



ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」

第 11 回ラットリソースリサーチ研究会

講演抄録集

平成 30 年 1 月 22 日 (月) 13:00 – 17:30

京都大学医学部 芝蘭会館 稲盛ホール



第11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： 横井 伯英（神戸大学）
真下 知士（大阪大学）

ラットリソース

1. 第4期ナショナルバイオリソースプロジェクト 13:00-13:30
「ラット」の展開
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. 免疫不全ラットで同定されたラットポリオーマウイルス2 13:30-14:00
田中 美有
(京都大学大学院 医学研究科 附属動物実験施設)
3. ラット生殖工学技術の「いま」と「これから」 14:00-14:30
本多 新
(京都大学大学院 医学研究科 附属動物実験施設)
4. *ex vivo* 胚操作が不要なゲノム編集動物作製法 14:30-15:00
「GONAD」の開発とラットへの応用を目指して
大塚 正人
(東海大学 医学部 基礎医学系)

休憩 15:00-15:30

第2部

座長： 浅野 雅秀（京都大学）

庫本 高志（京都大学）

ラットリサーチ

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 5. アウトブレッドラットの集団に由来する
先天異常誘発突然変異の遺伝学的解析
佐藤 旭
(一般財団法人残留農薬研究所 毒性部) | 15:30-16:00 |
| 6. ペプチドの神経を介する摂食とエネルギー代謝の調節機構
迫田 秀之
(宮崎大学医学部 内科学講座 神経呼吸内分泌代謝学分野) | 16:00-16:30 |
| 7. 異種動物体内における膵臓作製と糖尿病治療
山口 智之
(東京大学医科学研究所 幹細胞治療部門) | 16:30-17:00 |
| 8. 光遺伝学・化学遺伝学を用いたラット脳内痛み
ネットワークの解析
加藤 総夫
(東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 神経科学研究部) | 17:00-17:30 |

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 百周年時計台記念館 国際交流ホール

〒606-8501 京都市左京区吉田本町 京都大学 百周年時計台記念館内 2F

懇親会費：6000円（当日受付でお支払下さい）



※地図中の本部構内③が百周年時計台記念館

抄 録

1. 第4期ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」の展開

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(現在は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。これまでに856系統を保存し、1235件を国内外に提供してきて、世界最大規模のラットリソースセンターとして確立しました。ラット研究コミュニティの皆様のご支援により、今年度からは課題管理者を庫本から浅野に交代し、分担機関に大阪大学を加え、新たに第4期をスタートすることができました。

第4期では以下の3点を重点的に展開していく予定としています。①世界最大規模のラットリソースを多くの研究者にさらに利用していただけるよう、広報活動を活発に行い、提供数の拡大を図っていく所存です。具体的にはこれまで参加したことのない関連学会でのポスター発表や展示ブースでの宣伝、およびメーリングリストを利用した新着情報の発信です。本日の研究会もラットコミュニティの研究交流の場であると共に、新しい利用者の開拓の場としても位置づけており、今後も続けていく予定です。②ラットではマウスと比較すると生殖工学技術が遅れており、実用的な精子の凍結保存や体外受精(IVF)の技術開発が必要です。顕微受精による個体復元は手間と時間がかかるので、少なくともF344などの標準系統では実用的な精子の凍結保存とIVFの技術開発を目指します(本多の発表参照)。③ゲノム編集技術で開発したX-SCIDなどの重度免疫不全ラットの安定した供給体制を整備する必要があります。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、再生医療研究での需要が見込まれますが、日和見感染を起こしやすく(田中の発表参照)、安定した提供ができていないのが現状です。繁殖・飼育方法の改善と微生物モニタリング項目の検討を行います。

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けるよう努力してまいりますので、ご支援のほどよろしく申し上げます。

