



ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」

# 第8回ラットリソースリサーチ研究会

## 講演抄録集

平成27年1月23日（金） 13:00 – 17:30

京都大学 百周年時計台記念館





## 第8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（信州大学学術研究院先鋭領域融合群バイオメディカル研究所  
先端疾患予防医学部門）

吉木 淳（理化学研究所筑波研究所バイオリソースセンター  
実験動物開発室）

#### ラットリソース

1. 第3期ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」 13:00－13:30  
中間報告  
庫本 高志（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）
2. 大規模トキシコゲミクスデータベースを活用した安全性バイオ 13:30－14:00  
マーカー探索  
山田 弘（独立行政法人医薬基盤研究所創薬基盤研究部）
3. ウイルスベクターを利用した遺伝子デリバリー 14:00－14:30  
小林 憲太  
（生理学研究所脳機能計測・支援センターウイルスベクター開発室）
4. ラットにおける生殖工学技術の展開 14:30－15:00  
金子 武人（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）

休憩 15:00－15:30

## 第2部

座長： 押村 光雄（鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医科学専攻生体機能医  
工学講座）

横井 伯英（神戸大学大学院医学研究科分子代謝医学）

### ラットリサーチ

5. CRISPR/Cas system を用いたジストロフィン遺伝子変異 15:30－16:00  
ラット作製  
中村 克行、山内 啓太郎（東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学）
6. ヒト肝細胞を担持するキメラ非ヒト動物 16:00－16:30  
立野 知世（株式会社フェニックスバイオ）
7. ミエリン形成不全の新たな原因遺伝子 Dopey1 16:30－17:00  
桑村 充（大阪府立大学生命環境科学研究科獣医学専攻）
8. 環境ストレスから生命を守る体温調節システム 17:00－17:30  
中村 和弘（京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニット）

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. 第3期ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」中間報告

庫本 高志

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

NBRP-Rat は、第1期(平成14年～18年度)、第2期(平成19年度～23年度)を経て、世界最高水準のリソースセンターとなった。第3期(平成24年度～28年度)では、NBRP-Rat のさらなる体制整備を行い、ラットに関する世界最高水準のリソースセンターとしての地位を強化することを目標としている。具体的には、1)収集・保存・提供事業の着実な推進、2)系統データベースの充実、3)リソースの品質保証の高度化、4)研究会の開催によるコミュニティの活性化、5)生殖工学に関する技術提供、などを目標としている。それぞれの項目について、着実に目標が達成されており、第3期NBRP の中間評価では、NBRP-Rat で得られた成果は「優れた水準に達している」と評価された(『ナショナルバイオリソースプロジェクトの評価報告書』ナショナルバイオリソースプロジェクト評価委員会、平成26年8月)。

また、平成26年8月には、NBRP 推進委員会と文部科学省による現場訪問(サイトビジット)を受けた。このサイトビジットでは、NBRP-Rat におけるリソースの整備状況を説明し、今後の展望について意見交換を行った。

本研究会では、第3期NBRP-Rat の収集・保存・提供事業の成果に加え、中間評価ならびにサイトビジットの概要を報告する。また、リソースの遺伝学的、微生物学的品質管理について報告する。さらに、研究支援の状況についてその内容と実績を紹介する。

MEMO

## 2. 大規模トキシコゲミクスデータベースを活用した安全性バイオマーカー探索

山田 弘

独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部

“トキシコゲノミクス”はゲノム解析技術を応用した毒性学研究である。当初は主に遺伝子発現プロファイルを研究の対象としていたが、最近ではゲノム全体の構造や機能等にも着目し、それらの解析を実現するゲノム解析技術も応用した毒性学研究として、以前より幅広く捉えられるようになってきている。この場合、従来の遺伝子発現プロファイルに基づく毒性学研究は、トキシコトランスクリプトミクスと呼ばれることになる。また、他のオミクス技術（プロテオミクス、メタボロミクスなど）と融合したマルチオミクスのアプローチも盛んに用いられるようになってきている。

