



ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」主催

# 第5回ラットリソースリサーチ研究会 講演抄録集

平成24年2月3日（金） 13:00 – 17:30

京都大学 百周年時計台記念館



## 第5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：森 政之（信州大学大学院医学研究科加齢生物学分野）

上田正次（株式会社フェニックスバイオ）

#### 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」の報告と展望  
13:00－13:30  
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. 体外受精に利用可能なラット精子凍結法の開発  
13:30－13:45  
伊藤潤哉（麻布大学獣医学部動物応用科学科）
3. 長期保存が可能なラット精子フリーズドライ法の開発  
13:45－14:00  
金子武人（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）
4. F344 ラットの全ゲノムシーケンス解析の現状  
14:00－14:15  
豊田 敦（大学共同利用機関法人情報・システム研究機構国立遺伝学研究所）
5. ラット ES 細胞および iPS 細胞の樹立とその応用  
14:15－14:45  
平林真澄（自然科学研究機構生理学研究所行動・代謝分子解析センター）
6. ラット遺伝子改変技術としての ZFN/TALEN の開発  
14:45－15:15  
山本 卓（広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻）

休憩（coffee break） 15:15－15:30

## 第2部

座長：庫本高志（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）  
佐藤匡央（九州大学大学院農学研究院栄養化学）

### ラットリサーチ

7. ラット ES 細胞を利用した応用研究 15:30-16:00  
川又理樹（国立がん研究センター分子細胞治療研究分野）
8. 重症免疫不全 SCID ラットとその応用研究について 16:00-16:30  
真下知士（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）
9. レプチンノックアウトラットの開発とトランスレーショナルリサーチ 16:30-17:00  
海老原 健（京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科）
10. ノックアウトラットを用いた創薬研究への期待 17:00-17:30  
山本 智（武田薬品工業株式会社医薬研究本部生物研究所）

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. ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」の報告と展望

芹川忠夫

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

平成 14 年 7 月に第 1 期 NBRP-Rat (平成 14~18 年度) が発足した。今年度末に、第 2 期 NBRP-Rat (平成 19~23 年度) を終了する。この機会に、本プロジェクトを振り返り、成果と今後の展望について述べたい。

我が国においては、高血圧、糖尿病、てんかんなど、ヒト疾患の優れたモデルラットが世界に先駆けて開発されてきた。ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat) の発足にあたって、分散維持されている全てのラット系統を収集することを当初の目標にして、ラット系統を効果的に活用できる収集・保存・提供システムを構築し、それを運用するという本プロジェクトを開始した (Nature 2004 年 5 月 6 日号に紹介)。収集した主なラット系統については、ゲノムプロファイルと特性プロファイルを作製して、系統樹と共にユーザーフレンドリーなデータベースにて公開した。すると、サイエンス誌は研究目的に最適なラット系統を選択するには、NBRP-Rat を利用すべきだと紹介した (Choose your rat, Science 2005 年 7 月 15 日号)。また、増加するラット系統を確実に保存するため、生体維持に加えて胚および精子の超低温保存を進めた。その技術普及のために、「ラット胚・精子の超低温保存と個体復元マニュアル」(日本語版 DVD、2006 年) と、その英語版 DVD (2007 年) を作製してラットコミュニティーに配布した。Nature Genetics 誌のラットの特集 (2008 年 5 月号) においては、我々の標的遺伝子変異ラット作製用 ENU 誘発ラットミュータントアーカイブの開発、ラット遺伝解析のための SNP とハプロタイプマッピングなどの論文が含まれ、ラットコミュニティーの見解 (総説) と本誌の Year of the Rat というタイトルの論説には、NBRP-Rat が国際的に大きな貢献をしていることが紹介された。NBRP のゲノム情報等整備プログラムにおいて、F344/Stm と LE/Stm の BAC クロンを整備した。現在、F344/Stm の全ゲノムシーケンス解析が進行中である。この間、ラット ES 細胞と iPS 細胞の確立、さらには ES 細胞、ZFN あるいは TALEN 技術を用いた遺伝子ノックアウトラットの開発が報告されるようになった (Enter the rat (ラット時代に入る) Nature 2010 年 9 月 9 日号、Breakthrough of the year: Rats Redux (ラットの復古) Science 2010 年 12 月 17 日号を参照)。遺伝子改変ラットの急激な増加を想定して、NBRP 基盤技術整備プログラムにて「ラット精子に関する基盤技術の整備」の研究も進行中である。平成 23 年 11 月現在、寄託数は 634 系統に達し、提供件数は 800 件を超えた。