MEMO

2. 免疫不全ラットで同定されたラットポリオーマウイルス 2

田中 美有

京都大学大学院 医学研究科 附属動物実験施設

ポリオーマウイルス (PyV) は幅広い動物種に感染し、哺乳類の PyV の多くは不顕性感染症を引き起こす。ヒトでは免疫不全患者において、腎炎、脳症、肺炎、腫瘍など様々な PyV 関連疾患が報告されている。ラットでは、ヌードラットに唾液腺炎、気管・気管支・細気管支炎、肺炎を引き起こす PyV 感染症が 1984 年に初めて報告された (Ward et al. 1984)。2016 年には、米国の X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) ラットコロニーにおいて、新規のラットポリオーマウイルス 2 (Rat PyV2) 感染症が報告され (Rigatti et al. 2016)、非常に高い関心を集めた。日本でも、我々の施設を含めた複数の X-SCID ラットコロニーにおいて、本感染症の発症が報告されている。さらに、研究に利用される免疫正常ラット系統コロニー中にも、Rat PyV2 がすでに一定の割合で浸潤しているのではないかと懸念されている。

Rat PyV2 感染症の発症個体は、様々な程度の呼吸器症状や消瘦、全身状態の悪化を呈し、繁殖率も低下していく。そのため、免疫不全ラットを用いた研究のニーズが高まっている中で、X-SCID ラットを用いた研究遂行に大きな支障をきたしている。Rat PyV2 は上皮細胞 (唾液腺、呼吸器、生殖器/副生殖器、乳腺など) への親和性が高く、中でも、唾液腺に対する親和性が特に高いことが示唆されている。病理組織学的には、標的上皮細胞における好塩基性核内封入体の形成が特徴的である。標的臓器からも分かるように、経口・経鼻・接触感染、垂直感染いずれによっても伝播して容易に感染が広がりうると考えられるため、Rat PyV2 の詳細な病態や汚染状況の把握、Rat PyV2 感染症対策の立案は急務である。

我々は、京都大学で維持する X-SCID ラットを中心に、Rat PyV2 感染例の病理学的・遺伝子学的検索を実施してきた。本講演では、Rat PyV2 感染症の症状、病変 (解剖所見・病理組織学的所見)、診断方法、日本と米国における感染状況について、米国の研究グループの報告と我々のこれまでの検索結果から、最新の知見をご紹介します。

MEMO

3. ラット生殖工学技術のいまとこれから

本多 新

京都大学大学院 医学研究科 附属動物実験施設

「マウスとラットではできているのですが～・・・」と、昨年までウサギを用いた研究を行っていた私は言ってきた。マウスやラットではできているのに、他の動物種（ウサギ）では困難であることを強調する枕詞にしてきた。私はラットの生殖工学に携わり半年が経つが、ラットを扱ってこられた皆さま方に「すみません!!!」と深く謝罪したい。

最近までの私を含め、研究者の多くがラットはマウスと同じように様々なことが効率良くできると誤解している。今の私は「少なくとも生殖工学技術開発においては、ラットは10年以上マウスより遅れている」と認識している。たとえば“ラットは体外受精が（ほとんど）できない”と言うと多くの方々が驚くだろう。精子の凍結融解技術も確立はされているものの、非常に貴重な試薬が必要不可欠だったり、融解後の運動性もマウスの精子に比べると圧倒的に低かったりする。顕微授精もラット精子頭部の特徴的な形から、マウスのように効率良く注入するのは難しく、高い技術を必要とする。実際に、昨年の実験動物学会や分子生物学会（ConBio2017）でも、ラット体外受精培地を開発しようとして苦勞している発表や、効率良く顕微授精をするためにはどうすれば良いか検討している発表が見かけられた。ただし、ラットの体外受精も精子凍結融解も「不可能ではない」という表現が的確であろう。非常に困難で非効率的ではあるものの、不可能ではないという段階まで押し上げてきたのは、日本の研究者による貢献が大きいことを忘れてはならない。

本講演では、ラットの配偶子や初期胚を扱って半年になる私を感じた、ラット生殖工学技術の現状（なにができて、なにができないのか）と、その原因と対策について紹介したい。これからラットの生殖工学を始めようとする多くの研究者に、「最近ではラットでもマウスと同じようにできるようになりました。」と紹介できるような技術を開発したい。

