

東京大学医科学研究所 奄美医科学研究施設

奄美医科学研究 シンポジウム 2024

| 会期 | 2024年10月2日 (水) ~10月5日 (土)

| 会場 | アマホームPLAZA



ご挨拶

奄美病害動物研究施設（2024年10月1日に奄美医科学研究施設に名称変更予定。以降は変更後の名称で記載）は、昨年6月末に第3棟の改築工事が完了し、昨年10月には「第3棟改築記念シンポジウム」を皆様のお蔭をもちまして盛況のうちに開催させていただくことができました。その後は急ピッチで本格的な稼働に向けた準備を行い、現在ではマラリア医学研究をはじめとする共同利用・共同研究が新第3棟においても進行中です。今後奄美施設を拠点として感染実験を含めた医科学研究を益々発展させていくためにも、本年度からは「奄美医科学研究シンポジウム」と名称を変えて、引き続きここ奄美において若手や学生を含めた様々な研究者が集い意見交換を行える場を提供することにいたしました。これまで奄美施設を利用されてきた研究者の方にはもちろん、奄美施設をまだ利用されたことのない皆様にも積極的にご参加をいただき、今後の研究の発展に繋がることを願っております。

奄美医科学研究施設長 真下 知士

開催概要

| | |
|--------------|--|
| 名称 | 奄美医科学研究シンポジウム 2024 |
| 会期 | 2024年10月2日（水）～10月5日（土） |
| 会場 | アマホーム PLAZA（奄美市市民交流センター） 奄美市名瀬柳町2番1号、0997-52-1816 |
| 実行委員会 | 真下 知士（東京大学医科学研究所） 案浦 健（国立感染症研究所／東京大学医科学研究所） 横田 伸一（東京大学医科学研究所） 吉見 一人（東京大学医科学研究所） 川合 寛（獨協医科大学医学部） 水上 修作（長崎大学熱帯医学研究所） 根岸 英雄（東京大学医科学研究所） |

日程表

10月2日(水) 奄美医科学研究シンポジウム 1日目

| [プログラム] | [時間] | [会場] |
|------------|-------------|-------------|
| セッション 1 | 16:00~17:00 | 1階 マチナカホール |
| ウエルカムパーティー | 19:00~21:00 | ホテルビックマリン奄美 |

10月3日(木) 奄美医科学研究シンポジウム 2日目

| [プログラム] | [時間] | [会場] |
|-----------|-------------|--------------|
| セッション 2 | 9:00~12:00 | 1階 マチナカホール |
| 昼食 | 12:00~13:00 | 3階 大多目的室 |
| ポスターセッション | 13:00~14:30 | 2階 マチナカギャラリー |
| セッション 3 | 14:30~17:30 | 1階 マチナカホール |
| 意見交換会 | 19:00~21:00 | 奄美観光ホテル |

10月4日(金) 奄美医科学研究シンポジウム 3日目

| [プログラム] | [時間] | [会場] |
|------------------------|-------------|---------------------|
| 奄美医科学研究施設見学 | 9:00~12:30 | ホテルウエストコート奄美 I ⇄ 施設 |
| Session 4 (In English) | 15:00~18:00 | 1階 マチナカホール |

10月5日(土) 奄美医科研教育講座

| [プログラム] | [時間] | [会場] |
|-----------|------------|------------|
| 奄美の医療を考える | 9:30~12:00 | 1階 マチナカホール |

参加者の皆様へ

講演者へのご案内

- ・ 20分で1鈴、25分で2鈴となります。
- ・ PC受付は1F マチナカホール前方左側（会場のご案内参照）となります。
- ・ 各セッションの15分前までに動作確認を行ってください。込み合うことも予想されますのでお早めに確認をお願いします。
- ・ ご自身で演台上のコンピューターを操作していただきます。
- ・

<PCをお持ち込みの場合>

- ・ Windows、Macintoshのいずれも受付可能です。
- ・ HDMI（タイプA）によって接続いたしますので、必要に応じて付属品をご持参ください。
- ・ 電源ケーブルは必ずお持ちください。念のため、バッテリーに十分な充電を行った状態でお持ちください。
- ・ スクリーンセーバーやスリープモード等は事前に解除していただくようお願いします。
- ・ 万が一映らない場合に備え、バックアップデータを保存したUSBフラッシュドライブをご持参ください。

<データをご持参の場合>

- ・ Windowsで作成したPowerPointデータのみ受付可能です。Macintoshで作成したデータ、また動画や音声データ等が含まれる場合は、ご自身のPCをご利用ください。
- ・ データはUSBフラッシュドライブ（タイプAコネクタ）に保存してご持参ください。
- ・ 「発表者ツール」は使用できません。
- ・ データは事前の動作確認、ウイルスチェックを必ず行ってください。
- ・ お預かりしたデータは本シンポジウム終了後、事務局が責任をもって消去致します。

ポスター発表者へのご案内

- ・ 掲示会場は 2F マチナカギャラリーとなります。
- ・ ご準備されたポスターを所定の番号位置に各自でご掲示ください。演題番号は要旨集をご参照ください。
- ・ ポスター発表は座長等設けておりませんが、活発な議論をお願いいたします。
- ・ 撤収は 10 月 3 日（木）14:30 ポスターセッション終了後、速やかに各自で行ってください。

