

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

ゲノム創薬およびゲノム医療技術の開発・臨床応用に資する
画期的な霊長類研究リソースの開発研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 寺尾 恵治

独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター

平成19（2007）年3月

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総合研究報告書（平成18年度）

ゲノム創薬およびゲノム医療技術の開発・臨床応用に
資する画期的な霊長類研究リソースの開発研究

区分	氏名	所 属	職名
班長	寺尾 恵治	医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	センター長
班員	吉田 高志	医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	研究リーダー
	明里 宏文	医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	研究リーダー
	山海 直	医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	研究員
	下澤 律浩	医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	研究員
	揚山 直英	医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター	研究員
	数藤 由美子	日本赤十字社中央血液研究所	主査

目 次

I. 総括研究報告書（平成18年度）

ゲノム創薬およびゲノム医療技術の開発・臨床応用に資する画期的な ----- 1

霊長類研究リソースの開発研究

班長 寺尾 恵治（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター長）

II. 分担研究報告書

1. C型肝炎モデルの有用性評価指標の開発 ----- 5

明里 宏文（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 研究リーダー）

2. 循環器疾患モデルの開発 ----- 12

揚山 直英（国医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 研究員）

3. 軸索輸送モーター蛋白発現抑制によるアルツハイマー病関連蛋白の蓄積 --- 16

木村 展之（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 研究員）

4. 実験用カニクイザルを用いた閉経後骨粗鬆症モデルの開発 ----- 20

吉田 高志（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 研究リーダー）

5. サルを用いた発生工学領域での基盤技術開発

—カニクイザルES細胞：TRSK-1株の樹立— ----- 23

山海 直（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 主任研究員）

6. カニクイザルの染色体地図の作製 ----- 30

数藤 由美子（日本赤十字社 中央血液研究所 主査）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 34

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 36

ゲノム創薬およびゲノム医療技術の開発・臨床応用に資する画期的な霊長類研究リソースの開発研究

主任研究者 寺尾恵治 医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター長

研究要旨

ヒトゲノムの研究成果をもとにして開発が進められているゲノム創薬やゲノム医療技術で標的とされ今後10年間で患者数の急増が危惧されている厚生労働行政上重要な疾患として、痴呆症、循環器疾患、骨粗鬆症と、世界的に重要な感染症としてC型肝炎を取り上げ、新規な治療法、予防法開発に有用な画期的な霊長類の疾患モデル、感染モデル、基盤技術、汎用リソースの開発を試み、以下の結果を得た。

- 1) **C型肝炎モデル**: C型肝炎ウイルス(HCV)に近縁なGBV-Bウイルスをタマリンに感染させることにより、再現性のある感染モデルを確立した。同モデルを用いて、ワクチンの有効性評価などに必須な血清生化学マーカー、病理解析技術、ウイルス動態解析などの技術を確立した。
- 2) **循環器疾患モデル**: ヒト疾患に極めて類似した心不全病態を呈する拡張型心筋症をはじめとするカニクイザルの循環器疾患モデルを診断・抽出することに成功した。20歳以上の個体では、約半数の個体で循環器疾患が確認された。
- 3) **痴呆症モデル**: 軸索輸送に関与するタンパク質(dynein)の機能が加齢と共に低下することを*in vitro*実験で確認し、アルツハイマー症(AD)関連タンパクのシナプス領域への蓄積がAD発症の病態を進行させるとする作業仮説を裏付ける結果を得た。
- 4) **骨粗鬆症モデル**: カニクイザルを用いて閉経後の骨量変化を継時的に測定し、30歳以上の個体で閉経後骨粗鬆症に類似する骨量減少を認めた。
- 5) **発生工学領域の基盤技術**: これまでに整備した発生工学領域の技術を応用し、カニクイザルの新規なES細胞の樹立に成功した。さらに、リポフェクションによりYFP-mito遺伝子を導入したES細胞の作出にも成功した。
- 6) **ゲノムリソースの高度化**: カ新たに66のカニクイザルマイクロサテライトマーカーを確立した。完全長cDNAクローンの配列情報を参考にして、BACライブラリーから46のクローンを抽出し、FISHによる染色体マッピングをおこなった。本法は効率的なカニクイザルの染色体地図作成法として有用である。

分担研究者

吉田 高志

医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・研究リーダー

明里 宏文

同・研究リーダー

山海 直

同・主任研究員

木村 展之

同・研究員

揚山 直英

同・研究員

数藤 由美子

日赤中央血液研究所・研究員

A. 研究目的

痴呆症、循環器疾患、骨粗鬆症はいずれも今後10年間に患者数が急増することが危惧されている重要な疾患である。またC型肝炎は地球規模の最重要感染症であり、感染制圧を目指したワクチンや治療薬の開発が精力的に進められている。これら厚生労働行政上重要な疾患の新しい治療技術として、ヒトゲノムの研究成果をもとにしたゲノム創薬やゲノム医療技術が注目されているが、ヒトゲノム情報を基にした新しい予防法、治療法の開発では、遺伝的に人に近縁なサル類が最も有用なモデル動物とみなされている。

本研究は第一期三年(平成15年～17年)の研究により得られた個体レベルから細胞レベルまでの汎用性の高い基盤的霊長類リソース及び基盤技術をベースにして、ゲノム科学の成果を基にした次世代医学科学研究に有用な戦略的霊長類研究リソースの開発に挑戦する。本研究により有用性の高い疾患モデルが確立できれば、霊長類を用いて新規な治療・予防戦略や医薬品の有効性、安全性を検証することが可能となり、国際競争力のある治療法、治療薬の早期実用化が期待できる。

B. 研究方法

主として独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医学科学研究センターで維持されている繁殖育成群のカニクイザルを用いて実験を行った。C型肝炎モデルでは、新世界ザルのタマリンを、痴呆症モデル開発ではヒト由来神経系培養細胞株 (SH-SY5Y) を用いて解析を行った。循環器疾患の確定診断は、筑波霊長類センターで定期的実施している定期健康診断時に集中的に行った。

上記実験のうち個体レベルでの動物実験および個体からの材料採取については、独立行政法人医薬基盤研究所・動物実験委員会により審査・承認された後実施した。また、動物の取り扱いにあたっては、筑波医学実験用霊長類センター諸内規、作業方式に従って動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。実験の具体的方法については分担研究者の報告書に詳述する。

C. 研究結果および考察

本研究で対象としたモデルおよびリソースの成果を項目毎に記述する。

1) C型肝炎モデルの有用性評価指標の開発:

感染モデルの開発が切望されているヒトC型肝炎感染のサロゲートモデルとして、新世界ザルの一種であるタマリンに HCV に最も近縁な GBV-B を感染させる感染モデルを確立している。本研究では GBV-B 感染タマリンにおける病態解析のための評価指標を確立する目的で研究を行った。その結果、定量的ウイルス測定系および特異抗体測定計の確立、病態評価の血清生化学的マーカーの特定、病理学的解析技術など、病態評価に必須の技術を確立した。これらの整備により、タマリン/GBV-B の感染系を用いた新規治療法及びワクチンの有効性評価のための技術が確立できた。

