

ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」主催

第2回ラットリソースリサーチ研究会 抄録集

平成21年1月30日（金）13:00－17:00

京都大学 百周年時計台記念館

第2回 ラットリソースリサーチ研究会 プログラム

開会の辞 芹川忠夫 13:00-13:15
(京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設)

第1部

座長：森 政之 (信州大学大学院医学研究科加齢適応医科学系専攻)
柏崎直巳 (麻布大学獣医学部動物応用科学科動物繁殖学)

ラットリソース

1. ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」現状報告 13:15-13:40
芹川忠夫 (京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設)
2. ラットゲノム研究：SNP解析と次世代シーケンサー 13:40-14:05
豊田 敦 (国立遺伝学研究所)
3. ラット精子の保存と受精技術の開発 14:05-14:30
金子武人 (熊本大学生命資源研究・支援センター)

ラットリサーチ -テーマ：神経-

4. ラットを用いた認知脳科学研究 14:30-14:55
古屋敷智之 (京都大学大学院医学研究科神経細胞薬理学教室)

休憩 14:55-15:20

第2部

座長：牛島俊和（国立がんセンター研究所）

吉木 淳（(独) 理化学研究所バイオリソースセンター）

ラットリサーチ –テーマ：癌–

5. 前がん病変を指標とした大腸がん感受性遺伝子の同定研究 15:20–15:45
落合雅子（国立がんセンター研究所生化学部）
6. 前立腺癌の発がん機構に関する研究 15:45–16:10
白井智之（名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学）
7. Kyoto Apc Delta (KAD) ラット：その開発と応用 16:10–16:35
庫本高志（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）
8. ラット化学発癌誘発肝癌抵抗遺伝子の研究 16:35–17:00
日合 弘（滋賀県立成人病センター研究所）

懇親会

17:30–19:30

お問い合わせ： 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. ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」現状報告

中核機関代表者 芹川忠夫

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

NBRP-Rat の現状を関連情報と共に報告する。

NBRP-Rat は 2002 年 7 月に発足した。5 年間の第 1 期プロジェクトを終え、現在、継続開始された 5 年間の第 2 期プロジェクトの 2 年目にある。ラット系統の「収集・保存・提供」事業は、それぞれ順調に進んでおり、「生物遺伝資源寄託同意書」を締結して収集したラット系統数は、500 系統を超えている。ラット系統の収集時には、系統名の確認、ラボコードやラット系統の国際登録、遺伝子改変ラットなどの変異遺伝子の遺伝子診断法の確認などを実施している。それぞれのラット系統の特性や利用状況に合わせて、生体(SPF)、胚、あるいは精子の状態に保存している。主な標準系統については生体と胚で保存しており、汎用性のあるトランスジェニックラットは生体と精子で保存している。超低温保存した胚や凍結精子は個体復帰試験を実施している。提供については、ラット系統ごとに、生体、胚、精子、組織、あるいは DNA にて応じられるよう順次整備を進めている。NBRP-Rat のホームページ (<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/NBR/>) は、今年度に刷新した。昨年 の Nature Genetics 5 月号にラット特集が生まれ、ラットの国際コミュニティーによる総説において、NBRP-Rat の活動が紹介されたが、今や、NBRP-Rat は、量的にも質的にも世界最高水準のリソースセンターと評価されている。上記のラット特集号では、NBRP-Rat の事業ではない独自の研究ではあるが、EU の EURATools Consortium に参画して実施したラットの SNP 解析研究や F344 系統を用いた ENU-mutant archive の論文が掲載された。後者については、効果的な標的遺伝子スクリーニング法 (MuT-POWER 法) と顕微授精法を組み合わせた方法により、現在、約 5,000 頭の G1 ラットの Kyoto University Rat Mutant archive (KURMA) から、遺伝子変異 (KO を含む) ラットを作製している、現在、5,000 頭から 10,000 頭に規模を拡大するよう準備しており、順次、NBRP-Rat に寄託している。他に、NBRP-Rat の関連事業として、「ラット LE/Stm の BAC エンドシーケンス」(京大、情報・システム研究機構) と「実験動物マウス及びラットリソースの輸送システムの開発」(理研 BRC、京大、熊本大) を実施している。