会場のご案内

<シンポジウム>

アマホーム PLAZA（奄美市名瀬柳町 2-1）

<ウエルカムパーティー>

ホテルビッグマリン奄美（鹿児島県奄美市名瀬長浜町27-1）

<意見交換会>

奄美観光ホテル（鹿児島県奄美市名瀬港町2-10）

お問い合わせ先

奄美医科学研究シンポジウム事務局

Web : www.ims.u-tokyo.ac.jp/amami/symposium/toppage.html

Mail : alia_sympo-group@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

（奄美）東京大学医科学研究所 奄美医科学研究施設

住所：〒894-1531 鹿児島県大島郡瀬戸内町手安802 TEL:0997-72-0373

（白金）東京大学医科学研究所 先進動物ゲノム研究分野

住所：〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1 TEL: 03-6409-2230

プログラム

10月2日（水） 奄美医科学研究シンポジウム 1 日目

セッション1

座長：真下 知士（東京大学医科学研究所）

16:00～16:05

開会挨拶

中西 真（東京大学医科学研究所長）

16:05～16:30

基調講演 1「細胞内情報伝達ネットワークの制御とその破綻による疾患発症機構」

武川 睦寛（東京大学医科学研究所副所長）

16:30～17:00

基調講演 2「フィラリアを追って」

多田 功（九州大学名誉教授）

ウエルカムパーティー

10月3日（木） 奄美医科学研究シンポジウム 2 日目

セッション2

座長：岩間 厚志（東京大学医科学研究所）

9:00～9:25

造血幹細胞の加齢変化

岩間 厚志（東京大学医科学研究所）

9:25～9:50

進化するヒト化マウス：次世代ヒト疾患モデルの開発

伊藤 亮治（公益財団法人実中研）

9:50～10:15

非ヒト霊長類を用いた神経病原性エンテロウイルス研究

永田 典代（国立感染症研究所）

10:15～10:45

休憩

座長：吉見 一人（東京大学医科学研究所）

10:45～11:10

AAV（アデノ随伴ウイルス）を活用した次世代型サブユニットワクチンの研究開発

恒川 雄二（東京大学医科学研究所）

11:10~11:35 **人工繁殖による医学研究用カニクイザル繁殖事業の成果と課題**
守村 敏史（滋賀医科大学動物生命科学研究センター）

11:35~12:00 **モデル動物を活用した糸球体疾患の病態解明**
市村 浩一郎（順天堂大学大学院医学研究科）

昼食

13:00~14:30 **ポスターセッション**

セッション3

座長：案浦 健（国立感染症研究所／東京大学医科学研究所）

川合 寛（獨協医科大学医学部）

14:30~14:55 **無菌マーマモセットの作出と特性解析**
井上 貴史（岡山理科大学獣医学部）

14:55~15:20 **京都大学ヒト行動進化研究センターにおける
サル類健康診断の紹介**
兼子 明久（京都大学ヒト行動進化研究センター）

15:20~15:45 **肝臓での細胞性免疫誘導に着目したマラリアワクチン開発研究**
水上 修作（長崎大学熱帯医学研究所）

15:45~16:15 休憩

16:15~16:40 **新規 HTS 法による速効性抗マラリア活性化化合物探索系の構築**
稲岡 健 ダニエル（長崎大学熱帯医学研究所）

16:40~17:05 **原虫は真核生物進化を教えてくれるかも？**
矢崎 裕規（農業・食品産業技術総合研究機構高度分析研究センター）

17:05~17:30 **非光合成性葉緑体の多様性から見たマラリア原虫の
アピコプラスト**
神川 龍馬（京都大学農学研究科）

意見交換会

10月4日（金） 奄美医科学研究シンポジウム3日目

奄美医科学研究施設見学（要予約）

9:00 ホテルウエストコート奄美 I エントランス集合、バス移動

10:00 奄美医科学研究施設到着、施設見学

11:30 奄美医科学研究施設出発
12:30 ホテルウエストコート奄美 I 到着

Session 4

Chair : Hideo Negishi (Institute of Medical Science, The University of Tokyo)

Coban Cevayir (Institute of Medical Science, The University of Tokyo)

15:00~15:25

Non-human primates, marmosets, as a flavivirus infection animal model and application in vaccine development studies

Moi Meng Ling (Graduate School of Medicine, The University of Tokyo)

15:25~15:50

Control of type I IFN response by targeting transcription

Hideo Negishi (Institute of Medical Science, The University of Tokyo)

15:50~16:15

Therapeutic efficacy of an adjuvant-containing live-attenuated AIDS vaccine in pathogenic SHIV-infected cynomolgus macaques

Yasuhiro Yasutomi (Director, NIBIOHN Primate Research Centre)

16:15~16:40 Break

16:40~17:05

Evolution of SARS-CoV-2

Kei Sato (Institute of Medical Science, The University of Tokyo)

17:05~17:30

Molecular mechanisms and physiological functions of translation quality controls

Toshifumi Inada (Institute of Medical Science, The University of Tokyo)

17:30~17:55

Host-Pathogen interactions

Coban Cevayir (Institute of Medical Science, The University of Tokyo)

奄美医科研教育講座

奄美の医療を考える

医科研×大島高校×奄美看護福祉専門学校

2024年10月5日(土)
9:30～12:00

参加費：無料

場所：アマホームPLAZA（奄美市市民交流センター）

9:30～ 9:35

開会挨拶

真下 知士 東京大学医科学研究所 教授

9:35～10:05

科学リテラシーのすゝめ～遺伝子からRNAワクチンまで～

稲田 利文 東京大学医科学研究所 教授

10:05～10:20

私の経験記

久原 みな代 東京大学医科学研究所附属病院 副看護部長

10:20～10:35

世代間交流に新しい風を!!結のころですべての人に健康を

鹿児島県立大島高等学校 3年生

10:35～11:05

地域医療に関する実地調査の発表

奄美看護福祉専門学校 看護学科 2年生

11:20～12:00

医科研×高校生×看護学科生 討論会



東京大学医科学研究所



県立大島高等学校



奄美看護福祉専門学校

講演者プロフィール



稲田 利文
いなだ としふみ

東京大学医科学研究所RNA制御学分野 教授
出身地：鹿児島県奄美大島名瀬市平田町

〔学歴〕

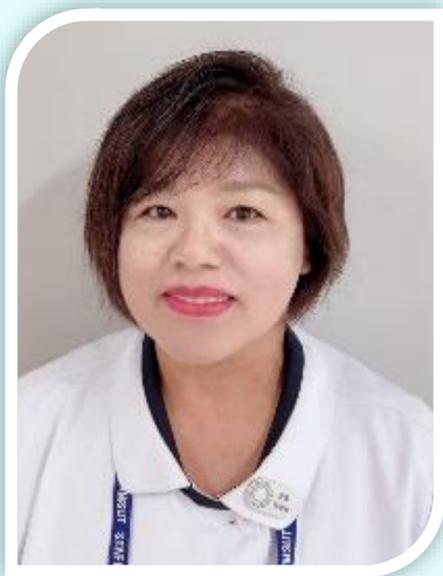
昭和52年 奄美市立（旧名瀬市立）奄美小学校 卒業
昭和55年 奄美市立（旧名瀬市立）名瀬中学校 卒業
昭和58年 鹿児島県立錦江湾高校理数科卒業（10期）
昭和62年 東京大学理学部生物化学科 卒業
平成4年 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻博士課程 修了

〔職歴〕

平成4年 名古屋大学理学部分子生物学科 助手
平成10年 カリフォルニア大学バークレー校留学
平成13年 名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 助教授
平成22年 東北大学大学院薬学研究科生命薬学専攻遺伝子制御薬学分野 教授
令和3年 現職

新型コロナウイルス感染症のパンデミックは人類にとって大きな厄災であったが、その一方で感染症に立ち向かうRNAワクチンという武器の大切さを実感する契機にもなった。医学薬学の基盤には生命科学の進歩があり、細菌感染を防ぐ抗生物質が非常の多くの命が救ってきたことは顕著な例である。進展著しい抗がん剤を含め、現在使用されている薬の99%近くは、過去50年以内に開発されたものであり、RNAワクチン開発にも遺伝子発現に必須なRNAに関する基礎研究が大きく貢献している。医学の進歩には我々市民の科学リテラシーが非常に重要であり、基礎生命研究への理解を深めてもらう機会として、RNAの働きや仕組みに関する最新の研究成果を紹介したい。

〔奄美の高校生、看護学生へ一言〕
夢中になれる時間を大事にしてください。Stay hungry, stay foolish.



久原 みな代
ひさはら みなよ

東京大学医科学研究所附属病院看護部
副看護部長
出身地：鹿児島県奄美大島名瀬市大熊町

〔学歴〕

昭和52年 奄美市立（旧名瀬市立）朝日小学校 卒業
昭和55年 奄美市立（旧名瀬市立）朝日中学校 卒業
昭和58年 鹿児島県立奄美高等学校 家政科卒業
昭和60年 板橋中央看護学校 准看護学科卒業
昭和63年 板橋中央看護学校 高等看護学科卒業

〔職歴〕

昭和58年 南春日部中央病院 入職
平成4年 東京大学医科学研究所附属病院 入職
平成19年 東京大学医科学研究所附属病院 副看護師長
平成21年 東京大学医科学研究所附属病院 看護師長
平成27年 現職

〔奄美の高校生、看護学生へ一言〕
何にでも興味を持ち挑戦してください。
何があるかわかりませんから～

開催会場

アマホームPLAZA（奄美市市民交流センター）
住所：奄美市名瀬柳町2番1号
電話番号：0997-52-1816
<https://warabee.org/amahomeplaza/>

問い合わせ先

東京大学奄美医科研シンポジウム事務局
alia_sympto_group@g.ecc.u-tokyo.ac.jp



東京大学医科学研究所
The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Session4 Abstract

[S4-1]

Non-human primates, marmosets, as a flavivirus infection animal model and application in vaccine development studies

Moi Meng Ling

School of International Health, Graduate School of Medicine, the University of Tokyo

Sub-neutralizing levels of antibody against dengue virus (DENV) is speculated to enhance infection, and play a central role in the pathogenesis of severe and life-threatening illness, dengue hemorrhagic fever (DHF). It has been reported that secondary DENV infection with a heterotypic serotype induces viremia kinetics and antibody responses that differ from those in primary infection. We have previously reported the utility of marmosets as an animal model for studying primary and secondary dengue infections. Infected marmosets consistently develop viremia and antibody kinetics that reflect those of patients with dengue. Marmosets also consistently develop lower viremia with an attenuated vaccine strain. During secondary challenge, the IgM response was delayed, whereas IgG levels rose rapidly, indicating a secondary antibody response. Neutralizing activities to homotypic serotype were high; all marmosets were protected against viremia following secondary inoculation. Additionally, DENV infection resulted in cross-reactive antibodies across flaviviruses including ZIKV, indicating ZIKV infection in DENV-immune marmoset induces a robust, amnestic cross-reactive immune response. Our results suggested that viremia markers and antibody responses in marmosets were consistent with those of human DENV infection and vaccinees. These results demonstrate the utility of marmosets as an animal model for the study of dengue and other flavivirus vaccine efficacy.