2) 循環器疾患モデルの開発:

高齢ザル集団を含むカニクイザル繁殖コロニーを対象として、画像診断技術を中心とした診断・解析技術を用いて自然発症の循環器疾患モデルの抽出と解析を行った。その結果、ヒトの病態に極めて類似した心不全病態を呈する拡張心筋症モデルの抽出に成功した。拡張性心筋症以外にも、多様な循環器疾患と診断される個体が少なからず存在したが、特に 20 歳以上の高齢ザルで循環器機能に障害を有する個体の頻度が高かった。これらの自然発症モデルはヒト心疾患の発症機序解明のみならず診断技術および治療法の開発に有用である。

3) 認知症モデル: 実験的にサル類の認知症モデルを開発するためには、発症に関わる新規の仮説に基づく開発戦略が必須である。本研究では、軸索輸送関連タンパクの加齢に伴う機能低下により、アルツハイマー病 (AD) 関連タンパクの神経細胞内蓄積が生じるとする独自の仮説に基づく開発戦略を定めている。今年度は本仮説の妥当性をヒト神経細胞株を用いて検証した。軸索輸送に関わる dynein の発現を抑制する siRNA を培養系に添加した 72 時間後では、AD 関連タンパクである tau および APP の有意な蓄積が確認されるとともに、細胞内での tau の凝集と APP 陽性顆粒の肥大化が確認された。dynein 以外の輸送関連タンパクの発現には変化がないことから、dynein

の機能低下により AD 関連タンパクの細胞内蓄積が生じることが明らかになった。

4) 骨粗鬆症モデル：

カニクイザルを対象として閉経後骨粗鬆症モデルの確立を試みた。カニクイザルの閉経時期を推定するため、20歳以上のメスザルについて月経血発現記録を調査した結果、5頭で最終月経が確認され、最速が18歳11ヶ月、最長が25歳8ヶ月であった。そこで25歳以上の老齡ザルについて、6ヶ月間隔で骨量・骨密度を継時的に測定したところ、骨量が減少する傾向が認められた。本調査結果は、サル類で初めて閉経後の骨量減少を確認したものであり、サル類を用いて閉経後骨粗鬆症モデルが確立できる可能性を強く示唆している。

5) 発生工学領域での基盤技術開発：

これまでに開発してきた基盤技術を応用して、新規のカニクイザルリソースとしてES細胞の樹立を試みた。カニクイザルの成熟卵から顕微授精により胚盤胞を作出し、ES細胞に類似したコロニーを形成する細胞を分離した。この細胞はアルカリフォスファターゼ陽性で胚様体形成能を有し、免疫不全マウスに三胚葉すべての組織で構成されるテラトーマを形成することから、新規のカニクイザルES細胞株 (TRSK-1) と判断した。今後は本ES細胞の表現型及び機能を精査し、ヒトのES細胞を用いた再生医療・細胞治療研究に応用してゆく予定である。

6) ゲノムリソースの高度化：

これまでの研究で整備したカニクイザル主要組織由来のcDNAライブラリー、バクテリアル人口染色体(BAC)ライブラリー、500家系以上の核DNAライブラリーを活用するためのツールとして、マイクロサテライトマーカー(MSM)の整備と染色体地図の作製を試みた。ヒトおよびアカゲザルのMSM情報を基にカニクイザルで多型性を示す66のMSMを確立した。BACライブラリーから351の任意のクローンを抽出し、両端もしくは片側の塩基配列を決定し、ヒト、チンパンジー、アカゲザルのゲノムと対応させ(マッピング)周辺部のMSMを抽出した。一部のクローンについてはカニ

クイザル染色体上にマッピングした。今後は抽出したBACクローンの染色体地図を確定すると共に、周辺のMSMの多型性を確認し、染色体地図の充実を図る必要がある。

以上、本研究で開発を試みた実験用サル類の疾患モデル、基盤技術、新規リソースのいずれも21世紀の医科学研究を視野に入れた重要な課題であり、今後も公的資金の支援を受けて整備を継続する必要がある。本研究で取り上げた霊長類の新規リソースおよび疾患モデルが確立されれば、新規な治療・予防戦略や医薬品の有効性、安全性を霊長類を用いて検証することが可能となり、国際競争力のある治療法のトランスレーショナルに貢献することが可能となる。

E. 結論 (成果の活用、提供)

霊長類に限らず医科学研究用の生物資源(リソース)は汎用性、高品質をキーワードとする基盤的リソースと高付加価値をキーワードとする戦略的リソースに大別される。本研究で整備・開発対象とした霊長類疾患モデルは、特定の研究領域(C型肝炎、循環器疾患、認知症、骨粗鬆症)に特化したものであるが、これまでに有用なモデルが存在せず、かつヒトとの類似性から霊長類モデルが待望されていることから、あえて困難な挑戦を試みた。疾患モデルの価値は、発症機序解明のみならず新規治療薬及び治療法の有効性評価に耐えられるか否かで決定される。開発途上の疾患モデルが確立され、評価系として利用されるまでは公的資金のサポートを必要とする。本報告がモデル開発のfeasibilityを示すものとなることを期待する。

本研究で樹立したカニクイザルのES細胞および各種遺伝的リソースについては、詳細な解析が終了した時点で希望者に配布する予定としている。

F. 研究発表

Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Ogawa H, Nagashima T, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K. Prevention of Immune Responses to Human

Erythropoietin in Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*). J Vet Med Sci. 2006, 68: 507-510.

Ageyama N, Koie H, Nakamura S, Ono F, Kanayama K, Sakai T, **Terao K**, **Sankai T**. Non-human Primate Model of Severe Heart Failure Associated with Dilated Cardiomyopathy. (投稿中)

Hara M, Kikuchi T, Sata T, Nakajima N, Ami Y, Sato Y, Tanaka K, Narita T, Ono F, **Akari H**, **Terao K**, Mukai R. Detection of SRV/D shedding in body fluids of cynomolgus macaques and comparison of partial gp70 sequences in SRV/D-T isolates. Virus Genes, (印刷中)

Ishii K, Iijima S, **Kimura N**, Lee Y-J, **Ageyama N**, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, **Terao K**, Miyamura T, **Akari H**: GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues *in vivo*. *Microbes and Infection*, (印刷中)

Kimura N, Imamura O, Ono F, **Terao K**. Aging attenuates dynactin-dynein interaction: down-regulation of dynein causes accumulation of endogenous tau and APP in human neuroblastoma cells. J Neurosci Res, 2007;(投稿中)

Kimura N, Ishii Y, Suzaki S, Negishi T, Kyuwa S, Yoshikawa Y. A β upregulates and colocalizes with LGI3 in cultured rat astrocytes. Cell Mol Neurobiol, 2006; (印刷中)

Kimura N, Takahashi M, Tashiro T, **Terao K**. Amyloid β up-regulates brain-derived neurotrophic factor production from astrocytes: rescue from amyloid β -related neuritic degeneration. J Neurosci Res, 2006; 84: 782-789.

