



ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」

第16回ラットリソースリサーチ研究会

講演抄録集

令和5年1月27日（金） 13:00 – 17:20



第16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：真下 知士（東京大学） ・ 石田 紗恵子（東京大学）

ラットリソース

1. 開会の辞 13:00-13:10
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. ゲノム編集による遺伝子改変ラットの作製 13:10-13:30
吉見 一人
（東京大学医科学研究所 先進動物ゲノム研究分野/ゲノム編集研究分野）
3. NBRP-Rat における凍結保存精子からの個体復元法 13:30-13:50
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）
4. ラット ES 細胞を使用した研究法 13:50-14:10
小林 俊寛
（東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 再生発生学分野）
5. ウイルスベクター局所注入による Cre 発現ラットの効率的な組換え活性の解析 14:10-14:30
松下 夏樹（愛知医科大学）
6. 総合討論 14:30-15:00
座長：浅野 雅秀（京都大学） ・ 真下 知士（東京大学）
Cre ラットの現状と展望
石田 紗恵子（東京大学）

休憩 15:00-15:10

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

7. *Hspa8* 遺伝子変異ラットの新規神経軸索ジストロフィーモデルとしての確立 15:10-15:40
田中 美有（大阪公立大学獣医学部獣医病理）
8. NADPH オキシダーゼ変異ラット系統群を用いた好酸球増多症研究 15:40-16:10
森 政之（信州大学学術研究院先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所ニューロヘルスイノベーション部門）
9. 異種（ラット×マウス）の胚盤胞補完によって多能性幹細胞からの再生を試みる臓器ならびに生殖細胞 16:10-16:40
平林 真澄
（生理学研究所行動・代謝分子解析センター遺伝子改変動物作製室）
10. SHRSP を用いた高血圧、脳卒中遺伝子の探索 16:40-17:10
並河 徹（島根大学医学部）
11. 総合討論会 17:10-17:20

抄 録

1. 開会の辞

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、2022年12月時点で955系統を収集し、約1,600件を国内外に提供してきました。皆様からのご支援をいただき、2022年度から第5期をスタートすることができました。

第5期は引き続き真下先生の東大医科研と吉木先生の理研BRCが分担機関として参加し、特に東大医科研は重症免疫不全ラットに加えてCreラットの保存と提供も行うこととなりました。様々な組織や細胞特異的、時期特異的にCreを発現するCreドライバーラットの品揃えを充実させ、様々な遺伝子のより精緻な解析を強力に支援していく予定です。運営委員会も新たに4名の新しい委員に参加していただき、新委員長の庫本先生(東京農大)を中心にNBRP-Ratの活動にご指導、ご支援をいただき進めていく所存です。皆様からの提供依頼、寄託申込をお待ちしています。

MEMO

2. ゲノム編集による遺伝子改変ラットの作製

吉見一人

東京大学医科学研究所 先進動物ゲノム研究分野/ゲノム編集研究分野

実験動物として100年以上の歴史をもつラットでは、古くから自然発症モデル、突然変異モデルが多数樹立され、ヒト疾患モデルとして利用されている。その多くがナショナルバイオリソースプロジェクト-ラット (NBRP-Rat) に保存されており、世界中の研究者が利用できる。加えて近年では、ZFN、TALEN、CRISPR-Cas9 といったゲノム編集技術が登場したことでラットにおいても遺伝子改変が容易になり、世界中で多くの新しい遺伝子改変ラット系統が作出、利用されている。

我々は簡単かつ自由度の高い遺伝子改変ラット作製プラットフォームを構築するため、様々な効率的ゲノム編集法の開発を行ってきた。具体的には、2本のオリゴヌクレオチドとプラスミドDNAを用いたプラスミドノックイン法 (2H2OP)、1kb程度の長鎖一本鎖DNA (lssDNA) をドナーDNAとして用いる lssDNA 法、lssDNA とエレクトロポレーションを組み合わせた CLICK 法、相同組み換え修復と非相同性末端結合修復を組み合わせたプラスミドノックイン Combi-CRISPR などが挙げられる。こうした技術を利用することで、単純ノックアウト、ノックインやコンディショナルノックアウト、遺伝子ヒト化など、ユーザーの目的に沿った様々な遺伝子改変ラットを生み出してきた。

