



ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」

第 14 回ラットリソースリサーチ研究会

講演抄録集

令和 3 年 1 月 29 日（金） 13:00 – 17:30

Web 開催



第14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： 成瀬 智恵 (京都大学)
 椛嶋 克哉 (京都大学)

ラットリソース

1. はじめに：コロナ禍での第4期 NBRP-Rat 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. Growth hormone receptor を欠損させたマイクロミニラットの開発 13:15-13:45
守田 昂太郎 (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開発 13:45-14:15
中潟 直己 (熊本大学 CARD 生殖工学共同研究分野)

休憩 14:15-14:30

第2部

座長： 浅野 雅秀 (京都大学)

守田 昂太郎 (京都大学)

ラットリサーチ

4. 放射線被ばくによる乳がんのリスクと乳腺幹細胞系の放射線応答 14:30-15:00
今岡 達彦
量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所
放射線影響研究部
5. ゲノム編集法により作製した遺伝子改変ラットを用いたビタミン D 15:00-15:30
作用メカニズムの解明
榊 利之
富山県立大学工学部医薬品工学科
6. トランスジェニックラットにより同定された眼球運動系神経積分器 15:30-16:00
ニューロンの特性
齋藤 康彦
奈良県立医科大学・医学部・生理学第一講座
7. ラットを用いた精神疾患モデリングの限界と課題 16:00-16:30
那波 宏之
新潟大学 脳研究所
8. 国産ゲノム編集技術 CRISPR-Cas3 の開発と応用 16:30-17:00
吉見 一人
東京大学医科学研究所 実験動物研究施設
9. 総合討論 17:00-17:30

抄 録

1. はじめに：コロナ禍での第4期 NBRP-Rat 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」を行ってきた。世界最大規模のラットリソースセンターとして、2020年10月末時点で898系統を保存し、1411件を国内外に提供した。2017年度からスタートした第4期も終盤を迎え、これからというときに新型コロナウイルス感染拡大という事態に巻き込まれた。

第4期では、特に以下を重点項目として取り組んでいる。

- ① 広報活動を活発に行い、提供件数の増加を目指す。
 - ② ラットの生殖工学技術を確立して、研修により開発した技術の普及を図る。
 - ③ 分担機関の大阪大学から東京大学への移動をスムーズに行い、X-SCIDなどの重度免疫不全ラットの供給を拡大する。
-
- ① 緊急事態宣言のために寄託・提供業務は一時中断(4/16-5/31)、ケージ交換を2週間に1回に削減して、飼育担当者は隔日の交代勤務となった。この間は最低限の系統維持と液体窒素タンクの補充に専念した。また、上半期は多くの学会が中止となり、下半期はWeb開催となって、学会を通じた広報活動がほとんどできなかった。その代わりにNatureなどの科学雑誌に広告を掲載する。
 - ② NBRP基盤技術整備プログラム(2019-20年度)に採択され、本多らを中心に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にも成功した(Honda *et al.* Scientific Reports, 2019)。これらの技術を普及させるために、昨年度は合計5回の研修を行い、全国の10研究機関から13名の参加があった。しかし、今年度は実施することが困難で、ようやく年明けから再開する予定である。一方、中潟先生らからラット精子凍結方法と融解精子を用いた高効率なIVF法の報告がなされた(Nakagata *et al.* Scientific Reports, 2020)。本日の研究会ではその詳細を発表いただく。
 - ③ 分担機関の大阪大学から東京大学への移動はスムーズに進み、X-SCIDなどの重度免疫不全ラットの提供も順調に進んでいる。本日の研究会では真下先生のグループの吉見先生に新しいCRISPR-Casシステムの発表をいただく。

このようにコロナ禍の影響で業務に大きな影響を受けたが、寄託や提供も徐々に回復してきており、多くの研究者の期待に応えられるよう更に努力をしていく所存である。

MEMO

2. Growth hormone receptor を欠損させたマイクロミニラットの開発

守田昂太郎

京都大学大学院 医学研究科 附属動物実験施設

第4期ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat)では、ラットの「収集」・「保存」・「提供」の事業に加え、3年目からは基盤技術整備プログラムの支援の下で新規利用者の拡大に努めてきた。特に昨年度は、本多新らの研究により、幅広い系統のラットから安定的に過剰排卵を誘起させ、体外受精に成功するだけでなく、非常に高効率なゲノム編集技術を確立したことを報告した (Honda et al., 2019)。さらにその技術を普及させるためにラット生殖工学技術研修を開始した。昨年度は研修を開始してから約6ヵ月の間に5回の研修を実施し、順調に技術還元を始めることができたと言える。現在は新型コロナウイルスの感染拡大により研修は中断しているが、更なる新規利用者の拡大のために、マウスの利用者がマウス用の飼育・実験設備を用いて、ラットの行動解析ができないかと考え、マイクロミニラットの開発を行った。