ラットに係る大きなニュースとしては、昨年末に、ラットの ES 細胞と iPS 細胞の樹立が報告されたことが挙げられる (Cell 2008, Cell Stem Cell 2008)。今後、遺伝子機能解析から疾患の治療・予防法の開発に至る研究環境がラットにおいて一段と向上すると期待される。

最後に、第 18 回国際ラット遺伝子システムワークショップ (The 18th

International Workshop on Genetic Systems in the Rat) を、2010 年（平成 22 年）11 月 30 日（火）から 12 月 3 日（金）に、京都大学キャンパス内で開催する予定であることをお知らせする。本ラット国際会議については、皆さま方のご支援、ご協力、ご参加をお願いしたい。

MEMO

2. ラットゲノム研究：SNP 解析と次世代シーケンサー

豊田 敦

国立遺伝学研究所

配列決定技術や情報解析の進展により、進化系統において重要な生物種および病原性や産業上有用な微生物（メタゲノム解析を含む）を中心に多くのゲノム配列がサンガー法を用いて解読され、さらに 3,400 を超えるプロジェクトが進行中である（GOLD, 2009 年 1 月現在）。このような状況のなか、次世代シーケンサーと呼ばれる超並列配列決定装置が次々と登場し、遺伝的多様性や変異遺伝子座の同定を目指して、個体（系統）や近縁種、変異体を対象にしたゲノムの再解読が精力的に行われている。また、ゲノム配列決定以外にも遺伝子発現解析や DNA 結合タンパクの結合部位の同定、メタゲノム解析などさまざまな分野において新たな可能性を切り開きつつある。これらのシーケンサーの特徴は、大腸菌へのクローニングを必要としないことや数ギガ塩基にもおよぶ配列データを高速に得られること、解読長が数十塩基と従来法より短いことが挙げられる。

ヒトゲノム研究では 2004 年に完了した高精度なゲノム配列をもとに、ヒトの遺伝的多様性の網羅的な解析を目指した大型プロジェクトが次々と進められており、個人ゲノム解析においても次世代シーケンサーを使用してワトソン博士を始め 3 人のゲノム配列が公開されている。遺伝的多様性（一塩基多型や挿入、欠失、逆位、重複、遺伝子コピー数などの構造多型）は疾患ばかりではなく体質や薬物応答などとも密接に関連しており、今後の新たな予防法やテーラーメイド医療の基盤情報として重要である。また、さらに簡便かつ高速、低コスト、高精度な配列決定法の開発も重要な課題である。

本講演では、次世代シーケンスシステムを利用したゲノム解析を例に実際のパフォーマンスなどについて紹介する。

MEMO

3. ラット精子の保存と受精技術の開発

金子武人

熊本大学生命資源研究・支援センター

バイオリソースバンクによる集中的な遺伝資源の「収集・保存・提供」により研究基盤が整備され、その結果多くの有用な研究成果が報告されている。ラットやマウスのモデル動物を扱うバイオリソースバンクにおいて、生殖工学技術は必要不可欠なものである。生殖工学技術を用いた配偶子レベルでの遺伝資源の保存・提供は、遺伝的交雑や感染症汚染といった動物利用者・管理者にとって極めて重要な問題を回避することが可能である。しかしながら、ラットにおいては古くから生殖工学に関する技術開発が行われているにもかかわらず、技術の成熟化が進んでいないように思われる。バイオリソースバンクは、増加する遺伝資源を効率的・経済的に「収集・保存・提供」することが求められる。このため、バイオリソースバンクに必要とされる技術成熟および新規技術開発は重要な課題である。今回は、モデル動物を扱うバイオリソースバンクにおいて利用されている、あるいは今後応用可能な生殖工学技術および新規精子保存法としてのフリーズドライ法について紹介したい。

