BCG

HIV感染者や免疫不全児では播種性BCGを引き起こすためにBCGは使用不可

抗酸菌：感染細胞でSOCS1の発現を誘導

SOCS1アンタゴニスト発現型組換BCGを開発 (rBCG-SOCS1DN)
 ...弱毒化かつワクチン効果の増強



SOCS1を抑制すると自然免疫だけでも抗酸菌をコントロールできる

感染細胞におけるSOCS1の発現は細胞の生存率を低下させる

感染特異的なSOCS1は自然免疫のNOの機能を抑制する

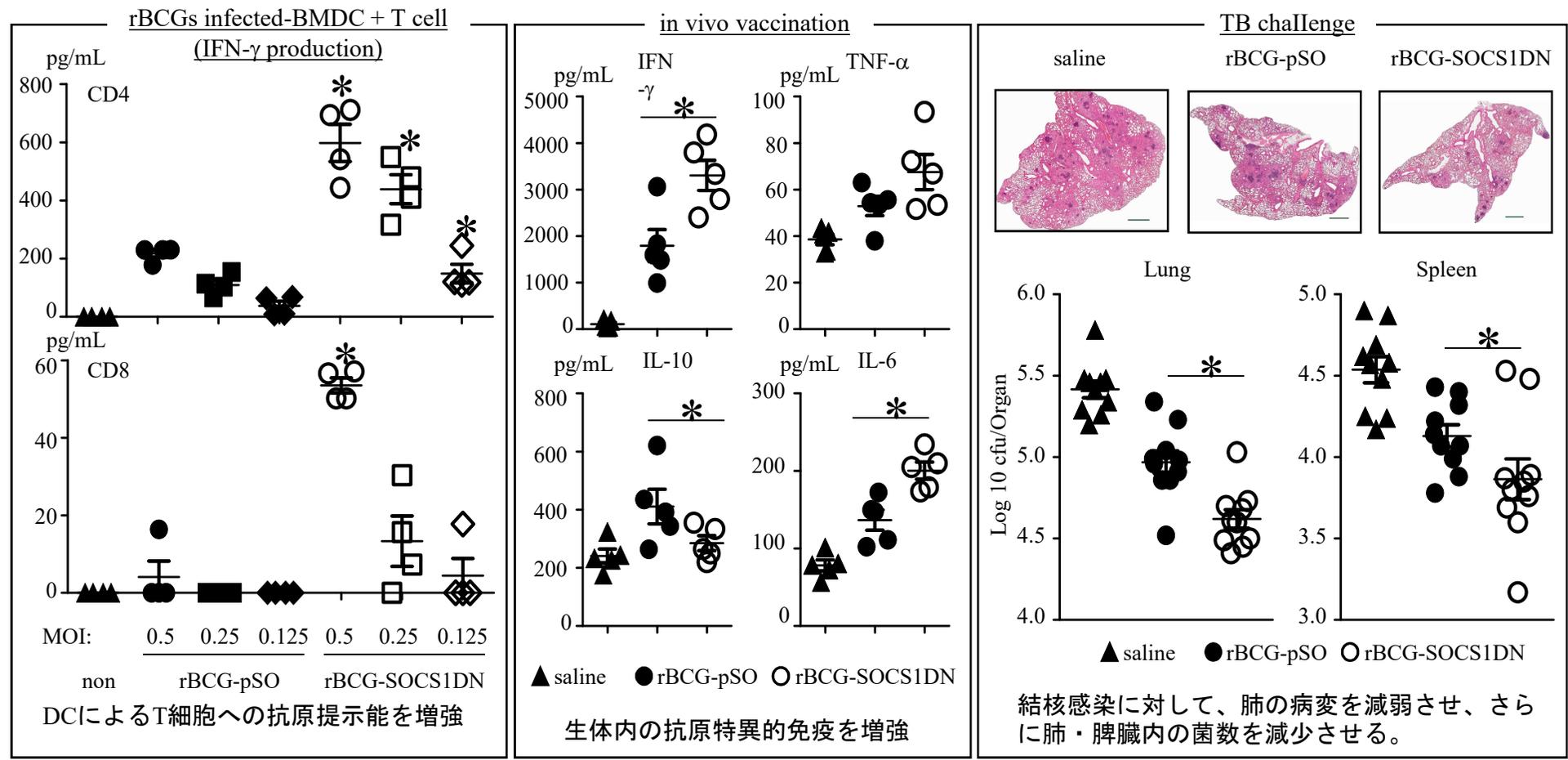
抗酸菌は、宿主細胞にSOCS1を発現させることにより自然免疫におけるNOの産生を抑制し、感染初期における殺菌機構の回避により感染成立することを発見。

