



ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」

第 10 回ラットリソースリサーチ研究会

講演抄録集

平成 29 年 2 月 3 日（金） 13:00 – 17:30

京都大学医学部 芝蘭会館 稲盛ホール



第10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： 並河 徹（島根大学 医学部病態病理学講座）

庫本 高志（京都大学大学院 医学研究科附属動物実験施設）

ラットリソース

1. 第3期ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」
成果報告
金子 武人
（京都大学大学院 医学研究科附属動物実験施設）
13:00-13:30
2. ラットの系統保存 -初期胚のガラス化保存と関連技術-
江藤 智生
（公益財団法人実験動物中央研究所 実験動物研究部 生殖工学研究室）
13:30-14:00
3. 脳活動計測に適したラットの行動学習システム
磯村 宜和
（玉川大学 脳科学研究所）
14:00-14:30
4. 染色体工学技術によるヒト化モデル動物の作製
香月 康宏
（鳥取大学 大学院医学系研究科/染色体工学研究センター）
14:30-15:00

休憩 15:00-15:30

第2部

座長：筆宝 義隆(千葉県がんセンター 発がん研究グループ 発がん制御研究部)
真下 知士(大阪大学大学院 医学系研究科附属動物実験施設)

ラットリサーチ

5. てんかんモデルラット *NER* の原因遺伝子探索研究 15:30-16:00
芹川 忠夫
(京都疾患モデル研究所、大阪薬科大学)
6. 毒性学における *Nrf2* 欠失ラットの貢献 16:00-16:30
田口 恵子
(東北大学大学院 医学系研究科 医化学分野)
7. *Kiss1* ノックアウトラットを用いた生殖中枢メカニズムの解明 16:30-17:00
上野山 賀久
(名古屋大学大学院 生命農学研究科 生殖科学研究分野)
8. 腱特異的転写因子 *Mkx* のノックアウトラット作成による 17:00-17:30
腱組織の発生・恒常性維持機構の解析
浅原 弘嗣
(東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 システム発生・再生医学分野)

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

抄 録

1. 第3期ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」成果報告

金子 武人

京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設

文部科学省は、2002年からライフサイエンスの総合的な推進を図る観点から、実験動植物や各種生物の遺伝子材料などのバイオリソースのうち、国が戦略的に整備することが重要なものについて、体系的な「収集・保存・提供」などを行うための体制を整備することを目的としてナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）を開始した。ラット（NBRP-Rat）は、2002年のプロジェクト発足と同時に開始され、本年度で第3期を終了する。2012年からの第3期は、京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設が代表機関、理研BRCが分担機関となり、ラットリソースの「収集・保存・提供」事業を実施し、世界最大規模のラットリソースセンターとして確立した。現在NBRP-Ratでは、820系統のラットリソースを保存している。

第3期では、寄託されたラット系統を生体での維持から胚・精子として保存することを積極的に行い、提供依頼については保存胚・精子から個体を作製することで対応した。提供依頼の多い系統については、SPF環境下で生体として維持することで迅速な提供を可能にした。また、定期的な病原微生物および遺伝子検査を行うことで提供個体の品質の向上に努めた。

第3期中には、ゲノム編集技術が急速に発展しラットにも応用されたことで、多くの遺伝子改変ラットが作製された。NBRP-Ratにおいても遺伝子改変動物等の作製支援を行ったことから、遺伝子改変ラットの寄託が増加した。このことから、ゲノム編集動物の取扱いに関する情報整備にも注力した。また、ラットを用いた研究の提案・支援、研究成果および技術開発に関する情報などをホームページやラットリソースリサーチ研究会の開催により積極的に発信し、ラットを用いた研究推進・支援を行うことでラットコミュニティに貢献した。