東京大学医科学研究所では、先進モデル動物作製コアを立ち上げ、学内外でのモデル動物作製を広く支援することで、医学研究の高度化を図っている。また、新学術領域研究・先端モデル動物支援プラットフォームを通じた遺伝子改変ラット作製支援事業も行っている。本発表では、疾患モデルラット作製支援事業の概要およびこれらを可能にしたゲノム編集の基盤技術について、特に本研究会で焦点を当てている Cre/loxP、レポーター系統の作製法を中心に紹介する。

MEMO

3. NBRP-Rat における凍結保存精子からの個体復元法

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

NBRP-Rat では、2002 年の第 1 期からラットリソースの収集を続け、現在は約 800 系統が提供可能となっている。その中で、コンジェニック系統やトランスジェニック・ゲノム編集等の遺伝子組換え系統の精子で凍結保存された系統が 6 割程であるが、近年、CRISPR/Cas9 技術の開発によってゲノム編集ラットが多く寄託されるようになってきたため、今後は精子凍結で保存される割合はさらに増え、精子から復元して提供する系統が増えていくものと予想される。しかしながら、これまでの凍結融解精子を用いた復元法として、顕微授精が用いられており、復元効率が高くないため、提供までに労力と時間がかかっていた。そこで、NBRP-Rat では、これまで保存されてきたリソースの凍結精子から効率よく個体を復元できるようにするために、熊本大学の中潟グループが開発された体外受精技術(Nakagata et al., *Sci. Rep.*, 2020)を一部改変し、非常に安定的で効率よく個体復元ができることが分かった。体外受精で個体復元をすることで作業時間と労力を大幅に減らすことができ、複数の系統を同時に復元することも可能になり、業務の効率化が実現した。さらに、これまでは個体復元したラットを交配して、依頼者の希望する頭数を用意していたが、個体復元作業のみで実験群を用意して短期間で提供するなどの実績も得られた。

本発表では、ラット精子の凍結保存と個体復元をするための技術を普及させることを目的とし、麻布大学の柏崎グループによって開発された精子凍結法が、すでに NBRP-Rat が発行している DVD（ラット胚・精子の超低温保存と個体復元技術マニュアル，2006 年）でもわかりやすく解説されているが、その凍結法を改めて紹介するとともに、我々が業務で行っている体外受精での個体復元法を紹介する。

第 4 期では、基盤技術整備プログラムの支援(2019 年～2021 年)でラットの体外受精、受精卵のエレクトロポレーション及び胚移植の研修を行い、22 期間から 27 名が研修を修了した。今後の第 5 期では、これらの研修に加えて精子の凍結保存と個体復元の研修も行っていく予定である。

MEMO

4. ラット ES 細胞を使用した研究法

小林 俊寛

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 再生発生学分野

着床前初期胚である胚盤胞から樹立することのできる胚性幹細胞 (ES 細胞) は、生体のあらゆる細胞になれる多分化能と無限の増殖能を併せ持つユニークな細胞株である。マウスでは ES 細胞を別のマウスの胚盤胞内に注入すると、胚発生に同調・寄与し、全身に ES 細胞由来の細胞を持つキメラマウスを作製することができる。特に生殖細胞に ES 細胞の寄与が認められた場合、次世代に ES 細胞の表現型を伝えることができることから、1980 年代以降、ノックアウトマウス作製に欠かせないツールとして広く用いられてきた。一方ラットでは、マウスと同じ方法では ES 細胞の樹立・維持が不可能であったため、このことは遺伝子改変動物の作製および利用においてラットがマウスに大きく水をあけられる要因の一つとなった。しかし 2000 年代後半における 2 種類のシグナル阻害剤 (2i) を用いた培養系の開発により、キメラ形成および生殖系列への寄与が可能なラット ES 細胞の樹立・維持が可能になったことでようやくノックアウトラット作製の道が拓けた。近年では遺伝子編集技術も急速な発展を遂げており、受精卵レベルでも直接遺伝子操作が可能になってきたが、複雑な仕掛けをもつ個体の作出や人工染色体の導入など依然として ES 細胞を介した個体作製が不可欠な場合も多く、目的に応じた使い分けが効率的な研究の推進に繋がると考えられる。またマウスとラットという種の異なる 2 種類の ES 細胞が利用できることで、それぞれの胚発生の試験管内における再現・比較や、互いの胚盤胞に注入したマウス-ラット異種間キメラの作製、さらにはそれを利用した臓器再生など、新たな研究も展開できるようになった。

本講習会ではラット ES 細胞の培養法、ES 細胞を介した遺伝子改変ラット作製の実際、あるいは我々が取り組んできたラット ES 細胞を用いた研究法について紹介したい。

