



ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」

第9回ラットリソースリサーチ研究会

講演抄録集

平成28年1月29日（金） 13:00 – 17:30

京都大学医学部 芝蘭会館 稲盛ホール



第9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）

庫本 高志（京都大学大学院 医学研究科附属動物実験施設）

ラットリソース

1. イマミチラットクローズドコロニーに由来する変異系統の解析 13:00-13:30
鈴木 浩悦
（日本獣医生命科学大学 獣医生理学研究室）
2. 様々な遺伝子変異を有する LEA ラットの有用性 13:30-14:00
岡村 匡史
（国立研究開発法人国立国際医療研究センター研究所 動物実験施設）
3. ラットゲノム解析のためのターゲットキャプチャキットの
開発とその応用 14:00-14:30
須山 幹太
（九州大学生体防御医学研究所 情報生物学分野）
4. 第4期ナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）に向けて 14:30-15:00
小幡 裕一
（理化学研究所 バイオリソースセンター）

休憩 15:00-15:30

第2部

座長：柳川 右千夫（群馬大学大学院 医学系研究科 遺伝発達行動学分野）
横井 伯英（神戸大学大学院 医学研究科 分子代謝医学部門）

ラットリサーチ

5. マウス↔ラット異種キメラが導く応用研究の可能性 15:30-16:00
磯谷 綾子
(大阪大学免疫学フロンティア研究センター 感染動物実験施設)
6. Tremor ラットを用いた本態性振戦の病態、薬理研究 16:00-16:30
大野 行弘
(大阪薬科大学 薬品作用解析学研究室)
7. ラットの記憶・学習の行動学的解析：海馬と関連皮質の役割 16:30-17:00
一谷 幸男
(筑波大学 人間総合科学研究科 行動神経科学研究室)
8. 精神疾患と動物モデル –有用性と問題点 17:00-17:30
廣瀬 毅
(大塚製薬株式会社 Qs'研究所 精神疾患ユニット)

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. イマミチラットクローズドコロニーに由来する変異系統の解析

鈴木浩悦

日本獣医生命科学大学 獣医学部獣医学科

基礎獣医学部門形態機能学分野 獣医生理学研究室

1938年にウイスター研究所から3対のラットが東京大学農学部家畜生理学教室に導入された。その後、1957年に日本獣医畜産大学（現在の日本獣医生命科学大学）に導入された2匹の雄と10匹の雌を創始動物として、1996年までウイスターイマミチラット原種クローズドコロニーとして維持された。当初内分泌学研究に適した生理学的特徴の向上と固定を目的として育種改良がなされ、1980年以降は近交化を抑えて原種コロニーを維持する一方で、コロニーで見出される様々な劣性形質の突然変異が分離・固定され、それらの病態発生在解析された。

精巣形成不全症（HGN）は胎生後期から生後初期のセルトリ細胞の異常分裂により精細管の成長が阻害され、減数分裂開始前に生殖細胞の多くが脱落し、精巣原発性の不妊となる。雌では卵母細胞の数が少なく早期不妊症を呈する。腎臓は低形成でネフロン数が少なく、進行性に慢性腎臓病を発症する。原因遺伝子はHeLa細胞において有糸分裂中期の進行において役割を果たす微小管結合タキシン *Astrin* であり、同ラットでは *Astrin* 遺伝子の第7エクソンに25塩基の挿入がある。セルトリ細胞で見られる異常分裂は *Astrin* の紡錘体微小管結合蛋白質としての機能の喪失に基づくものと考えられるが、発生期の腎臓で異常分裂像が観察されないため、腎低形成症は *Astrin* の別の機能に関連する可能性がある。骨軟骨形成異常症（OCD）は全身性皮下水腫、四肢短縮、突舌、口蓋裂などを呈して呼吸困難で出生直後に死亡する。胎齢16.5日から皮下水腫と軟骨の形成障害が顕著となる。原因遺伝子は細胞内小胞輸送に関わる *Giantin* であり、OCDでは同遺伝子の第13エクソンに10塩基の挿入が見られ、膜アンカー配列のほとんどを欠くため、正常なタンパク質は検出されない。発症ラットの表現型が部分的にアグリカン変異マウスと類似しているため、アグリカンなどの細胞外基質の合成分泌に障害があることが想定される。てんかんを伴う致死性矮小症（LDE）は生後早期から矮小、てんかん、歩行異常などを示し、早期に死亡する。組織学的に海馬と扁桃体に空胞が見られ、てんかんは高周波で誘発できる（聴原性てんかん）。原因遺伝子は染色体脆弱部位に存在する抗腫瘍因子の *WWOX* であり、*WWOX* の第9エクソンに13塩基の欠失があり、C末端に異常な配列が付加される結果、正常なタンパク質は検出されない。*WWOX* の欠失が腫瘍の発生と関連することが報告されているが、LDEラットで腫瘍の高発は見られない。最近になって、人で *WWOX* の変異が精神遅滞や小児てんかんの発生と関わることを報告され注目を集めている。LDEでは、特に髄鞘の形成が障害されており、オリゴデンドロサイトの分化・成熟の異常が神経病態に関連している可能性がある。半致死性矮小症（PET）は、胸腺の低形成を伴う矮小症であり、HGN系統から分離された野生型正常系統において新たに発見された突然変異である。転写調節因子 *Thap4* 遺伝子の第2エクソンに2塩基の欠失が認められ、*Thap4* 蛋白質の70%以上が失われる。*Thap4* の機能については現在までのところほとんど報告がない。