[S4-2]

Control of type I IFN response by targeting transcription

Hideo Negishi

Institute of Medical Science, The University of Tokyo

The type I IFN response is the first line of host defense that is critical for a variety of viruses. On the other hand, type I IFN response is also known to have detrimental effects in exacerbation of inflammation, autoimmune and other various diseases. In addition, a recent study revealed that type I IFN is involved in SARS-CoV-2 mediated lung inflammation and also inhibits the effect on mRNA vaccine efficacy. Therefore, it is of great benefit to control type I IFN response in a variety of diseases. We have studied the mechanisms underlying the transcription of type I IFNs, focusing on the IRF family of transcription factors. We have shown that IRF family transcription factors play an essential role in type I IFN transcription in a variety of situations. Based on our knowledge of the transcriptional regulation of type I IFNs, we are trying to develop drugs that directly regulate the transcriptional mechanism. We are using an old and new drug modality, the pyrrole imidazole polyamide. In this talk, I will present our latest findings on the development of IRFs inhibitors using pyrrole imidazole polyamides.

[S4-3]

Therapeutic efficacy of an adjuvant-containing live-attenuated AIDS vaccine in pathogenic SHIV-infected cynomolgus macaques

Yasuhiro Yasutomi^{1), 2), 3), 4)}

1) Tsukuba Primate Research Center, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, 2) Mie University Graduate School of Medicine, 3) School of Integrative and Global Majors, University of Tsukuba, 4) Osaka University Graduate School of Pharmaceutical Science

The combination antiretroviral treatment (ART) has led to a dramatic reduction in HIV-related morbidity and mortality; however, it cannot eradicate HIV from viral reservoirs established before the initiation of therapy. Then, ART require lifelong administration, and remission and complete cure that enable drug discontinuation in HIV infection are the current global goal. Development of a vaccine therapy is one of the strategies being pursued for functional cure and seeks to induce immunological control in the absence of ART. In the previous study, we genetically constructed a live attenuated simian human immunodeficiency virus to express the adjuvant molecule Ag85B (SHIV-Ag85B). Most of macaques inoculated with SHIV-Ag85B showed protective effects against the intravenous challenge of pathogenic SHIV89.6P. Also, eradication of SHIV89.6P was confirmed by an adoptive transfer experiment and CD8⁺ cell depletion study. These results suggest that provide the possibility of eradicating a pathogenic lentivirus from infected cells. In this study, we investigated the therapeutic efficacy of SHIV-Ag85B in pathogenic SHIV89.6P-infected cynomolgus monkeys that began antiretroviral therapy during acute infection. In the cynomolgus monkeys inoculated with SHIV-Ag85B, monkeys did not show viral rebound after discontinuation of ART. In those animals, proviral DNAs in peripheral blood were reduced to low levels and the numbers of peripheral CD4⁺ T cells were recovered at normal levels. Our findings showed partial therapeutic efficacy of SHIV-Ag85B vaccination following ART discontinuation in pathogenic SHIV-infected cynomolgus macaques.

[S4-4]

Evolution of SARS-CoV-2

Kei Sato

Division of Systems Virology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Japan

To elucidate the virological characteristics of newly emerging SARS-CoV-2 variants in real-time, I launched a consortium, "The Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan)". With the G2P-Japan consortium colleagues, we have revealed the virological characteristics of SARS-CoV-2 variants. In this talk, I briefly introduce the scientific activity of G2P-Japan consortium and would like to discuss the possibility for international collaboration to combat the outbreaks and pandemic that will happen in the future.

[S4-5]

Molecular mechanisms and physiological functions of translation quality controls

Toshifumi Inada

Division of RNA and gene regulation, Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Ribosome stall and collision trigger stress responses and activate ribosome quality-control pathways that depend on ribosome ubiquitination. In ribosome-associated quality control (RQC), a collision sensor recognizes the collided ribosomes and forms K63-linked polyubiquitin chains on the uS10 of the leading ribosome, which leads to RQT complex-mediated dissociation into subunits. Subsequently, nascent polypeptides on the 60S subunit are degraded by LTN1-mediated K48-linked polyubiquitination or Ala-tail formation via NEMF-mediated mRNA/40S independent peptide-bond formation.

In 18S non-functional rRNA decay (18S NRD), stall ribosome sensors detect individual stalled 80S ribosomes carrying exogenously expressed defective 18S rRNA and eliminate it depending on poly-ubiquitination of the ribosomal protein uS3. Ribosome collision formed by mRNA-damaging agents, translation inhibitors, and starvation induces the CRD, Collision-mediated 40S Ribosome subunit Decay. Slow-translating ribosomes are recognized and mono-ubiquitinated by Mag2, and prolonged stalling leads to ribosome collision and Hel2-mediated poly-ubiquitination of uS3. In mammals, eRF3 degradation ribosome stalling at stop codons leads to RNF10-mediated uS3/uS5-ubiquitination and 40S downregulation. Ribosome stall also induces stress responses, ISR (Integrated Stress Response), and RSR (Ribotoxic Stress Response), which are responsible for 40S downregulation.

[S4-6]

Cevayir COBAN, M.D., Ph.D. (Clinical Microbiology)

Professor, Division of Malaria Immunology,
Department of Microbiology and Immunology, Institute of Medical
Science (IMSUT), University of Tokyo
Lab HP: <https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/malimmun/>
E-mail ccoban@ims.u-tokyo.ac.jp



Host-*Plasmodium* interactions

My laboratory focuses on malaria infection and has developed tools to understand how these intracellular parasites evade host immunity by evading barriers within the host. Recently, we have expanded our research to investigate *Leishmania* parasites, which cause cutaneous leishmaniasis. With global warming projected to expose an additional 4.7 billion people to vector-borne diseases by 2070, understanding the early stages of infection is crucial. These protozoan parasites initiate infection in the skin following transmission by insect vectors, and it is vital to uncover how they induce pathology and evade host immunity. In my presentation, I will overview our recent discoveries and discuss how a deeper understanding of host immune responses can guide strategies to eliminate these parasitic infections.