MEMO

5. ウイルスベクター局所注入による Cre 発現ラットの効率的な組換え活性の解析

松下夏樹

愛知医科大学

多種多様な細胞種から成る生物個体において、特定の標的細胞種のみを選択的に遺伝子の機能や細胞の機能を操作する技術は、モデル動物を用いた生命システムの解析とその理解のために欠かせない技術であり、より精密な遺伝子発現コントロールの実現が望まれている。例えば、脳では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、特定の神経回路が動作して高次機能を発現している。実験科学的に脳の機能を理解するために、細胞種特異的な遺伝子操作にもとづいて特定の神経回路の機能を選択的に操作する技術の必要性が強いモチベーションとなって、有用な技術の高度化が図られてきた。

Cre/loxP 組換えシステムは、Cre 組換え酵素が loxP 配列特異的に遺伝子組み換えを誘導する仕組みであり、細胞タイプ選択的な遺伝子操作に様々に利用されてきた。マウスでは現在までに既に多くの Cre 発現系統が整備されている。一方、Cre ドライバーラットのリソースは未成熟で、今後 Cre ラットリソースの整備が強く期待される。

我々は、脳の大脳基底核回路を構成する各神経細胞の機能を解析するために、チロシン水酸化酵素(TH)遺伝子、及びパルブアルブミン(PV)遺伝子の標的位置に Cre 遺伝子を正確にノックインした TH-Cre ラット、PV-Cre ラットをそれぞれ *Combi-CRISPR* 法によって作製して系統化した。両ラットの Cre 酵素依存的な遺伝子組み換えを調べるために、Flex スイッチ GFP 誘導システムを搭載したアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの脳内局所注入によって、Cre 組み換え細胞種の同定をおこなった。TH-Cre ラットが中脳ドーパミン神経細胞や青斑核ノルアドレナリン細胞選択的に Cre/loxP 組み換え活性を示すことを確認した。また、PV-Cre ラットでは線条体の PV 発現介在細胞のみ選択的に組み換えが生じることを確認した。Flox 動物との交配で得られる次世代動物を用いる Cre 発現解析に対して、ウイルスベクターの活用は、Cre 発現ラットの性状解析を Cre 動物一代で短期間に実施できる利点だけでなく、標的の組織や局所領域に絞って精度よく細胞種を同定するのに都合がよい。Cre 発現ラットリソースの整備にとっても、ウイルスベクターを利用する効率のよい方法が適していると考えられる。

最近我々は、より精巧に細胞種選択的な Cre/loxP 組み換えを実現する「Flex/USS スイッチシステム」を開発することに成功した。従来の Flex システムでは避けられなかった Cre に依存しない不都合な組み換えの頻度を著しく低減して、遺伝子発現誘導の細胞種選択性を格段に高めることを実現した Flex/USS ベクターシステムを紹介する。

MEMO

7. *Hspa8* 遺伝子変異ラットの新規神経軸索ジストロフィーモデルとしての確立

田中 美有

大阪公立大学獣医学部獣医病理

神経軸索ジストロフィー (Neuroaxonal dystrophy: NAD) は、神経系におけるスフェロイド (腫大軸索) 形成を特徴とする神経変性疾患である。NAD に分類される代表的疾患には、乳児型神経軸索ジストロフィー (infantile neuroaxonal dystrophy: INAD) など国内の小児慢性特定疾病対象疾患などが含まれており、治療法の確立を目指した病態解明が課題となっている。INAD の *PLA2G6* (phospholipase A2 group VI) 遺伝子変異など、一部の NAD では原因遺伝子が同定されているが、その病態メカニズムは十分には解明されていない。NAD の病態解明の上で疾患モデル動物の果たす役割は非常に大きい。既報の NAD モデル動物は、INAD モデルマウスなどのマウスモデル数種に限られていた。獣医学領域においても、犬種特異的な NAD などが国内外で知られており、それらの診断・治療法、モデル動物としての応用の両面を目指した病因解明が進められてきた。