今後、NBRP-Rat を基盤にして、遺伝子改変ラット (疾患モデルラット) の開発、利用、研究、支援を担うラットリソースセンターが新設され、EU の EURATRANS (European large-scale functional genomics in the rat for translational research) プロジェクトや米国の RGD (Rat genome database) との国際連携を柱に、ラット研究が発展することを願っている。

## 2. 体外受精に利用可能なラット精子凍結法の開発

伊藤潤哉

麻布大学獣医学部動物応用科学科

近年、ES細胞[1]あるいはZinc Finger Nuclease[2]を用いたノックアウトラットが作製可能になったことから、今後ナショナルバイオリソースプロジェクト等において、それらの遺伝子改変ラットを遺伝資源として保存することがますます重要になると考えられる。通常それらの遺伝資源の保存は、精子あるいは胚の状態で液体窒素中にて保存し、体外受精および胚移植を介して個体へと復元される。ラットでは近年まで凍結精子を用いた体外受精技術が確立されていなかったことから、人工授精あるいは顕微授精により個体を作出してきた。

我々のグループはWistarラットを用い、凍結融解精子を3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)で処理することで、精子に受精能獲得を誘起させ、その結果体外受精率の著しい改善および産仔を作出することに成功した[3]。また、射出精子を凍結保存し、体外受精による産仔作出にも成功した[4]。現在、その体外受精技術の近交系への応用を目的として、Fischer 344 およびLong Evans等における凍結精子を用いた体外受精技術の確立やラット卵・胚を安定的に体外で操作可能な培養液の開発について検討を行っている。本研究会では、凍結融解精子を用いたラットにおける体外受精技術に関する我々の最新の知見を紹介する予定である。

1. Tong C, Li P, Wu NL, Yan Y, Ying QL. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 2010; 467: 211-213.
2. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X, Vincent A, Lam S, Michalkiewicz M, Schilling R, Foeckler J, Kalloway S, Weiler H, Ménoret S, Anegon I, Davis GD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jacob HJ, Buelow R. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 2009; 325: 433.
3. Seita Y, Sugio S, Ito J, Kashiwazaki N. Generation of live rats produced by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa. *Biol Reprod* 2009; 80: 503-510.
4. Seita Y, Fujiwara K, Takizawa A, Furukawa K, Inomata T, Ito J, Kashiwazaki N. Full-term development of rats from oocytes fertilized in vitro using cryopreserved ejaculated sperm. *Cryobiology* 2011; 63: 7-11.

### 3. 長期保存が可能なラット精子フリーズドライ法の開発

金子武人

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

フリーズドライ法は、インスタントコーヒーや宇宙食など食品加工や医薬品製造に汎用されている技術である。この技術は精子保存にも応用することが可能であり、従来の凍結保存法と比較すると以下の利点が挙げられる。

- ・ 特殊な保存液が不要 (TE buffer で保存可能)
- ・ 液体窒素タンクや定期的な液体窒素の購入・補充が不要 (4℃での保存)
- ・ 設備・維持費の大幅なコストダウンが可能
- ・ 保有サンプルの管理、バックアップが容易
- ・ ドライシッパー・ドライアイス不要の常温国際輸送が可能