フリーズドライ法を用いた精子保存法の開発は、近年多くの動物種で報告がされていることから、その注目度の高さがうかがえる。遺伝資源の保存を目的としたフリーズドライ法のメリットは、

- 4℃での長期保存が可能
- 常温での輸送が可能

であることであり、液体窒素の定期的な供給を行わなければならない現行の凍結保存法と比べて管理が容易で経済的な保存法であるといえる。ラットにおいて精子フリーズドライ法の開発の歴史は浅く、その報告例も他の動物種と比べて少ないが、徐々に実現可能なものになりつつある。そこで、今まで得られた知見およびフリーズドライ法の今後のバイオリソースバンクへの応用の可能性についても報告したいと思う。

MEMO

4. ラットを用いた認知脳科学研究

古屋敷智之

京都大学大学院医学研究科神経細胞薬理学教室

ラットが認知脳科学研究に導入されたのは二十世紀初頭である。比較的従順であること、他の哺乳動物に比べ飼育がやり安いこと、記憶学習を得意とすることなどから、ラットを用いた認知脳科学研究は急速に普及した。現在でもラットは認知脳科学研究に最もよく用いられる動物種である。本講演では我々が行った研究を例に、認知脳科学研究におけるラットの有用性を紹介したい。

動物は将来の結果を予測し、柔軟に行動を選択し制御する。一方、学習の繰り返しは将来の予測を伴わない習慣的な行動を誘導する。眼窩前頭皮質 (OFC) は将来の予測に基づく行動の最適化を促すとともに、習慣的な行動の抑制にも関与することが、動物種を超えて知られてきた。OFC の機能を明らかにするため、我々は味覚報酬の予測に関わる神経活動と自らの行動に関わる神経活動を分離するためのラット匂い分別課題を独自に開発した。この課題施行中のラットの OFC より単一ユニット記録を行い解析したところ、味覚報酬の予測に関わる神経活動と自らの行動の監視に関わる神経活動がほぼ独立して観察された。次にこれらの神経活動が生成されるメカニズムについて、各脳領域を破壊して調べた。OFC における味覚報酬の予測に関わる神経活動には味覚野が必須であった。さらに味覚野の破壊により OFC における自らの行動を監視する神経活動が増強した。これらの結果は 1) OFC が報酬の予測を維持しつつ自らの行動を監視すること、2) 報酬予測情報により自らの行動監視を抑制することを示唆している。

認知脳科学研究には、ラット以外にも、遺伝子組換えの容易なマウスや複雑な認知課題をトレーニングできるサルがしばしば利用される。しかしこれらの動物種にはそれぞれ固有の問題がある。マウスの行動課題の多くは本能行動を応用したもので、脳情報処理の解析に適さない。実際、我々が開発した匂い学習課題をマウスにトレーニングすることは極めて困難である。一方サルを用いた実験は手間とコスト、動物愛護の観点から実験の幅に制約が大きい。たとえば本研究で利用した脳領域破壊実験をサルで繰り返し行うのは容易ではないであろう。すなわち認知行動課題、単一ユニット記録、脳領域破壊を組み合わせた本研究にはラットは不可欠である。近年遺伝子組換えラットの作出も可能となっており、ラットを用いた認知脳科学研究はますます重要になると考えられる。

MEMO

5. 前がん病変を指標とした大腸がん感受性遺伝子の同定研究

落合雅子

国立がんセンター研究所生化学部

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) は、加熱魚肉食品中に含まれるヘテロサイクリックアミン(HCA)の1種であり、HCA 中で最も含量が多い。雄ラットに PhIP を投与すると、大腸前がん病変の候補である aberrant crypt foci (ACF)を誘発すると共に、大腸腫瘍を誘発する。ACF 及び大腸腫瘍誘発性に関して、近交系ラット F344/NJcl (F344)は感受性を、ACI/NJcl (ACI)は抵抗性を示す。これら 2 系統を用いて、ACF 誘発性を量的形質として、大腸発がん感受性遺伝子座(the susceptibility to colon tumors: *Sct*)を同定するために、遺伝的連鎖解析による検索を行った。