Okabayashi S, **Kimura N**. LGI3 colocalizes with intracellular A β and endocytosis-associated proteins in monkey brains: Aging causes these proteins to accumulate in lipid rafts. Acta Neuropathologica, 2007; (投稿中)

Okada H, Hashizume R, **Yoshida T**, **Sankai T**, Ito M. Characterization of blastocysts reconstructed by the cells equivalent to mouse 16-cell-stage blastomeres. (投稿中)

Okada A, Sudo T, Igarashi H, Kuroda M, Yoshikawa Y, Hidaka H, **Sankai T**. Distribution of the Ca²⁺ binding proteins

calyculin (S100A6) and annexin XI in guinea pig seminiferous cells and epididymal. (投稿中)

Shibata H, **Ageyama N**, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, **Terao K**, Hanazono Y. Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting. Stem Cells. 2006, 24:1450-1457.

Shimozawa N, Okada H, Hatori M, **Yoshida T**, **Sankai T**. Comparison of methods to stimulate ovarian follicular growth in cynomolgus and African green monkeys for collection of mature oocytes. Theriogenology, (印刷中)

Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Kobayashi M, Tomonaga M, Izumi T, Fukunaga K, Sasada A, Abudu A, Miyauchi Y, **Akari H**, Iwai K, Uchiyama T: Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif-Cullin5-ElonginB-ElonginC complex. Virology 2006, 344: 263-266.

Yasuda T, Miyachi S, Kitagawa R, Wada K, Nihira T, Ren YR, Hirai Y, **Ageyama N**, **Terao K**, Shimada T, Takada M, Mizuno Y, Mochizuki H. Neuronal specificity of alpha-synuclein toxicity and effect of Parkin co-expression in primates. Neuroscience. 2007, 144:743-753.

Asano T, Sasaki K, Kitano Y, **Terao K**, Hanazono Y. In vivo tumor formation from primate embryonic stem cells. Methods Mol Biol. 2006;329:459-67.

Kikuchi T, Hara M and **Terao K**, Development of microsatellite marker set applicable to genome-wide screening in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), Primates, 2006 Nov 22; [Epub ahead of print]

Nomiyama H, Otsuka-Ono K, Miura R, Osada N, **Terao K**, Yoshie O and Kusuda J. Identification of a Novel CXCL1-Like Chemokine Gene in Macaques and its Inactivation in Hominids. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2007, 27:32-37.

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

H. 健康危険情報

特になし

C型肝炎モデルの有用性評価指標の開発

分担研究者 明里宏文（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター）

研究協力者 飯島沙幸、木村展之、揚山直英、岩崎優紀

（医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター）

石井孝司、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男（国立感染症研究所 ウイルス2部）
榎昇、森健一（先端生命科学研究所）

研究要旨：HCV は、ヒト及びチンパンジー以外の動物では感染・発症しない。このことは病態解明および治療薬・ワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの有効性試験を行なう上での大きな障害となっている。我々はこの克服を目的として、サル類を用いたC型肝炎のサロゲート動物モデルの開発を進めている。HCV に最も近縁なウイルスである GBV-B を用いた C型肝炎のサロゲート（代用）モデルの開発に向けて、ウイルス感染タマリンにおける病態解析のための評価指標を確立する事を目的とした。本研究の結果、①再現性のある感染システム、②定量的ウイルス測定系、③生体内での肝障害を裏付ける血清生化学マーカー、④抗 Core および NS3 抗体価の定量的測定系、⑤病理学的解析技術、⑥ウイルス感染後の個体内ダイナミクス、など多様なウイルス側、生体側からの解析技術を確立できたことから、これらのデータを総合的に判断することで新規治療薬やワクチン候補薬の有効性評価が可能となった。

A. 研究目的

現在、本邦における C 型肝炎ウイルス (HCV) キャリアは約 200 万人とされる。その多くが肝硬変・肝細胞癌へと移行し、年死亡者は 3 万人を数えることから、保健医療上その克服は急務である。インターフェロン・リバビリンを基軸とした現行治療法ではそのウイルス排除率は 50%程度であり、半数の患者は肝癌発症のリスクを避けられないことから、新規治療法の開発が不可欠な状況となっている。おける各種定量的評価マーカーを用いることにより、新規治療薬やワクチンの評価に有用であるのみならず、C型肝炎の発

一方 HCV は、ヒト及びチンパンジー以外の動物では感染・発症しないため、このことが治療薬・ワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの有効性試験を行なう上での大きな障害となっている。

本研究ではこの点を克服すべく、HCV に最も近縁なウイルスである GBV-B を用いた C型肝炎のサロゲート（代用）モデルの開発に向けて、ウイルス感染タマリンにおける病態解析のための評価指標を確立する事を目的とした。本感染モデルに症機序や発症防御に係る宿主免疫応答の解明にも寄与するものと期待される。

B. 研究方法

新世界ザルであるタマリンおよびマーモセット感染実験は当センター感染症実験施設にて実施した。感染性分子クローン pGBB は Dr. Bukh (NIAID, NIH, USA) より分与を受けた。pGBB から *in vitro* transcription により得られたウイルスゲノム RNA をサルに接種後 4 週で全採血した plasma を以後のウイルス接種用ストックとした。同時に得られたサル由来各種組織を用いて、免疫病理学的解析を行なった。感染ザルよりケタミン麻酔下で定期的に採血を行ない、血清生化学検査、plasma 中ウイルス量及び抗体価測定を行った。抗体価は、pGBB よりサブクローニングした Core 発現ベクターを導入した大腸菌からリコンビナント Core および NS3 蛋白を得て、これを基に ELISA 系を構築して測定を行った。血液および組織中のウイルス RNA 量および複製中間体（ネガティブ鎖）RNA は PCR 法により定量した。なおすべての動物実験は、倫理面を含めて医薬基盤研究所動物実験委員会の審査・承認を得て実施した。

C. 研究結果

GBV-B 感染性 plasma (1.3×10^9 copies/head) を 2 頭のタマリン肝臓に接種したところ、二頭ともに接種後 2～10 週にわたり顕著なウイルス血症 (10^8 ～ 10^{10} copies/ml) および肝炎マーカーである ALT 値の上昇を主徴とする急性～亜急性 C 型肝炎様症状を発症した。代表例を図 1 に示す。どの個体においても ALT 値と血中ウイルス量の推移はほぼ並行していたことから、肝臓中でのウイルス複製増殖が肝障害を誘導しているものと考えられた。

次にウイルス感染により誘導される免疫応答を検討するため、我々が開発した

ELISA 法を用いて抗 Core および NS3 抗体価を測定した。その結果、ウイルス血症および血清生化学値の低下と相反して抗 Core および NS3 抗体価両方の顕著な上昇が認められた。抗体価は血中ウイルスが消失する感染後 10～12 週をピークとして、以後緩やかに低下した (図 1)。