このため、これまでに多くの動物種においてフリーズドライ精子保存法の開発に関する報告がされている。ラットにおいては、人工ヌクレアーゼである Zinc Finger Nuclease (ZFN) や Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) を用いた新規系統開発技術の発展により、系統数の増加が今後予想されることから遺伝資源の効率的保存法の確立が急務の課題となっている。また、上記の利点に加えてフリーズドライにより精子を保存することは、液体窒素やディープフリーザーで保存されている研究用サンプルと異なり、災害等により停電や液体窒素の供給が途絶えた時でも短期間の常温保存が可能である。

これらのことから、フリーズドライ法を新たな精子保存法として利用することが期待されており、実用化に向けた長期保存可能なラット精子フリーズドライ法の開発を現在行っている。

#### 4. ラット F344 系統の全ゲノムシーケンス解析

豊田 敦

大学共同利用機関法人情報・システム研究機構国立遺伝学研究所

ラットは、ヒトのモデル動物として生命科学のさまざまな研究分野において世界中で活用されている。また近年、ジンクフィンガーヌクレアーゼや ES 細胞を用いた遺伝子改変技術が確立され、これまで不可能であった遺伝子改変ラットが多数作製されている。これらの遺伝子改変技術に使用される系統としては、繁殖能力および適応能力が高い F344 系統がよく利用されているが、現在ゲノム情報が公開されている BN 系統とは遺伝的にかけ離れており、F344 系統のゲノム情報の早急な整備が求められている。

そこで、ナショナルバイオリソースプロジェクト・ゲノム情報等整備プログラムでは、BN 系統との遺伝的背景の違いを明らかにすることを目的として F344 系統の全ゲノムシーケンスおよび BN 系統のゲノム配列と大きく異なると推測される領域上にマップされた BAC クローンの全長シーケンスを実施した。本講演では、これまでに実施した BAC ライブラリーの作製および末端配列決定を含めた解析結果について報告する。

## 5. ラット ES 細胞および iPS 細胞の樹立とその応用

平林真澄

自然科学研究機構 生理学研究所行動・代謝分子解析センター

ラットはマウスに比べて体が大きいことから操作性に優れ、ライフサイクルもマウスのそれとほぼ変わらないので、ヒトの生理機能や疾患を研究するモデル動物として広く利用されてきた。ラットにおける一連の生殖工学関連技術（過剰排卵誘起、胚採取、胚移植、胚の凍結保存、体外受精、外来遺伝子導入など）はマウス並の高い完成度にあり、2004年には全ゲノム配列の解読（BN 系統）も完了した。ただ、2003年に報告された体細胞クローンラットの誕生については再現性が確認されておらず、ES 細胞株の樹立方法も未開発だったので、ノックアウト（KO）ラットを利用した研究は遅々として進まなかった。しかし 2008年、ラットの ES 細胞株ならびに iPS 細胞株の樹立が報告され、2010年には p53 遺伝子 KO ラットの作製も実証された。

我々の研究室でもラット ES/iPS 細胞を樹立することに成功し、ラットにおける逆遺伝学的研究を推進する準備を整えている。一般的に KO 動物を作製する際、相同遺伝子組み換えによって目的の遺伝子を破壊した ES/iPS 細胞を作製し、キメラ動物（F0 世代）を介して生殖寄与個体（F1 世代）を獲得し、さらにヘテロ個体同志を交配することによってホモ KO 個体（F2 世代）を作製している。このプロセスの時間短縮には、マウスで実証されているように、ES 細胞を 4 倍体胚に導入することにより F0 世代で 100%、ES/iPS 細胞に由来するヘテロ個体を作製する技術（4 倍体補完法）が有望そうである。

本講演ではまず「ラット ES/iPS 細胞株の樹立法」と「4 倍体胚補完による ES 細胞由来個体作製の試み」について紹介する。そして次に、ラット ES 細胞応用の実例として「Rosa26 ノックインラットの作製」についてお話しする。