遺伝学的解析により、ラット第 16 番染色体上に候補遺伝子座の局在を限定化した。更に、コンジェニック系統を用いた解析により、D16Nkg9 – D16Nkg38 (C34 領域、約 12 Mb)に感受性候補領域が存在することを見出した。ラットバイオソースから供与されたラットを含む近交系ラット 16 系統を用いて、ACF 誘発性の検討及びハプロタイプ解析を行い、約 1.8 Mb に候補領域を絞り込んだ。この領域内に存在する 15 個の遺伝子に関して定量的遺伝子発現解析を行い、両系統間で発現量に差がある遺伝子を探索した。4 個の遺伝子において、大腸粘膜における遺伝子発現が確認され、そのうち 1 個(*Sct A*)が、PhIP 投与及び非投与時のいずれにおいても、両系統間で、遺伝子発現量に違いが認められ、蛋白質の発現でも系統差が認められた。両系統間での塩基配列の違いを、プロモーター領域及びエクソン領域で検討したが、最終エクソン以外では、違いは認められなかった。最終エクソンにおいては、コード領域で、アミノ酸置換を伴わない一塩基多型が 1 個、3'-非翻訳領域(3'-UTR)では、15 個の多型が検出された。15 系統の近交系ラットで、これら 16 カ所の多型を調べた結果、F344 型及び ACI 型の 2 種のみで分類され、ハプロタイプブロックを形成していることが示された。ACF 誘発性が、1 匹当たり 5 個以上である高感受性の 5 系統のラットでは、いずれも F344 型であり、これらの多型が、ACF 誘発性に寄与している可能性が示唆された。F344 もしくは ACI の 3'-UTR 領域を組み込んだ *luciferase* 遺伝子を用いたレポーター遺伝子アッセイでは、蛍光強度に 2 系統間で違いが認められ、3'-UTR 領域の多型が、*Sct A* 遺伝子発現の系統間の違いに寄与している可能性が示唆された。ACI の BAC library を作成し、ACI 由来の *Sct A* を含む BAC construct を、F344 に組み込んだ transgenic ラットを、現在、作成中である。この BAC transgenic ラットを用いて、*Sct A* が ACF 誘発性及び発がん性に及ぼす影響を検討し、*Sct A* が大腸がん感受性遺伝子であることを確認する予定である。

MEMO

6. 前立腺癌の発がん機構に関する研究

白井智之

名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学

前立腺癌は近年日本を含めたアジア諸国で増加している。本邦では高齢化と食事の欧米化によって急速に罹患率と死亡率が上昇し、その対応が急がれている。年齢依存性に罹患率が急上昇する疾患であることから前立腺癌の一番のリスク要因は年齢といわれているが、他のリスク要因は不明なことが多い。前立腺癌の発生機序、予防、ならびに治療に資する基礎的な成果を得るためには適切な動物モデルが必須であり、我々の研究室では長年にわたってラットを用いた前立腺発癌モデルの確立に努力を重ねてきた。現在化学発がん物質を用いる2つの系とそれから波及した1系、さらに遺伝子改変による系の計4モデルを確立した。本研究では我々のラットモデルを紹介し、それを用いた研究成果を述べたい。