MEMO

4. *ex vivo* 胚操作が不要なゲノム編集動物作製法「GONAD」の開発とラットへの応用を目指して

大塚 正人

東海大学 医学部 基礎医学系

近年の CRISPR ゲノム編集技術の発展により、従来と比べて極めて簡便に遺伝子改変動物が作出できるようになった。多くの場合、古くからのトランスジェニック動物作製法である受精卵への顕微注入法を用いてゲノム編集動物が作製されているが、この場合、(1)受精卵の回収、(2)回収した受精卵への CRISPR 関連試薬の顕微注入、(3)顕微注入卵の偽妊娠動物卵管への移植、という、熟練した技術と高価な設備を要する3つのステップを経ることとなる。最近、顕微注入を行わずに、回収した受精卵に電気穿孔処置を施すことでゲノム編集動物が作製できるようになってきているが、それでもなお受精卵の回収と偽妊娠動物への移植のステップは避けられない。

我々は、上述した3つのステップ全てを省くことが可能な新規ゲノム編集動物作製法「GONAD (Genome-editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery)法」の開発を、マウスを用いて進めてきた。GONAD 法では、上記3ステップに代わって、受精卵を有する妊娠メス卵管への CRISPR 関連試薬の注入、続く卵管全体への *in vivo* 電気穿孔を行う。処置後は、妊娠動物そのものが出産するため、胚移植用の偽妊娠動物を準備する必要がない。これまでに、GONAD 法を用いて各種ゲノム編集マウスの作製に成功している。一連の高度で煩雑な工程を全てスキップしてゲノム編集動物を作製できるため、熟練した技術や装置を持たない研究者や学生個人レベルでも、個体レベルでの遺伝子改変を手軽に試みる事が可能な手法となると期待される。

我々はこれまでに、国内外の多数の研究者、技術者に向けた GONAD 法のデモンストレーションも行ってきた。その講習会参加者の何人かは、すでに各研究室においてマウスでの GONAD 法確立に成功しており、さらにラットを含めた他動物種での GONAD 法開発を目指した研究者もいる。今回、我々の共同研究者が確立したラット GONAD 法についても合わせて紹介したい。

MEMO

5. アウトブレッドラットの集団に由来する先天異常誘発突然変異の遺伝学的解析

佐藤 旭

一般財団法人残留農薬研究所 毒性部

我々の研究室では、化学物質のヒトに対する毒性を予測する目的で実施される毒性試験のうち、生殖能力や個体発生に及ぼす影響を調べる生殖・発生毒性試験を実施している。一般に毒性試験には、遺伝的な多様性に富んだヒトの集団のモデルとしてアウトブレッドの実験動物が好んで用いられ、我々の研究室でも主に Wistar 系や SD 系ラットを生殖・発生毒性試験に使用している。この様な動物試験を日常的に実施していると、児動物の表現型を検査する過程でしばしば劣性の遺伝形質であると疑われる先天異常に遭遇する。通常、これらの異常は特定の腹に偏って数例みられるに過ぎず、試験群における発生率も極めて低い。しかし、昨今の規制当局によるリスク評価では、対照群における過去の出現実績や何らかの実験的証拠の提出がない限り、観察された異常と投与物質との関連を完全には否定できないとする見方が強く、毒性評価に関する議論が紛糾する事例が少なくない。そこで、我々は市販のアウトブレッドラットの集団内に潜在する突然変異遺伝子を交配実験によって探索し、1) “表現型を調べて背景データとして活用する”と共に、2) “可能な限り原因遺伝子を同定して遺伝子診断法を確立する”ことを試みている。本講演では、我々のこうした取り組みについて紹介すると共に、これまでに実施した解析のうち先ごろ原因遺伝子の特定に至った遺伝性多指症ラットの話を取り上げ、アウトブレッド集団に由来する突然変異形質の疾患モデルとしての可能性についても述べる。

