



ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」

# 第13回ラットリソースリサーチ研究会

## 講演抄録集

令和2年2月21日（金） 13:00 – 17:20

京都大学医学部 芝蘭会館 稲盛ホール





## 第13回 ラットリソースリサーチ研究会 プログラム

### 第1部

座長：吉木 淳（理化学研究所）  
成瀬 智恵（京都大学）

#### ラットリソース

1. はじめに：第4期 NBRP-Rat の後半に向けての取り組み 13:00-13:15  
浅野 雅秀（京都大学大学院 医学研究科 附属動物実験施設）
2. 「ラット」の生殖工学技術開発は「マウス」にどこまで追いついたのか？ 13:15-13:45  
本多 新（京都大学大学院 医学研究科 附属動物実験施設）
3. Cre 組換え酵素ノックインラットを用いた神経回路操作モデルの構築 13:45-14:15  
松下 夏樹（愛知医科大学 医学部 総合医学研究機構 動物実験部門）
4. 遺伝子改変ラットによる末梢神経の操作・イメージング研究 14:15-14:45  
神谷 厚範（岡山大学大学院 医歯薬総合研究科（医学部）細胞生理学）

休憩 14:45-15:00

## 第2部

座長：柳川 右千夫（群馬大学）  
守田 昂太郎（京都大学）

### ラットリサーチ

- |   |             |
|---|-------------|
| 5. 腎臓病の病態解明に向けた分子遺伝学的解析<br>ーGONAD 法によるモデル動物作製から解析までー<br>古家野 孝行（重井医学研究所 分子遺伝部門）          | 15:00-15:30 |
| 6. 高血圧性疾患の病態解明への新たなアプローチ：<br>遺伝子改変 SHRSP の作成<br>大原 浩貴（島根大学 医学部 病理学講座病態病理学）              | 15:30-16:00 |
| 7. ノードラットを <i>in vivo</i> bioreactor とした新規肝再生療法の確立<br>八木 真太郎（京都大学 医学部 肝胆膵移植外科）          | 16:00-16:30 |
| 8. 脳内出血後の麻痺側集中使用による運動機能回復メカニズム<br>～ラットへウイルスベクターを用いた神経遮断～<br>飛田 秀樹（名古屋市立大学 医学研究科・脳神経生理学） | 16:30-17:00 |
| 9. 総合討論   | 17:00-17:20 |

懇親会 18:00–20:00

主催：ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」

〒606-8501

京都市左京区吉田近衛町

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

Tel: 075-753-9318 Fax: 075-753-4409

E-mail: nbrprat@anim.med.kyoto-u.ac.jp

【懇親会のご案内】

時間：18:00-20:00

場所：京都大学 楽友会館 レストラン「近衛 Latin」

〒606-8501 京都市左京区吉田二本松町

懇親会費：5,500円（当日受付でお支払下さい）





# 抄 録

## 1. はじめに：第4期 NBRP-Rat の後半に向けての取り組み

浅野 雅秀

京都大学大学院 医学研究科 附属動物実験施設

ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat)は2002年にスタートし、文科省やAMEDの支援を受けて5年ごとのプロジェクトとして、ラットリソースの体系的な「収集・保存・提供」を行ってきました。世界最大規模のラットリソースセンターとして、これまでに881系統を保存し、1377件を国内外に提供して参りました。2017年度からスタートした第4期も折り返し点を迎え、先日の中間評価では「本事業課題は計画通りの進捗が認められ、課題を継続することが妥当である」との評価をいただきました。

第4期では以下の3点を重点的に展開してきましたが、後半の取り組みについて発表させていただきます。

① 世界最大規模のラットリソースをより多くの研究者に利用していただけるように、国内外の関連学会、特に臨床系の学会やアジアの学会、企業の懇談会などに参加して、広報活動を活発に行います。2017年度は87件、2018年度は102件の提供を行い、目標値の70件を大きく上回ることができました。この調子で今後も提供件数を増やす努力をして参ります。