Recent Selected Publications:

1. Ekemen S, Nalcaci M, Toz S, Sanjoba C, Demirkesen C, Cetin ED, Tecimer T, Yildiz P, Gursel M, Ince U, Ozbel Y and **Coban C**. Diagnostic challenges in cutaneous leishmaniasis due to atypical *Leishmania infantum*: pathologists' insights from re-emergence zones. **Frontiers in Medicine**, 2024, 11:1453211. doi: 10.3389/fmed.2024.1453211
2. Alshaweesh J, Dash R, Lee MSJ, Kahyaoglu P, Erci E, Xu M, Matsuo-Dapaah J, Del Rosario Zorrilla C, Aykac K, Ekemen S, Kobiyama K, Ishii KJ, **Coban C**. MyD88 in osteoclast- and osteoblast-lineages differentially controls bone remodeling in homeostasis and malaria. **International Immunology**, 2024, <https://doi.org/10.1093/intimm/dxae023>. **Editor's pick**
3. Lee MSJ, Matsuo Dapaah J, Del Rosario Zorrilla C, Omatsu Y, Nagasawa T, Uemura S, Iwama A, Ishii KJ, **Coban C**. Acute malaria suppresses the B lymphocytic niche in the bone marrow through the alteration of CXCL12-abundant reticular cells. **International Immunology**, 2024, <https://doi.org/10.1093/intimm/dxae012>. **Editor's pick**
4. Lee MSJ, Inoue T, Ise W, Matsuo-Dapaah J, Wing JB, Temizoz B, Kobiyama K, Hayashi T, Patil A, Sakaguchi S, Simon AK, Bezbradica JS, Nagatoishi S, Tsumoto K, Inoue JI, Akira S, Kurosaki T, Ishii KJ, **Coban C**. B cell intrinsic TBK1 is essential for germinal center formation during infection and vaccination in mice. **Journal of Experimental Medicine**, 2022, Feb 7;219(2):e20211336. **Cover**
5. **Coban C**. The host targeting effect of chloroquine in malaria. **Current Opinion in Immunology**, 2020, Oct;66:98-107.
6. **Coban C**, Lee MSJ, Ishii KJ. Tissue-specific immunopathology during malaria infection. **Nature Reviews Immunology**, 2018 doi:10.1038/nri.2017.138.
7. Lee MSJ, Maruyama K, Fujita Y, Konishi A, Lelliott PM, Itagaki S, Horii T, Lin JW, Khan SM, Kuroda E, Akira S, Ishii KJ, **Coban C**. Plasmodium products persist in the bone marrow and promote chronic bone loss. **Science Immunology**, 2017, June 2; 2 (12), pii: eaam8093. **Cover**

ポスター要旨集

| 番号 | タイトル | 発表者 |
|----|---|--------------|
| 1 | アピコンプレクサおよびその近縁系統におけるオルガネラ局在 DNA ポリメラーゼの多様性と進化 | 稲垣 祐司 |
| 2 | 自由に活動する疾患モデルマーマーモセットの網羅的なデータ取得ための機器の開発 | 塚本 晃海 |
| 3 | Droplet digital PCR を用いた高度サルマラリア流行地における <i>Anopheles</i> の疫学調査 | 荒木 球沙 |
| 4 | 発現誘導型筋強直性ジストロフィー-1 型疾患モデルの表現型評価 | 宗庭 羽 |
| 5 | 新しい肝細胞移植ラットモデルの開発 | 村松 威音 |
| 6 | Type I CRISPR を用いた遺伝子発現活性化ツールの開発 | 公平 哲太郎 |
| 7 | ヒストン修飾酵素阻害剤を用いた発育期特異的な抗マラリア原虫効果とその分子基盤の解明 | 関澤 秀斗 |
| 8 | 重症免疫不全(SCID)ラットを用いた SARS-CoV-2 持続感染モデルの確立 | 宮崎 かや |
| 9 | ヒト赤血球の長期解析に向けたヒト化マウスの開発 | 大野 裕介 |
| 10 | AAV ベクターを用いた猫伝染性腹膜炎ワクチンの開発に関する基礎研究 | 田辺 愛理 |
| 11 | 尿中コモンマーマーモセット絨毛性ゴナドトロピン検査キットを用いた人工授精法の確立 | 佐々木 えりか |
| 12 | CRISPR-Cas3 を用いた高感度ウイルス核酸検出技術の開発 | 平野 里佳 |
| 13 | Establishing and optimizing <i>Saimiri boliviensis</i> peripheral blood mononuclear cells (PBMC) <i>in vitro</i> culture system | Jiun-Yu Jian |

【1】

アピコンプレクサおよびその近縁系統におけるオルガネラ局在 DNA ポリメラーゼの多様性と進化

○稲垣祐司¹、原田亮²

¹筑波大学計算科学研究センター、²ダルハウジー大学医学部

アピコンプレクサとその近縁系統においては、複数タイプのオルガネラ局在 DNA ポリメラーゼ (DNAP) が複雑な分布をしている。アピコンプレクサは、クロムポデリヅ、スクイミディア (Squimidea) と共に Apicozoa を構成するが、その姉妹群は渦鞭毛藻類とパーキンソゾアから構成される Dinozoa である。Dinozoa ではミトコンドリアと色素体ゲノムの複製・修復にそれぞれ異なる POP と呼ばれる DNAP をもちいる。一方 Apicozoa においては色素体局在 POP は検出されず、PREX と呼ばれる色素体局在 DNAP をもつ。従って、Dinozoa と Apicozoa が分岐したのち、後者において色素体局在 DNAP が POP から PREX に置換されたと解釈できる。Apicozoa にふくまれる 3 系統には 2 タイプのミトコンドリア (mt) 局在 DNAP、すなわち POP と acPolA が検出された。Apicozoans の中で最も初期に分岐するスクイミディアでは mt 局在 DNAP として POP のみが検出されたが、アピコンプレクサでは acPolA のみが検出された。一方アピコンプレクサと姉妹群となるクロムポデリヅでは POP と acPolA の両方を保持することが明らかとなった。アピコンプレクサ内部系統関係を鑑み、以下①～④の段階を経て現在の mt 局在 DNAP 多様性と分布を形成したと提唱する。①スクイミディアは Apicozoa の祖先状態を反映し、mt 局在 DNA ポリメラーゼとして POP を使用している。②アピコンプレクサおよびクロムポデリヅの共通祖先が acPolA を確立し、mt 局在 DNA ポリメラーゼとして POP と acPolA を用いていた。③現在のクロムポデリヅはこの祖先状態を維持している。④アピコンプレクサとクロムポデリヅが分岐した後、アピコンプレクサの共通祖先で POP が欠失した。興味深いことに、Hematozoa および Coccidia の一部の系統 (例えば *ThaILERIA* と *Sarococystis*) において、acPolA を含め既知の mt 局在 DNAP が検出されなかった。従ってアピコンプレクサの現存系統が分岐した後、acPolA が複数回消失し、その代わりに未知の mt 局在 DNAP が確立した可能性が高い。

【2】

自由に活動する疾患モデルマーモセットの網羅的なデータ取得のための機器の開発

○ 塚本晃海¹、菊池理加¹、山崎万喜¹、佐藤賢哉¹、汲田和歌子¹、佐々木えりか¹

¹ 公益財団法人美中研・マーモセット医学生物学研究部

コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*, マーモセット) は、小型の非ヒト霊長類であり、遺伝子改変技術によって Alzheimer's disease (AD) などの神経変性疾患のモデル動物も登場している (Sato et. al., *Lab Animal*, 2024)。しかしながら、これらの神経変性疾患モデルはどのように行動に異常が現れるかは不明である。そこで、ホームケージの中で自由に活動する動物の行動変化を網羅的に解析するため、Full Monitoring and Animals Identification (FulMAI) システム (Yurimoto et. al., *Communications Biology*, 2024) と常設するタッチパネル装置の2つを開発した。この2つを用いた AD モデルマーモセットの解析結果を報告する。

