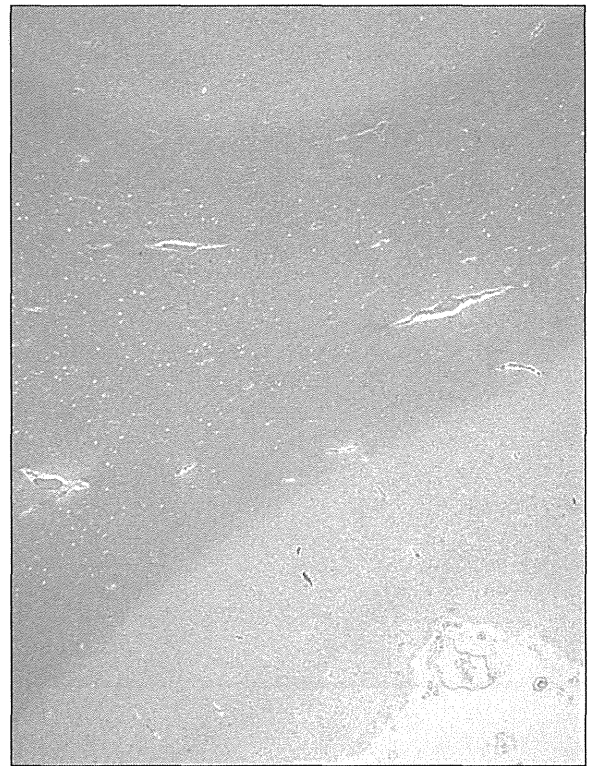
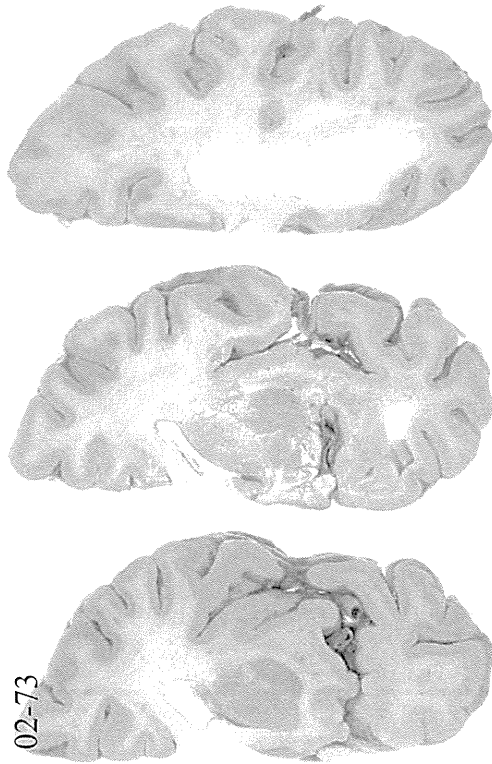
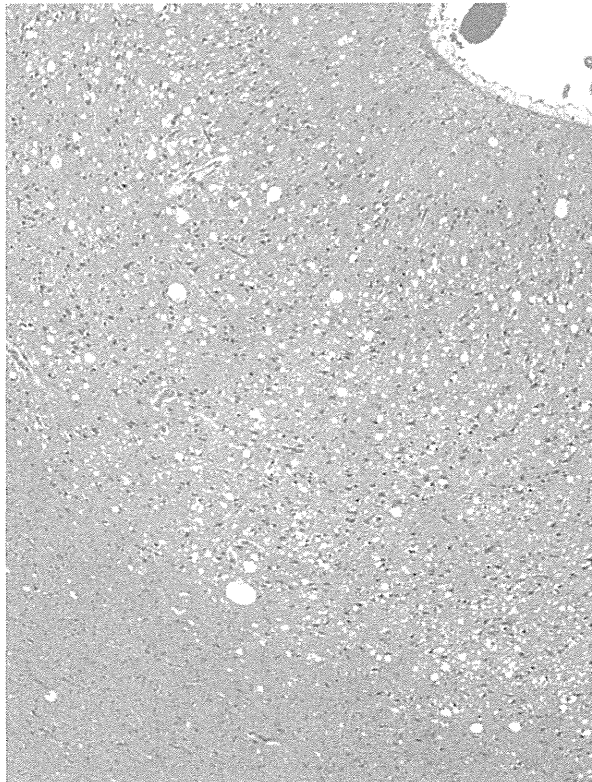