② ラットでもゲノム編集により遺伝子改変ができるようになりましたが、マウスと比較すると生殖工学技術が遅れており、実用的な体外受精(IVF)や精子の凍結保存の技術開発が喫緊の課題となっております。本多らを中心にラットの生殖工学技術の開発を行い、様々なラット系統において高効率の過排卵とIVFの技術開発に成功し、作製したIVF卵を用いて、高効率のKOとKIにも成功しました(Honda et al. *Scientific Reports*, 2019)。詳しくは次に本多が発表いたします。NBRP基盤技術整備プログラム(2019-20年度)に採択されましたので、今後は研修によりこれらの技術の普及を図る共に、理研BRCの小倉先生のご支援もいただき、精子の凍結保存法の開発にも取り組みます。

③ ゲノム編集技術で真下らが開発したX-SCIDなどの重度免疫不全ラットは、ヒトの様々な細胞の移植が可能なので、再生医療研究などでの需要が見込まれます。第4期から分担機関として参加した大阪大学からの供給を開始して、昨年度は15件の提供を行いました。来年度からは真下らの東京大学への移動に伴い、東大医科研からの供給となりますが、なるべく早く供給体制を整えて、さらに多くの研究者に利用していただけるようにいたします。

このように第4期NBRP-Ratはさらに多くの研究者に利用していただき、お役に立てるよう努力して参ります。ご支援のほどよろしく申し上げます。



MEMO

## 2. 「ラット」の生殖工学技術開発は「マウス」にどこまで追いついたのか？

本多 新

京都大学大学院 医学研究科 附属動物実験施設

我が国の研究者はラットの生殖工学技術開発において世界をリードする成果を発表し続けてきた。生殖工学技術の粋を集めたゲノム編集ラットの作製は、今も日本発の技術が世界のスタンダードとなっており様々な研究分野に貢献している。しかしながら、マウスでは容易に実施可能な生殖工学技術も、ラットで行おうとすると途端に実用性が低くなる。たとえば過排卵は、系統差や個体差が激しいため予定していた実験が出来なくなることも多い。また体外受精においては、いくつか報告があるものの再現が困難である。ラットの体外受精は、単に受精させるだけであれば極めて容易でその受精率も90%以上となることも多い一方で、その体外受精卵子が本当に産仔になるか否かについて大きな壁があるため、受精率のみでラット体外受精の可否を報告する例も散見される。ラットの購入価格および飼育経費はマウスの約3~5倍ほど高額であるため、使用頭数の増加は研究経費の負担に直結する。マウスであれば少数の雌から多くの受精卵を回収可能で、そこに精子を振りかければ簡単にたくさんの受精卵を得られる。必然的に多くの研究者が自らモデルマウスを開発し自身の研究に活用できる。一方ラットの場合は、特別な技術や経験を積んだ研究者のみが成し得る状況にあるため、どうしても研究の裾野が広がりにくい。

このような背景から我々は、ラットの生殖工学技術開発をマウスのレベルにまで引き上げることを目的として研究に取り組んできた。本講演では、ラットの過排卵、体外受精、ゲノム編集などの基礎的な技術開発について我々の成果を紹介しながら、マウスとラットの生殖工学技術開発の現状についてまとめたい。

MEMO

### 3. Cre 組換え酵素ノックインラットを用いた神経回路操作モデルの構築

松下 夏樹

愛知医科大学 医学部 総合医学研究機構 動物実験部門

高度な情報処理をおこなう脳では多種多様な神経細胞のシナプス接続によって特徴的な神経回路が形成される。その神経回路で行われる情報処理によって、多様な脳高次機能が実現している。したがって、脳の機能を理解するために、神経回路がどのように形成されて、そして特定の神経回路がどのように動作して特有の高次機能を発現するのかを解明することが重要な研究課題である。