➡ rBCG-SOCS1DNの新規結核ワクチンとしての可能性を検討
 SOCS1DN発現による結核菌の弱毒化を検討

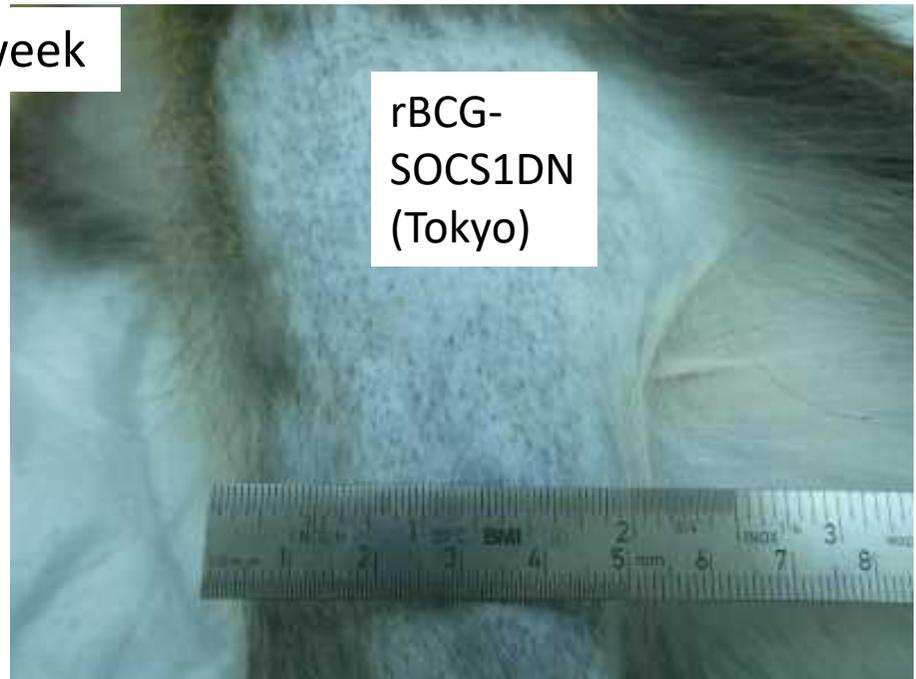
