

## 創薬基盤推進研究事業 研究開発課題 事後評価報告書

研究開発課題名	創薬に資する高度実験動物霊長類の作製と疾患モデルの構築・解析
代表機関名	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
職名	センター長
研究開発代表者名	保富 康宏
全研究開発期間	平成 28 年度～令和 2 年度

### 1. 研究開発成果

実験動物カニクイザルを用いて以下の如く成果を得た。

#### 1. アレルギー・アトピー性疾患モデルの開発とその病態解析

カニクイザルの IL-4 ならびに IL-4 アンタゴニストの DNA ワクチンを作製した。この IL-4 ならびに IL-4 アンタゴニスト DNA ワクチンをカニクイザルに投与した時の免疫反応の解析を行ったところ、IL-4 および IL-4 アンタゴニスト DNA ワクチンのいずれの投与においても、ワクチン投与のみでは免疫系の変化は認められなかった。しかしながら、抗原投与においては IL-4 DNA ワクチンでは Th2 に、IL-4 アンタゴニスト DNA ワクチンでは Th1 の抗原特異的な反応が認められた。さらに IL-4DNA ワクチン投与カニクイザルに RS ウイルスを経鼻感染させたところ、対称の DNA ワクチン投与カニクイザルに比較し、鼻腔ならびに咽頭で高いウイルス量が認められ、さらに著しい白血球の増加が認められた。この様に液性免疫優位では病態が悪化することが確認された。現在 RS ウイルスに対するワクチンは極めて必要性が高いと考えられているが、このようなアレルギー体質で病態が悪化することを考えると、ワクチンアジュバントを慎重に選定する必要性が示唆され、Th1 型のアジュバントを用いることが重要と思われた。

#### 2. 室内飼育下での繁殖技術の高度化のための繁殖特性および生殖関連疾患の解析

オスカニクイザルの特性を解明するために、3連のケージを用いて真ん中にオスを配置、左右に特性の異なるメスを配置し「オスはどのようなメスと積極的に交配するか」について検索したところ、オスは妊娠経験のあるメスを、また若いメスよりも高齢のメスを好んで交配するという結果を得た。また、オスの性成熟時期を知るために精巣サイズと血中テストステロン濃度を測定したところ、精巣は 2.5-4歳齢の間に陰嚢に下降し同時にテストステロン濃度が上昇することが判明し、さらに長期にわたる性成熟過程の期間が存在することも考えられた。また、繁殖システムを運用している過程で、カニクイザルの子宮内膜症の病態はヒトのそれと極めて類似していることが判明した。雌においての繁殖特性、とくに性成熟について解析したところ、初潮は概ね3歳齢で認められるが、その後の月経周期が安定するまでにさらに1年を要することがわかった。その後、オスと同居させたとしても妊娠にいたるまでにはさらに1年以上、すなわち5、6歳齢で多くが初めての妊娠を経験することが判った。初潮から初めての妊娠までに体重が20%以上増加しており、この期間はヒトでの思春期の状態にあたる可能性があると考えられ、8、9歳齢においても妊娠経験がない個体は妊娠できない

何らかの理由が存在する可能性があると考えられた。また、10-20%の割合で死産、流産があることが判明し、大規模繁殖を行っている筑波の霊長類センターでは年間約40頭のロスとなっている。そこで、死産、流産を減らすことを目的としてプロゲステロンやエストロゲンを投与し、一部の個体で改善されることを見出した。これらカニクイザルの雌雄の特性情報をもとに、繁殖に適した個体をいかにして選抜するかは、結果的に繁殖効率の向上に大きく影響する。それに加えて死産、流産を減らすことは、確実に産児数を増加させることになり、大規模コロニーを維持していくうえで極めて重要である。また、感染症施設では安易に複数頭を同居させることができないため、基本的に繁殖のための交配はできない。

### 3. 人為的なカニクイザル生産技術に関する研究

カニクイザルの卵巣発育刺激法において内在性の性腺刺激ホルモンを抑制する GnRH antagonist (Antagonist 投与方法) と GnRH agonist (Agonist 投与方法) との比較を行ったが、採卵成績に差は認められなかった。また、一方、卵巣発育刺激における個体への影響として体重に与える変化を調べたところ、Agonist 投与方法はその投与後減少していた。一方 Antagonist 投与方法では Agonist 投与方法と比較して有意に体重の減少が小さかった。作製した受精卵を血清成分を含まない合成培地および個別培養シャーレを用いて培養したところ、胚盤胞への発生を確認した。血清を利用しないことからロット差は無く、カニクイザルの発生工学研究に対する有効性を確認した。