脳・神経科学領域では、上記課題の解決のために、分子遺伝学的技術に加えて高度なイメージング技術や光遺伝学、化学遺伝学、ゲノム編集、ウイルスベクター技術などを巧みに組み合わせることで、神経回路研究に有効な新しい解析技術の開発が進んできた。Cre/loxP 組換えシステムは、細胞タイプ選択的な遺伝子組み換えを誘導する仕組みに有効で、それによって複雑な脳の中で標的の神経細胞を正しく観ることや、標的の神経回路のみを操作する（機能を変容させる）アプローチに利用される。様々な細胞タイプ選択的 Cre 発現モデル動物の脳内へ、独創的アイデアを盛り込んだウイルスベクターを局所注入することによって、狙った局所神経回路を選択的に操作することが可能になる。特徴的な Cre 発現様式を示すラット系統の作製は、神経回路操作手法の基盤となるだけでなく、新規の有用なラットリソースの構築に大いに貢献すると考えられる。

中脳黒質ドーパミン神経や青斑核ノルアドレナリン神経を始めとする中枢カテコールアミン神経回路は様々な脳機能に関与する。この神経回路の操作と機能解明を目的に、カテコールアミン産生細胞において特異的に発現するチロシン水酸化酵素(TH)遺伝子の発現制御下で Cre を発現するラットの作製をおこなった。ラット TH 遺伝子のストップコドン位置に正確に T2A-Cre が挿入されるよう導入遺伝子をデザインして、ラット受精卵における CRISPR/Cas9 系を利用したノックイン誘導と胚移植で産仔を得て、その結果 TH-2ACre ノックインラット系統を樹立することに成功した。同ラットの免疫組織学的解析によって、中脳黒質と腹側被蓋野ドーパミン神経ならびに青斑核ノルアドレナリン神経選択的に Cre が発現することを確認した。また、Cre/loxP 組換え依存 GFP レポーターのウイルスベクター局所注入実験をおこなって、中脳黒質及び腹側被蓋野ドーパミン細胞選択的に Cre/loxP 組換えが誘導されることを確認した。今回作製した新規 TH-2ACre ノックインラットは、中枢神経のみならず末梢神経の TH 陽性細胞の機能解析に有用なラットリソースになると考えている。TH-2ACre ノックインラットと、Cre/loxP 組換えに依存した遺伝子ノックダウンやゲノム編集の誘導、化学遺伝学手法などを搭載するウイルスベクターの脳内局所注入を組み合わせ、同神経回路機能の解明に向けた新たな研究計画を進めている。

MEMO

#### 4. 遺伝子改変ラットによる末梢神経の操作・イメージング研究

神谷 厚範

岡山大学大学院 医歯薬総合研究科(医学部)細胞生理学

末梢神経は、身体各所の生体情報を直接あるいは間接に感知してその情報を電気信号として脳・脊髄に伝達したり(求心性神経)、また、全身の各臓器に個別の電氣的命令信号を送って効果器臓器の機能を調節する(遠心性神経)。従来の末梢神経研究では、神経電気信号は、神経を体外で培養下した状態で記録されたり(パッチクランプ法等)、臓器の外部にある神経軸索部で記録されたり(ワイヤ電極、針型電極等)してきた。ところが、末梢神経が生体情報を感知するのは臓器の内部においてであり、また、末梢神経が効果器臓器の細胞機能を調節するのも、臓器に内部においてであるのに、これまで、生きた動物の臓器の内部における末梢神経の動態を計測する技術は未発達であった。そこで、この臓器内部における末梢神経動態をイメージングによって計測する技術を試作した。例えば、交感神経の計測については交感神経の Ca 活動が光るラットやマウス(TH-Cre::GCaMP6fflox 等)を作成し、観察対象臓器の内部の神経動態を2光子顕微イメージングで解析した(1)。この2光子顕微イメージングは、数百  $\mu\text{m}$  の生体深部を高解像度で観察できる利点がある。また、求心性神経の計測については、求心性神経の Ca 活動が光るラット(例. Nav-Cre::GCaMP6fflox)を開発し、2光子顕微イメージングによって、皮膚組織内部の求心性神経(感覚神経)終末Ca活動を解析した。このように、本技術は、臓器内部における末梢神経動態を生きた動物においてリアルタイムに計測することが可能であり、神経による生体情報の感知や、効果器臓器・細胞の調節について理解を深める一助になると、期待される。