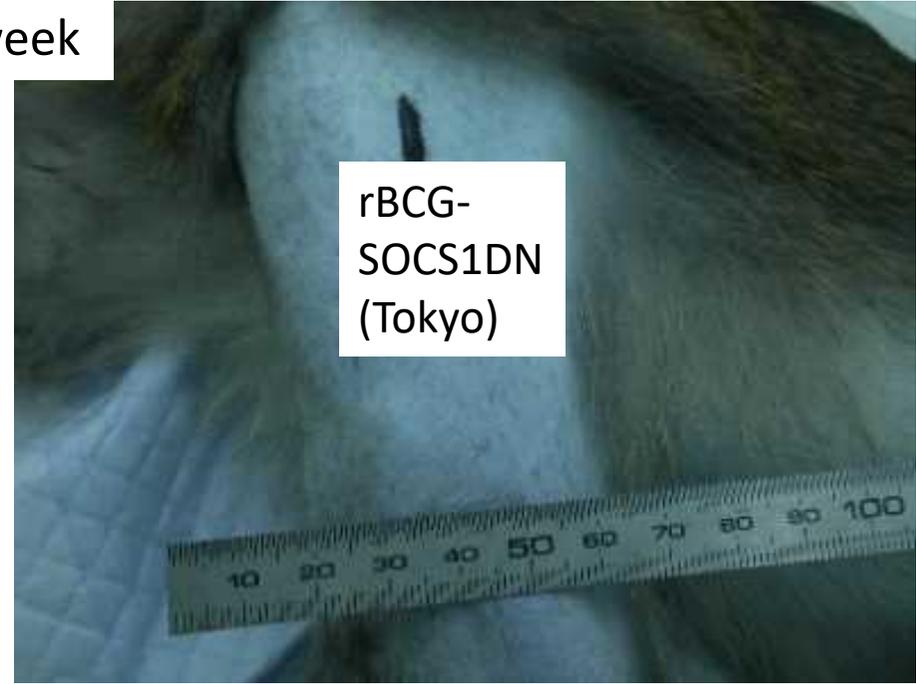
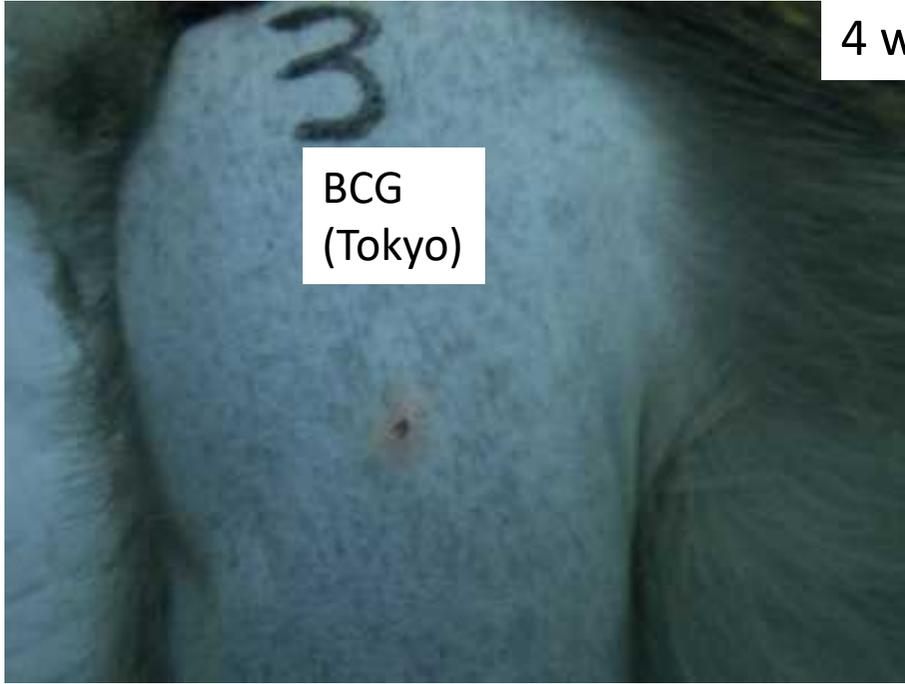
SOCS1アンタゴニスト発現型組替BCG(rBCG-SOCS1DN)ワクチンによる結核防御効果