カニクイザル精子の凍結保存の可能性を明らかにするためにヒト用の精子凍結保存液を使用してカニクイザル精子の凍結保存について検討したところ、新鮮精子と比べ活性は低下するものの、運動性を維持している精子を回収できることを確認した。この凍結保存精子を使用して、顕微授精により受精卵の作製を検討したところ、雌雄両前核を持つ受精卵が得られた。しかし、その受精卵の作出効率は著しく低下した。

### 4. 霊長類循環器疾患モデルの開発及び解析

カニクイザル拡張型心筋症等の循環器疾患を中心に心疾患マーカー、心エコー等臨床所見や病理組織学的所見等も含めて精査を行ったところ、臨床所見と血中ANP、BNPに高い相関性が認められた。

カニクイザルにおいて被毛中微量元素の分析を行った結果、AI等で心疾患群に有意な差が認められた。加えて、カニクイザル自己免疫性心筋炎モデルを作出し、各種臨床所見の解析や組織学的検索等の評価を進めた結果、心不全症状や心筋線維化等ヒト同様の病態が確認され、創薬の探索に有用なヒトを反映するモデルである事が明らかになった。また、新たに被毛中ミネラル分析やMRI等画像診断法を用いた解析方法を樹立し、さらに動脈血液ガスや心電図、心エコーの基準値を樹立し自己免疫性心筋炎モデルや拡張型心筋症等に適応し検証を行った結果、何れの解析方法や基準値もカニクイザル循環器疾患の評価に有用であることを確認する事が出来た。

### 5. 慢性ウイルス感染症サルモデルの開発・解析

サル免疫不全ウイルス (SIV ; SIVmac239, SIVmac251) およびサルヒト免疫不全ウイルス (SHIV ; SHIV89.6P) を用いて、カニクイザルの直腸粘膜より様々な感染力価で接種を行いカニクイザルを用いた粘膜感染サルエイズモデルを確立した。これらの感染サルを用いて、急性期および

慢性期における免疫応答および宿主因子の解析を行った。SIV 感染サルにおける抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生細胞数は、急性期から慢性期にかけて強力な反応が継続して認められた。また抗体価についても同様に強い反応が確認された宿主因子として MHC-class-I の解析を行ったところ、様々な class-I のアリルが検出されたが、エイズウイルスを制御する class-I のアリルは確認されなかった。病理組織学的解析の結果、脳炎や肺炎等のエイズ症候群の病態を認めた。

#### 6. 結核感染モデルの開発と非発症感染コロニーの作製

新規結核ワクチンの開発を見据えた結核感染サルモデルの構築を目的に実験を進め、結核菌 Erdman株40 CFUを気管内投与による結核の急性感染モデルを確立し、このシステムにおいて BCGの粟粒性結核に対する非常に強いワクチン効果もヒトでの報告と同様に確認できた (Tsujiura et al. *J. Immunol.* 2020)。結核感染サルモデルの構築を行う中で感染非発症の潜伏感染サル(臨床診断陰性、IGRA検査陽性)も数頭作出できた。呼吸器を標的とするヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(HPIV2)をベクターとし、結核感染早期(Ag85B,ESAT-6)および潜伏感染時(MDP1)に発現する結果抗原を組み込んだ新規結核ワクチンの効果試験も行い、肺結核に対する防御効果を確認した。

#### 7. 霊長類を用いたCJDモデルの構築・解析

孤発性 CJD モデルを作出するため、2 頭のカニクイザルを用いて非定型 L-BSE 由来プリオン発症カニクイザル脳乳剤(10%脳乳剤 0.2 mL)を視床に接種した。接種後 CJD 患者と同様な神経、精神状態を呈した霊長類を用いた CJD モデルを構築した。発症後には、抑うつ状態、ミオクローヌス等を呈し、末期には無動性を示した。大脳皮質脳波を測定し、孤発性 CJD に特徴的な周期性同期性放電(PSD)様のものが確認された。安楽殺直後の脳の MRI 撮像から大・小脳の萎縮や顕著な脳室拡大が認められた。脳の病理検索からスポンジフォームや孤発性に特徴的なプリオンのび慢性沈着を認めた。ウエスタンブロット解析により大脳皮質に異常プリオン蛋白質が蓄積されていた。これらの結果からこの動物モデルは孤発性 CJD の特徴を有することが示唆された。