## 6. ラット遺伝子改変技術としての ZFN/TALEN の開発

山本 卓

広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻

近年、様々な生物種において標的遺伝子を改変する技術として、人工ヌクレアーゼ(Zinc Finger Nucleases: ZFNs や Transcription Activator-like Effector Nucleases: TALENs)を利用した“ゲノム編集”が注目されている。人工ヌクレアーゼは、DNA に特異的に結合するドメインと、制限酵素の DNA 切断ドメインを連結させたキメラタンパク質である。2つの人工ヌクレアーゼが近接する標的配列に結合すると2量体を形成し、2本鎖 DNA を切断する。切断された DNA は、相同組換えあるいは非相同末端連結により修復されるが、この時に目的の遺伝子を改変することが可能となる。標的配列の選択が可能であることから次世代のノックアウト技術として注目され、ゼブラフィッシュ、マウス、ラットなどの動物やシロイヌナズナなどの植物、哺乳類培養細胞 (ES 細胞、iPS 細胞を含む) において成功例が報告されている(Urnov et al., 2010)。しかしながら、ZFN や TALEN が特定の企業の受託合成に頼っており、作製に高額な費用を要することから、広く利用されるに至っていない。

我々は、オープンリソースを利用した大腸菌の one-hybrid スクリーニングとヒト培養細胞での SSA アッセイを組み合わせた機能的 ZFN の選別法を確立してきた(Ochiai et al., 2010)。独自に作製した ZFN を用いて、生物個体 (コオロギ、ウニ、カエル) に変異導入できること、さらにはレポーター遺伝子を挿入し、内在遺伝子のリアルタイムモニタリングの可能なことを証明した。しかし依然として ZFN の作製には労力を必要とし、さらなる改善が求められていた。このような状況の中、昨年からは TALEN 作製キット (Golden Gate) が入手可能となり、TALEN を利用したラットやゼブラフィッシュでの遺伝子破壊が報告されている(Tesson et al., 2011)。本講演では、ラットでの遺伝子改変を目的として我々が行ってきた TALEN の作製方法の改良と高活性型 TALEN の作製について紹介し、TALEN の有効性について議論したい。

Urnov, F.D., Rebar, E.J., Holmes, M.C., Zhang, H.S. and Gregory. P.D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* 11(9): 636-646 (2010)

Ochiai, H., Fujita, K., Suzuki, K., Nishikawa, M., Shibata, T., Sakamoto, N. and Yamamoto, T. Targeted mutagenesis in the sea urchin embryo using zinc-finger nucleases. *Genes Cells* 15(8): 875-885 (2010)

Tesson L, Usal C, Ménoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, Santiago Y, Vincent AI, Meng X, Zhang L, Gregory PD, Anegon I, Cost GJ. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol.* 29(8):695-696 (2011)

## 7. ラット ES 細胞を利用した応用研究

川又理樹

国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野

ラットは過去 100 年、がんをはじめとした様々なヒト疾患のモデルとして研究され、現在までに膨大な研究資産が蓄積されてきた。しかしその一方で、マウスとは異なりラット ES 細胞の樹立は極めて困難であり、ノックアウトラット個体での遺伝子機能解析は殆ど行われてこなかった。2008 年にジャームライントランスミッション可能な真の ES 細胞が樹立されたが、長期培養による染色体異常が原因で安定的なノックアウトラットの作製は現在でも困難とされている。我々は 20%の血清を含むマウス培地に 4 つのシグナルインヒビターを加えた YPAC 培地を開発し、2010 年にトランスジェニックラットを作製することに成功した<sup>1</sup>。この ES 細胞は長期培養を経ても染色体は安定であり、我々は現在までに 5 系統のトランスジェニックラットと、1 系統のノックアウトラットの作製を完了している。