我々は、若齢時から後肢の歩行異常・運動失調を呈するミュータント系統 KK ラットに着目し、その原因遺伝子の同定や詳細な病態評価を行ってきた。病理組織学的解析の結果、KK ラットの脊髄 (主に胸髄・腰髄の背索) および小脳・脳幹を中心とした中枢神経系では多数のスフェロイドが観察され、病理組織学的に NAD と診断した。中枢神経系以外にも、坐骨神経などの末梢神経系におけるスフェロイド形成や脾臓・胸腺における異常所見も見出している。また、遺伝子解析の結果、原因遺伝子として、ラット第 8 染色体上の *Hspa8* (heat shock protein family A (Hsp70) member 8) 遺伝子におけるミスセンス変異を同定した。さらに、ゲノム編集技術により、*Hspa8* 遺伝子変異ラットを新たな NAD モデルとして確立した。ヒト・動物のいずれにおいても、*Hspa8* 遺伝子変異による神経変性疾患は報告されておらず、新たな NAD の病態メカニズム解明が期待される。現在、*Hspa8* 遺伝子変異による NAD の病態メカニズムについての詳細な解析を進めている。

本講演では、我々が新たに確立した NAD モデルである KK ラットおよび *Hspa8* 遺伝子変異ラットの詳細な病態について、これまでに得られた病理組織学的解析結果を中心にご紹介したい。

MEMO

8. NADPH オキシダーゼ変異ラット系統群を用いた好酸球増多症研究

○ 森 政之^{1, 2)}・代 健¹⁾・宮原大貴¹⁾・吉見一人^{3, 4)}・真下知士^{3, 4)}・樋口京一^{1, 5)}

¹⁾ 信州大学学術研究院先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所ニューロヘルスイノベーション部門, ²⁾ 信州大学大学院医学系研究科加齢生物学教室, ³⁾ 東京大学医科学研究所実験動物研究施設先進動物ゲノム研究分野, ⁴⁾ 東京大学医科学研究所システム疾患モデルセンターゲノム編集研究分野, ⁵⁾ 長野保健医療大学地域保健医療研究センター

顆粒球の一種である好酸球は骨髄中の前駆細胞から分化・成熟した後に末梢血に入り、皮膚、肺、腸、骨髄などに移行する。ヒト末梢血中の好酸球数は通常は 400 個/ μ L 以下である。好酸球の発生・体内動態の制御機序や生体機能には未だ不明な点が多い。Matsumoto Eosinophilia Shinshu (MES) (ラットは雌雄ともに 100%の個体が 10 週齢以降に持続的な末梢血好酸球増多 (>500 個/ μ L) を自然発症する。我々は MES ラットの好酸球増多の原因がチトクローム b-245, α ポリペプチド (CYBA) をコードする遺伝子の機能喪失変異 (*Cyba^{mes}* 変異アレル) であることを明らかとした。CYBA タンパク質は NOX1、NOX2、NOX3、または NOX4 タンパク質とともに NADPH オキシダーゼ複合体を構成し、スーパーオキシドを産生する。そこで、どの NOX を含む NADPH オキシダーゼの機能喪失が好酸球増多の原因であるのかを特定するために、CRISPR/Cas9 法により *Nox1*、*Nox2*、*Nox4* 遺伝子それぞれをノックアウトした F344/N ラットを作製した。その結果、血中好酸球増多は *Nox1*、*Nox4* KO ラット、および *Nox2* KO 雄ラットには認められなかったが、同雌ラットの約 20%に認められたことから、NOX2 NADPH オキシダーゼの欠損が原因であることが明らかとなった。さらに、これらの KO ラットと同じ遺伝的背景を有する F344.MES-*Cyba^{mes}* コンジェニックラット、及びこれらとは異なる遺伝的背景を有する BN.MES-*Cyba^{mes}* コンジェニックラットを作製し、その好酸球関連表現型を調査した。F344.MES-*Cyba^{mes}* の雌は全個体が、また雄は約 50%が好酸球増多を発症した。一方、BN.MES-*Cyba^{mes}* においては雌雄ともに血中好酸球レベルは正常範囲内に留まっていたが、骨髄では好酸球の異常な増殖が認められ、さらに肝臓には好酸球の浸潤による多数の壊死巣が形成された。これらの結果は、NOX2 NADPH オキシダーゼ、または CYBA の欠損に起因する好酸球増多とその後の骨髄からの血中や臓器への動員がラットの遺伝的背景と性関連因子による複雑な制御を受けることを示唆した。さらに MES と BN.MES-*Cyba^{mes}* の F₂ 交雑仔群を利用した遺伝解析により、これらの好酸球増多の系統差に関与する遺伝子が第 1、第 5、および第 9 染色体上に存在することを明らかとした。一方、ヒトやマウスにおいては CYBA または NOX2 の遺伝的機能喪失は慢性肉芽腫症や末梢血や脾臓中の CD11b⁺ 細胞の有意な増加などを生じさせるが、好酸球増多は報告されておらず、ラットとは明確な種差がある。今後これらの好酸球増多発症特性の異なる NADPH オキシダーゼ変異ラット系統群を用いて、① CYBA 欠損が好酸球増多を惹起する分子機序の解明、② 好酸球増多の系統差や性差に関与する遺伝子の同定、③ 好酸球の体内動態制御の分子機序の解明を進める予定である。