NBRP-Ratには、通称ミニラットと呼ばれる *Growth hormone 1 (Gh1)* のアンチセンス鎖を発現する Jcl:Wistar 由来のトランスジェニックラット(NBRP-Rat No. 0603 W-Tg(Gh1as)Nibs)がすでに寄託されている。比較的小型で有用なリソースとして期待されるが、利用者拡大のためには、より小さく、簡便に作製して研究に用いることが求められる。そこで、我々は、ゲノム編集技術を用いて *Growth hormone receptor (Ghr)* を欠損させたラットを作製した。まず、ラットの行動実験に汎用される Crlj:WI (WI) 及び Iar:Long-Evans (LE) を用い、Triple-CRISPR で *Ghr* の gRNA を3種類導入した結果、すべての産仔の両アリルにインデル変異または約130~140 kb の大規模欠損が認められた。また、これらすべての F0 世代は10週齢の時点で、野生型の5週齢程度の大きさになることが分かった。さらに、30週齢(約7ヵ月齢)まで飼育すると、脂肪がついて体重が増加するものの、5週齢程度のサイズを維持した。体重測定の結果から、LEの雄に関しては野生型と比較して緩やかに増加し、30週齢以降は約250g でほとんど変わらなかった。*Ghr* ホモ欠損ラットは産仔数が約半数に減少するが、性周期や交尾に問題はなく、ホモ欠損同士でも繁殖させることが十分可能であった。これらのラットは比較的大型な系統から作製したが、より小さなラットの作製のために、現在は小型の F344/Stm 系統を用いて、*Ghr* KO ラットの作製を行い、繁殖を行っている。

さらに本発表では、今回作製したマイクロミニラットを用いることで研究の幅が広がる可能性について紹介する。

MEMO

3. ラット生殖工学技術の開発

中潟直己

熊本大学 CARD 生殖工学共同研究分野

近年、ゲノム編集ツール、CRISPR/Cas9 が登場したことで、マウスのみならず、様々な動物種において遺伝子改変動物が作製されるようになった。特にラットは、生理試験、薬理試験、毒性試験、行動解析などで、広く利用されている実験動物であり、マウスに比べてはるかに大きく、外科的処置を比較的簡単に行え、かつ血液や尿などの試料を多量に繰り返し採取することが可能であるという特長があることから、ヒト疾患モデル、創薬・毒性ヒト代謝、脳機能行動解析および再生医療移植モデル等の遺伝子改変ラットが急速に作製されつつある。それに伴い、受精卵への遺伝子導入法も、顕微鏡下でガラス針を用いて遺伝子を注入するマイクロインジェクション法から、エレクトロポレーション法(電気パルスにより受精卵に微細な穴をあけることで、一度に約 100 個程度の受精卵に DNA や RNA を導入できる方法)に移行しつつあり、遺伝子導入が極めて簡易化された。しかしながら、ラットの生殖工学技術は、マウスに比べて 20~30 年遅れていると言われており、種々の技術の開発は遅々として進んでいないのが現状である。最近、過剰排卵法やそれら卵子を用いた効率的な体外受精法が開発されつつあるが、体外受精により得られた受精卵や胚、また、数的に最も有利な精子(成熟雄の精巣上体尾部から簡単に採取可能であり、その数は 1 億匹以上)の凍結保存法など、未だ確立の域に達しているとは言い難い。そこで、本発表では、特に精子の凍結保存を中心にラットにおける生殖工学技術の現状と将来の展望について述べる。

MEMO

4. 放射線被ばくによる乳がんのリスクと乳腺幹細胞系の放射線応答

今岡達彦、工藤健一、細木彩夏、西村まゆみ、臺野和広、柿沼志津子
量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 放射線影響研究部