FulMAI システムは、レーザーレーダーとビデオトラッキング、Deep learning を組み合わせ、顔を識別することで、無標識で個体を 3 次元トラッキングすることができ、個体ごとの活動量や個体間距離を定量化が可能である。また、タッチパネル装置をケージと常時接続することで、動物が能動的にタッチパネル課題を実施できる。そのため、認知機能の検査と同時に課題試行回数から報酬獲得へのモチベーションを解析する。課題はトレーニング用の課題と遅延型学習課題を行った。これらの実験機器を用いて、AD モデル (*PSEN-1* 変異) のマーモセット 10 頭 (2-5 歳) と野生型のマーモセット 4 頭 (5-11 歳) を 1 年間飼育した。FulMAI では、AD モデルの一部で野生型よりも優位に活動量が低く、2 頭の AD モデルで、夕方の活動量が高値となった。この夕方の活動量の増加はヒト AD の夕暮れ症候群に似た徴候を捉えた可能性がある。また、タッチパネル課題は、10 頭中 6 頭の AD モデルでヒトの対面したトレーニングをすることなく遅延型学習課題まで学習させることができ、1 ペアでは、遅延型学習課題の正解率が 60% 以上 (オス: 69%, メス: 64%) まで学習させることができた。一方で、入室回数あたりの課題実施回数は 2-5 回に 1 回の課題を実施が認められたが、まだ特筆する徴候は認められなかった。AD モデルについて、今後も継続した調査を実施する予定である。

[3]

Droplet digital PCR を用いた高度サルマラリア流行地における *Anopheles* の疫学調査

○荒木球沙^{1,2}、小山哲秀³、吉村比呂¹、荒井絢子¹、川合覚⁴、関澤秀斗^{1,5}、梅木優子¹、中野由美子¹、今井孝¹、岡本宗裕⁶、サトウ恵⁷、Wipaporn Thabthimthong⁸、Taratorn Kemthong⁸、久枝一¹、Suchinda Malaivijitnond^{8,9}、案浦健^{1,5}

¹国立感染症研・寄生動物部、²国立感染症研・安全管理センター、³新潟大・法医、⁴獨協医大・熱帯病寄生虫病、⁵農工大院・共同獣医・熱帯寄生、⁶京都大・ヒト行動進化研究センター、⁷新潟大・保、⁸National Primate Research Center of Thailand, Chulalongkorn University、⁹Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

マラリアは依然として世界的な公衆衛生上の重大な感染症であり、近年では東南アジア諸国を中心にサルマラリアの人獣共通感染症の症例数が増加している。しかし、媒介昆虫である *Anopheles* 属の蚊からマラリア原虫の DNA を検出することが難しく、サルマラリアのベクターに関する報告は非常に少ない。そこで本研究では、高感度 PCR 法である droplet digital PCR (ddPCR) を用いて、*Anopheles* 属の蚊からサルマラリア原虫の DNA を検出することを試みた。疫学調査は、野生のカニクイザルにおいてサルマラリア高度流行地で知られるタイ中部のプー・ポティサット寺院 (PPT) で実施し、サルマラリア媒介種の同定を目的とした。結果として、CDC トラップにより計 152 匹のメスの *Anopheles* を収集し、標準的な 18S rRNA をターゲットとした Nested-PCR 法によりマラリア原虫の DNA 検出を試みたが、すべての *Anopheles* で PCR 陰性であった。しかし、その後、同じく 18S rRNA をターゲットとした ddPCR による解析を行ったところ、25 匹の蚊からサルマラリア原虫 (*Plasmodium cynomolgi*) などの DNA が検出された。また、今回サルマラリア原虫が検出された *Anopheles* は *An. minimus* /*An. dirus* /*An. sawadwongporni* の 3 種類であり、*An. sawadwongporni* からサルマラリア原虫 DNA が検出されたのはこれが初めての報告である。これらの結果は、ddPCR が *Anopheles* 属の蚊からサルマラリア原虫 DNA を検出するための強力なツールであることを示しており、サルとヒト間のマラリア感染における人獣共通感染症の理解を深めると考えられる。

【4】

発現誘導型筋強直性ジストロフィー1型疾患モデルの表現型評価

○宗庭羽¹、Zhao Di¹、石田紗恵子¹、宮井尊史²、真下知士¹

筋強直性ジストロフィー1型（DM1）は、成人で最も頻度の高い筋ジストロフィーであり、筋萎縮・強直に加え、白内障や心臓伝導障害などの全身性症状を示す。Myotonic dystrophy protein kinase（DMPK）遺伝子の3'非翻訳領域におけるCTGリピートの異常伸長（50-3000回）が病因とされているが、根本的な治療法は確立されていない。

患者の症状を模したモデル動物は、治療法の開発に不可欠である。異常CTGリピート（>1,000）を含むヒトDMPK遺伝子が導入されたDMSXLマウスは、DM1モデルとして広く利用されている。しかし、恒常的なCTGリピートの発現により著しい発育遅延が認められ、生存率が低く、個体数の確保や長期的な評価が困難であるという問題が存在する（Huguet *et al.*, 2012）。本研究では、Tet-Onシステムにより、CTGリピートの発現時期を制御することで、致死性を回避し、安定して利用できるDM1モデルマウスの開発を目指した。

転写活性化因子rtTAを全身に発現するRosa26-rtTAマウス（東大山田泰広先生より譲渡）とTREプロモーター下でCTGの960リピートを発現するTREDT960Iマウス（Morriss *et al.*, 2018; Rao *et al.*, 2021）を交配することによって、ドキシサイクリン（Dox）投与によりCTG960リピートを全身に発現するマウスを作製した。生後0日齢より母乳を介してDox誘導を開始したところ、15日齢より体重増加が停止し、3週齢までにすべての個体が死亡した。解剖の結果、横隔膜や骨格筋において顕著な筋量低下が認められた。そこで、致死性を回避するために、Dox投与開始時期を検討し、生後1、3、6週齢に変更した。結果、すべての個体が14週齢以降も生存した。また、生後1もしくは3週齢にDox投与を開始した群では、白内障や骨格筋の有意な萎縮が認められた。CTGの異常伸長は、核内で異常mRNAの凝集を引き起こし、様々なmRNAのスプライシング異常が引き起こされることが報告されている。萎縮を示したマウスの筋サンプルにおいてもヒト患者と同様に、*Mbnl1*と*Mbnl2*遺伝子におけるスプライシング異常が認められた。本研究で開発されたマウスモデルは、DM1の幅広い症状の発症機序および病態の解明に役立つ。また、遺伝子治療を含めた治療法の開発へ貢献することが期待される。

【5】

新しい肝細胞移植ラットモデルの開発

○村松威音¹、石田紗恵子¹、飯田龍哉¹、佐藤悠介²、真下知士¹

¹東大・医科研・先進動物ゲノム、²北大・院薬学研究院

肝障害を与えたレシピエント動物に、他の動物由来の肝細胞を生着させた肝細胞移植モデルは、ドナー肝細胞によって肝機能を補完する肝障害治療モデルや、ヒト肝細胞を生着させたヒト化肝臓モデルの研究に用いられている。従来は外科手術や薬物による一時的な肝障害が用いられていたが、近年、継続的かつ、レシピエント動物の細胞に対して選択的に肝障害を導入できる遺伝子改変動物が様々な生物種で開発され、レシピエントとして利用されるようになった。中でも、*Fah*（フマリルアセト酢酸ヒドラーゼ）遺伝子の全身性 KO によって肝細胞死を誘導する *Fah* KO マウス・ラットは、ドナー肝細胞による高いキメラズムを示し、本モデルに有用である。しかし、*Fah* の全身性 KO は胎生致死のため、出生前から NTBC（ニチシノン）を継続投与する必要があり、*Fah* KO 動物の新たな作製と系統化・維持には、多大な労力と費用を要する。また、腎障害を併発することが知られており、全身性 KO による肝臓以外の組織への悪影響も懸念されている。

そこで本研究では、ゲノム編集ツールを搭載した肝臓を標的とする脂質ナノ粒子（LNP）を用いて、肝臓特異的に *Fah* 遺伝子の KO を導入することで、あらゆるラット系統を用いて任意のタイミングで作製できる、従来の課題を克服した新たな肝細胞移植モデルの開発を目指した。