BCGによって発現されるSOCS1によるワクチン効果の減弱

SOCS1を感染細胞でのみ抑制させる新規結核ワクチンrBCG-SOCS1DNの開発



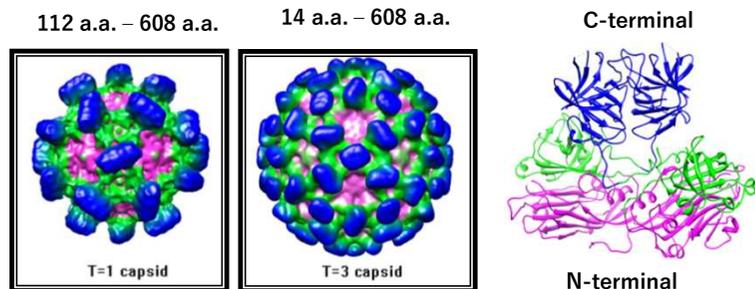
SOCS1を制御する事によってDCからT細胞(CD4⁺, CD8⁺)への抗原提示が増加される事により、生体における免疫を増強し、結核菌感染に対する防御能が強化される事を明らかとした。



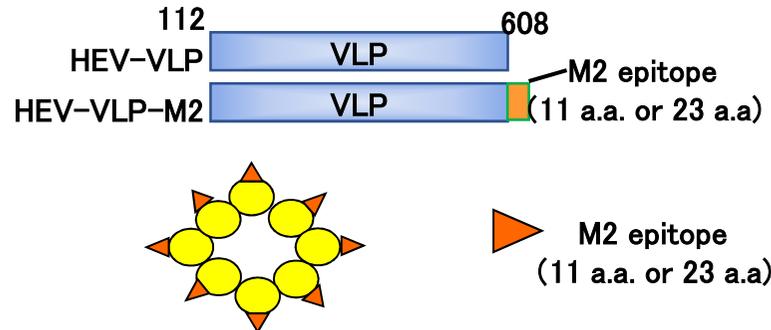
「食べるワクチン」：VLP発現トマトのワクチン効果の検討

目的:「食べるワクチン」は、免疫誘導物質を発現する食物を食べることで、腸管粘膜に直接届くことにより通常の予防接種では得ることのできない粘膜免疫を惹起できることが期待される。しかし、免疫誘導物質が腸管に届くまでにされてしまうために、経口によるワクチンはあまり開発がなされていない。本研究では、消化されずに腸管まで到達できるHEVのウイルス様粒子(VLP)を発現するトマトによるワクチン効果を検討する。

HEVウイルス様中空粒子(HEV-VLP)

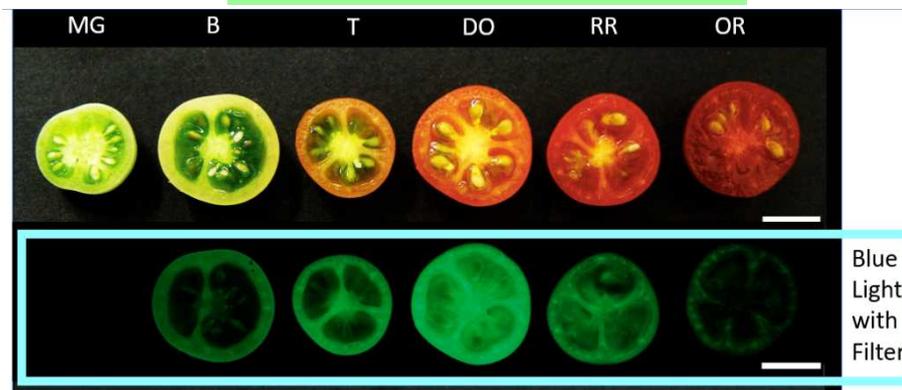


インフルエンザM2抗原発現キメラHEV-VLP



HEVのORF2タンパク質はORF2が60個集合して形成されるT=3 CapsidとRNA結合領域を持たない、T=1 capsidの2つの形態をとる。T=1 capsidはRNA結合領域を持たないため安全性が高い。

トマトにおけるHEV抗原の発現



食用に適するトマトで抗原の発現が確認された！！

I say tomato

A new super-tomato highlights Europe's outdated approach to gene editing.

The world produces some 800 billion tomatoes each year — but how many of them are worth eating? Thousands of years of breeding have produced a fruit that often suits farmers and sellers more than consumers. Vines now grow in an orderly fashion, and produce lots of tomatoes that stay in place until they are harvested and are firm enough to be shipped long distances. But, in too many cases, studies have confirmed that flavour and nutrition have got lost somewhere along the way.

Plant scientists are on the case. This week, three papers from research groups around the world detail attempts to make a new type of super-tomato: one that does not sacrifice taste for convenience. To do this, the researchers used CRISPR-Cas9 gene editing, which allowed them to modify specific genes in wild relatives of tomatoes. The result — according to a scientist who has tasted one of the fruits — is an “aromatic” tomato that could re-energize taste buds.

The studies are a demonstration of the fruits of decades of painstaking plant-genetics research: a cupboard full of genes with known effects, that can each be adjusted to turn an unruly wild plant into a valuable domesticated one. The work serves as a reminder of the value of basic research into plant growth and development. And it shows how other useful traits could be introduced in other crops.