放射線被ばくの影響には確率的影響（がん、遺伝性影響）と確定的影響（急性放射線症、不妊、胎児影響、白内障等）がある。乳がんは、放射線によって最も誘発されやすいがんの一つである。ラットは古くから、ヒト乳がんと発生機序やホルモン依存性が類似した疾患モデルとして認識され、世界中の放射線誘発乳がん実験に使用されてきた。我々もラット乳がんモデルを用いて、低線量率放射線影響評価や、誘発腫瘍のゲノム異常の解明等を行ってきた。

放射線発がんの機序に関する定説では、放射線が作る DNA 損傷が誤修復されることで、がんの元となる組織幹細胞に突然変異が生じ、発がんが開始するとされる。我々は、放射線が組織幹細胞の生死や増殖に影響を及ぼし、これも発がんを促進する要因となっているのではないかと考え、ラットにおいて乳腺幹細胞に対する放射線の影響を調べる研究を開始した。

当初、ラットの乳腺幹細胞の実験系は発達しておらず、個体から採取した初代細胞を限外希釈して別個体に移植し再生能を評価する実験系だけが gold standard として存在していた。この実験系には、使用する動物数や手間が膨大であるという欠点がある。そこでまず、ヒトやマウスの乳腺幹細胞が低接着性培養器内で濃縮されるというマンモスフィアと呼ばれる実験モデルを、ラット向けにアレンジした。このモデルは、ヒトやマウスの実験系で観察される特徴をよく再現した。一方、移植再生能実験と比較すると、マンモスフィア形成能の放射線感受性は非常に低いことがわかった。

次に、ラット乳腺上皮を構成する2種類の細胞（基底細胞、内腔細胞）を、細胞表面の integrin $\alpha 6$ (CD49f) 及び CD24 抗原の発現量を指標に識別する実験系を構築した。この実験系でソーティングされた細胞を用いて、基底細胞と内腔細胞の前駆細胞の活性を測定することに成功し、基底前駆細胞の放射線感受性が移植再生能実験の結果と酷似すること、内腔前駆細胞の放射線感受性はそれよりも低いことが示された。細胞間の感受性の差異は、これらの細胞が放射線被ばく後に示す細胞周期停止、アポトーシス、DNA 二重鎖切断修復、DNA 損傷応答シグナルの差異と関連していた。このように、2種類の細胞の放射線感受性が異なることは、放射線がこれらの細胞数のバランスを変動させることを示唆しており、放射線が単に突然変異だけを誘発するのではないことを意味している。

今後の展望として、ゲノム編集による遺伝子改変ラットを用いた研究の可能性や希望についても触れたい。

MEMO

5. ゲノム編集法により作製した遺伝子改変ラットを用いたビタミンD作用メカニズムの解明

榊 利之

富山県立大学工学部医薬品工学科

ビタミンD₃は肝臓でCYP2R1とCYP27A1によって25-ヒドロキシビタミンD₃(25D3)に変換され、腎臓でCYP27B1によって1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD₃(1,25D3)に変換される。1,25D3はその後、CYP24A1による多段階反応により不活性化される。1,25D3はビタミンD受容体(VDR)に結合することにより様々な生理作用を発揮することが知られているが、最近の研究では、(1)1,25D3のVDR依存性作用、(2)1,25D3のVDR非依存性作用、(3)25D3のVDR依存性作用、(4)25D3のVDR非依存性作用、(5)VDRのリガンド非依存性作用の5種類の作用の存在が示唆された。我々はCRISPR/Cas9系を用いたゲノム編集法により、CYP27B1、CYP24A1、VDRの遺伝子欠損ラットの作製に成功した¹⁾。さらに、1,25D3に対する親和性が25D3と同程度にまで低下した変異型VDR(R270L)を有するII型くる病モデルラットを作製した。CYP27B1 KO、VDR KO、およびVDR(R270L)ラットは、発育遅延および骨形成異常などの“くる病”症状を示した。これらのうち、CYP27B1 KOラットは血中Ca濃度が顕著に低く、重度の発育遅延を示し、VDR KOラットは皮膚の異常と脱毛を示した。野生型(WT)ラットとVDR(R270L)ラットの差は、(1)1,25D3のVDR依存性作用に基づくと考えられる。また、VDR(R270L)よりもCYP27B1 KOの方がくる病症状が顕著で、(2)血中Ca濃度維持に対する1,25D3のVDR非依存性作用の喪失に基づくと考えられる。さらに、VDR(R270L)ラットとVDR KOラットの比較から、皮膚および毛包形成に対する(3)25D3のVDR依存性作用または(5)VDRのリガンド非依存性作用の存在が明らかになった。また、VDR(R270L)ラットに25D3を投与したところ、血中Ca値および骨形成が正常化し、25D3が変異型VDR(R270L)のリガンドとして作用することがわかった¹⁾。この結果は、弱いホルモンが十分量あれば強いホルモンの作用を補完できるということを示唆している。一方、正常な成長を示したCYP24A1 KOラットは、ビタミンDおよびその誘導体の代謝の研究に有用であり、WTラットとCYP24A1 KOラットの25D3代謝の比較から、CYP24A1非依存性の代謝経路が明らかになった。こうした代謝解析は血液量が少ないマウスでは困難であり、ラットの有用性を示している。