ウイスターイマミチラット原種コロニーにおいて見出された突然変異はいずれも 10 塩基以上の挿入や欠失であったが、由来を同じくする他のウイスター系統で同様の突然変異は報告されていない。非常に低い頻度の自然発症突然変異が同一コロニーで複数見出された理由は定かではないが、出生直後からの個体管理による各種データの採取が異常動物の検出率を上げていた可能性がある。また、これらの系統の原因遺伝子については、ノックアウトマウスが存在しないか (*Giantin*、*Thap4*)、存在していたとしても表現型が現れないか (*Astrin*)、ノックアウトマウスで報告されていない表現型が見出された (*WWOX*)。相同遺伝子の突然変異であってもノックアウトマウスと必ずしも表現型が一致せず、突然変異ラットの有用性を示唆する事例であると思われる。

MEMO

2. 様々な変異を有する LEA ラットの有用性

岡村匡史

国立国際医療研究センター研究所 動物実験施設

Long Evans Agouti (LEA) ラットは、1975 年神戸大学から、北海道大学理学部実験動物室に供与されたクローズドコロニーである Long Evans 系ラットから、雌雄ともに野生色である個体を選抜交配し、樹立した系統である。同様に、シナモン様被毛色を呈する個体を選抜交配して樹立した Long Evans Cinnamon (LEC) ラットは、*Atp7b* 遺伝子の機能を欠損するため、肝炎・肝癌を発症するウイルソン病モデルとして利用されている。

我々は、LEA ラットコロニーから、多飲多尿を呈する個体を発見し、LEA ラットは今までに報告されている糖尿病モデルラットとは異なる特徴を示す、インスリン分泌不全を主徴とした非肥満型糖尿病モデルラットであることを明らかにしてきた。LEA ラットは雄のみで加齢と共に膵島の線維化が進行し、経口糖負荷後 120 分血糖値が 200～300 mg/dl の軽度糖尿病を発症するが、一方で、尿糖は 5 ヶ月齢から検出され、8 ヶ月齢の個体では雌雄共に 100%陽性となる。尿糖は血糖値が尿糖排泄閾値を越えた場合に見られる症状の一つであるが、LEA ラットの耐糖能異常と尿糖との関連性は不明であった。F2 個体群を用いた連鎖解析から、LEA ラットでは第 10 染色体上のシスチノシン (*Ctns*) 遺伝子に変異があることを明らかにし、インスリン分泌不全に起因した耐糖能異常とともに、腎性糖尿を発症する事がわかった。

Ctns 遺伝子はリソソーム膜に存在するシスチンのトランスポーターであるシスチノシンをコードし、常染色体劣性疾患であるシスチノーシス (シスチン蓄積症) の原因遺伝子として報告されている。シスチノーシスは、全身性にシステインの 2 量体であるシスチンが蓄積することにより成長障害、代謝異常、甲状腺機能不全および多臓器不全等の症状を呈するが、特に腎障害 (腎尿細管症) が特徴的である。LEA ラットの *Ctns* 変異を F344 ラットに導入したコンジェニックラットを樹立したところ、コンジェニックラットでは、全身性にシスチンが蓄積し、LEA ラットと同様、尿細管上皮細胞が変性・脱落している尿細管病変が確認された。

LEA ラットは、ウイルソン病モデルである LEC ラットのコントロール系統として使用されてきたが、上記の特徴とともに D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) 欠損および放射線高感受性という特徴も有している。本シンポジウムでは、これまでに明らかになっている LEA ラットの病態および遺伝子変異を紹介し、モデル動物としての有用性について議論したい。