ラット *Fah* 遺伝子を標的とする sgRNA（sgRNA-1, 2, 3）を設計し、Cas9mRNA とともにラット初代肝細胞または HepG2（ヒト肝癌由来細胞株）に導入したところ、いずれの sgRNA でもラット *Fah* 遺伝子の変異導入が認められた。加えて、sgRNA-3 では他と比べて顕著なラット初代肝細胞の細胞死が観察された。Luciferase をコードする mRNA を搭載した肝臓標的 LNP（Luc-LNP）をラットの尾静脈から投与したところ、4 時間後に Luciferase 発現を示す発光が肝臓に局在しており、本 LNP が肝臓特異的に送達されることが示唆された。そこで、Cas9mRNA と sgRNA-3 を搭載した Cas9/sgRNA-LNP をラットに投与した。最初の投与から 10 日後、肝細胞からゲノム DNA を抽出したところ、変異導入率は単回投与で 45%、2 回投与で 59%であった。また、同日までに、毛なみの悪化がみられ、特に 2 回投与の個体では血中肝障害マーカーである ALT の増加と、肝細胞の肥大化が認められた。

以上の結果から、本手法により肝障害モデルを迅速に作製できることが明らかになった。今後、LNP 投与量や回数の方なる検討を行い、肝臓障害の最適化を行うことで、肝細胞移植モデルの確立を行う。

[6]

Type I CRISPR を用いた遺伝子発現活性化ツールの開発

○公平哲太郎¹、吉見一人¹、谷口ひろみ¹、真下知士¹

¹東大・医科研・先進動物ゲノム

CRISPR activation (CRISPRa)はゲノム編集技術として広く利用される CRISPR-Cas9 を応用した新しい転写制御技術である。CRISPRa は Cas9 によるゲノム編集では難しかった標的遺伝子の発現活性化を可能にすることから、研究・医療で広く応用されている。しかし、オフターゲット効果による非特異的な遺伝子発現変動や、標的認識に必要な PAM 配列によって設計が制限されるという問題があった。

そこで我々は Type I CRISPR-Cas3 に注目した。CRISPR-Cas3 は crRNA と複数の Cas タンパクから構成され標的配列に結合する Cascade 複合体と、ヌクレアーゼ活性を持つ Cas3 から成る。その PAM 配列は Cas9 と異なることから Cas9 では設計が難しい標的も認識可能である。加えて、認識配列長が Cas9 より長いことから標的特異性も高い。よって、Type I CRISPR-Cas3 を用いることで Cas9 による CRISPRa の課題を解決することが出来ると考え、Type I CRISPR を用いた新規発現活性化ツールの開発を目指した。

本研究では、crRNA に RNA アプタマーである MS2 配列が 8 つ連なった 8xMS2 配列を付加することで MS2 結合タンパク (MCP)に融合した転写活性化因子が Cascade 周辺に誘引される 8xMS2-Cascade システムを設計した。設計したシステムのヒト細胞内での効果を検証するために、mCherry を発現するレポータープラスミドのプロモーター上流を標的とした crRNA を設計し、HFK293T 細胞にトランスフェクション後、RT-qPCR による発現量の定量を行ったところ、mCherry の発現活性化が認められた。次に、同様の実験系で、複数の転写活性化因子を対象に最適な転写活性化因子の選定を行い、p65-HSF1 が最も発現を活性化することが明らかになった。最後に、8xMS2-Cascade と選定した p65-HSF1 を用い、*HBG* 遺伝子と *IL1RN* 遺伝子を標的として細胞内在性遺伝子の発現活性化を検証したところ、両方の遺伝子で大幅に発現を活性化することに成功した。

以上の結果から、設計した 8xMS2-Cascade と選定した転写活性化因子 p65-HSF1 を用いることで、ヒト細胞内で内在性遺伝子の発現を活性化できることが示された。Type I CRISPR を用いた新規遺伝子発現活性化ツールを確立することで、基礎研究における活用のみならず転写活性化を利用した安全性の高い遺伝子治療といった形での応用が期待される。

【7】

ヒストン修飾酵素阻害剤を用いた発育期特異的な抗マalaria原虫効果とその分子基盤の解明

○関澤秀斗^{1,2}、荒木球沙^{1,3}、梅木優子¹、立石祐樹¹、長谷川早悠里¹、中野由美子¹、久枝一¹、
案浦健^{1,2}

¹感染研・寄生動物、²農工院・獣医・熱帯寄生、³感染研・安管センター

マalariaは、世界三大感染症の一つであり、マalaria原虫の感染により引き起こされる寄生虫疾患である。マalaria原虫は、肝臓(肝内期)と赤血球(赤内期)で増殖した後、一部の虫体のみが伝搬ステージ(ガメトサイト)となって、ハマダラカの吸血により媒介される。マalaria原虫は、発育期により増殖様式が大きく異なるため、それらを制御する複雑な遺伝子発現制御機構の存在が示唆されているが、その詳細は不明な点が多い。マalaria原虫を含む真核生物に存在するヒストンは、様々なエピジェネティック制御により、細胞増殖や遺伝子発現制御に関与する。これまでの先行研究では、マalaria原虫に対するヒストン修飾酵素(HME)阻害剤を用いた研究が複数報告されている。それらの研究結果を総合すると、ヒストン修飾は、マalaria原虫の発育期に応じて異なることが示唆されるが、その詳細は不明である。そこで本研究では、独自に調製した HME 阻害剤ライブラリーを用いて、ネズミマalaria原虫(*Pb*)の赤内期と肝内期に対する抗原虫効果を試験し、異なる発育期に対する効果の違いを検討した。

In vitro 薬剤感受性試験の結果、*Pb* の赤内期に抗原虫効果を示した HME 阻害剤を 32 化合物見出した。次に、同一の阻害剤ライブラリーを用いて、肝細胞株(HuH-7)に対する細胞毒性評価を行い、細胞毒性を示さない 24 化合物を用いて *Pb* の肝内期試験を実施した。その結果、*Pb* の肝内期への抗原虫効果を有する HME 阻害剤を 7 化合物見出し、そのうち 2 化合物は赤内期には効果が無く、肝内期特異的な抗原虫効果を示した。また、HME 阻害剤の 1 化合物は、肝内期には効果は無く、赤内期特異的な抗原虫効果を示した。これらを総合すると、HME 阻害剤の抗マalaria原虫効果は、発育期間において異なる結果が得られた。今後、阻害剤の標的分子や作用機序などを明らかにすることにより、マalaria原虫の発育期に応じたエピジェネティック制御機構の解明を試みる予定である。

【8】

重症免疫不全(SCID)ラットを用いた SARS-CoV-2 持続感染モデルの確立

○宮崎かや^{1,2}、志和(須藤)希³、岩田(吉河)奈織子³、坂井祐介³、吉見一人⁴、真下知士⁴、鈴木忠樹³、長谷川秀樹^{1,2}、永田典代³

¹ 国立感染症研究所 インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター、² 東北大・医学系研究科、³ 国立感染症研究所 感染病理部、⁴ 東大・医科学研究所

【背景と目的】

免疫不全患者における SARS-CoV-2 の持続感染は、薬剤耐性や新たな変異株の出現につながる可能性が示唆され、重大な懸念となっている。しかし、その病態は不明な点が多く、効果的な治療法は未だ確立されていない。そこで本研究では、この問題を解決するために重症免疫不全 (SCID) ラットを用いた SARS-CoV-2 持続感染モデルの確立を試みた。