ところで急性 C 型肝炎時における病態は、ヒトにおいてはまだ明らかでない面が多い。特に、急性期以降に何故慢性化へと移行する場合と緩解する場合に分かれるのか、それを規定する要因は何なのか、これらに対する回答は現在まで得られていない。その理由として、急性期に顕著な症状を呈さず解析時期を逃してしまいがちであることや、個体内でのウイルス動態や宿主応答などを詳細に解析することが困難であることが挙げられる。そこで、我々のサルモデルを用いて急性 C 型肝炎期の病態を検討するため、ウイルス感染後 4 週において安楽殺を行ない、全身の臓器を採取し病理学的見地およびウイルス動態・生体内分布といった観点からの解析を行なった。

GBV-B 感染タマリンについて、肝臓における病理学的解析を行ったところ、肝細胞変性、類洞拡張が認められ、またアポトーシスの指標となる活性化カスパーゼ 3 に陽性を示す細胞も多数観察された (図 2)。これらの結果は ALT が高値を示す原因と考えられる。次に、個体レベルでのウイルス動態を検討するため、主要組織におけるウイルスゲノム RNA を定量した。その結果、肝臓におけるウイルス RNA 量はどの個体においても同様に高いレベルを示した。一方、PBMC、脾臓、リンパ節などにおいて個体差はあるものの高値を示した。また testis, ovary 等生殖器においても有意なウイルス RNA の存在が確認された (図 3)。なお図 3 に記載

のない組織においてはういす RNA は検出されなかった事から、前述の組織における選択的なウイルス複製が示唆された。

そこで、肝外組織、特に血液リンパ系組織において顕著にウイルスが感染・増殖したことを実証するため、HCV を含むフラビウイルス複製の特徴である複製中間体(ネガティブ鎖) RNA の検証を行なった。その結果、前述の肝外組織においても肝臓と同様にネガティブ鎖 RNA の存在を確認することが出来た(図4)。以上の結果より、GBV-B は HCV 同様に pleiotropism (多指向性) を有するウイルスである事が初めて明らかとなった。

D. 考察

本研究の成果より、HCV に最も近縁なサル肝炎ウイルスである GBV-B タマリン感染系に関する評価系は多くの面で確立されたと判断される。すなわち、①再現性のある感染システム、②定量的ウイルス測定系、③生体内での肝障害を裏付ける血清生化学マーカー、④抗 Core および NS3 抗体価の定量的測定系、⑤病理学的解析技術、⑥ウイルス感染後の個体内ダイナミクス、等多様なウイルス側、生体側からの解析データを総合的に判断することで、新規治療薬やワクチン候補薬の有効性評価が可能となったと考えられた。

GBV-B は HCV と同じフラビウイルス科、ヘパチウイルスに分類され、HCV に最も近縁なウイルスである事から、GBV-B を用いた C 型肝炎のサロゲート(代用)モデルの有用性が期待されている。しかし一方、GBV-B の解析が進んでいなかったことから、本モデルが果たして HCV に起因する C 型肝炎に外挿できうるモデルであるのかといった疑問も挙げられていた。この点で、今回の感染急性期における解

析結果は既知の HCV による急性 C 型肝炎および体内ウイルス動態に類似していたことから、上記の疑問に対する一つの回答となるであろう。興味深いことに、肝外組織、特に血液リンパ系組織において顕著にウイルスが感染・増殖したことが明らかとなった。このことは、GBV-B が HCV と同様に肝臓のみならず多様な組織への指向性を有する、いわゆる「pleiotropic virus」であることを初めて実証するものであり、非常に意義深い。特に HCV 感染者においても多様な臓器における肝外病変が報告されていることを考慮すると、本モデルは C 型肝炎を含めた HCV 感染症全体の感染モデルとしての有用性を示すものである。

GBV-B/タマリン感染モデルは、上述のようにある程度のレベルで評価系として有用であることが明らかとなった。しかしながら、HCV は長期間に渡り持続感染し、慢性 C 型肝炎から肝硬変、そして肝癌へと移行する事を考慮すると、より長期間の慢性感染に起因する疾患モデルの確立が期待される。今後は、より優れた C 型肝炎の感染・病態モデル確立を目指し、急性期以降の長期フォローアップを行ない、ウイルス動態や免疫病理学的な経時的変化を明らかにしていきたい。

E. 結論

本研究成果より、①再現性のある感染システム、②定量的ウイルス測定系、③生体内での肝障害を裏付ける血清生化学マーカー、④抗 Core および NS3 抗体価の定量的測定系、⑤病理学的解析技術、⑥ウイルス感染後の個体内ダイナミクス、など多様なウイルス側、生体側からの解析技術を確立できたことから、これらのデータを総合的に判断することで新規治療薬やワクチン候補薬の有効性評価が可

能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hara M, Kikuchi T, Sata T, Nakajima N, Ami Y, Sato Y, Tanaka K, Narita T, Ono F, Akari H, Terao K, Mukai R. Detection of SRV/D shedding in body fluids of cynomolgus macaques and comparison of partial gp70 sequences in SRV/D-T isolates. *Virus Genes*, in press.

2) Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee Y-J, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, Akari H: GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues *in vivo*. *Microbes and Infection*, in press.

2. 学会発表

1) 1. Iijima S, Lee Y-J, Arold S, Strebel K, Akari H. Tripartite hydrophobic residues as a potential myristoyl pocket are a determinant for MHC-I down-regulation by HIV-1 Nef. Cold Spring Harbor meeting on Retroviruses, New York, May 2006.

2) Lee Y-J, Iijima S, Arold S, Strebel K, Akari H. Identification of a new functional domain on Vif to modulate Gag processing by its N-terminus. Cold Spring Harbor meeting on Retroviruses, New York, May 2006.

3) 明里宏文：医薬基盤研究所におけるサル類を用いた感染症動物モデル開発。第1回人獣共通感染症セミナー、宮崎、

平成18年6月

4) Yokota T, Iijima S, Kubodera T, Ishii K, Ageyama N, Yingwei C, Lee Y-J, Maki N, Mizusawa H, Akari H: Efficient regulation of viral replication by systemically administered siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. 第12回日本遺伝子治療学会、東京、平成18年8月

5) 川合 覚、明里宏文、揚山直英、寺尾恵治、小野文子、片貝祐子、松田 肇。サル・重症マラリア疾患モデルに対するMRI解析システムの構築、第5回分子寄生虫・マラリアフォーラム、東京、2006年10月

6) 李永仲、飯島沙幸、明里宏文. Identification of a new functional domain in the N-terminus of HIV-1 Vif for modulating Gag processing. 第54回日本ウイルス学会学術集会、平成18年11月

7) 明里宏文、石井孝司、飯島沙幸、榎昇、森健一、吉崎佐矢香、横田隆徳、木村展之、片貝祐子、揚山直英、岩崎優紀、鈴木哲朗、宮村達男。C型肝炎のサロゲート霊長類モデル：GBV-B長期持続感染マーマセットの解析。第54回日本ウイルス学会学術集会、平成18年11月

8) 李永仲、飯島沙幸、明里宏文：HIV-1 Vif 蛋白における Gag p2/NC プロセッシング制御に関わる新しい機能ドメイン。第20回日本エイズ学会学術集会、平成18年12月