MEMO

9. 異種（ラット⇔マウス）の胚盤胞補完によって多能性幹細胞からの再生を試みる臓器ならびに生殖細胞

平林 真澄

生理学研究所 行動・代謝分子解析センター 遺伝子改変動物作製室

ラットでもマウスのように胚性幹細胞や人工多能性幹細胞といった多能性幹細胞株が樹立されており、遺伝子ノックアウト (KO) による臓器欠損モデルと組み合わせ、異種臓器移植研究を推進するシステムを提供しうる。とくに CRISPR/Cas9 のような新規ゲノム編集ツールの発展は、再生医療分野を含む多くの生物医学研究を強力に後押しした。ここでは主要齧歯類であるラットとマウスにおいて、異種間の胚盤胞補完によって多能性幹細胞から再生させた臓器ならびに生殖細胞について紹介する。*Pdx1*、*Foxn1*、*Sall1*、*Prdm14* 遺伝子をノックアウトすれば、それぞれ、膵臓、胸腺、腎臓、生殖細胞を欠失したラットを作製できた。臓器発生ニッチに幹細胞由来の臓器・生殖細胞を作製するにあたり、*Foxn1* KO 以外はヘテロ変異個体同士の交配によって確率 25% で出現するホモ変異ラット胚盤胞を準備しなければならない。異系統（ラット）または異種（マウス）の多能性幹細胞 10 個を顕微注入された KO ラット胚盤胞は、それぞれのニッチに幹細胞由来の 3D 臓器あるいは生殖細胞を持つキメラ個体として発生できた。再生臓器・細胞の機能性は、糖尿病モデルへの膵島移植や顕微授精後の産仔発生といったアプローチにより確認された。このように、多能性幹細胞で胚盤胞補完することによって同種あるいは異種の 3D 臓器や生殖細胞を作製することができ、再生医学による臓器移植医療の問題点を洗い出す生体材料を提供している。

MEMO

10. SHRSP を用いた高血圧、脳卒中遺伝子の探索

並河 徹

島根大学医学部

Spontaneously hypertensive rat (SHR)と stroke-prone SHR (SHRSP)は、京都大学で 1960 年代に開発された高血圧モデルラットであり、遺伝的に重症高血圧や脳血管障害を起こす。これらのラットはこれまで高血圧とその合併症の研究に最も広く用いられてきたが、その遺伝的メカニズムはまだ解明されていない。我々は、SHRSP を用いて QTL 解析を行い、その高血圧、脳卒中遺伝子の同定を試みてきた。

SHRSP とその対照ラットである WKY との血圧差に関与する QTL、SHRSP と SHR の間の脳卒中感受性に関与する QTL は、ラット第 1 染色体上のやや異なる領域に同定された。SHRSP と WKY, SHRSP と SHR の間でこれらの領域を入れ換えた congenic rat の解析から、高血圧 QTL の効果は「非対称」であるのに対して脳卒中 QTL は「対照的」であった。これは、高血圧 QTL は QTL 外の領域との間で相乗的作用が想定される (QTL 外の遺伝子に依存して効果を発揮する) のに対して脳卒中 QTL は相加的作用である (QTL 内の遺伝子のみで効果を発揮する) と解釈される。一方、Congenic rat の表現形解析から高血圧 QTL は SHRSP のストレス感受性に「対照的」な影響を与えることが明らかとなったため、この領域内の遺伝子が、他の領域とは独立にストレス感受性に影響すると考えられた。我々はその原因遺伝子同定を目標に subcongenic 系統の作成、解析をすすめる、SHRSP で、*Stim1* 遺伝子に truncation があることを発見した。*Stim1* は store-operated calcium entry 機構で重要な役割を果たす calcium sensor であり、この truncation によってその機能が減殺されることが明らかとなった。しかし、ゲノム編集によって SHRSP の *Stim1* を野生型に rescue した knock-in SHRSP を作成したところ、ストレス感受性に変化はみられず、*Stim1* はその原因遺伝子とはいえないことが明らかとなった。現在、この領域の他の遺伝子について解析を進めている。

MEMO