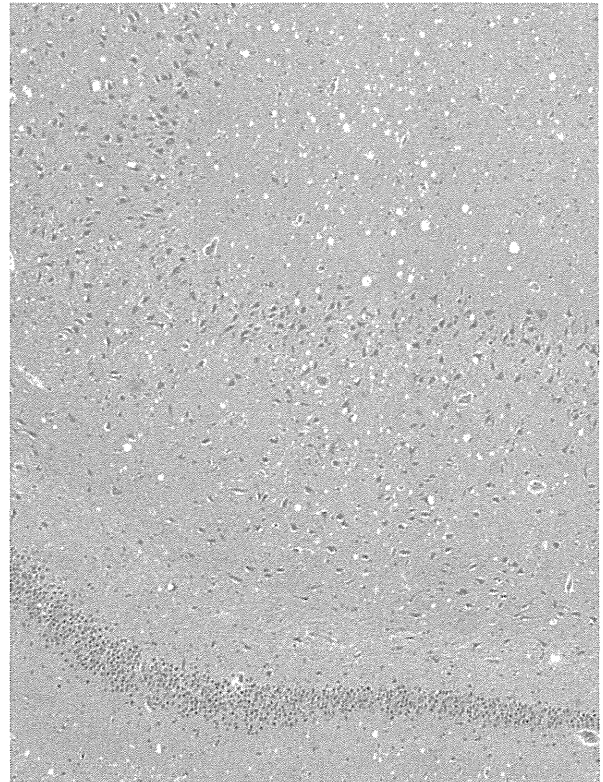
孤発性CJD(sCJD)：ヒトプリオン病のおよそ8割 (100万人にひとり)  
急性発症し、数か月以内で無言無動となる



L-BSE 感染サル



大脳皮質

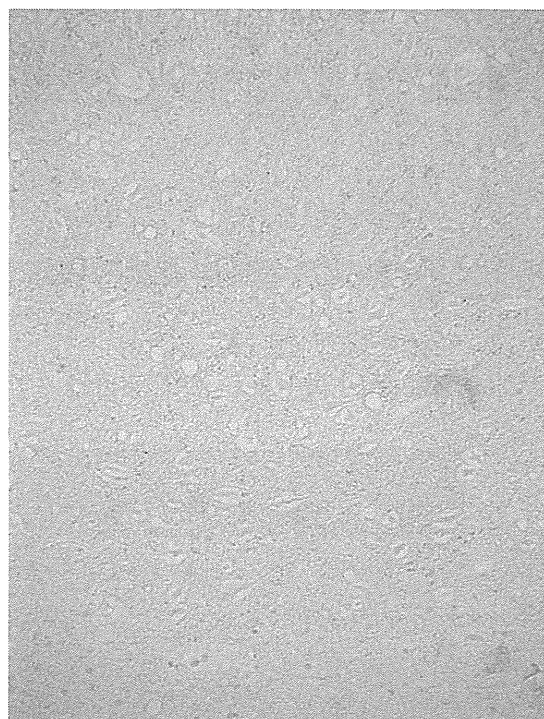


海馬付近

L-BSE 感染サル (免疫染色)