MEMO

3. ラットゲノム解析のためのターゲットキャプチャキットの開発とその応用

須山 幹太

九州大学 生体防御医学研究所

エクソーム解析は、疾患の原因となる変異を直接検出しようとするゲノム解析方法である。次世代シーケンサーの登場と、それに続くターゲットキャプチャ法の開発により可能になった比較的新しい解析法で、ヒトの疾患原因遺伝子の解明において大きな威力を発揮している。これまで、ヒトやマウスのためのエクソームキャプチャキットは市販されているが、ラットのためのものは存在していなかった。そこで、我々はラットのためのエクソームキャプチャキットを新たにデザインすることにした。

通常エクソーム解析ではゲノムの約 1~2%を占めるエクソン部分をターゲットとして濃縮することで効率的なゲノム解析が行われるが、それ以外のゲノム領域における変異の検出は原理的に不可能であった。そこで、今回ラット用のターゲットキャプチャをデザインするにあたり、エクソン部分だけでなく、脊椎動物間で高度に保存しているゲノム領域 (Conserved non-coding sequences; CNSs) も含めた全ゲノムの約 5%をターゲットとすることにした。これにより、表現型の違いを説明する上で、遺伝子本体の変異だけでなく、発現制御領域における変異も対象とすることが可能になった。

このターゲットキャプチャキットを、原因変異が未知であるラット系統に適用し、その表現型を説明する新規変異を CNSs 中に見出すことに成功した。現在、ナショナルバイオリソースプロジェクトの「ゲノム情報等整備プログラム」の支援を受け、NBRP-Rat が保有する様々な表現型を呈するラット系統を対象にターゲットキャプチャによるゲノム解析を進めているので、その状況についても紹介する。

MEMO

4. 第4期ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) に向けて

小幡裕一

理化学研究所バイオリソースセンター

【NBRP 推進委員会、NBRP プログラムオフィサー (PO)】

第3期 NBRP は平成 28 年度で終了することとなっており、事後評価が本年 5~6 月頃に文科省 科学技術・学術審議会 研究計画・評価分科会 ライフサイエンス委員会によって実施される予定である。さらに、第4期の事前評価も8月頃に予定されている。第4期 NBRP に向けての推進委員会報告書のドラフトを3月末のライフサイエンス委員会に提出することとなっており、作成が始まった。文科省ライフサイエンス課、日本医療研究開発機構 (AMED)、NBRP 推進委員会、プログラムスーパーバイザー (PS : 小原雄治先生) と PO の私が共同で作業している。また、作成の参考として現状を把握するため、昨年 12 月の分子生物学会年次大会中に NBRP 全リソースを対象にヒアリングも実施した。現在は、章立てが定まったばかりだが、構成は、第1章バイオリソースを取り巻く現状、第2章バイオリソースを取り巻く新たな課題・動向、第3章今後のバイオリソース整備の在り方について、そして結語となっている。それぞれの章の項目の候補は挙げられているが、内容については今後の議論に委ねられている。

一般的に、文科省のプロジェクトは5年を単位に、2回程度の更新で終了する。しかし、本プロジェクトは継続することが必要であるという認識から、実施の主体を文科省から大学・研究機関に移し、資金形態も委託費から補助金に変更した。その結果、中核拠点とその母体の大学・研究機関の責任はより重くなったことを関係者は認識しておく必要がある。さらに平成 27 年度より、予算管理及び運営が文科省から AMED に移管された。NBRP は植物リソースも含んでいることから、AMED による運営が適切かどうか一抹の不安があったが、幸いこれまで問題は発生していない。

さて、NBRP ラットは中核機関である京都大学大学院医学研究科附属実験動物施設の努力と研究コミュニティの支援で、量・質ともに世界最高水準のラットリソースセンターとなった。また、技術開発の実績も素晴らしく、NBRP 発足当時は困難であった胚と精子の凍結保存も可能とした。さらに、ゲノム編集技術をいち早く取り入れ、多能性の ES 細胞が樹立できない弱点を克服し、遺伝子改変ラットの作製に成功している。これらは誇るべき成果である。一方、NBRP ラットの課題の一つは、利用の拡大である。次世代、第3世代のシーケンサーの開発によりゲノム配列が容易かつ迅速に解読され、さらに iPS 技術・細胞分化誘導技術が開発され、Biomedical 研究がヒトおよびヒト由来試料を直接の対象にすることが可能となった。今後もそのトレンドは続くであろう。また、病因解明や創薬研究の場でマウスやラット等の齧歯類をモデル動物として用いた研究成果がヒトに外挿できない等の批判もあり、齧歯類を用いた研究に追い風が吹いている状況ではない。従って、齧歯類を用いた研究は、ヒトでは実験が不可能であり、分子や細胞レベル、またショウジョウバエ、メダカ、線虫等の小型動物では解析が不可能な生命現象の個体レベルの研究および遺伝子と個体をつなぐ研究にフォーカス