また、一方、末梢神経は正常組織だけでなく、がん組織にも分布することを発見した。そこで、このがん組織に分布する末梢神経の機能を調べるために、末梢神経の操作する局所神経エンジニアリングを開発した。例えば、神経活動を刺激したり、抑制したり、除去したりするための遺伝子を局所神経に選択的に発現させることによって、末梢神経の操作(刺激・抑制・除去)が可能となった。実際に、がん組織等に分布する末梢神経を操作したところ、がん進展に大きく影響することが分かった(1)。この局所神経エンジニアリング技術は、末梢神経の未知の機能を調べる一助になると、期待される。

1. Kamiya A et al. Genetic manipulation of autonomic nerve fiber innervation and activity and its effect on breast cancer progression. *Nat Neurosci.* 22(8):1289-1305 (2019).

MEMO

## 5. 腎臓病の病態解明に向けた分子遺伝学的解析

### —GONAD 法によるモデル動物作製から解析まで—

古家野 孝行

重井医学研究所 分子遺伝部門

慢性腎不全になると、人工透析や腎移植が必須になる。新たな治療薬の開発が期待されるが、開発の基盤となる細胞・分子レベルでの病態の理解は進んでいない。我々は、ラットを用いた2つの特異な技術アプローチから、腎臓病の分子病態の解明に取り組んでいる。一つは、モノクローナル抗体作製である。腸骨リンパ節を利用することで、脾臓を使うよりもはるかに効率的かつ迅速にモノクローナル抗体を作製できることを見出し、その方法を確立している。二つ目は、ゲノム編集ラット作製である。クラシカルなゲノム編集動物作製過程においては、*ex vivo* での受精卵の取り扱いやマニピュレーターによるマイクロインジェクションなど非常に高度かつ専門的な技術が必要とされ、ラットにおいては特に難しい。我々は、受精卵を体内から取り出すことなく、簡便にゲノム編集可能な方法、GONAD (Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery) をマウス (i-GONAD; *Genome Biol.*, 2018) およびラット (rGONAD; *BMC Biotechnol.*, 2018) において確立した。

本発表では、この二つの技術を利用した我々の最近の研究について紹介したい。



MEMO

## 6. 高血圧性疾患の病態解明への新たなアプローチ：遺伝子改変 SHRSP の作成

大原 浩貴、並河 徹

島根大学 医学部 病理学講座病態病理学

高血圧は国内患者数が4千万人を超えるとされる、まさに国民病と言うべき疾患である。高血圧は心筋梗塞や脳梗塞といった心血管疾患の主要な危険因子であり、高血圧患者数の増加に伴うように心血管疾患による死者は増加傾向にある。高血圧（およびその合併症）の分子病態を理解し、より優れた予防・治療法開発を目指すうえで、ヒト高血圧病態を模倣した疾患モデルは大変有益である。

高血圧自然発症ラット (Spontaneously hypertensive rat; SHR) は、京都大学の Wistar 系コロニーより分離されたヒト本態性高血圧モデルである。我々の教室では、SHR およびその脳卒中易発症亜系である Stroke-prone SHR (SHRSP) における高血圧・脳卒中の病態解明と遺伝的素因の同定を試みてきた。SHR や SHRSP の本態性高血圧発症の遺伝的機序については、古くより交感神経系の過活動の関与が指摘されているため、我々もこの phenotype の系統差に着眼し、高血圧関連遺伝子の同定を目指してきた。