9) 明里宏文、石井孝司、飯島沙幸、榎昇、森健一、吉崎佐矢香、木村展之、片貝祐子、揚山直英、岩崎優紀、鈴木哲朗、宮村達男。C型肝炎の霊長類サロゲートモデルの開発：GBV-B長期持続感染マーマセットの解析とその意義。第13回サル類疾病国際ワークショップ、つくば、平

成18年12月

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

図1： GBV-B/タマリン感染実験における各種マーカーの推移

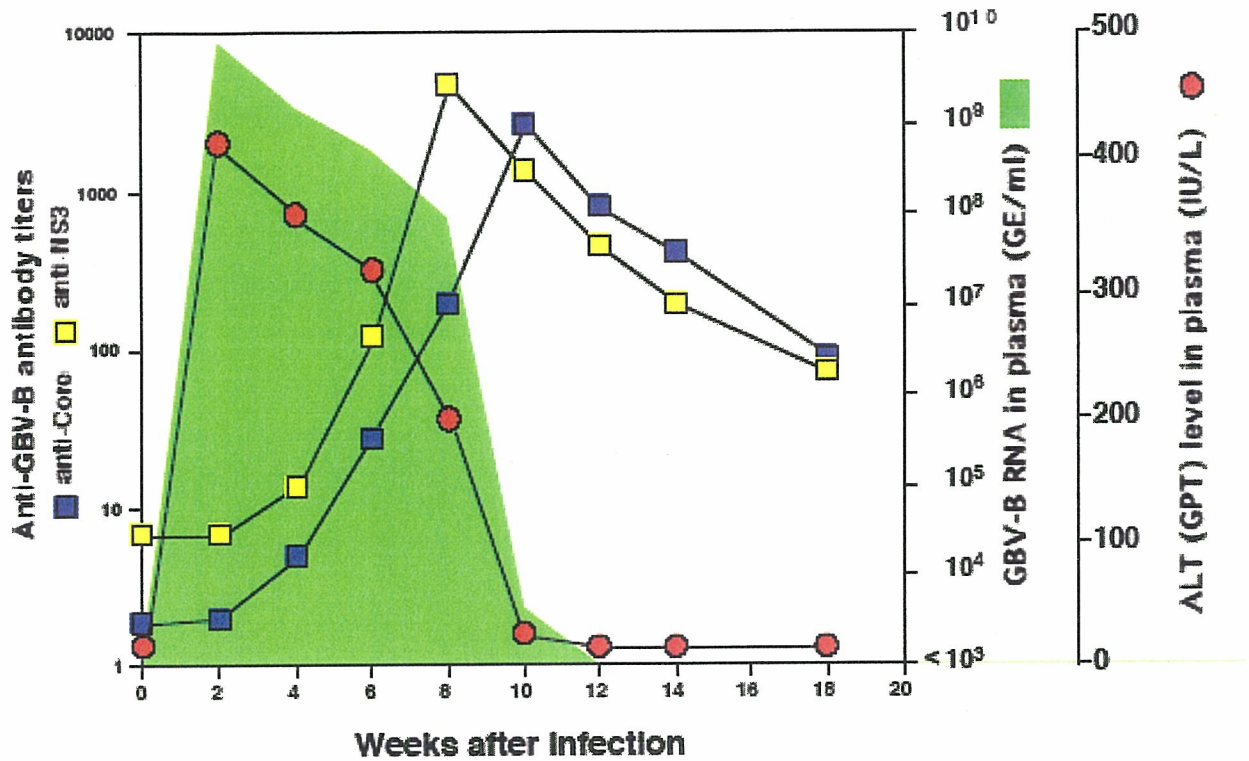


図2： GBV-B 感染タマリン由来肝臓における病理組織検索

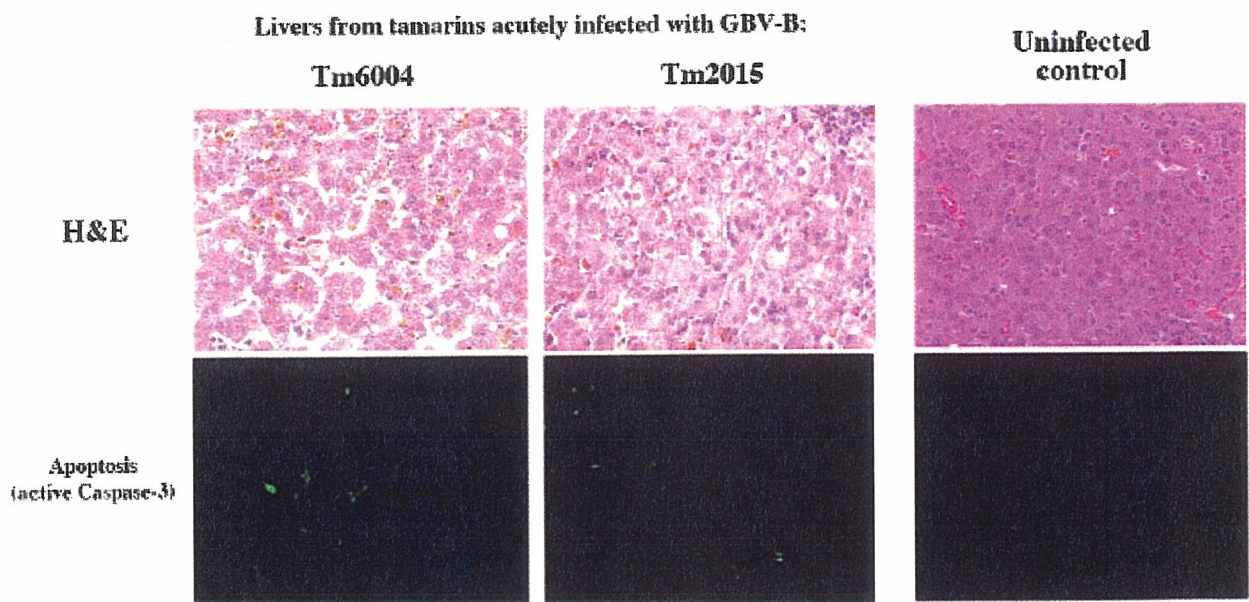


図 3 : GBV-B 感染タマリンにおけるウイルス RNA の組織分布

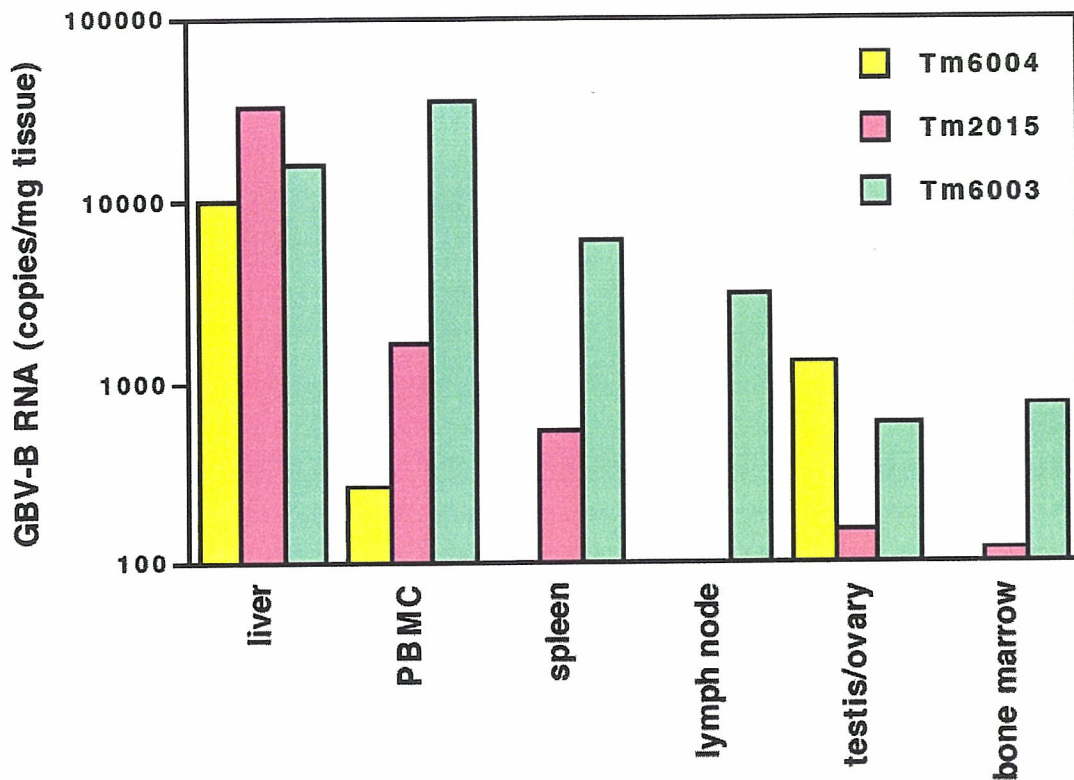
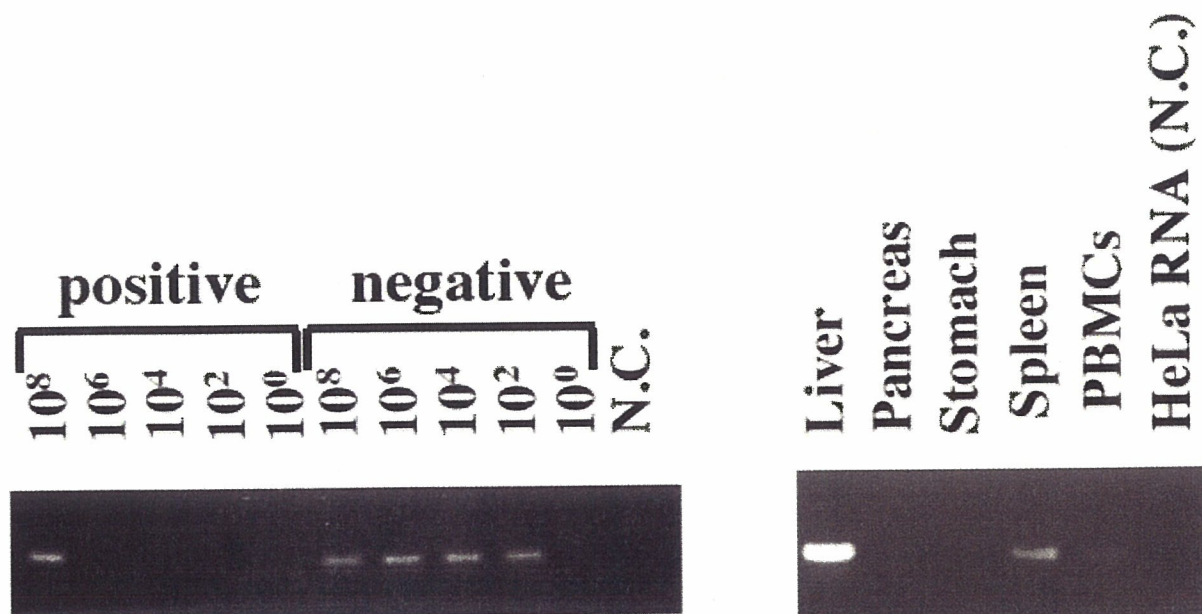


図 4 : GBV-B 感染タマリン各種組織におけるウイルス複製の解析



循環器疾患モデルの開発

分担研究者 揚山直英（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター）
研究協力者 山海 直（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター）
鯉江 洋（日本大学・生物資源科学部）
中村紳一郎（社団法人・予防衛生協会）

研究要旨