ここでは、第3期のNBRP-Ratの成果報告を行うとともに、第4期のNBRP-Ratのあり方について議論したい。

MEMO

2. ラットの系統保存 –初期胚のガラス化保存と関連技術–

江藤 智生

公益財団法人実験動物中央研究所 実験動物研究部 生殖工学研究室

実験動物ラットには多数の近交系、コンジェニック及びクローズドコロニー等の系統があり、更にこれらの遺伝的背景に遺伝子改変やゲノム編集を行った無数の系統が存在する。これらの系統を再現性のある動物実験に継続して使用するには、長期間形質を保持する必要がある為、交配・経代による「系統維持」が行われてきた。しかし個体での維持は遺伝的変異や微子物汚染および天災での系統断絶が懸念され、飼育には継続的な労力や費用が生じる。そのため現在では、生殖細胞である配偶子や胚の保存が主流となった。精子(配偶子)の保存は、遺伝子の保存に限定されるが、オス1匹から数多くの精子が採取できる利点があり、遺伝子改変やゲノム編集を行った系統に多用されている。一方、胚の保存は遺伝子をはじめ細胞内の物質を丸ごと保存できる為、系統そのものの保存、つまり「**系統保存**」に使用される。その為、主に近交系・コンジェニック・クローズドコロニー等の保存が対象となる。

それでは、主題であるラットの系統保存の要点を幾つか上げる。広義には遺伝子型・表現型・演出型を視野に入れる必要があるが、今回は胚を用いた生殖工学に焦点を絞る。

まず技術面を紹介する。系統保存に使用する技術は、大きく胚の採取・保存・個体復元に分けられる。採取法は、現状では得られる胚数に限りがあるため、効率の良い過剰排卵や体外受精の研究が継続されている。保存法には、胚を長期間保存して死滅せずに形質が変化しない事、また保存後の胚の生存・胎子発生が高率である事が必要となる。これらを鑑み、我々はラット初期胚に適したガラス化保存法の開発に着手した。まず、耐凍剤の細胞内への透過、細胞透過性耐凍剤の細胞毒性、溶液のガラス化を検証した。次に、超低温保存に適した保存液の選抜や胚の処理の設定を検証し、P10(前処置液)とPEPES(ガラス化液)を用いたガラス化保存法を確立した。本法は2細胞期胚を対象として開発したが、他の発生ステージにも有用なことも検証された。個体復元に用いる胚移植は、胚の発生ステージにより移植部位が異なる。また、胎子発生を前提とした胚移植の条件は系統により異なる場合がある。

次に、生殖工学面からの系統保存の定義を考える。大前提は、復元個体を用いて系統維持ができる事である。例えば近交系では、採卵メス1匹から得られる胚数から最低2匹の産子(メス1オス1匹)が必要となる。つまり「採卵メス1匹あたりの平均胚採取数×保存後の胚の生存率×胎子発生率=2匹以上の出産子」が生殖工学の基本的な課題である。また本前提は、複数系統でクリア出来なければ技術の汎用は困難となる。

系統保存を行う際の生殖工学には、胚の採取・保存・個体復元の成績が高く安定する技術の確立、技術に対する背景データの蓄積、系統保存の定義が必要となる。今回はこれらを織りまぜて紹介をおこないたい。

MEMO

3. 脳活動計測に適したラットの行動学習システム

礒村 宜和

玉川大学 脳科学研究所

過去数十年間、霊長類動物の電気生理学的研究の主流は、被験動物の頭部を固定し、心理学的な行動課題を遂行させながら、脳内に挿入した電極を介して単一ユニット活動を記録する手法であった。一方、げっ歯類では、一昔前までは頭部を固定して行動課題を学習させることは極めて困難であると信じられていて、自由行動下での行動課題を採用した電気生理学的研究がほとんどであった。しかしながら、頭部固定下でのげっ歯類の行動実験は、電気生理学的手法のみならず、高い空間精度と安定性が要求される二光子レーザー走査型顕微鏡や MRI・PET などの大型計測機器を使用する最先端の研究手法にも望ましいと考えられていた。

近年、私たちの研究グループは、頭部を脳定位固定装置に固定したラットに前肢を使ったレバー操作の課題をオペラント学習させる行動学習システム **TaskForcer** を開発した（協力：小原医科産業・成茂科学器械）。頭部固定部や胴部保定部はラットが過度の負担なく行動しやすい形状に工夫し、レバー操作部には報酬供与部と一体化させたスパウトレバーを考案した。行動課題を平易に設計できる操作性の良い課題制御プログラムも導入した。この行動学習システムを活用することにより、ラットに単純なレバー操作を数日程度で学習（シェイピング）させた後に、Go/No-go 弁別課題、Stop-Signal 課題、視覚・聴覚反応課題、報酬確率に基づく選択課題、左右前肢運動課題など、研究目的に応じた行動課題を数週間ほどで学習させることを実現している。