我々は、SHRSP と Wistar-Kyoto (WKY) ラット（正常血圧の対照系統）の間で複数のコンジェニック系統を作成し、第1染色体の血圧に関連する量的形質遺伝子座 (QTL) に、ストレス負荷に対する過剰な交感神経反応と昇圧を引き起こす遺伝子が存在することを明らかにした<sup>1)</sup>。その有力な候補遺伝子として、SHRSP においてナンセンス変異 (p.Arg640X) が存在する Stromal interaction molecule 1 (*Stim1*) を見出した<sup>2)</sup>。

小胞体膜に存在する STIM1 は、小胞体内腔の  $Ca^{2+}$  貯蔵量の減少を感知して細胞質への  $Ca^{2+}$  流入を促進する機能を持ち [ストア作動性  $Ca^{2+}$  流入 (Store-operated  $Ca^{2+}$  entry; SOCE)]、特に非興奮性細胞の  $Ca^{2+}$  シグナル調節に重要な役割を担うとされる。以前に、この *Stim1* 遺伝子変異が SHRSP において SOCE 活性の低下をもたらすことをアストロサイトの初代培養系で明らかにしたこと<sup>3)</sup>、本研究では CRISPR/Cas9 による遺伝子ノックインにより「STIM1 機能を回復させた」SHRSP/Izm 系統 (SHRSP-*Stim1*<sup>emIzm</sup>) を作成し、*Stim1* が SHRSP における「真の」高血圧遺伝子の一つであるかを検証することを目的とした。予想に反して、SHRSP-*Stim1*<sup>emIzm</sup> において冷温ストレスや拘束ストレスに対する交感神経活性（尿中ノルアドレナリン排泄量）および昇圧反応の抑制などは確認されなかった。そのため、*Stim1* 遺伝子変異の SHRSP の高血圧病態形成への寄与については、現時点ではまだ不明である。

### 参考文献

- 1) Xiao B et al. *J. Hypertens.* 2011;29:257-265.
- 2) Ferdaus MZ et al. *PLoS One* 2014;9:e95091.
- 3) Ohara H, Nabika T. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;476:406-411.

MEMO

## 7. ノードラットを *in vivo* bioreactor とした新規肝再生療法の確立

八木真太郎、政野裕紀、小林英司、上本伸二

京都大学 医学部 肝胆膵移植外科

【背景】生体肝移植は肝臓の再生能を応用した医療であるが、患者の体格に比して小さすぎる肝グラフト（過小グラフト）を移植した場合には再生不良を起し、グラフト機能不全に陥る。本研究では肝グラフトを体外で大きくして安全に移植するために「異種動物を *in vivo* bioreactor として小さな肝グラフトを再生させ、より大きな肝グラフトを作成する」という新しい発想に基づき異所性異種部分肝移植の完全に新しい方法を確立し、syrian hamster から摘出した小さい部分肝グラフトが *in vivo* Bioreactor である nude rat 体内で再生しうるかどうかを検討した。

【方法】ドナーは syrian hamster（雄 8-10 週齢、体重 100-140g）、レシピエントは nude rat（雄、9-11 週齢、体重 180-230g）を用いた。nude rat はミコフェノール酸モフェチル（MMF）を移植 7 日前から術当日まで 25mg/kg/day 経口投与、タクロリムス（FK506）を術前日に 1mg/kg、術当日に 0.2 mg/kg を筋肉内投与した。ドナー手術では、hamster から肝授動、胆嚢摘出、各脈管の処理後に、腹部大動脈から臓器保存液の HTK 液 20ml にて灌流し、全肝摘出（グラフト重量約 5g）を行う。バックテーブルにて肝切除を行い、60%部分肝グラフトを作成した。レシピエント手術は、門脈血はすべてグラフト肝に灌流させ、自己肝への流入血は動脈のみとした。自己肝はすべて温存し、肝グラフトの肝下部大静脈をレシピエントの肝下部大静脈に端側吻合、門脈はレシピエントの門脈を肝門部で離断し、グラフト門脈に端端吻合、動脈はグラフト大動脈とレシピエントの腹腔内大動脈を端側吻合、胆管は嵌立法による胆管十二指腸吻合とした。術後 1 日目、3 日目、7 日目で犠牲死を行い、血液、臓器のサンプリングを行い、移植された部分肝グラフトの拒絶反応、再生、viability について検討した。