ヒトの循環器疾患は世界各国で大きな問題となっており、その病態解明、新規診断・治療法開発研究は極めて重要である。サル類においてこのような疾患モデルを構築することができれば、医科学研究への貢献が大いに期待される。そこで、本研究では高齢ザル群を含めたカニクイザル繁殖コロニーを対象に、画像診断を主とした様々な解析手法を適応し、循環器疾患モデルを抽出・解析する事を目的とした。その結果、ヒト病態を忠実に反映した心不全病態を呈する拡張型心筋症と言った特徴的な疾患をはじめとした多数の循環器疾患を確定診断し、抽出することに成功した。さらに、これらの疾患を年齢別に見ると20歳以上の高齢群で約半数の個体で何らかの疾患が認められていることも明らかにした。こうした霊長類における加齢性変化を含めた循環器疾患の解析、さらには疾患モデルとしての樹立を推進することは、心臓病態機序の解明、新規治療診断法開発研究に有用であるのみならず、生物資源研究や厚生行政にも多大な影響を与えるものである。

キーワード：循環器疾患、疾患モデル、画像診断、加齢性疾患、拡張型心筋症

A. 研究目的

心疾患は世界各国で大きな問題となっており、その病態解明、新規診断・治療法開発研究は極めて重要である。近年、ヒトと同じ霊長類であるサル類の心臓病態作出モデルを用いた前臨床研究も増加する傾向にある。しかし、未だヒト病態を忠実に反映した自然発症性循環器疾患モデルの報告は少なく、霊長類自体の循環器疾患についても体系的に明らかにされたとは言えない。こうしたことから、サル類において循環器疾患個体を抽出し、自然発症疾患モデルとして構築することができれば、

心臓病態学、医科学研究のみならず生物資源研究、厚生行政上への貢献も大いに期待される。そのため、本研究では、これまで確立してきた画像診断技術を応用し、霊長類医科学研究センターで維持されている高齢ザル群を含めたカニクイザル繁殖コロニーを対象に、自然発症する循環器疾患を抽出し、その病態解析、分類を行い、循環器疾患モデルとして樹立する事を目的とした。