医薬品の重篤な副作用発現は国民の保健と福祉を脅かすとともに、製薬企業の経営に重大な影響を与える要因ともなりうる。一方で、依然として臨床試験中あるいは上市後に予期せぬ副作用が発生し、開発を断念あるいは市場から撤退する医薬品が後を絶たない。従って、医薬品のヒトでの安全性を精度よく予測および診断する新しい測定法、技術およびバイオマーカー等の開発が急務となっており、それによりトキシコゲノミクス研究の発展に対する期待も大きい。安全性研究分野においてトキシコゲノミクス技術の導入に期待されることとして、毒性メカニズムの解明、新規バイオマーカーの開発、そして病理組織学検査にみられるような主観的な評価に対してより客観性を持たせることなどが挙げられ、1990年代後半より医薬品開発現場への導入が進んだ。これらの企業サイドでの動きに呼応するように国レベルでの活動も始まり、本邦では、2002年度から国立医薬品食品衛生研究所が主体となり（2005年度より独立行政法人 医薬基盤研究所が主体）、多くの国内製薬企業が参加するトキシコゲノミクス研究に関わるコンソーシアム（トキシコゲノミクスプロジェクト）が設立され、産官学が連携した研究が精力的に進められてきた。トキシコゲノミクスプロジェクトでは、様々な研究活動を通して大規模トキシコゲノミクスデータベースを構築および公開（[http:// toxico.nibio.go.jp/](http://toxico.nibio.go.jp/)）するとともに、当データベースを活用して36種の肝毒性あるいは腎毒性に係るバイオマーカーの特定を達成した。

本講演では、トキシコゲノミクスプロジェクトで特定された幾つかの安全性バイオマーカーを紹介するとともに、当該研究領域の将来像について考察する。

MEMO

### 3. ウイルスベクターを利用した遺伝子デリバリー

小林 憲太

生理学研究所脳機能計測・支援センターウイルスベクター開発室

遺伝子の生理機能を解析するための強力なツールとして、トランスジェニック法やジーンターゲット法が知られている。これらの手法は、確かに非常に画期的であるが、例えば、霊長類を利用した研究に適用するにはまだ問題が多いのが現状である。我々は、齧歯類から霊長類まで広範なモデル動物に適用出来る遺伝子導入ツールとして、ウイルスベクターに着目した。特に、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターやレンチウイルスベクターは、1）分裂細胞のみならず非分裂細胞にも遺伝子発現の誘導が可能、2）導入遺伝子の長期的かつ安定な発現、3）AAV ベクターの場合は生体に対する毒性が認められない、などの利点を有する。高次脳機能は複雑な神経回路網によって制御されており、その機能を解明するには、ある特定の神経路が持つ役割を一つずつ詳細に解析して行かなくてはならない。そのためには、特定神経路に導入遺伝子を発現誘導出来る新たな技術を開発する必要がある。最近、我々は、げっ歯類と霊長類の中樞神経系において、軸索の末端より感染して細胞体へと逆行性に輸送されてから導入遺伝子を発現する改良型レンチウイルスベクター（高頻度逆行性遺伝子導入ベクター）の開発に成功した。この高頻度逆行性遺伝子導入ベクターや、高頻度逆行性遺伝子導入ベクターと AAV ベクターを組み合わせた新しい遺伝子導入システムを利用することによって、特定神経路の機能を詳細に解析することが可能となった。本講演では、様々な生理機能を解析するための有用な遺伝子導入ツールとなり得る AAV ベクターとレンチウイルスベクターに関して概説すると共に、高頻度逆行性遺伝子導入ベクターを利用した最新の研究例を紹介する。