【結果】ハムスター部分肝グラフトを異所性移植したノードラットは犠牲死を行った術後 1 日目、3 日目、7 日目まで生存した。HE 染色では超急性拒絶反応を認めず、術後 1 日目は正常、術後 3 日目は軽度の浮腫、軽度の胆管浮腫および静脈内皮炎、術後 7 日目は中等度の急性細胞性拒絶反応が認められた。術後 3 日目 7 日目の肝再生率はそれぞれ  $1.54 \pm 0.23$  と  $2.54 \pm 0.43$  であった。Ki-67 陽性細胞は術後 3 日目に  $27.5\% \pm 4.1\%$  と最も高値を示した。血清 HGF および VEGF は術後 1 日目および 3 日目で上昇した。術後 7 日目には肝グラフトの ATP レベルは回復した。

【結論】これらの結果により、部分的な肝グラフトが異種動物において、適切な免疫抑制療法により、拒絶反応を抑制し、viability を維持しながら再生することを示した。

MEMO

## 8. 脳内出血後の麻痺側集中使用による運動機能回復メカニズム<sup>[1][2]</sup>

### ～ラットへウイルスベクターを用いた神経遮断～

飛田 秀樹

名古屋市立大学 医学研究科・脳神経生理学

脳血管障害後の集中的なリハビリテーションは、ヒトがもつ内在的な回復能を高め、神経回路の再構成に大きな影響を及ぼし、運動機能の再建を導く有効な方法として知られている。

我々は、皮質脊髄路のボトルネック部位である内包に局限した小出血を生じさせ永続的な運動麻痺を示す内包出血モデルラットを用い、脳内出血後の集中的なリハビリテーションが中枢神経系の神経回路の再編に及ぼす影響の検討を行った。

その結果、内包出血1日後の早期から7日間麻痺肢を集中使用させる（リハビリテーション）ことにより、障害された上肢運動機能が改善し、出血側運動野において前肢体部位表現マップが拡大していること、また同領域から赤核への投射が増加していること等を明らかにした。さらにウイルス二重感染法（伊佐研との共同研究）により皮質-赤核投射路を選択的に神経遮断することによって、同経路がリハビリテーション後の運動機能改善と因果関係を有することを明らかにした（Ishida et al., J. Neurosci., 2016）。

次に、予め皮質赤核路および皮質網様体路に対しそれぞれウイルスベクターを感染させ両経路を選択的に神経遮断できる系を確立し、皮質-脳幹回路（皮質赤核路および皮質網様体路）の変化および機能回復との因果性を検証した。

その結果、リハビリテーション開始時から皮質赤核路を遮断した場合には、皮質赤核路に変化が見られず、代わりに皮質網様体路の軸索分枝の増加が認められることが明らかになった。さらにこのとき皮質網様体路の選択的神経遮断によって、運動機能の改善が消失することも明らかになった。また、リハビリテーション終了したあと皮質赤核路を選択遮断した場合にも、速やかに皮質網様体路の機能的代償が生じることが示された。

以上のように、ウイルス二重感染による選択的神経遮断による結果から、脳内出血による皮質脊髄路障害後のリハビリテーションによって皮質赤核路がまず第一に代償すること、皮質赤核路が遮断された場合には皮質網様体路へのダイナミックなスイッチングが生じることが示された。またこの現象がリハビリテーションによる運動機能の回復と密に関わることが示唆された（Ishida et al., J. Neurosci., 2019）。

MEMO