ES 細胞はノックアウト・ノックイン動物を作製する際の有用なツールであるが、作製までの時間が非常に長く、且つ、確実に作製できるという保証もない。ES 細胞に変わる技術として Zinc-Finger nuclease (ZFN)が開発され、1 細胞期胚で直接ノックアウトのみならずノックインも可能となり、非常に短期間での改変動物作製が可能となった。ノックアウト動物を作る目的としての ES 細胞の価値が低くなる中で、我々は今回 ES 細胞を用いた新たなノックアウト技術の開発に成功した。この方法を用いると ZFN 法よりも迅速に作製できるのみならず、通常のノックアウト法では見出すことの出来なかった新規表現型を導き出せることが判明した。今回ターゲットとした遺伝子はがん抑制遺伝子 p53 であるが、新規ノックアウト法による改変ラットにおいて p53 が胚の発生に必須であることが証明された。以上の点において、本研究会ではラット ES 細胞を如何に応用研究に発展させていく事が出来るか、そしてラットの有用性についても発表したい。

<sup>1</sup> Kawamata M & Ochiya T, (2010) *PNAS* 107: 14223-8

## 8. 重症免疫不全 SCID ラットとその応用研究について

真下知士

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

実験用ラットは、古くから医学、薬学、生物学、栄養学、行動学、心理学などの幅広い分野で利用されてきた。遺伝的基盤と環境的基盤を厳格に制御して実験を行うことができ、さらに、マウスより 10 倍ほど大きいいため、生理実験、外科的処置実験、移植実験、脳研究などにもよく利用される。

近年、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) や TALE ヌクレアーゼ (TALEN) という人工ヌクレアーゼを利用することで、ES 細胞を使うよりも短時間で効率的に遺伝子可変動物を作製することが可能となった。ZFN/TALEN は、あらゆる系統に利用することができるため、従来の疾患モデルラットに対して、遺伝子を破壊してさらに病気を起こしたり、逆に遺伝子を改変することで病気を治すことが可能となる。本研究会では、ZFN 技術を利用して開発した重症免疫不全 (SCID) ラットについて報告する。特に、SCID ラットに認められた矮小、繊維芽細胞の増殖率低下など SCID マウスとは異なる表現型について議論したい。さらには、SCID ラットにヒト細胞・組織等を移植したヒト化ラットについても紹介する。

現在、ラットでは、ZFN/TALEN 技術を利用して、循環器疾患、糖尿病、がん、脳神経疾患などのモデルが、多数作製されている。さらに、SCID ラットは、基礎・臨床医学研究、幹細胞移植研究、創薬研究等に有用なモデルになると期待している。

## 9. レプチンノックアウトラットの開発とトランスレーショナルリサーチ

海老原 健<sup>1,2</sup>、阿部 恵<sup>1,2</sup>、中尾一和<sup>2</sup>

1. 京都大学医学部附属病院探索医療センター

2. 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科

我々はこれまでに、脂肪細胞由来ホルモンであるレプチンが肝臓において高発現するレプチン過剰発現トランスジェニック (LepTg) マウスを作製し、その解析を通してレプチンのインスリン感受性亢進作用および脂質代謝促進作用を明らかにしてきた(Diabetes 48: 1882, 2009、Am J Physiol 280: E334, 2001)。また LepTg マウスと脂肪萎縮性糖尿病モデルマウスである A-ZIP/F-1 マウスを交配することにより、脂肪萎縮性糖尿病のインスリン抵抗性はレプチン欠乏が主な原因であり、レプチンが脂肪萎縮性糖尿病治療薬として有用であることを示した(Diabetes 50: 1440, 2001)。しかしながら、マウスにおいて骨格筋特異的にインスリン受容体をノックアウトしたマウスでは耐糖能異常を来さないことや、A-ZIP/F-1 マウスに PPAR $\gamma$  アゴニストを投与すると血中中性脂肪が低下する一方で脂肪肝が増悪するなどヒト脂肪萎縮症では観察されない現象がマウスモデルを用いた検討で報告されている(Mol Cell 2: 559, 1998、J Clin Invest 106: 1221, 2000)。これらの事実は、マウスモデルを用いて得られた知見をヒトの病態生理に外挿する際には他の動物種でも検討する必要性があることを示している。一方、ラットでは糖取り込みにおける骨格筋の比重がよりヒトに近く、肝臓における PPAR $\gamma$  の発現様式もヒトに類似していることから、ヒトの糖脂質代謝調節機構の解明にはラット疾患モデルが有用である可能性が考えられる。