このような行動課題に関連する大脳皮質や基底核の神経細胞の活動を、マルチニューロン記録法、傍細胞記録法、ホールセル記録法などの電気生理学的手法により記録し解析を進めてきた（Isomura et al. *Nat. Neurosci.* 2009; Kimura et al. *J. Neurophysiol.* 2012; Isomura et al. *J. Neurosci.* 2013; Igarashi et al. *J. Neurosci.* 2013; Saiki et al. *PLoS ONE*. 2014; Kimura et al. *J. Physiol.* 2016）。共同研究として二光子レーザー走査型顕微鏡でのマウスの脳内活動の観測にも成功している（例 Masamizu et al. *Nat. Neurosci.* 2014）。現在は、チャンネルロドプシン2を脳内に多量発現するトランスジェニックラットを行動実験系に導入して、光遺伝学的にマルチニューロン記録細胞の投射先を決定する新技術 Multi-Linc 法の開発と改良に取り組んでいる（Saiki et al. in revision）。

MEMO

4. 染色体工学技術によるヒト化モデル動物の作製

香月 康宏

鳥取大学 大学院医学系研究科/染色体工学研究センター

トランスジェニック技術は遺伝子を破壊または導入し、その表現型を解析することにより、導入した遺伝子がどのような機能を持つかを知る上で非常に重要な技術となっている。しかし、クローン化DNA断片を使用するこれまでのトランスジェニック技術では、導入可能なDNAは通常数百kbが限界であり、1Mbを超える大きさを持つ遺伝子や遺伝子クラスターの導入は不可能であった。これらの問題を解決するために、巨大なヒト遺伝子、複数のヒト遺伝子を比較的安定な形で導入可能であるヒト人工染色体 (human artificial chromosome : HAC) およびマウス人工染色体 (mouse artificial chromosome : MAC) の開発を染色体工学技術を用いて行ってきた。これまでに、ヒト化薬物代謝モデル動物作製や染色体異常症候群モデル作製を目的として、ヒト遺伝子クラスター領域を上記 HAC/MAC ベクター上に搭載し、マウスあるいはラットに導入することで、ヒト遺伝子群を発現するマウスあるいはラットの作製に成功した。一方、完全なヒト化モデルマウスやラットを作製するためには上述のヒト遺伝子に対応する内在遺伝子を破壊する必要がある。これまではマウス ES 細胞において相同組換えや Cre-loxP システム等を用いてクラスターごと破壊することで、完全なヒト化マウスの作製を行ってきたが、最近ではゲノム編集技術を利用することで容易にマウスやラットの内在遺伝子を破壊することが可能となった。本講演では、染色体工学技術によるヒト化モデル動物作製技術を紹介し、ゲノム編集技術との融合によるヒト化モデルラット・疾患モデルラットの作製の現状について、紹介する。

MEMO

5. てんかんモデルラット NER の原因遺伝子探索研究

芹川 忠夫

京都疾患モデル研究所、大阪薬科大学

てんかんの発症要因と発症機構の解明、新規の予防・治療法の開発改善に貢献することを目的に、てんかんモデルラットの開発解析研究を進めてきた (Serikawa et al. *Exp Anim* 2015)。本講演では、Noda Epileptic Rat (NER) の遺伝解析結果に関する最新の知見を紹介する。

NER は、市販の Crj:Wistar ラットから自発性の強直間代発作 (Generalized tonic-clonic seizures, GTCS) を指標にした選抜育種によって樹立したてんかんモデルラットである (Noda et al. *Epilepsia* 1998)。放り上げ刺激によって誘発される GTCS の遺伝解析の結果においては、第 1 染色体上の *Ner1* と第 3 染色体上の *Ner2* がマッピングされた (Maihara et al. *Epilepsia* 2000)。この度、自発性の GTCS の遺伝解析において、第 1 染色体上の *Ner1* と第 5 染色体上の *Ner3* をマッピングした。NER をレシピエント系統、GTCS 非発症系の F344 をドナー系統としたシングルコンジェニック系統において、*Ner1* の置換では発症率の低下、*Ner3* では発症時期の遅延傾向を認めた。そして、*Ner1* と *Ner3* を共に置換したダブルコンジェニック系統において、20 週齢までの観察期間に明瞭な発症抑制を認めた。さらに、置換領域を狭めたダブルコンジェニック系統の行動観察とゲノム解析から原因遺伝子座領域を狭めた。次いで、大脳皮質、海馬、および扁桃体における遺伝子発現をダブルコンジェニック系統と NER 間で比較解析した。*Ner1* においては、てんかんと関与が報告されている複数の遺伝子、*Ner3* においてはてんかんと関与が知られていない 1 つの遺伝子に有意な発現変異があった。NER では、海馬の Ca^{2+} イオンチャネルの異常と扁桃体アストログリアの Kir4.1 チャネルの発現低下が報告されている。これらの異常と *Ner1*, *Ner3* 遺伝子の関与について議論したい。