MEMO

## 4. ラットにおける生殖工学技術の展開

金子 武人

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

これまでラットは、自然突然変異個体の近交化あるいは外来遺伝子を受精卵に導入する方法で多くの新規系統を作出してきた。近年では、ゲノム編集技術の発展により、ラットにおいてもこれまで作製が困難であったノックアウト・ノックイン系統も短期間で容易に作製できるようになった。我々の研究室においても、ZFN、TALEN、CRISPR-Cas システムといったゲノム編集技術を用いて遺伝子改変ラットの作製に成功しており、自身の研究および共同研究のための遺伝子改変ラットの作製・支援を行っている。

ゲノム編集技術の発展およびラットへの応用から、今後増加する新規系統を遺伝資源として効率的に保存・提供することは、バイオリソース事業において重要な課題である。生殖工学技術は、これら新規系統の作製および保存に貢献する不可欠な技術であり、効率向上のための更なる技術改良および新規技術の開発が求められている。

ここでは、ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変ラットの作製の現状および以下に示す我々が開発した遺伝子改変ラットの作製や系統保存に応用することのできる最新の生殖工学技術について紹介する。

### 1. テイク (TAKE) 法

遺伝子改変ラットは、「マイクロマニピュレーター」と呼ばれる特殊な機械および熟練した技術を用いて、受精卵に遺伝子を導入することで作製されていたが、これらを必要としないエレクトロポレーション法による簡易な遺伝子改変ラット作製法

### 2. フリーズドライ精子保存法

液体窒素の利用が不可欠であった精子保存において、液体窒素を必要としない冷蔵庫 (4℃) での長期保存および常温での国際航空輸送が可能な「簡易・安全・低コスト」の系統保存法

これらの技術が、遺伝子改変動物を用いた研究の基盤を支え、その推進に貢献できることを期待している。

MEMO

## 5. CRISPR/Cas system を用いたジストロフィン遺伝子変異ラットの作製

中村 克行、山内 啓太郎

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学研究室

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は X 染色体上に存在するジストロフィン遺伝子の変異に起因するヒトの遺伝性疾患で、新生男児のおおよそ 3000 人に一人の割合で発症する重篤な疾患である。DMD では、筋線維の安定性を担うジストロフィンタンパク質が欠損することで筋線維が脆弱化する。これにより DMD 患者は幼少期より筋力の低下や運動不全を呈し、年齢を重ねるごとに横隔膜や心筋にまで病変が及び、最終的に呼吸器機能低下や心不全を招く。DMD に対する治療法開発においては、mdx マウスや cxmd イヌといったモデル動物がこれまで広く用いられてきたが、mdx マウスでは表現型がヒト DMD に比べて軽度であること、一方 cxmd イヌでは症状は重篤であるものの、そのコロニーを維持するために多大な労力を要することがそれぞれ課題となっている。そこで本研究では遺伝子改変技術である CRISPR/Cas system を用い、新たな DMD 疾患モデル動物としてジストロフィン変異ラットを作出しその有用性を検討した。

CRISPR/Cas system によりジストロフィン遺伝子のエクソン 3 および 16 に変異を導入した結果、F0 世代においてジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異、in-frame 変異をそれぞれ持つラットの作出に成功した。ジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を持つオスラットでは骨格筋におけるジストロフィンタンパク質の発現が欠損しており、筋線維の壊死や間質における線維化の亢進といった重篤な病態を示した。また横隔膜や心筋においても筋線維の壊死や炎症細胞の浸潤がみられた。この変異は次世代へと伝わるものであり、F1 世代においても骨格筋での筋線維の壊死像が観察された。以上の知見は、ジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を持つラットがヒト DMD の病態をよく反映した DMD 疾患モデルラットであることを示すものである。本研究会ではこれに加えて、最近得られた、in-frame 変異を持つラットの解析結果についても紹介したい。これらヒトの病態に近い表現型を示すジストロフィン変異ラットが、筋ジストロフィー治療法を開発する上で有用なツールとなることが期待される。