MEMO

6. ペプチドの神経を介する摂食とエネルギー代謝の調節機構

迫田 秀之

宮崎大学医学部 内科学講座 神経呼吸内分泌代謝学分野

消化管は、経口摂取した栄養素を消化吸収する臓器であるが、空腹満腹の刺激や栄養素などの情報を得てペプチドやホルモンを分泌する内分泌・外分泌臓器でもある。消化管から分泌されたペプチドは、血中に移行して全身の臓器に作用する。その一方で、消化管に張り巡らされた自律神経の神経終末を刺激して、その情報が中枢で統合され、自律神経遠心路により指令が末梢臓器に伝達することでインスリンを含むホルモン分泌や肝臓での糖新生、脂肪の燃焼などが調整されて、生体の恒常性が維持されている。この中枢におけるエネルギー代謝情報の統合制御機構が何らかの原因で破綻を来した時に、肥満、インスリン抵抗性、糖尿病や脂質代謝異常を生じることが考えられる。我々は、消化管や中枢で発現して摂食やエネルギー代謝を調節に関与している新規のペプチドを同定し解析している。ニューロメジン U (NMU) は、子宮筋収縮活性をもつ 25 アミノ酸からなるペプチドとして単離された。末梢に存在する NMU 受容体 1 (NMUR1) と中枢に存在する NMUR2 を同定し、NMU ノックアウトマウスなどの解析から摂食抑制、体重減少、交感神経活性化などの作用を明らかにしてきた。NMU と NMUR1 は膵 β 細胞にも発現し、NMU と NMUR1 アゴニストは *in vivo* (マウス) と *in vitro* (単離膵島と β 細胞由来 MIN6 細胞) のいずれでもグルコース刺激によるインスリン分泌を抑制した。NMU の作用は、siNmu と NMU 中和抗体で消失した。細胞内 Ca^{2+} イメージング解析から、NMU は β 細胞への Ca^{2+} 流入を減少させ、インスリン分泌を抑制することを立証した。空腹時に、NMU の発現は腸管と迷走神経節で増加し、NMUR1 発現は迷走神経節で増加した。NMU のラットへの末梢投与は、迷走神経求心線維の電気活動を亢進し、視床下部室傍核の *c-fos* 発現を増加する。NMU は、空腹時に自律神経求心路を活性化してインスリン分泌を抑制するデクレチン作用を示すペプチドの可能性が示唆された。NMU は、摂食時には β 細胞から分泌され直接にオートクライン作用で、また空腹時には神経を介するデクレチン作用の両者の機序を介して、インスリン分泌を制御し、糖代謝調節に機能していると考えられる。

我々は、NMU 以外にもグレリン、NERP など新規ペプチドが摂食や体液、胃酸分泌などを調節することを解析しており、合わせて発表する。

MEMO

7. 異種動物体内における膵臓作製と糖尿病治療

山口智之

東京大学医科学研究所 幹細胞治療部門

臓器移植における慢性的なドナー不足や移植後の拒絶の問題は非常に深刻である。これらの問題を解決するためには、患者自身の細胞から移植可能な臓器をつくるのが最善の方法である。人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell, iPS 細胞）の開発により、*in vitro* で患者自身の細胞から治療用の組織を再生させることが現実となり、臓器移植における慢性的なドナー不足や移植後の拒絶の問題は解決の方向に向かっている。加齢黄斑変性症治療の為に網膜色素上皮シートや、輸血の為に血液などは、その代表例であり、自分自身の細胞から自分自身の組織を再生するという再生医療の究極の目的が達成されようとしている。しかし、三次元構造をもった臓器を *in vitro* で再現するのはきわめて困難であり、これまでに成体の臓器と完全に同等の機能を持つ機能分化した臓器作製の報告はない。これら *in vitro* 分化誘導法の問題点を克服する為には動物体内での正常な発生、分化過程を経て臓器が再生されることが理想的であると考えられる。そこで我々は多能性幹細胞のもつキメラ形成能を利用した”胚盤胞補完法”（blastocyst complementation）により、異種動物体内に多能性幹細胞由来の臓器を作製し、移植治療に用いるというコンセプトを考案した。これまでにこの手法で膵臓欠損マウスの体内にラット多能性幹細胞由来の膵臓を、また、膵臓欠損ラット体内にマウス多能性幹細胞の膵臓を作製することに成功した。さらに、ラット体内に作製したマウス膵臓から単離した膵島を糖尿病モデルマウスに移植したところ、1年以上免疫抑制剤無しで、正常血糖値を維持することができた。これにより、*in vivo* での臓器再生の有効性と安全性が確認され、我々の目指す再生医療のコンセプトを実証することに成功した。本発表では胚盤胞補完法を利用した臓器再生法について概説するとともに、これまでの我々の取り組みを総括したい。