MEMO

6. 毒性学における *Nrf2* 欠失ラットの貢献

田口 恵子、山本 雅之

東北大学大学院 医学系研究科 医化学分野

Nrf2 は酸化ストレスや毒物に応答して活性化する転写因子である。*Nrf2* の活性はユビキチン E3 リガーゼのアダプター分子である *Keap1* を介したタンパク質分解によって制御されている。*Keap1-Nrf2* システムによる生体防御機構は、これまで主に遺伝子改変マウスを用いて解析されてきた。しかし、マウスでは再現できないヒト病態モデルや、小型のマウスでは手技が難しい実験モデルもあり、実験の展開が滞っていた。そこで、我々はゲノム編集技術を利用して、新たに *Nrf2* 欠失ラットの作出に挑んだ。ジンクフィンガーヌクレアーゼ法により、*Nrf2* 遺伝子エキソン 5 に 7 塩基欠失 ($\Delta 7$) 型と 1 塩基挿入 (+1) 型の変異体を得た。*Nrf2* は恒常的に即座にプロテアソームで分解されるため、通常状態では *Nrf2* のタンパク質発現は検出できない。そこで、変異型における *Nrf2* の欠失を確認するため、*Nrf2* 活性化剤 (CDDO-Im) を投与した野生型と変異型ラットの肝臓における *Nrf2* の活性化を、*Nrf2* の核蓄積と *Nrf2* の代表的な標的遺伝子の発現で評価した。野生型ラットでは CDDO-Im により *Nrf2* が活性化したが、予想通り、変異型ラットは CDDO-Im により *Nrf2* は活性化しなかった。以上より、2 つの変異型 ($\Delta 7$ および +1) はいずれも *Nrf2* 欠失ラットであることを同定した。続いて、肝発がんモデルであるアフラトキシン B₁ (AFB₁) の解毒代謝における *Nrf2* の関与を調べた。AFB₁ は、食品に付着したカビが産生する毒物で、DNA に結合して変異を生じるため、長期に曝露されるとヒトで肝発がんを発症する。しかし、マウスは AFB₁ の解毒に関わる酵素の発現が恒常的に高いために、マウスではヒトの肝発がんは再現できないので、これまで AFB₁ の動物実験にはラットが利用されてきた。*Nrf2* 欠失 ($\Delta 7$) ラットでは野生型に比べて AFB₁ の解毒代謝に関わる酵素群が遺伝子およびタンパク質レベルで減少していた。AFB₁ 毒性の指標となる DNA 結合体は、AFB₁ を単回投与した *Nrf2* 欠失ラットにおいて肝臓および尿中で増加した。また、野生型および *Nrf2* 欠失ラットに野生型では死亡しない濃度の AFB₁ を投与すると、*Nrf2* 欠失ラットは 63% 死亡した。以上より、*Nrf2* 欠失ラットを用いることによって、AFB₁ の解毒代謝に対する *Nrf2* の重要性を初めて示すことができた。毒性学の実験ではラットが多く使用されてきた歴史的背景がある。マウスでは再現できないモデルを *Nrf2* 欠失ラットに適用することで新たな発見が期待される。

MEMO

7. *Kiss1* ノックアウトラットを用いた生殖中枢メカニズムの解明

上野山 賀久

名古屋大学大学院 生命農学研究科 生殖科学研究分野

Kiss1 遺伝子にコードされるキスペプチンは G タンパク質共役受容体のひとつである GPR54 の内因性リガンドとして 2001 年に発見された神経ペプチドである。2003 年に、性成熟を示さない中枢性の性腺機能低下症の患者において、*GPR54* 遺伝子に機能喪失型の変異があることが明らかとなり、キスペプチンの生殖機能における重要性に注目が集まった。ヒトにおける *GPR54* の変異を発見した研究グループが *Gpr54* ノックアウト (KO) マウスを作製し、*Gpr54* KO マウスが不妊であること、*Gpr54* が性腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) ニューロンに発現することを明らかにした。*Gpr54* KO マウスにおけるこれらの結果は、キスペプチンが視床下部からの GnRH 分泌を直接支配し、生殖制御の中枢機構において重要な役割を果たしていることを強く示唆するものであった。