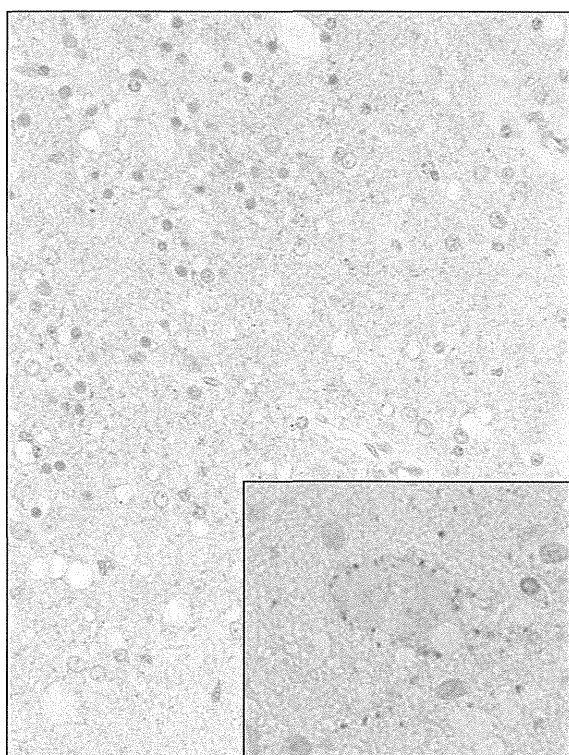


大脳皮質

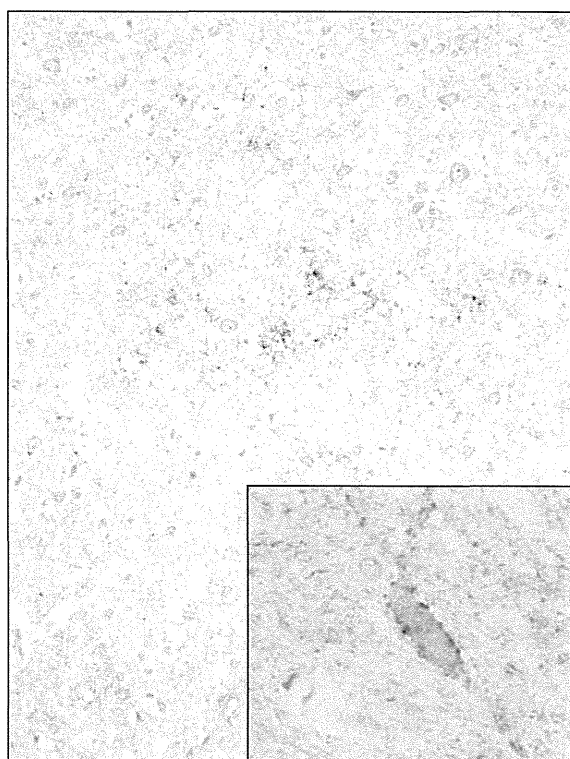


海馬付近

L-BSE感染 サル

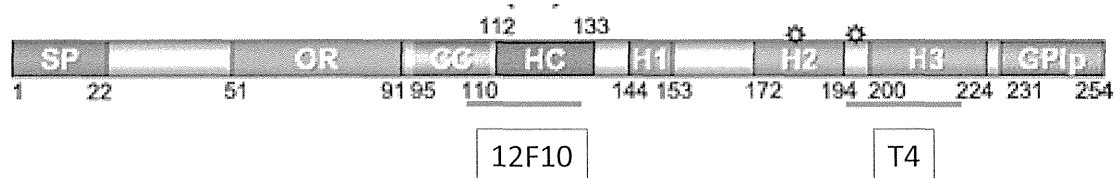


sCJD



## プリオン種を病理学的に鑑別可能か？

- ・使用抗体の選別



- ・パラフィン切片の前処理法の検討

- ・ 1mM HCl 121°C 20分
- ・ 100mM NaOH 60°C 10分

	HCl +T4	HCl +12F10	NaOH +T4	NaOH +12F10
C-BSE	+	+	+	+
L-BSE	+	+	+	-

### プリオン蛋白質の遺伝子多型等に関する解析系樹立の試み

国立感染症研究所:細胞科学部 中村(桶本)優子、感染病理部 飛梅 実

#### —背景および目的—

プリオン蛋白質の遺伝子(*Prnp*)には複数の多型が存在することが知られている。特にコドン129のメチオニン(M)およびバリン(V)の多型は、プリオン病への感受性に関与すると考えられており、そのメカニズムの解明はプリオン病の予防ならびに治療方法の確立に貢献できるものと期待される。