F344 ラットに 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) を 50mg/kg bw にて皮下投与を週一回 20 週間投与後 50 週間観察期間の後約半数の動物の前立腺腹葉に微小癌が発生する。発生過程にはヒトで見られる前癌病変である PIN (prostatic intraepithelial neoplasia) が観察される。その後ヒトが日常的に食べ物を通して摂取していることが判明した加熱食品中のヘテロサイクリックアミンの一つである 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) がラット大腸癌、乳癌、前立腺癌を誘発することを見出し、PhIP を DMAB の代わりに投与する系を確立した。DMAB と PhIP で誘発した前立腺癌はいずれも腹葉前立腺に非浸潤性のアンドロゲン依存性である。DMAB や PhIP とともに高濃度のテストステロンを同時に投与すると腹葉前立腺の癌発生は逆に抑制され、側葉や前葉あるいは精囊からアンドロゲン非依存性で、しかも浸潤性・転移形成性の腺癌が発生することが明らかとなった。この3つのモデルは前立腺癌のリスク要因や逆に化学予防物質の追究に極めて有用である。

しかし実験期間が極めて長いことや発生率が低い点が欠点であることから、短期間にしかも高頻度に前立腺癌の発生する系の確立が切望された。当時すでにマウスを用いた数種類の遺伝子改変動物で、高頻度に前立腺癌が発生することが報告されていて、その中から前立腺で特異的に発現している *probasin* をプロモーターにして、SV40T 抗原導入した系をラットで作製することを試みた。その結果 SD ラットで SV40T 抗原を前立腺に特異的に発現する系が確立でき、5 週齢の若齢から前立腺にいわゆる PIN の病変が出現し、15 週齢で 100% に腹葉前立腺癌が発生することが確認できた。この SV40T 抗原導入前立腺癌モデルを TRAP (Transgenic Rat for Adenocarcinoma of the Prostate) と命名した。DMAB や PhIP のモデルと異なって早期にしかも大きな前立腺癌が確実に発生するが、

微小浸潤は認めるものの多臓器への転移は現時点まで認められていない。アンドロゲンに完全に依存した増殖態度を示す点も DMAB や PhIP 単独モデルと類似している。

これらの 3 つの実験系を有機的に活用して、ラット前立腺癌の生物学的特徴の解明と発がん機構の追究を行ってきたが、更なる改善も必要と考えている。

MEMO

7. Kyoto Apc Delta (KAD) ラット：その開発と応用

庫本高志

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

大腸癌の発症機序の理解、新しい治療法、予防法、薬剤の開発には、モデル動物の利用が欠かせない。ラットは、その適度な大きさのために、疾患モデル動物としての利用価値が高い。大腸癌モデルラットを得ることを目的として、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子 Adenomatous polyposis coli (*Apc*) 遺伝子に変異を持つラットを作製した。

ENU ミュータジェネシス法を利用し、*Apc* 遺伝子にナンセンス変異 (S2523X) をホモに持つ Kyoto Apc Delta (KAD) ラットを開発した。KAD ラットの APC タンパク質は C 末端に位置する EB1 結合ドメインと DLG 結合ドメインを欠いている。

KAD ラットは 2 年以上生存し、大腸・小腸腫瘍とも自然発症しなかった。しかし、アゾキシメタン (AOM) とデキストラン硫酸 (DSS) による大腸腫瘍誘発試験において高感受性を示した。すなわち、KAD ラットでは、全ての個体に大腸腫瘍が誘発され、剖検時の 1 頭当たりの腫瘍数は KAD ラットの方が多く (9.5 ± 0.7 個 vs 1.3 ± 0.3 個、 $p < 0.001$)、腫瘍 1 個当たりの体積も KAD ラットの方が大きい ($33.9 \pm 9.4 \text{ mm}^3$ vs $10.3 \pm 5.6 \text{ mm}^3$ 、 $p < 0.003$)。興味深いことに、KAD ラットは、DSS 投与中とその後数週間、野生型ラットよりも激しい下痢症状を示した。また、KAD ラットの腫瘍では、 β カテニン遺伝子の変異と β カテニンの核内移行が認められ、野生型ラットの腫瘍と同様、Wnt シグナル系が昂進していると推察された。

以上の結果から、KAD ラットでは、野生型ラットと同様に AOM による β カテニン遺伝子の変異が誘発されるが、DSS による大腸粘膜障害の感受性に差異があり、その高感受性が腫瘍の増数増大につながっていると考えられた。