1) Nishikawa *et al.*, *Sci. Rep.* 10 (1):5677 (2020)

MEMO

6. トランスジェニックラットにより同定された眼球運動系 神経積分器ニューロンの特性

齋藤 康彦

奈良県立医科大学・医学部・生理学第一講座

視覚情報を適切に脳に取り込むには、視線を保持することで視覚対象を網膜上で静止させる必要がある。脳幹の舌下神経前位核 (PHN) は水平性の視線保持に関与しており、眼球速度信号を位置信号へ変換する神経積分器と呼ばれている。これまで、理論研究により神経積分器に関する様々なモデルが提唱されているが、生体内での実体は不明のままである。我々は、神経積分器を構成するニューロンやネットワークの特性を明らかにすることで、神経積分器の実体に迫ることを研究目標にしている。一般的に脳幹のニューロンは、皮質などのニューロンとは異なり、その形態や位置などの情報をもとに興奮性や抑制性といったニューロンタイプを区別することが困難である。そこで本研究では、抑制性ニューロンが黄緑色蛍光の Venus を発現するトランスジェニック (TG) ラット (VGAT-Venus ラット) やコリン作動性ニューロンが赤色蛍光の tdTomato を発現する TG ラット (ChAT-tdTomato ラット)、さらには2種のTGラットを交配させて2重TGラットを作製することで、PHNで主に存在する3つのニューロンタイプ、抑制性ニューロン (Venus+)、コリン作動性ニューロン (tdTomato+)、興奮性ニューロン (Venus- & tdTomato-) の蛍光顕微鏡下での同定を可能とした。PHNを含む脳スライス標本作製し、ホールセル記録法によりそれぞれのニューロンタイプの電気生理学的特性を調べた結果、活動電位の発生後に生じるスパイク後過分極や定電流通電に対する発火パターンをもとに分類されたニューロンの分布がニューロンタイプ間で異なっていた。また、PHNのコリン作動性ニューロンの一部は小脳の様々な領域へ投射することが知られているが、投射先が異なるニューロン間で分布も異なっているのかは不明であった。そこで、ChAT-tdTomato ラットを用いて、小脳の異なる領域に蛍光トレーサーを注入して逆行性標識されるコリン作動性ニューロンの割合を比べたところ、小脳片葉へ投射しているコリン作動性ニューロンは他の領域へ投射するニューロンに比べて割合が小さいことが分かった。これらの結果から、TGラットを用いることにより、これまで不明であったPHNの異なるニューロンタイプにおける機能や投射の特徴が明らかになった。

MEMO

7. ラットを用いた精神疾患モデリングの限界と課題

那波 宏之

新潟大学 脳研究所

相同性組み換え技術が開発されてから、遺伝子改変マウスをモデルとするヒト疾患モデルが一世を風靡したが、現在ではクリスパーキャス法で遺伝子改変ラットも簡単に作製できるようになってきた。演者は長年にわたり、ヒト精神疾患のげっ歯類を用いたモデリングに挑戦してきた。その中で、ラットを用いたほうが、数段、ヒト精神疾患へのモデルの表現妥当性を高めることを見出したので、その事例を今回紹介したい。演者は、統合失調症の周産期障害仮説や母体感染仮説に基づき、ラットやマウスを使ってその評価を行ってきた。たしかにマウスを用いたほうが、飼育費も安価で遺伝子介入も簡便であるものの、ラットを用いることで以下の点で精神疾患のモデルリングには有利になる。