【方法】

ラットに感受性を持つマウス継代 SARS-CoV-2 株 (B.1.系統由来) を 9-10 週齢の SCID ラットに接種し、接種 5 日目のウイルス感受性・病原性を評価した。また、ウイルスの持続感染を明らかにするために、別の SCID ラットを用いて同様の感染実験を行い、ウイルス接種後 43 日間にわたり経過観察と経時的な鼻口部と体表拭い液からのウイルスゲノムの検出確認、経過観察後の諸臓器におけるウイルスの検索、および検出されたウイルスゲノムの変異解析を実施した。

【結果と考察】

接種 5 日目の SCID ラットの肺の病理学的解析では局所的な軽度の炎症像が見られ、気管支と病変部でのウイルス抗原陽性像が確認された。長期間の経過観察を行った SCID ラットでは、経時的に採取した鼻口部と体表拭い液からウイルスゲノムが持続的に検出された。接種 43 日目に採材した肺での炎症は見られなかったが、鼻腔と気管支組織においてウイルス抗原陽性像が確認された。また、接種 5 日目と 43 日目の個体から採取した鼻腔洗浄液と肺から抽出したウイルス RNA の NGS 解析によって、ウイルスの経時的な変異の蓄積が明らかとなった。構造タンパク質領域での変異は比較的少なかった一方、特に非構造タンパク質領域で多くの変異が観察された。これらの変異の一部は、先行研究において自然免疫回避や持続感染に関与することが示唆されているものであった。

以上のことから、SCID ラットにおいてマウス継代 SARS-CoV-2 の持続感染が成立した。本モデルは、免疫不全患者における SARS-CoV-2 持続感染の病態解明に有用であり、新たな治療法開発に寄与することが期待される。

【9】

ヒト赤血球の長期解析に向けたヒト化マウスの開発

○大野裕介¹、Yunmei Mu^{1,2}、望月美沙¹、川井健司¹、後藤元人¹、高橋利一¹、伊藤亮治¹

¹公益財団法人実中研、²Mayo clinic

ヒト赤血球をマウスに生着させたヒト化マウスは、マalaria感染症におけるワクチン開発や創薬研究に向けた優れたツールとなる事が期待される。しかしながら、末梢血より単離されたヒト赤血球を重度免疫不全 NOG マウスに移植した場合、ヒト赤血球は早期に検出されなくなる。NOG マウスはリンパ球が完全欠損であるため、好中球やマクロファージと言った貪食細胞による排除が働いていると予想されるが、排除を行っている細胞種の特異性や局在する組織に関しては解析が進んでいない。

そこで我々は、ヒト赤血球排除を担う細胞の特異性を行い、その細胞を選択的に除去し、ヒト赤血球が in vivo で長期生着する新規ヒト化マウスモデルの樹立を試みた。

インフォームドコンセントを得た健常者より採取した赤血球を IVISence DiR により蛍光標識し、NOG マウスに移植した。IVIS イメージングシステムで解析を行ったところ、肺、肝臓、脾臓において強い蛍光が観察された。さらに各組織の細胞を Flow cytometry (FCM) で解析したところ、肝臓、続いて脾臓の CD68+マクロファージが DiR を強く発しており、ヒト赤血球を多く貪食している事がわかった。そこで我々は、ヒト CD68 プロモーター支配下にチミンキナーゼ (TK) を遺伝子導入した CD68-TK NOG マウスを作製し、Valganciclovir (ValGCV) 飲水投与により CD68 陽性細胞が選択的に除去されるマウスを開発した。免疫組織化学染色および FCM 解析を行ったところ、ValGCV 投与翌日より多くのマクロファージが除去されることが確認された。ValGCV はマウスに対し強い毒性を示すため継続投与は不可能である。そこで ValGCV 3 日間投与後にヒト赤血球を CD68-TK NOG マウスへ移植するプロトコルを検討した。その結果、2 週間にわたってヒト赤血球が末梢血中で検出され、通常の NOG マウスに比べて生着期間が 4 倍程度持続した。最後に抗マウス Ly6G 抗体による好中球除去を行い、ヒト赤血球生着性がより亢進するか確認した。その結果、ヒト赤血球生着は延長せず、赤血球排除における好中球の影響は微小である事が分かった。

以上の結果より、CD68-TK NOG マウスはヒト赤血球を長期維持可能なマウス系統であり、ヒト赤血球を対象とした研究において有用な実験動物であることが示唆された。

【10】

AAV ベクターを用いた猫伝染性腹膜炎ワクチンの開発に関する基礎研究

○田辺 愛理^{1,2}、恒川雄二¹、田中良和²、岡田尚巳¹

¹ 東京大学・医科学研究所、² 日本獣医生命科学大学・大学院獣医生命科学研究科

猫伝染性腹膜炎 (FIP) はネココロナウイルス (FCoV) 感染によって引き起こされる致死的な疾患である。近年、ウイルス研究の進歩にとまらぬ、抗ウイルス薬が報告されるようになった一方で、未だ有効なワクチンは存在しない。今日に至るまで生ワクチンや組み換えタンパクワクチン、核酸ワクチンなど様々なタイプのワクチンが開発されたが、十分な効果を示すことはなかった。そこで、我々はこれまで十分に研究が行われていない新しいワクチンモダリティとして、アデノ随伴ウイルス(AAV) ベクターを用いたベクターワクチンに着目した。

FCoVはその遺伝子の違いから1型と2型の血清型に分けられる。日本国内では自然発生症例の70~90%を1型が占めるにもかかわらず、その分離培養が困難であることから、これまでII型FCoVを用いて研究が進められてきた。しかしながら、実用的なワクチンの開発には国内で流行しているI型FCoV株を用いて実験を行う必要がある。発表者らはまず、AAVベクターワクチン開発の基盤研究として、新規1型FCoVの分離およびその培養スピードを改善することを目的に、ウイルス複製が増強される細胞株の樹立をおこなった。

CyclophilinA (CypA) および CyclophilinB (CypB) はペプチジルプロリルイソメラーゼ(PPIase) 活性を持つタンパク質である。これらはコロナウイルスのスパイクタンパク質と受容体の結合の安定性に関連しており、FCoV複製を増強させる。哺乳類ゲノムにおいて高効率に外来遺伝子を組み込める Piggy Bac トランスポゾンシステムを用いて、CypA、CypBの遺伝子を全ネコ胎児由来細胞コーネル大学株 (Fcwf-4 Cu 細胞) に導入し、CypA、CypB 過剰発現細胞を作製した。

作製した細胞に1型・2型それぞれのウイルスを接種し、TCID50法を用い感染価を測定することで、細胞の感染増強能を評価した。1型FCoVの分離培養を容易にすることは、新規ワクチン設計に貴重な情報を提供し、持続的な免疫応答を誘導するワクチンの開発に向けた大きな一歩となることが期待される。現在、実験は進行中であり、本発表では、これまでに得られたデータを紹介し、今後の実験計画についての議論を行う。

【11】

尿中コモンマーモセット絨毛性ゴナドトロピン検査キットを用いた人工授精法の確立

○佐々木えりか¹、岸本恵子¹、上岡美智子¹、加藤法子¹、塚本晃海¹、向笠圭亮¹

¹公益財団法人実中研

新世界ザルのコモンマーモセットは、バイオメディカル研究のモデル動物として需要が高まっているが、非ヒト霊長類で唯一、自然交配受精卵を獲得可能な動物であり、初期胚発生研究のモデルとしても近年、注目されている。初期胚発生研究の研究には、受精卵の獲得が必須であるが、効率よく受精卵を獲得するためには、マーモセットの受性周期管理が重要となる。これまで、マーモセットでは血中プロゲステロン値が 10 ng/mL を超えた日を排卵と定義し、数日後にカテーテルによる子宮内還流法によって受精卵を採取してきた(Summers PM et al., J Reprod Fert., 1985)。我々は最近、遺伝子改変マーモセットを効率よく繁殖させるために人工授精の技術を開発したが、血中プロゲステロン値が上昇した時には既に排卵後であるため、人工授精のタイミングとしては遅めであるという問題点があった。