MEMO

## 6. ヒト肝細胞を担持するキメラ非ヒト動物

立野 知世

株式会社フェニックスバイオ

実験動物とヒトにおける薬物代謝酵素や薬効に関与するタンパク質等の種差により、実験動物を用いた薬効試験や安全性試験の結果と、臨床試験での結果が異なることがある。そのため、医薬品開発のかなり進んだ段階で開発中止となったり、場合によっては、安全性の問題から上市後に販売中止となることもある。また、B型、C型肝炎ウィルス（HBV, HCV）のように、ヒトとチンパンジーにしか感染しないウィルスもあるが、最近では動物愛護の観点から、新薬の薬効試験にチンパンジーを用いた実験はほとんど行われなくなった。このような問題を解決するため、我々は、urokinase-type plasminogen activator transgenic/severe combined immunodeficiency (uPA/SCID)マウスにヒト肝細胞を移植することにより、マウス肝臓がヒト肝細胞で置換された「ヒト肝細胞キメラマウス（キメラマウス）」を作製した。現在、このキメラマウスは、HBVやHCVに容易に感染するため、抗HBVやHCV候補薬の薬効試験や、新薬のヒトにおける薬物動態を予測するための試験や安全性試験などに利用されている。

マウスは体が小さいため、採血量などが限られることや、各種手術も容易ではない。また、ラットを用いた様々な化学物質の投与データの蓄積は、マウスに比べてはるかに多い。これらのことから、我々は「ヒト肝細胞キメララット（キメララット）」の作製を試みている。キメララットを作製するためには、肝細胞の増殖刺激、肝細胞増殖障害、免疫不全が必要である。免疫不全ラットとして、真下らが作製した F344-Prkdc<sup>tm2Kyo</sup>Il2rg<sup>tm6Kyo</sup> (FSG) ラットを用いた。肝細胞の増殖刺激に関しては、肝細胞の増殖が旺盛な2週令のラットを用い、Retrorsineを投与することにより肝細胞増殖抑制障害を誘導した。2週令のFSGラットにRetrorsineを投与後、ヒト肝細胞を脾臓経由で移植した。移植後は定期的に血液を採取し、ヒト肝細胞の生着・増殖を確認する目的で血中のヒトアルブミン (hAlb) 濃度を測定した。これらの個体は状態不良のために15週令以上の飼育は出来なかったものの、hAlb値は最高で1 mg/mLを超えた。最も高いhAlb値を示した個体の肝臓について、ヒトサイトケラチン (hCK) 8/18抗体を用いた免疫染色を行ったところ、ホストラット肝臓へのヒト細胞の生着が確認され、その置換率はおよそ40%であった。

これらの結果から、マウスと同様、ラットに免疫不全、肝細胞増殖刺激、肝細胞増殖障害を与えると、ラット肝臓にヒト肝細胞が生着・増殖することが確認できた。現在、キメララットのホスト動物として、さらに適した肝障害を持つ遺伝子改変ラットの作製を行っている。

MEMO

## 7. ミエリン形成不全の新たな原因遺伝子 Dopey1

桑村 充

大阪府立大学大学院獣医病理学教室

ミエリン（髄鞘）は神経細胞の軸索を取り巻いて絶縁体として働き、神経系の情報伝達の手度と精度を決定付ける重要な組織である。ヒトの多発性硬化症をはじめとするミエリン疾患の多くは難治性疾患であり、ミエリンに異常を有するミュータント動物は、ミエリン疾患のメカニズムを解明する上で有用なモデル動物となっている。VF（vacuole formation）ラットは、全身の振戦症状を示す常染色体劣性ミュータントラットであり、振戦症状は生後 4～8 週齢をピークとしてその後は軽減するというユニークな発症パターンを特徴とする。本研究では、VF ラットのミエリン病変の詳細な病態解析を行うとともに、原因遺伝子を同定し、その機能を明らかにすることを目的とした。