する必要がある。ラットには、マウスに比べ優れた認知・学習能力と移植実験に適した体の大きさを有している、実験結果の再現性を保証する近交系が存在する、遺伝子改変技術が確立している等々の優位性が存在する。これらの優位性を最大に活かし、様々な高次生命現象の解明に有用なラットの系統を、中核機関と研究コミュニティが一体となり整備することにより、利用が拡大されることを期待している。

MEMO

5. マウス⇄ラット異種キメラが導く応用研究の可能性

磯谷 綾子

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 感染動物実験施設

異種キメラ動物の研究は古くからなされており、哺乳類では、ヒツジとヤギや、実験用マウス(以下、マウス)とオキナワハツカネズミのように限られた種間同士で誕生していた。しかし、実験動物として汎用されているマウスとラット間の異種キメラは、従来の異種胚同士を集合させて作製する方法では、誕生に至っていなかった。

我々は、胎盤も異種キメラになると、母体との間の適合性に問題が出るからではないかと考え、胎盤に寄与しない ES 細胞をラット胚から樹立し、マウスの胚盤胞にインジェクションして異種キメラ胚を作製した。この異種キメラ胚を、偽妊娠マウスに移植することによって、マウスとラットの異種キメラ(以下、マウス←ラット ES キメラ)を誕生させることに成功した。さらに、このマウス←ラット ES キメラでは、様々な組織細胞にラット由来の細胞が寄与していることが確かめられた。

次に、我々は、ラット ES 細胞がマウス←ラット ES キメラ内で様々な細胞に分化していたという点に着目し、複雑な機能や 3 次元構造を有しているため *in vitro* での構築が難しいと考えられている臓器形成をこのマウス←ラット ES キメラを用いて行えるのではないかと考えた。そこで、胸腺を持たないヌードマウスの胚盤胞にラット ES 細胞をインジェクションしてマウス←ラット ES キメラを作製したところ、ラット細胞に由来する胸腺が形成されることが確かめられた。この様にして作られたラットの胸腺をヌードラットに移植すると、ヌードラットの末梢血に成熟 T 細胞が分布するようになり、人為的に作製したラット胸腺は T 細胞を教育するという機能も保持していることが明らかになった。

さらに、我々は、マウス←ラット ES キメラの精巣内にラット ES 細胞に由来する生殖細胞が延長精子細胞にまで分化することも見出した。このラット延長精子細胞は、ラットの未受精卵に直接注入する顕微授精 (TESE-ICSI 法) によって、仔として誕生できることが確かめられた。そこで、マウス←ラット ES キメラを介して KO ラットを作出できるのではないかと考え、従来の方法で相同組換えを行った遺伝子変異アレルを持つラット ES 細胞を樹立し、マウスの胚盤胞にインジェクションして異種キメラを作製した。遺伝子変異アレルを持ったラット ES 細胞は、マウス←ラット ES キメラの精巣内で延長精子細胞へと分化することが確かめられ、顕微授精 (TESE-ICSI 法) によって、遺伝子変異アレルを持つラットとして誕生させることができた。誕生した F1 ラットの交配により、KO ラットを作出することができた。

このように臓器形成モデルや新規 KO ラット作製モデルの事例を中心に、本研究会では、マウス⇄ラット異種キメラを用いた応用研究の可能性について紹介したい。

MEMO

6. Tremor ラットを用いた本態性振戦の病態、薬理研究

大野 行弘

大阪薬科大学 薬品作用解析学研究室

振戦は本態性振戦、パーキンソン病振戦、薬物振戦など 20 種以上に分類される。このうち最も頻繁にみられるものが本態性振戦であり、罹患率は 65 歳以上で約 20%、平均発症年齢は約 40 歳といわれる。原因遺伝子は未だ不明で、選択的な治療薬もなく、経験的に β 受容体遮断薬、ベンゾジアゼピン系薬物、バルビツール酸系薬物などが治療に用いられるが、その作用機序も不明である。今回の発表では、新たな本態性振戦モデルとして開発された Tremor ラット (TRM/Kyo) に関する最近の研究成果を紹介する。