マーモセットでは排卵時に絨毛性ゴナドトロピン (CG)が、一過性に上昇する CG サージがある事が知られている (Gromoll J et al., Biol Reprod., 2003, Muller T et al., J Mol Endocrinol., 2004)。そこで、尿中 CG による妊娠診断キット(Dual Checker, 日本クリア株式会社)を排卵予測に応用できないか検討した。

マーモセットの排卵のタイミング確認のため、Dual Checker で CG の陽性が確認された日、もしくは翌日に人工授精を行い、受精卵採取を実施し、採卵が可能かを検討した。その結果、70.5%の確率で受精卵が取得され、キットで尿中 CG が検出されるタイミングと排卵は一致している可能性が示唆された。さらに、血中プロゲステロンの測定結果を元に体外授精を実施した時の採卵効率 30.4%と比べ、受精卵の取得率が上昇した。尿中 CG で性周期管理することで動物への負担を減らし、排卵前に排卵日を予測することで、確実に人工授精が実施でき、より多くの受精卵を取得することが可能となり、CG 検査による有効性が示された。

【12】

CRISPR-Cas3 を用いた高感度ウイルス核酸検出技術の開発

○平野里佳¹、浅野宏治¹、皆川慶嘉²、野地博行²、吉見一人¹、真下知士¹

¹東大・医科学研究所, ²東大・院工学系研究科

近年流行した COVID-19 の検査法として PCR 検査が広く使用され、核酸検出による診断方法の重要性が明らかとなってきた。我々は、PCR 検査に代わる迅速かつ簡単なウイルス核酸検出法として、CRISPR-Cas3 を用いた CONAN (Cas3 Operated Nucleic Acid detectioN) 法を開発してきた。CONAN 法では、CRISPR-Cas3 が標的ウイルスの DNA 配列を切断・認識する際に周辺の本鎖 DNA を非特異的に切断する活性を利用し、標的ウイルスを検出する。しかし、検出感度を高めるためには標的核酸を PCR 増幅する必要があり、結果が得られるまでに長い時間を要する、またサーマルサイクラーのような加温機械がある場での検査に限定されるという課題がある。

そこで、本研究では、1 分子単位での酵素反応を行うことが可能なデジタル計測技術を利用し、CRISPR-Cas3 の特性を解析して応用利用性を向上させるとともに、高感度かつ PCR フリーな CONAN 法を開発することを目指した。

はじめに、デジタル計測技術及び合成二本鎖 DNA を用いて通常条件下での CONAN 反応の検出限界値を検証したところ、1 反応あたり 100 コピー程度が必要であった。そこで、1 反応あたりに得られる蛍光強度を大きくすることで低コピー数を検出可能とすることを検討した。複数の異なる塩基配列を持つ一本鎖 DNA 蛍光プローブを用いて CONAN 法を実施したところ、プローブ中の塩基配列によって得られる蛍光強度は大きく異なっていた。最も良好な蛍光強度が得られたプローブを用いてデジタル計測技術を用いた CONAN 法を実施したところ、1 反応あたり推定数十コピー以下の二本鎖 DNA を検出することができた。

以上より、CRISPR-Cas3 による周辺の本鎖切断活性は塩基配列により異なることを示し、これを応用することで核酸検出の感度を上げることに成功した。今後、CRISPR-Cas3 の特性をさらに解明できれば、本核酸検出法のさらなる改善につながることに加え、ゲノム編集への応用利用性の向上が期待できる。

[13]

Establishing and optimizing *Saimiri boliviensis* peripheral blood mononuclear cells (PBMC) *in vitro* culture system

○Jiun-Yu Jian¹, Shin-Ichi Yokota², Shuto Sekizawa³, Tamasa Araki³, Yuki Tateishi³, Munehiro Okamoto⁴, Satoru Kawai⁵, Takeshi Annoura³, Tomoji Mashimo² and Shusaku Mizukami¹

¹ Department of Immune Regulation, Institute of Tropical Medicine (NEKKEN), Nagasaki University, Nagasaki, Japan

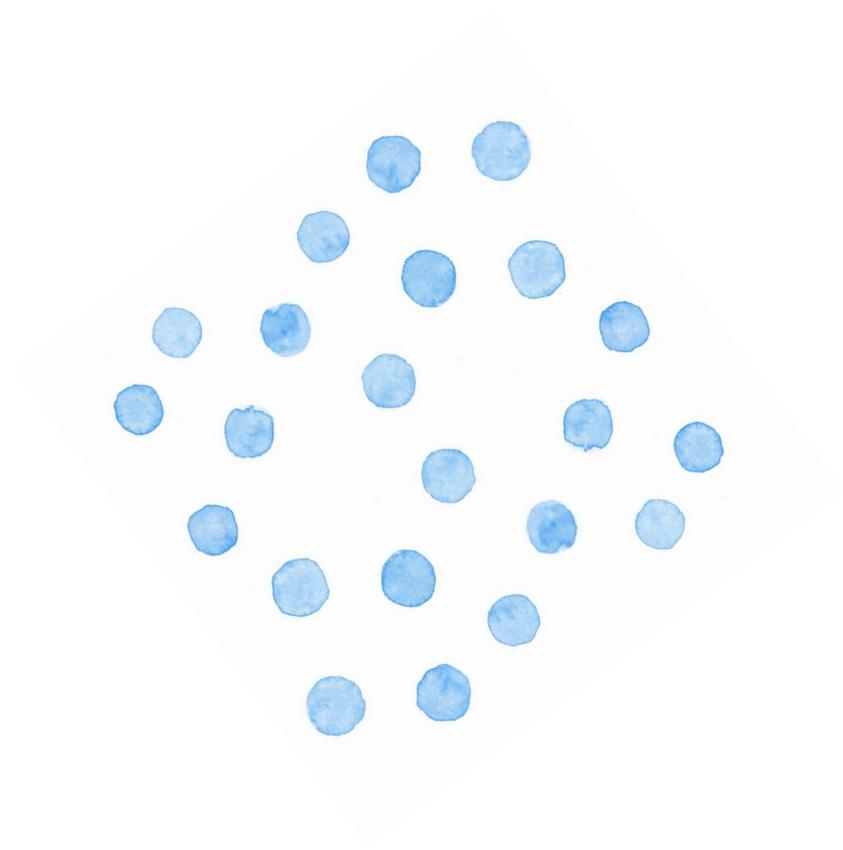
² Division of Animal Genetics, Laboratory Animal Research Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

³ Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

⁴ Section of Molecular Biology, Center for the Evolutionary Origins of Human Behavior, Kyoto University, Inuyama, Aichi, Japan

⁵ Department of Tropical Medicine and Parasitology, Dokkyo Medical University, Mibu, Tochigi, Japan

Saimiri boliviensis (Bolivian squirrel monkey) is a species that belonged to New World primates. This species showed human malaria parasite susceptibility, and it enable us to utilize them as a precious animal model for vaccine development studies. To monitor the immune cell phenotypes and function, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are the relatively accessible samples for monkeys. Although *in vitro* analysis is useful to evaluate vaccine candidates, *S. boliviensis* PBMC culture system was not well established yet. So, in this study, we proposed several conditions with bovine, human and monkey (*S. boliviensis*) serums to test the culture condition. Furthermore, to optimize the condition, we also consider adding cytokines. We hope this trial will benefit for immunological analysis on human malaria research by using *S. boliviensis* PBMC.



●主催●

東京大学医科学研究所
(国際共同利用・共同研究拠点事業)

●協力●

鹿児島県立大島高等学校
奄美看護福祉専門学校

●後援●

鹿児島県奄美市
鹿児島県大島郡瀬戸内町



東京大学医科学研究所
The Institute of Medical Science, The University of Tokyo