B. 研究方法

霊長類医科学研究センターで維持されているカニクイザル繁殖コロニーおよび高齢ザル群を対象に検査を行い、各年齢層における循環器疾患の抽出・分類および病態解析を行った。さらにはこれまでに確立してきた画像診断などの技術を充実させ、その診断、解析能力の向上も図った。検査は心エコー図、心電図、胸部レントゲン検査、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) および脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の血中濃度の測定を行った。一部の個体には血圧検査、MRI 検査を適応し、さらに、ホルター心電計による 24 時間心電図から得られた心拍変動解析も行い、疾患の分類と病態のさらなる詳細な解析を行った。

C. 研究結果

検査の結果、心室中隔欠損症、右室二腔症、弁膜症等の症例数を増し、さらにそれらに加えて、高血圧症、拡張型心筋症を診断し、抽出した。

特に拡張型心筋症個体では、心電図所見で一般的なカニクイザルと比較して、左室高電位差を示す傾向にあり、心拡大の所見を呈した。レントゲン所見では正常個体と比較して、明らかな心胸郭比の拡大を認め、ラテラル像でも心ウエストの消失が見て取れた。さらに、MRI、心エコー図検査では拡張期および収縮期の左室内径が正常個体に比べ、優位に拡張している事を明らかにした。また、機能評価の結果、左室内径短縮率 (FS) および駆出率 (EF) も正常個体に比べ優位に低下しており、左室機能不全を呈し、血圧測定からも低血圧が認められ、心不全病態を呈していることも明らかにした。これら FS および EF と ANP および BNP 値の間にはそれぞれ優位な相関が認められた。さらに死亡した個体の剖検所見ではうっ血性心不全の所見である胸水、腹水の著明な貯留、肝臓、肺のうっ血なども

認め、病理学的検索では心筋間質のびまん性線維化、心筋の錯綜交差配列や脱落および菲薄化などが認められた。

ここまでに得られたこうした疾患を年齢別に分類した結果、20 歳以上の高齢群では 38 頭中 19 頭 (50%) の個体で何らかの疾患を認めた。

さらに、ホルター心電計による 24 時間心電図から得られた心拍変動を高周波成分と低周波成分に分け交感神経、副交感神経の支配を解析したところ、高齢群と若齢群の間に差がある傾向が認められた。

以上の様に循環器疾患の詳細な解析技術をさらに充実させることにより、各種疾患を確定診断、抽出する事に成功し、それら疾患の特徴的な病態を明らかにし、各年齢層における分類も行った。

D. 考察

本研究により、カニクイザル繁殖コロニーにおいて様々な循環器疾患が存在する事が明らかとなった。その中のひとつである拡張型心筋症においては心エコー、心電図、レントゲン、MRI、血圧検査を用いて左室の重度な拡張から左室機能不全を認め、心臓ペプチドホルモンの上昇を来とし、心不全病態を呈するといった特徴的な病態の機序を明らかにし、ヒトの病態を忠実に反映する疾患モデルとしての可能性を示した。さらには、血中心臓ペプチドホルモンと心機能の間には優位な相関がある事も示し、霊長類の循環器疾患の指標として、これらの測定値が有用であることも明らかにした。

こういった疾患を分類した結果からは特に高齢群にその割合が多いことも明らかにしたが、これは、霊長類における循環器疾患がヒトを忠実に反映する加齢性疾患モデルとして有用である可能性を示すものである。さらにはそれらの原因の一端として、心拍変動解析により、心臓の神経

支配における加齢性変化があげられることも示唆した。

E. 結論

本研究結果は高齢群を有するカニクイザル繁殖コロニーが循環器研究にとって有用な生物資源群であることを示すものである。霊長類における加齢性変化を含めた循環器疾患の解析を進めることは、心臓病態機序の解明、新規治療・診断法開発研究に有用であるのみならず、厚生行政上の貢献度も計り知れない。今後の展開として、カニクイザル繁殖コロニーにおいて、さらなる循環器疾患の抽出、詳細な病態解析を進めることで、ヒト病態を忠実に反映する疾患モデル動物としての樹立を目指し、生物資源としての充実を図りたい。

なお、本結果を含む研究流れ図を末尾に添付する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ageyama N, Hanazono Y, Shibata H, Ono F, Ogawa H, Nagashima T, Ueda Y, Yoshikawa Y, Hasegawa M, Ozawa K, Terao K. Prevention of Immune Responses to Human Erythropoietin in Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Vet Med Sci*. 2006; 68: 507-510.

2) Shibata H, Ageyama N, Tanaka Y, Kishi Y, Sasaki K, Nakamura S, Muramatsu S, Hayashi S, Kitano Y, Terao K, Hanazono Y. Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey ES cells in the allogeneic setting. *Stem Cells*. 2006; 24:1450-1457.

3) Yasuda T, Miyachi S, Kitagawa R, Wada K, Nihira T, Ren YR, Hirai Y, Ageyama N, Terao K, Shimada T, Takada M, Mizuno Y, Mochizuki H. Neuronal specificity of alpha-synuclein toxicity and effect of Parkin co-expression in primates. *Neuroscience*. 2007; 144:743-53.

2. 学会発表

1) 揚山直英, 鯉江 洋, 中村紳一朗, 金山喜一, 酒井健夫, 小野文子, 寺尾恵治, 山海 直. カニクイザルにおける心不全病態を呈する拡張型心筋症. 第53回日本実験動物学会総会(神戸). 2006年5月11-13日

2) 花園豊, 岸友紀子, 田中裕次郎, 池田たま子, 柴田宏昭, 村松慎一, 揚山直英, 林聡, 北野良博, 阿部朋之, 長尾慶和, 寺尾恵治. ES細胞を利用する移植・再生治療の安全性に関する研究. 第4回幹細胞シンポジウム(東京). 2006年5月19-20日.

3) 中村紳一朗, 岡林佐知, 揚山直英, 鯉江 洋, 山海直, 小野文子, 藤本浩二, 寺尾恵治. 老齡アフリカミドリザルに認められた3種の異なったアミロイド症. 第22回日本霊長類学会大会(大阪). 2006年7月15日~17日.

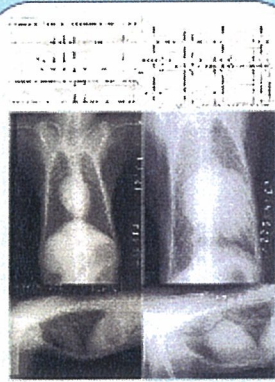
4) 揚山直英, 鯉江 洋, 中村紳一朗, 金山喜一, 酒井健夫, 小野文子, 寺尾恵治, 山海 直. カニクイザルにおける心不全病態を呈する拡張型心筋症. 第14回サル類疾病国際ワークショップ. 2006年12月6日.