2, 4, 10, 20 週齢のホモ型ラットおよび非発症の対照ラットの脊髄を採材し、経時的な推移を含めた中枢神経系病変の検討を行った。ホモ型ラットの脊髄白質では、ミエリン低形成と軸索周囲の異常な空胞形成が観察された。空胞病変は 2 週齢から形成され始め、4 週齢において最も顕著となったが、その後は減少し 20 週齢頃には消失した。

ミエリン構成蛋白である PLP と MAG は、対照ラットでは主にミエリンに発現していたが、ホモ型ラットではこれらのミエリン構成蛋白がオリゴデンドロサイト(OL)の細胞体、特にゴルジ装置に異常蓄積し、ゴルジ装置が著しく拡張していた。10 週齢以降のホモ型ラットでは、小型で細胞突起の乏しい未分化な OL が認められ、OL の成熟異常が示唆された。

遺伝子解析の結果、ラット第 8 番染色体上の候補遺伝子のうち、ホモ型ラットにおいて顕著な発現低下が認められた Dopey1 において、ナンセンス変異を発見した。DOPEY1 蛋白に対する抗体を用いて、免疫組織化学法、免疫電子顕微鏡法を行ったところ、正常ラットでは、DOPEY1 蛋白は主に神経細胞、オリゴデンドロサイト前駆細胞と成熟 OL の細胞質に発現していた。また、DOPEY1 はゴルジ装置とエンドソームに局在することを示した。一方、ホモ型ラットでは DOPEY1 発現細胞は認められなかった。

以上の結果から、VF ラットでは、Dopey1 でのナンセンス変異により DOPEY1 蛋白の発現が欠失していることを明らかにした。また、Dopey1 が、ミエリン形成時の細胞内輸送や、神経細胞・軸索と OL 間の相互作用において重要な役割を演じる可能性を示した。

MEMO

## 8. 環境ストレスから生命を守る体温調節システム

中村 和弘

京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニット

科学技術振興機構 さきがけ

ヒトを含めた恒温動物において、体温の調節は生命維持に関わる最も重要な生体機能の一つである。体温調節のための生体反応としては、積極的な熱産生や熱放散の調節が挙げられるが、中でも褐色脂肪組織における交感神経性の代謝熱産生は、齧歯類やヒト乳幼児のみならず、成人でも寒冷環境での体温維持や、エネルギー消費亢進を通じた肥満防止に機能することがわかってきた。この褐色脂肪の熱産生を含めた体温調節反応は脳内の神経回路システムが発する指令によって惹起・調節される。本講演では褐色脂肪組織に注目し、寒冷ストレスのみならず、感染、心理ストレス、飢餓など様々な環境ストレスから生命を守るために褐色脂肪へ熱産生を指令する脳内の神経回路メカニズムについて解説する。

私達の研究グループではラットを用いた *in vivo* 生理実験系を構築し、褐色脂肪組織の交感神経活動や体温、血圧、脈拍などの変化を同時に計測することによって、寒冷刺激を受けた際に体温を維持するための褐色脂肪熱産生を惹起する中枢神経回路のメカニズムを解明してきた。興味深いことに、この神経回路は感染ストレスを受けた際にも駆動され、強い褐色脂肪熱産生を惹起することで、病原体から生命を守る生体防御反応である発熱 (fever) を起こすことがわかった。また、心理ストレスを受けたときに生じる体温上昇は、身体パフォーマンスを上げて生命の危機となるストレス状況を切り抜ける手段となるが、私達は、その体温上昇に寄与する褐色脂肪熱産生を駆動する仕組みを報告した。さらに、最近、飢餓ストレスを受けて褐色脂肪熱産生を抑制する仕組みがあることも見出し、現在、その詳細を解析中である。

このような研究から、中枢の体温調節システムは生体内の温熱恒常性の維持に機能するだけでなく、様々な環境ストレスから生命を守ることに寄与する重要な仕組みであるであることが明らかとなってきた。

MEMO