One group edited a wild relative of the tomato called *Physalis peruviana*, which is grown in Central and South America (Z. H. Lammon *et al. Nature Plants* 4, 766–770; 2018). Its berries are tasty and slightly sweet, but its sprawling growth pattern and tendency to drop its fruit onto the ground make it ill-suited for large-scale agriculture. The edited plant was more compact, and produced larger fruits.

The other two groups tinkered with a relative called *Solanum pimpinellifolium*. This species is stress tolerant and resistant to the commercially devastating disease bacterial spot, but the researchers sought to boost the size and attractiveness of its fruits.

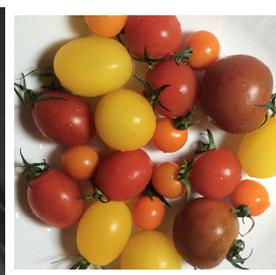
Biotechnol. <http://doi.org/cvtr2>; 2018). I they aimed to combine the benefits of *S. pimpinellifolium* with the features of modern tomatoes that appeal to farmers and consumers. The researchers also laboured to increase the nutritional value of their new tomatoes: first, by boosting the levels of lycopene, a carotenoid linked to health benefits, and second, by focusing on a greater vitamin C content.

To achieve the same product through conventional breeding would have taken decades, says Jorg Kudla at the University of Münster in Germany, a lead author on one of the papers. Instead, it took his team three years. It's an example of science serving a need of society — and one that highlights the flawed steps the European Union is taking that will threaten such work in the future. In July, the European Court of Justice ruled that foods produced by CRISPR-Cas9 gene editing must be bound by the same onerous regulations as genetically modified crops. The resulting mandatory tests and trials will massively increase the cost of developing a commercial product, which in turn makes funding for research on such products less viable.

The expense is one reason why genetically modified crops have so far yielded little benefit for consumers: because it has cost so much to produce such plants, companies focus on developing commodity crops and traits that appeal to farmers. Kudla has grant applications for up to €2 million (US\$2.3 million) now under review to fund research related to his gene-editing work. But funders have a responsibility to spend their cash in ways that might benefit taxpayers, he notes, and if such crops have no commercial future in Europe, it might be a struggle to justify paying for the crops' development.

The long-awaited European court decision puzzled many researchers, because the technique involves gene edits that merely disable a gene, rather than rewriting it with a specific sequence. Scientifically, advocates see this as being similar to using a chemical or radiation to generate mutations and then screening the plants for a desired trait — which is not classed as genetic modification. But with CRISPR-Cas9, researchers can generate the mutations in specific genes, without having to screen thousands of plants for each trait they want to introduce.

The ruling came as a blow, particularly because, in January, an advocate-general to the European court argued that such crops do not need the same scrutiny as conventional genetically modified crops. And it highlights the degree to which researchers are at odds with officials on genetic modification in Europe. Scientists and supporters must keep up



共同利用施設運営

医薬基盤研究所研究員以外のセンターの利用

霊長類医科学研究センター 共同利用施設 運営

平成30年度	共同利用施設利用申請数	継続・変更申請数	新規申請数	計
	医科学実験施設：	9	8	17
	感染症実験施設：	3	4	7
	(BSL2)：	(2)	(1)	
	(BSL3)：	(1)	(3)	
	計：	12	12	24

平成30年度	共同利用施設利用採択数	継続・変更採択数	新規採択数	計
	医科学実験施設：	9	6	15
	感染症実験施設：	3	4	7
	(BSL2)：	(2)	(1)	
	(BSL3)：	(1)	(3)	
	計：	12	10	22

採択率	継続・変更申請	新規申請	計
医科学実験施設:	100%	75%	88%
感染症実験施設:	100%	100%	100%
計:	100%	83%	92%

平成30年度における実験用サル類管理頭数

飼育施設	区分	カニクイザル	ミドリザル	アカゲザル	タマリン	マーモセット	計
第一棟	繁殖・育成	527					繁殖・育成 1572
第二棟	繁殖・育成	378					
第七棟	繁殖・育成	591					
第三棟	育成	61	5	9	1		研究 248
	一般実験	12					
高度感染症実験施設(P2)	感染実験	56		19		10	
高度感染症実験施設(P3)	感染実験	25		16			
医科学実験施設	一般実験	110					
計		1760	5	44	1	10	1820