MEMO

8. 光遺伝学・化学遺伝学を用いたラット脳内痛みネットワークの解析

加藤 総夫

東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 神経科学研究部

「痛み」は生体に生じた組織損傷や炎症を検出し、最適な応答を誘発して生体の生存可能性を高める有害状況警告システムである。生体のサバイバルに必須のこの統合機能は、しかし、本邦でおよそ 2000 万人の慢性痛患者を苦しめ続け、「このつらさをなんとかしてくれ」と病院を受診させる「痛みの苦痛」の直接的原因でもある。

近年の脳機能イメージングなどの進歩によって、ヒト患者およびモデル動物で、1) 脊髄後角や三叉神経脊髄路核から上行した侵害受容入力、視床一皮質系のみならず、扁桃核、帯状回、島皮質、側坐核、あるいは前頭前野などの「広義の情動」に關与する神経核群を活性化すること（これらの総体を「痛みネットワーク」と呼ぶ）、2) これらの神経核が慢性痛の経過に連關した可塑的变化を示すこと、そして、3) これらの神経核の活動が、中脳水道周囲灰白質、青斑核、縫線核などの下行性投射系を介して痛み受容そのものに影響を及ぼしうることなどが明らかにされている。

しかしながらこれらのネットワークが相互にどのように影響を及ぼし、その活性化や抑制が痛み關連行動をどう制御するのか、というネットワーク構成の根幹的情報はまだほとんど得られていない。その主な理由は、(1) これらのネットワーク要素間の連絡に關する解剖学的情報が少なく、また、あっても、単純な経路を構成しない、(2) したがって特定のネットワーク要素、および、要素間結合のみを活性化することが従来の電気刺激・薬物投与法ではほぼ不可能、そして、(3) 歴史的にさまざまな痛み行動評価系あるいは慢性痛モデルがラットで開発されている、である。

これらの問題を解決する手段として、扁桃核中心核などの抑制性ニューロンからなる神経核での特異的分子発現を可能にする GABA 作動性ニューロン特異的 cre リコンビナーゼ発現ラット (W-Tg(Slc321-cre)_{3_5}Fusa; NBRP Rat No.0839) および、痛み關連ニューロンのノルアドレナリン作動性ニューロン特異的 cre リコンビナーゼ発現ラット W-Tg(Dbh-tTA/cre)_{2_7}Fusa; NBRP Rat No. 0856) を作製し、cre リコンビナーゼ依存的に channelrhodopsin2、あるいは、designer receptor exclusively activated by designer drug (DREADD) を発現する AAV ベクターを痛みネットワーク神経核に導入、その活動に人工的に操作して行動とシナプス伝達を評価した。従来の方法では解析不可能であった扁桃核中心核—中脳水道周囲灰白質間抑制性シナプス伝達におよぼす炎症性疼痛の影響、あるいは、扁桃核中心核ニューロンの人工的興奮が広汎性痛覚過敏を誘発する事実などを、電気生理学、行動観察、機能的 MRI など明らかにしている。このようなリソースを世界中の研究者が活用することによって、多様な脳部位への多様なアプローチが推進され、痛みの脳機構の理解が革命的に前進するものと期待される。

MEMO