H. 知的所有権の出願・登録状況

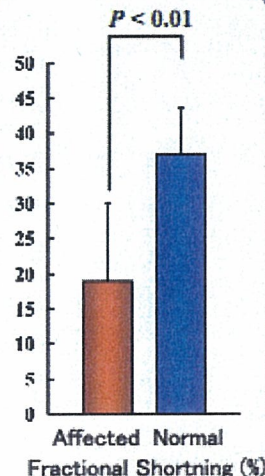
なし

これまでに樹立した診断技術などを用いて心室中隔欠損症、右室二腔症、弁膜症、高血圧症、拡張型心筋症などの循環器疾患を診断、抽出

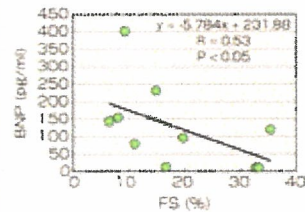
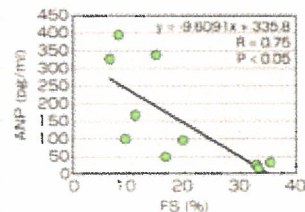
拡張型心筋症の病態解析



Normal Affected
左室の明らかな拡張



左室機能不全

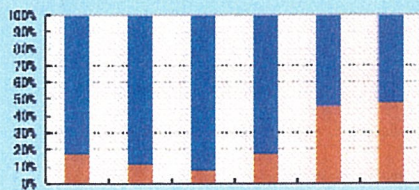


機能低下に伴う心臓ペプチドホルモンの優位な上昇

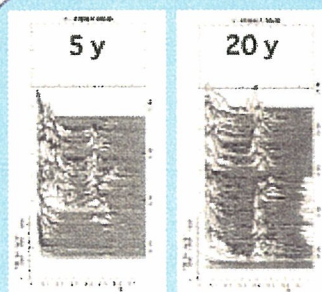
こうした病態機序を通して心不全病態を呈している事を明らかとする

さらに、
こうした疾患の年齢
分布を見ると・・・

ヒト病態を反映する霊長類 循環器疾患モデルの樹立



各種心疾患は加齢性に増加傾向



心拍変動解析による年齢差

加齢性心疾患モデルの可能性

軸索輸送モーター蛋白発現抑制による アルツハイマー病関連蛋白の蓄積

分担研究者 木村 展之
(独立行政法人医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター)

研究要旨

2004年度研究成果により明らかとなった軸索輸送関連蛋白 dynein-dynactin 間蛋白相互作用の加齢性減弱により、同蛋白機能の低下がアルツハイマー病関連蛋白群の神経細胞内加齢性蓄積に大きく関与している可能性が示唆された。そこで本研究では軸索輸送モーター蛋白であり、なおかつ lysosome 成熟過程にも関与することが示唆されている dynein に注目し、同蛋白の人為的発現抑制効果がアルツハイマー病関連蛋白群にどのような影響を与えるのかを in vitro 系を用いて検索を行った。

A. 研究目的

我々は過去の検索において、アミロイド前駆体蛋白 (APP) や細胞内アミロイドβ (Aβ) を含む AD 関連蛋白群が神経終末分画に蓄積することを明らかにした。また、軸索輸送機能に関与するモーター蛋白群も同様に神経終末分画において蓄積することを明らかにし、さらに老齡カニクイザル脳では軸索輸送モーター蛋白 dynein の機能発現に必須である dynein-dynactin 間蛋白相互作用が減弱していることを発見した。

そこで本研究では、軸索輸送モーター蛋白であるのみならず、最新の知見によって lysosome 成熟過程にも関与していることが示唆されている dynein に注目し、同因子の発現抑制＝機能低下がアルツハイマー病関連蛋白 tau や APP にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするため、tau および APP が内因性かつ恒常的に発現しているヒト由来神経芽細胞 (SH-SY5Y) を用いて検索

を行った。

B. 研究対象および方法

細胞株の選定に当たっては、以下の条件を満たすものとして SH-SY5Y を研究対象とした。

- 1) ヒト由来の神経系細胞株であること。
- 2) アルツハイマー病関連蛋白群である tau および APP を内因性かつ恒常的に発現していること。

Dynein 発現抑制は、dynein intermediate chain (dynactin との蛋白相互作用に必須の構成因子) に対する siRNA を、リポフェクション導入法によって上記細胞株に導入し、最大 72 時間後の細胞を回収して生化学的検索および免疫細胞化学的検索を行った。

生化学的検索は、siRNA 導入後 24・48・72 時間後の細胞をライセート化したものを western blot 法によって検索

し、免疫細胞科学的検索は、siRNA 導入後 72 時間後の細胞を用いて免疫染色を行った。

C. 結果

siRNA 導入後 24 時間において、dynein intermediate chain の有意な発現抑制が確認され、この発現抑制効果は 72 時間後の細胞においても維持されていた。一方、dynein とは逆方向の軸索輸送に関連するモーター蛋白である kinesin や、dynein intermediate chain との蛋白相互作用に関わる dynactin の蛋白発現レベルは安定していた。このことから、本研究において用いた siRNA は正確に dynein intermediate chain だけをノックダウンさせていることが確認された。

siRNA 導入 24 時間後の細胞においては、生化学的検索による tau および APP の明確な変化は確認されなかったが、siRNA 導入 48 時間後の細胞においてはわずかながら蛋白量の増加が確認され、siRNA 導入 72 時間後の細胞においては約 2 倍にも達する有意な tau ならびに APP の細胞内蛋白蓄積が確認された。一方、免疫細胞科学的検索からは、siRNA 導入 72 時間後の細胞において、tau の凝集および APP 陽性顆粒の肥大化が確認された。

D. 考察

Dynein intermediate chain の発現抑制単独によって tau および APP の細胞内蓄積が確認されたことから、同蛋白の機能 = dynein の機能が、アルツハイマー病関連蛋白群の細胞内蓄積に大きく関与していることが明らかとなった。特に、本実験系では外因性 tau および APP の遺伝子導入による過剰発現系は用いておらず、内因性に発現されてい

るレベルの tau および APP ですら細胞内蓄積が確認されたことは特筆に値する。

このことから、過去の検索によって明らかになったアルツハイマー病関連蛋白群の加齢性蓄積と、dynein-dynactin 蛋白相互作用の加齢性減弱は密接に関係していることが示唆された。即ち、加齢性に dynein-dynactin 蛋白相互作用が減弱することで dynein の機能発現が低下し、軸索輸送および lysosome 成熟過程が減弱することによって、加齢性にアルツハイマー病関連蛋白群が細胞内に蓄積する可能性が考えられる。

一方、アルツハイマー病のみならず他の様々な加齢性神経変性疾患においても、各種疾患関連蛋白群の細胞内蓄積が、その病態メカニズムに大きく関与している可能性が示唆されている。本研究ではアルツハイマー病関連蛋白群にのみ焦点をあてて検索を行ったが、他の各種疾患関連蛋白群の細胞内蓄積メカニズムにも、dynein の機能減弱が何らかの影響を与えている可能性も考えられる。

今後の本研究系の発展であるが、今回の検索はあくまでも in vitro 系を用いた検索であるため、in vivo 系を用いて dynein 機能減弱によるアルツハイマー病関連蛋白群の細胞内蓄積が再現されるか否かを確認することが重要である。このため、現在は in vivo 実験開始に向けた準備を行っている。

また、同 in vivo 実験系によってアルツハイマー病変の再現ならびに認知機能低下が確認されれば、それはとりもなおさず孤発性 (= 加齢性) アルツハイマー病発症メカニズムの解明に繋がることが期待される。