ほ乳類の雌において、GnRH はパルス状を呈する持続的な分泌と、一過性の大量放出 (サージ状分泌) というふたつの分泌様式を示す。パルス状の持続的な GnRH 分泌が下垂体からの性腺刺激ホルモンの持続的な分泌を介して卵巣機能を刺激して卵胞を发育させるのに対し、サージ状の GnRH 分泌は下垂体からの性腺刺激ホルモンのサージ状分泌を介して排卵を誘起する。我々は、このようなふたつの GnRH 分泌様式におけるキスペプチンの役割を明らかにするために *Kiss1* KO ラットを作製した。性腺刺激ホルモン分泌動態の解析に欠かせない頻回採血が可能であるというラットの特徴を活かして、*Kiss1* KO ラットにおいて性腺刺激ホルモンのパルス状およびサージ状分泌を解析し、キスペプチンの欠損により性腺刺激ホルモン分泌不全となることを示し、GnRH とそれに続く性腺刺激ホルモンの分泌にキスペプチンが必要不可欠であることを証明した。

本講演では、上記の *Kiss1* KO ラットを用いた研究などから明らかとなりつつあるほ乳類の生殖制御中枢メカニズムについて解説する。

MEMO

8. 腱特異的転写因子 Mkkx のノックアウトラット作成による腱組織の発生・恒常性維持機構の解析

浅原 弘嗣

東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 システム発生・再生医学分野

腱・靭帯は身体各組織を繋ぐロープのようなもので、この組織が全身の動きを支え、力を伝えることで、“動く”ことが可能になる。その発生・再生のメカニズムはまだ不明の点が多く、腱・靭帯の損傷や疾病の完全かつ早期の治癒は未だ困難である。私たちは腱・靭帯の再生の要となる遺伝子 Mohawk (Mkkx) を同定し(1)、腱におけるマスター転写因子としての重要な機能を明らかにしてきた(2-7)。しかし、より詳細な生理学的、分子生物学的、組織学的および医学的な研究においては、マウスより大型のラットでの遺伝子改変動物の作製と解析が必要となっていた。

今回、遺伝子編集技術である CRISPR/Cas9 システムを導入することで、ラットの遺伝子を改変することに成功し、マウスでは困難であった研究を進めることができた(8)。

Mkkx が欠損すると全身の腱が脆弱になっていることがわかった。さらに、ノックアウトラットをさらに詳細に解析すると、出生後まもなくアキレス腱が骨化することが明らかになった(8)。このメカニズムとして、腱細胞に対する機械的な伸展刺激（メカノ刺激）が、Mkkx という遺伝子スイッチを押すことで、腱・靭帯を守り、骨化を妨げることが示唆された(8)。さらに、このノックアウトラットから得られた十分量の腱細胞を用い、クロマチン免疫沈降と次世代シーケンサーを組み合わせた研究手法によって、腱を再生し維持する遺伝子のプログラムを詳細に明らかにした(8)。

今回、ノックアウトラット（遺伝子を改変したラット）を作成することで、ノックアウトマウスでは十分解析できなかった、生理学的な検査や組織的な解析、さらには最先端の分子生物学的な手法を用いた研究が可能となった。また、本研究は力学的刺激（メカノ刺激）が生体の中でどのように伝わるかという医学・生物学の大きなテーマにも新しい理解を与えた。この発見を応用することで、腱・靭帯にかかわる傷害や疾病の診断や治療が大幅に進むと考えられる。

文献

1. Ito Y, *et al.* (2010) *Proc Natl Acad Sci USA*.
2. Nakahara H, *et al.* (2013) *Arthritis Rheum*.
3. Onizuka n, *et al.* (2014) *J Orhop Sci*.
4. Otabe K, *et al.* (2015) *J Orthop Res*.
5. Koda N, *et al.* (2016) *Development*.
6. Nakakichi R, *et al.* (2016) *Nat Commun*.
7. Kayama T, *et al.* (2016) *Mol Cell Biol*.
8. Suzuki H, *et al.* (2016) *Proc Natl Acad Sci USA*.

MEMO