一方、ZFN、TALENあるいはCRISPR/Cas9といった、ゲノム編集技術が近年急速に発展してきており、これらを用いることで哺乳動物細胞に対し、標的遺伝子のノックアウトや点変異導入などが可能になってきている。

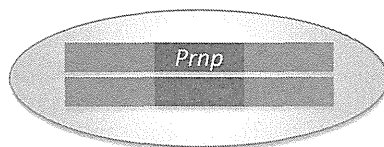
そこで、神経細胞株を用い、まずは(1)*Prnp*ノックアウト細胞の確立を試み、さらには(2) 多型を有する神経細胞株を樹立することを目指した。

これらの細胞株を用いた解析系は、遺伝子改変動物の作製、維持に比べ低コストであり、実験動物に代る簡便な解析系として有用である。

また、プリオンを効率に感染させることが可能になれば、プリオン病の予防および治療方法の開発に貢献できる解析系としても期待される。

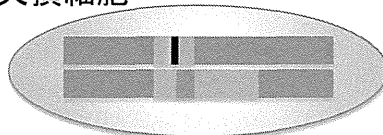


神経細胞 (*Prnp*<sup>+/+</sup>)株



ZFN、TALENあるいはCRISPR/Cas9等による  
欠失変異あるいは挿入変異

*Prnp* 欠損細胞

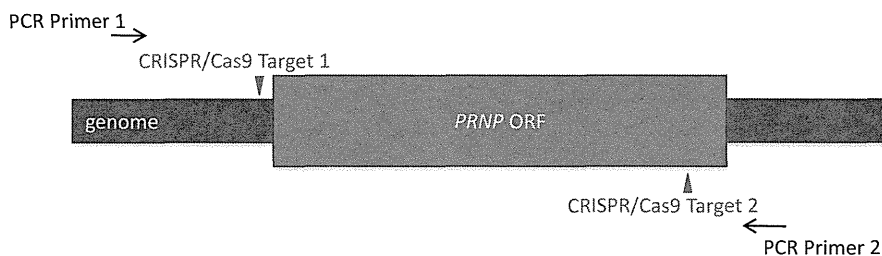


*Prnp* 再導入による、多型を有する細胞株の樹立

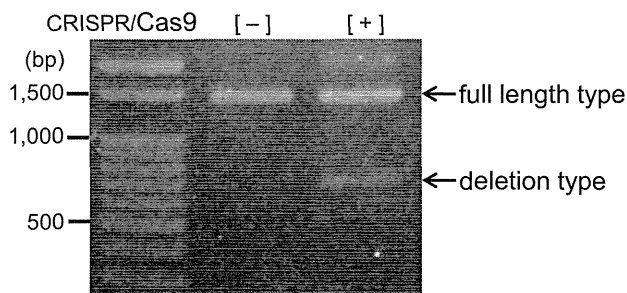
*Prnp* 多型とプリオン病への感受性に関する解析

プリオン病に対する治療薬等のスクリーニング系  
としての利用

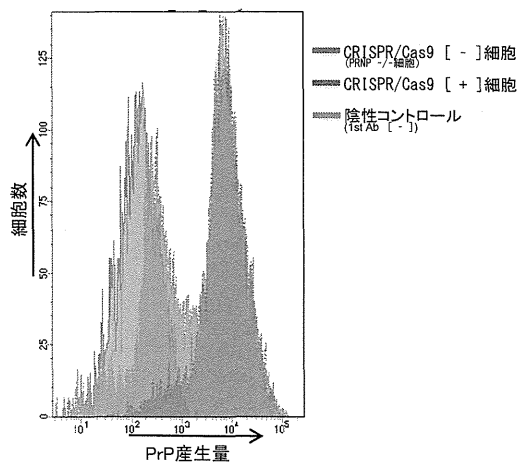
プリオン蛋白質に関する基礎研究、およびプリオン病に関する治療法の開発に有用



・2箇所 (*PRNP* ORFの上流および*PRNP* ORF C末側に位置する部位)のCRISPR/Cas9ターゲット配列を設定した

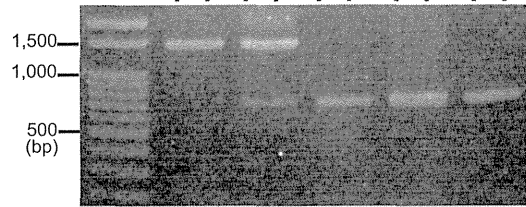


・full length type: 約1,400bp  
・効率は良くないものの、約700bpのdeletion typeのバンドが確認され、CRISPR/Cas9によるゲノム切断および修復がおきたと考えられた