- 1) ラットは意味のある鳴き声（陰性発声 22kHz, 陽性発声 50-70kHz）を持つ
- 2) 高度な社会行動、社会認知能力を有するので、その異常を敏感に検出できる。
- 3) マウスに比べ脳が大きいので、脳波測定などの空間分離能、精度があがる。
- 4) ヒトや装置に順化させうるので、ストレス性の副反応を低減できる。

新生児ラットに羊水サイトカインである上皮成長因子（EGF）を皮下投与すると、その動物は性成熟後に異常行動を呈する。ラットの場合には、標準的な行動テストバッテリー（PPI, 八方迷路、社会行動、運動量、恐怖学習など）の異常に加えて、独り言発声や陰性鳴き声誘発性の錯乱行動、3種類の聴覚生理機能障害（ASSR, MMN, ABR）を呈する。これらのラットモデルの指標は、従来の行動テストバッテリーとは異なり、統合失調症患者の症候と直接的にマッチするものであり、表現妥当性と説得力をもつ。

しかし、「統合失調症はヒト特有の認知高次機能の障害であり、げっ歯類では再現できないはずがない」と断言する研究者も少なくない。最近、演者は偶然に YOUTUBE でラットの持つ多種多様な芸の能力、情動性の高さを再認識する機会に恵まれ、一筋の光を見出した。ラットは教育すると、犬なみの芸（ボール拾い、公園フリーRUN、障害物競争、綱渡り、追いかっこ、呼びかけ？、かくれんぼ？、笑い？、愛情表現？）ができる認知学習能力を持つことを。ならば脳波のみならず、MRI などの脳機能画像測定や GCAMP カルシウム全脳イメージングを用いて、当該モデルラットの精神機能変化を検出し、患者データと対比できるのではないかと、日夜、研究にいそしんでいる。この講演を通して、ラットの専門家の皆さんから、さらなるアドバイスを頂戴したい。

<引用>

Rats are ADORABLE!; <https://www.youtube.com/watch?v=iMVh5uO3FSA>

Awesome, Amazing Rat Tricks; https://www.youtube.com/watch?v=7g2rxtWu_FM

Shadow The Rat - Best Rat Tricks; <https://www.youtube.com/watch?v=AV9z0c1hjnA>

MEMO

8. 国産ゲノム編集技術 CRISPR-Cas3 の開発と応用

吉見 一人

東京大学医科学研究所 附属実験動物研究施設 先進動物ゲノム研究分野

2012年に登場したゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 が、2020年のノーベル化学賞を受賞したことは記憶に新しい。実際、ゲノム編集技術を用いることで様々な生物種や細胞での遺伝子改変が簡単に実施できるようになった。我々はこれまでラットを中心に、CRISPR-Cas9 を用いた効率的なゲノム編集法を開発してきたが、まさに自由自在に遺伝子改変ラットを作製できるようになりつつある。

一方でゲノム編集技術は、モデル動物の効率的な遺伝子改変といった基礎研究以外にも、工業や農水産業、医療など様々な応用分野での活用が展開されている。しかし応用研究を進める際には、ゲノム編集技術の安全性やデザインの自由度といった技術的問題、知的財産の問題など様々なハードルが存在する。そのため、CRISPR-Cas9 登場後も更に高精度で高効率な新しいゲノム編集技術の開発が世界中で広く進められている。

我々はこうした状況の中で、国産ゲノム編集技術として、クラス1に属する CRISPR-Cas3 がヒト細胞でゲノム編集できることを示した。CRISPR-Cas3 は標的を認識する配列長が 27 塩基と長い一方で、ゲノム上の標的部位に大きな欠失変異を誘導でき、確実に遺伝子破壊を誘導できる。このことから安全性の高いゲノム編集ツールとして *ex vivo* や *in vivo* での遺伝子治療応用が期待されている。

また新たにわかってきた DNA 切断機構を生かして、CRISPR 診断への応用も進めている。新型コロナウイルスの迅速な診断法を確立し、医療現場への導出も進めている。本発表では、ラットにおけるゲノム編集、国産ゲノム編集技術 CRISPR-Cas3 の特徴と応用、新型コロナウイルスなどへの迅速な診断法について紹介したい。

MEMO