KAD ラットで欠損している EB1 ドメインは微小管を結合し細胞の形態、移動に関与するといわれている。DLG ドメインは、染色体分離に関与するといわれている。*Apc* 遺伝子の腫瘍発生への関与は、これまで Min マウス、*Apc* Δ 716 マウスなどを用いて調べられてきた。これらのモデルマウスは、KAD ラットで欠失している 2 つのドメインに加え、 β カテニン結合領域も欠いている。そのため、EB1 ドメイン、DLG ドメインの腫瘍発生への関与を解析することができなかった。

本研究は、APC タンパク質が、Wnt シグナル系の昂進だけでなく、大腸粘膜障害に対する感受性にも関与している可能性を示すものである。KAD ラットは、*Apc* 遺伝子の未知の機能を明らかにするモデル動物として、利用価値が高い。

MEMO

8. ラット化学発癌誘発肝癌抵抗遺伝子の研究

日合 弘、逢坂光彦、田沼順一、木下和生、木村めぐみ、劉洪波、
大見奈津江、蔣 麗、東 監
滋賀県立成人病センター研究所

ラットの化学発癌誘発肝癌はもっとも古くから研究されてきた発癌モデルである。発癌剤投与後、GST-P などの Phase II 酵素を強く発現する酵素変異巢 (EAF) が形成される前癌段階を経て肝細胞癌の発生を見る二段階発癌モデルでもある。DRH ラットは発癌剤による Phase II 酵素誘導の低下を指標に選別交配された近交系で 3'Me-DAB, DEN, AAF などによる肝発癌に対し強い抵抗性を示す。感受性 F344 ラットとの F2 に 3'Me-DAB を経口投与し、前癌段階で EAF 数、サイズ、GST-P mRNA 量などをもとに QTL 解析を行い Drh1 (RNO1), Drh2 (RNO4) をマップした。いずれも抵抗性が半優性であった。Drh1 単独の効果を評価するため、感受性 F344 ラットの Drh1 を含む染色体セグメントを導入した Speed congenic rat DRH.F344-Drh1 (DFD) を作成した。DRH, DFD, F344 ラットに 3'Me-DAB を7週投与した前癌期において、さまざまな変数を測定したところ EAF 数、肝細胞アポトーシス数が Drh1 単独支配と考えられた。EAF サイズ、GST-P mRNA, 肝線維化、Cyclin D1, PCNA 陽性肝細胞数などについては DFD は中間値を示し、Drh1 以外の遺伝子、おそらく Drh2 が関与しているものと考えられた。また肝細胞に一過性の DNA 合成を起こすマイトゲンである硝酸鉛を投与し48時間後肝細胞の BrdU 取り込みを計測したところ、F344 と DFD では同等の取り込みがあったが、DRH ではほとんどなかった。この観察から、Drh1 はマイトゲンによる肝細胞 DNA 合成開始にいたる過程に与っている可能性が示された。Drh1 のポジショナルクローニングに向け、1057 頭の DRH x (DRH x DFD)F1 に硝酸鉛を投与して48時間後の肝 BrdU 取り込みやその他の変数を計測し、Drh1 領域 (RNO1: 165~247MB) 上の12の多型マーカーのタイピングをおこなった。この結果 240MB 近傍で BrdU 取り込みに対し LOD 値 26.2 の単一ピークを得た。同部には体重、肝重量などの QTL ピークも存在していた。現在-1LOD の範囲のすべての遺伝子、EST などの変異の有無、発現、レスキューを検討中である。当初、候補と考えていた Pten や Cyp などは除外された。一方、硝酸鉛投与 DFD, DRH の cDNA チップ解析を行ったが、マップ位置と矛盾しない変化を示すものは検出されていない。

この研究は Drh1 のポジショナルクローニングを通じて、肝発癌の遺伝的ステップ、さらに抵抗性のメカニズムの理解を目指すものである。

MEMO