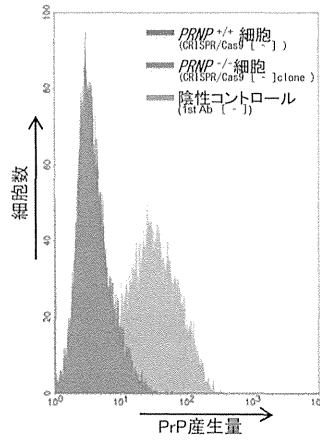


・抗プリオン抗体(6H4)によるFACS解析においても、プリオン蛋白質の産生が減少、あるいは産生が無いと期待される細胞集団が確認された

CRISPR/Cas9 [-] [+]<sub>mix</sub> [+]<sub>clone</sub> [+]<sub>clone</sub> [+]<sub>clone</sub>



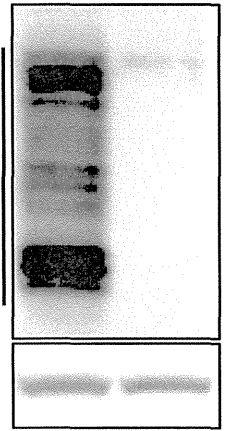
・PCRにおいてdeletion typeのバンドのみが確認されるクローンが得られた



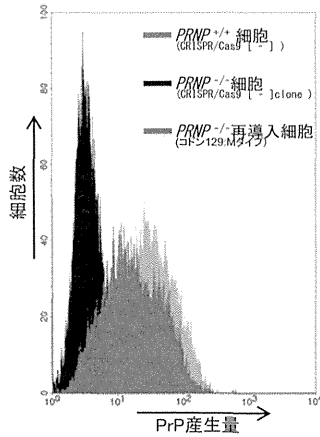
・FACSおよびWB解析の結果からも、PRNP欠損株が樹立できたと考えられた

CRISPR/Cas9 [-] [+]<sub>clone</sub>

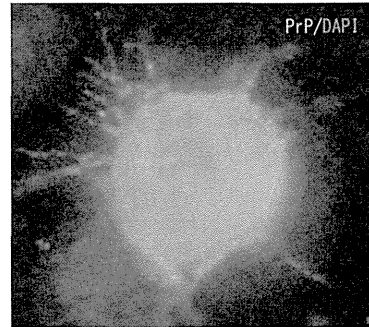
PrP<sup>C</sup>  
(1<sup>st</sup> Ab: 3F4)