#### 8. 霊長類を用いたタウオパチーの病態解析

若齢から老齢まで様々な年齢のカニクイザル脳組織を用いて Tau の生化学的解析を行ったところ、カニクイザルの脳内では実際に Tau 病変が形成される 10 年以上前から Tau の高度なリン酸化が既に生じていることが明らかとなった。また、詳細な組織学的検索の結果、老齢カニクイザルの脳組織では神経細胞のみならずアストロサイトやオリゴデンドロサイトにも Tau 病変形成が認められ、進行性核上性麻痺(PSP)と同様の 4RTau 病変が形成されることが明らかとなった。一方、Tau 病変の形成メカニズムが未だ不明なため内因性 Tau の病変を誘導する動物モデルは未だ存在しない。そこで、様々な年齢のカニクイザル脳組織を用いて神経活動関連因子の mRNA 発現量を検索したところ、Ca<sup>2+</sup>イオンの放出・取込に關与する因子の発現量が変化していた。そこで、カニクイザルの初代培養神経細胞を用いて化学的に長期増強(LTP)や長期抑圧(LTD)を誘導したところ、LTD を 24 時間以上持続的に誘導することで内因性 Tau のリン酸化と細胞内蓄積をともに誘導できることが明らかとなった。一方、初代培養アストロサイトでは同様の処置で Tau の変化が確認されなかった。これらの結果から、カニクイザルを用いた内因性 Tau の病変誘導モデルを開発す

るため、週3回の頻度で2週間にわたり MK801 の静脈注射 (0.02mg/kg) を行った。MRI 撮像を行ったところ、MK801 投与個体ではわずかに脳溝と脳室腔の拡大が確認された。安楽殺解剖後、摘出した脳組織では、前頭葉皮質および側頭葉皮質ともに内因性 Tau の顕著なリン酸化が確認された。一方、残念ながら Tau の有意な蓄積は認められなかった。今後は、更なる長期間の MK801 継続投与により、カニクイザルを用いた内因性 Tau の病変化誘導モデル確立を目指す。

In drug discovery research, it is necessary to analyze the effects and toxicity by advanced animal experiments following the analysis of the molecular mechanism. Furthermore, analysis and examination using primates are indispensable to enter the clinical trial stage, and of course the primates must be advanced as experimental animals. The National Institute of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Tsukuba Primate Research Center is the only primate center in Japan for the purpose of medical science research, and is the only one in the world that maintains more than 1,700 cynomolgus monkey strains and is converted to SPF. In recent years, we have also succeeded in analyzing the whole genome sequence of our center cynomolgus monkey. It also holds the world's only elderly (25 years and over) cynomolgus monkey colony (Aging Farm). In addition, it has advanced facilities for conducting experiments and research, and is operating the largest primate infectious disease facility in Japan. In this research, we utilized these advanced primates and advanced facilities to study the improvement of breeding technology of animal resources leading to drug discovery and disease models, and to build the development of medical research. Regarding the improvement of breeding technology, we examined the establishment of a stable production system for high-quality cynomolgus monkeys, and analyzed reproductive-related diseases accordingly. As a disease model for which research and development are useful in cynomolgus monkeys, we created and analyzed a cardiovascular disease model, analyzed allergic atopic diseases by immune control, and accumulated A $\beta$  in the brain that leads to tauopathy in elderly cynomolgus monkeys held only by this center. We also developed and analyzed AIDS virus infection, tuberculosis and a model of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), which is intractable disease using an infectious disease facility. Information provision and joint research with private companies are already planned for these disease models.

As described above, the research using primates conducted in this research can be regarded as a primate center where advanced medical equipment, technology and research results are accumulated by maintaining and breeding advanced primate resources for a long period of time. It is extremely

difficult to do it outside of this facility worldwide. Furthermore, since the results obtained are findings in primates that are close to humans, it is expected that progress in drug discovery and medical science research will develop in a form closer to clinical practice.

## 2. 総合評価

優れている

### 【評価コメント】

ヒトに近い種で、社会的ニーズの高い創薬研究につながる疾患モデル動物を複数作製し、維持する体制を整えたことは、病態モデル評価の基盤として、今後の創薬研究に貢献できるものと評価できる。

今後、開発途上の CJD モデルの作成については、研究体制を整え、継続していただきたい。さらに、世界的にも優れた霊長類研究施設である特長を活かし、霊長類でなければ検討できない疾患モデルを中心に、薬剤の効果等のデータ拡充を図り、創薬研究における疾患モデルの有用性を明らかにすることを期待する。また、疾患モデル動物が多くの研究機関で活用され、創薬の進展に貢献するために、他施設との共同研究のあり方を十分検討して運営していくことを望む。

以上