一方、レプチンは 1994 年にポジショナルクローニング法を用いて遺伝性肥満マウス *ob/ob* マウスの原因遺伝子産物として同定され、以来、*ob/ob* マウスを中心にレプチンの研究が進められてきたが、これまでにレプチン欠損ラットは存在しなかった。しかし、京都大学医学部動物実験施設で開発された新規 DNA スクリーニング法 (MuT-POWER) と凍結精子アーカイブからの個体復元技術 (ICSI) を利用した ENU ミュータジェネシスによる標的遺伝子変異ラットの効率的な作製システムを用いて、レプチン遺伝子にナンセンス変異を有する事実上のレプチンノックアウトラット *Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* ラットの開発に成功した。

本研究会では、*Lep<sup>mkyo</sup>/Lep<sup>mkyo</sup>* ラットの解析を通して得られた知見をもとに、糖脂質代謝領域におけるモデルラットの有用性について述べる予定である。

## 10. ノックアウトラットを用いた創薬研究への期待

山本 智

武田薬品工業株式会社医薬研究本部生物研究所

2008から2010年にかけて遺伝子欠損 (knockout, KO) ラットの作製に繋がる多くの革新的な技術が開発された。その一つが、GSK-3阻害剤およびMEK阻害剤を含む培地 (2i medium) を用いた生殖系列移行可能なラット胚性幹細胞 (embryonic stem cell, ES細胞) の培養技術の確立である。本研究において、我々は、新たな病態モデルラットを作製する方法論を確立するため、Dark Agouti (DA) ラット由来胚盤胞から2i mediumを用いてES細胞を樹立し、それらの遺伝子ターゲティングにより試験的に遺伝子欠損ラットを作製したので報告する。樹立したラットES細胞はES細胞特有の遺伝子 (*Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Rex1*) を発現するとともに、未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性を有し、マウスES細胞の分化誘導条件下で心筋へと分化した。さらに、Sprague-Dawley (SD) ラットより取得した胚盤胞へ注入し、生殖系列移行能を有したキメララットを取得した。このES細胞に、CAGプロモーター制御下のネオマイシン耐性遺伝子を有するprotease-activated receptor-2遺伝子 (*Par-2*) ターゲティングベクターを導入し、7日間の薬剤選択後、489クローンの薬剤耐性ES細胞コロニーを取得した。PCRによる遺伝子型判定とqPCR分析により、3クローンの相同組換えES細胞株を同定した (相同組換え効率 0.6%)。これらのES細胞株から作製したキメララットから*Par-2*欠損アレルを有する産仔 (*Par-2<sup>Δ/Δ</sup>*) を取得し、続いて、*Par-2<sup>Δ/Δ</sup>*ラット同士の交配によりホモ欠損 (*Par-2<sup>Δ/Δ</sup>*) ラットを取得した。*Par-2<sup>Δ/Δ</sup>*ラットは、*Par-2*発現が欠損しており、また、機能的にも摘出大動脈におけるPAR-2を介した弛緩反応が消失していた。これらの成績は、2i mediumを用いて樹立したラットES細胞が、相同組換え後も未分化状態を維持し、生殖系列に分化する能力を備えていることを明らかにするとともに、新たに樹立したラットES細胞から遺伝子欠損ラットを作製する方法論が確立されたことを示す。ラットはマウスにはない利点を有していることから生物医学研究において広く使用されており、今後、ラットにおける遺伝子ターゲティング技術はヒトの病態研究や薬剤開発に大きく貢献するものと考えられる。