Actin



・さらに、PRNP欠損株をもとにPRNP再導入・安定発現細胞を得ることも可能であった



・PRNP再導入・安定発現細胞において、細胞表面や樹上突起上におけるPrPのシグナルが確認された

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
原園 景, 川崎ナナ	第7部第1章品質 評価試験に関する 規制と申請対応		世界への薬事 申請書の書き 方 成功のバ イブル	技術情報 協会	東京	2012	919-925
橋井則貴, 川崎ナナ	液体クロマトグ ラフィー/質量 分析によるバイ オ医薬品由来不 純物の解析	吉森孝行	バイオ (抗体) 医薬品におけ る不純物/凝 集の評価・試 験と免疫原 性, ウイルス 安全性への対 応	サイエン ス&テク ノロジー	東京	2012	150-168
遊佐敬介	第11章バイオ医 薬品のウイルス 安全性	吉森孝行	バイオ (抗体) 医薬品におけ る不純物/凝 集の評価・試 験と免疫原 性, ウイルス 安全性への対 応	サイエン ス&テク ノロジー	東京	2012	270-279
奥田晴宏, 川崎ナナ	16.7その他の医 薬品と関連物質	日本化学会 辰巳 敬	第7版化学便覧 応用化学編	丸善出版 株式会社	東京	2014	1079-1084
北條浩彦, 清水則夫	基本編ー原理と 基本知識ー リアルタイム PCRを使った解 析の基本 10プライマー/ プローブの設計 の手順②マルチ プレックスPCR の場合	北條浩彦	原理からよく わかるリアル タイムPCR完 全実験ガイド 最強のステッ プUPシリーズ	株式会社 羊土社	東京	2013	72-74
清水則夫, 渡邊 健, 外丸靖浩	実践編ープロト コールを中心に ー IV章 遺伝子量 解析 15 ウイルス感 染症を診断す るウイルスゲノ ムの定性的検査 と定量的検査	北條浩彦	原理からよく わかるリアル タイムPCR完 全実験ガイド 最強のステッ プUPシリーズ	株式会社 羊土社	東京	2013	192-202
清水則夫, 渡邊 健, 高橋秀行, 外丸靖浩, 森尾友宏	再生医療等細胞 製剤の品質評価 法: ウイルス・ マイコプラズマ 試験	紀ノ岡正博 監修	再生医療の細 胞培養技術と 産業展開	シーエム シー出版	東京	2014	51-62

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
川崎ナナ, 石井明子, 奥田晴宏	バイオ医薬品原薬のクオリティバイデザイン	<i>PHARM TECH JAPAN</i>	28	2491-2501	2012
石井明子, 原園 景, 川崎ナナ	バイオ後続品/バイオシミラーに関する国内外の規制動向と品質評価	<i>PHARM TECH JAPAN</i>	29	23-42	2012
橋井則貴, 原園 景, 栗林亮佑, 川崎ナナ	液体クロマトグラフィー/質量分析による糖タンパク質医薬品の糖鎖解析	<i>PHARM TECH JAPAN</i>	28	2897-2905	2012
川崎ナナ, 武田伸一, 渡部一人, 津田重城	わが国における今後のバイオ医薬品の開発について	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	43	884-896	2012
川崎ナナ, 石井明子	抗体医薬品のバイオ後続品の将来展望	臨床と微生物	39	459-465	2012
川崎ナナ, 石井明子	バイオ後続品	日本病院薬剤師誌	48	1079-1086	2012
Yuan Y, Yokoyama K, Maeda Y, Terasawa H, Harada S, Sato Y, Yusa K	Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1 <sub>JR-FL</sub> to maraviroc.	<i>Plos One</i>	8(6)	e65115	2013
Harada S, Yoshimura K, Yamaguchi A, Boonchawalit S, Yusa K, Matsushita S	Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro.	<i>J. Gen. Virol.</i>	94	933-943	2013
遊佐敬介, 前田洋助	ヒト感染が疑われたレトロウイルスの起源とウイルス安全性	<i>PHARM TECH JAPAN</i>	28	2075-2079	2012
遊佐敬介, 新見伸吾, 橋井則貴	バイオ医薬品の外来性感染性物質について	<i>PHARM TECH JAPAN</i>	28	941-946	2012
日本PDA製薬学会 バイオウイルス委員会 SALLY分科会	第2章:生物薬品の品質,安全性の向上に関する検討 過去の事例に学ぶウイルス汚染の防止対策 - 血漿分画製剤の感染事例とその対策	<i>PHARM TECH JAPAN</i>	29(7)	45-50	2013
Toda T, Kuwahara K, Kondo N, Matsuda Z, Maeda Y, Maeda K, Sakaguchi N	Dynamic appearance of antigenic epitopes effective for viral neutralization during membrane fusion initiated by interactions between HIV-1 envelope proteins and CD4/CXCR4.	<i>Immunobiology</i>	217	864-872	2012
Ogawa M, Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Nakagawa I, Mochizuki M	Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis.	<i>Jpn J Ophthalmol.</i>	56(6)	529-535	2012.



Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Ogawa M, Maruyama K, Usui N, Mochizuki M	Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders.	<i>Invest Ophthalmol Vis Sci.</i>	53(8)	4692-4698	2012
Ogawa M, Sugita S, Watanabe K, Shimizu N, Mochizuki M	Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA.	<i>Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.</i>	250(12)	1877-1883	2012
Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Ogawa M, Maruyama K, Usui N, Mochizuki M	Detection of Candida & Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis.	<i>Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.</i>	250(3)	391-398	2012
Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E	Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases.	<i>Biol.Pharm. Bull.</i>	36(2)	176-181	2013
Yasugi M, Kubota-Koketsu R, Yamashita A, Kawashita N, Du A, Sasaki T, Nishimura M, Misaki R, Kuhara M, Boonsathorn N, Fujiyama K, Okuno Y, Nakaya T, Ikuta K	Human Monoclonal Antibodies Broadly Neutralizing against Influenza B Virus.	<i>PLoS One</i>	9	e1003150	2013
Watanabe Y, Ibrahim M S, Ikuta K	Evolution and control of H5N1. A better understanding of the evolution and diversity of H5N1 flu virus and its host species in endemic areas could inform more efficient vaccination and control strategies.	<i>EMBO reports</i>	14	117-122	2013
Watanabe Y, Ibrahim M S, Suzuki Y, Ikuta K	The changing nature of avian influenza A virus (H5N1).	<i>Trends Microbiol.</i>	20	11-20	2012
Urayama T, Cameron R, Sato T, Yunoki M, Ikuta K	Misinterpretation in virus clearance studies of biological products due to an uncommon discrepancy between cytopathic effects and infectivity of human immunodeficiency virus (HIV).	<i>Biologicals</i>	41	125-127	2013

Sasaki T, Kubota-Koketsu R, Takei M, Hagihara T, Iwamoto S, Murao T, Sawani K, Fukae D, Nakamura M, Nagata E, Kawakami A, Mitsubayashi Y, Ohno M, Uehara Y, Fukukawa T, Kanai Y, Kosaka M, Ikuta K	Reliability of a newly-developed immunochromatography diagnostic kit for pandemic influenza A/H1N1pdm virus: Implications for drug administration.	<i>PLoS One</i>	7	e50670	2012
Noda M, Masrinoul P, Pipattanaboon C, Ramasoota P, Setthapramote C, Sasaki T, Sasayama M, Yamashita A, Kurosu T, Ikuta K, Okabayashi T	Limited cross-reactivity of mouse monoclonal antibodies against dengue virus capsid protein among four serotypes.	<i>Biologics</i>	6	409-416	2012
Kubota-Koketsu R, Yunoki M, Okuno Y, Ikuta K	Significant neutralizing activities against H2N2 influenza A viruses in human intravenous immunoglobulin lots manufactured from 1993 to 2010.	<i>Biologics</i>	6	245-247	2012
Sakudo A, Baba K, Ikuta K	Analysis of Vis-NIR spectra changes to measure the inflammatory response in the nasal mucosal region of influenza A and B virus-infected patients.	<i>J. Clin. Virol.</i>	55	334-338	2012
Sakudo A, Baba K, Ikuta K	Discrimination of influenza virus-infected nasal fluids by Vis-NIR spectroscopy.	<i>Clin. Chim. Acta</i>	414C	130-134	2012
Tian Y S, Verathamjamras C, Kawashita N, Okamoto K, Yasunaga T, Ikuta K, Kameoka M, Takagi T	Discovery of novel low-molecular-weight HIV-1 inhibitors interacting with cyclophilin A using in silico screening and biological evaluations.	<i>J. Mol. Model</i>	19	465-475	2013
Li Y G, Siripanyaphinyo U, Tumkosit U, Noranate N, A-Nuegoonpipat A, Kurosu T, Ikuta K, Takeda N, Anantapreecha S	Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells.	<i>Intervirology</i>	56	6-12	2013
Hirai I, Ebara M, Nakanishi S, Yamamoto C, Sasaki T, Ikuta K, Yamamoto Y	Jurkat cell proliferation is suppressed by Chlamydia (Chlamydophila) pneumonia infection accompanied with attenuation of phosphorylation at Thr389 of host cellular p70S6K.	<i>Immunobiology</i>	218	527-532	2013