TRM/Kyo は生後 2~8 週をピークとして前肢、頭部をはじめとする全身性振戦を呈するラットモデルである。TRM/Kyo の振戦表現型を解析した結果、TRM/Kyo が①ヒト本態性振戦に類似する 4-10Hz の動作時振戦を呈すること、②緊張時に振戦が顕著化すること、③ β 遮断薬の propranolol やバルビツール酸系薬の phenobarbital などにより振戦は改善されるが、④パーキンソン病治療薬の影響は受けないことがわかり、TRM/Kyo がヒト本態性振戦モデルとして有用であることが明らかとなった。

振戦発現の原因遺伝子に関しては、TRM/Kyo とその非振戦性亜系 TRMR/Kyo を用いたポジショナルクローニング解析から、以前から知られていた *Aspa* 欠損に加えて、過分極活性型環状ヌクレオチド開口型チャンネル 1 (HCN1) 遺伝子変異 (A354V) による HCN1 チャンネルの機能欠失が必須であることが判明した。また、脳の病態解析から、TRM/Kyo では延髄の下オリーブ核神経が特異的に興奮していること、さらに、TRMR/Kyo でも HCN1 チャンネルを遮断すると、下オリーブ核神経が特異的に興奮することが明らかとなった。

TRM/Kyo を用いた薬理研究においては、これまで作用機序が不明であった β 遮断が、 β_2 受容体の遮断を介して下オリーブ核神経を抑制することが確認された。さらに、GABA_A 受容体作用薬の他、グルタミン酸神経系作用薬や抗てんかん薬の一部が TRM/Kyo の振戦発現を改善することがわかってきた。

今回の結果から、TRM/Kyo の振戦発現が *Aspa* 欠損と *Hcn1*^{A354V}変異の 2 つの遺伝的要因に起因することが明らかとなった。また、本態性振戦には HCN1 チャンネルの機能欠失による延髄下オリーブ核の神経興奮が関与することが示唆された。治療的にはどちらか一方の遺伝子機能の復帰により振戦は改善され、振戦治療に向けた複数の創薬ストラテジーも示唆された。今後、TRM/Kyo を用いた新たな本態性振戦治療薬の創薬研究が進展するものと期待される。

MEMO

7. ラットの記憶・学習の行動学的解析：海馬と関連皮質の役割

一谷 幸男

筑波大学人間総合科学研究科 行動神経科学研究室

大脳辺縁系の海馬は、記憶・学習に深く関わる脳部位として数十年以上にわたり注目されてきた。海馬を含む内側側頭葉摘除または損傷患者事例の健忘の神経心理学的研究、海馬損傷動物の記憶・学習課題を中心にした行動実験が、多くの証拠を提供してきた。また、海馬における長期増強（LTP）の発見も記憶における海馬の重要性を示すものである。動物行動研究、とくにラットを用いた記憶の測定には、古典的条件づけ、道具的条件づけ、回避学習、迷路学習等が頻用されるが、その後モリス水迷路や放射状迷路を代表とする空間学習課題が導入されることにより、海馬と空間記憶の関係が検討されてきた。一方で、海馬の place cells の発見が空間の認識や記憶における不可欠の役割を示唆した。

我々は、ラットの空間記憶課題を用いて海馬グルタミン酸 N-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体の役割を検討してきたので、放射状迷路課題、その変形課題の遂行に及ぼす NMDA 受容体拮抗薬の効果について紹介する。また、海馬との神経連絡により記憶情報の流れが想定される1つの皮質部位である後部帯状皮質に注目し、その損傷が空間記憶に及ぼす順行性と逆行性の健忘効果を、海馬損傷の場合と比較検討したので、記銘後の時間経過に伴う海馬の役割の変化について考察する。

ラットの空間記憶や空間学習における海馬の役割は多くの動物実験から広く支持されているが、一方で非空間的な、つまり空間的な要素を含まない記憶や学習においての、海馬や NMDA 受容体の関与は議論的である。自発的物体再認テストは、すでに動物が出会った (familiar な) 物体よりも、初めて出会う (novel な) 物体に対して、より多くの探索行動を示すという生得的な傾向を利用した記憶テストであるが、特別な訓練や動機づけを必要とせず、ストレスフルな状況に曝さないという利点がある。このテストを用いて、空間記憶を要しない場面 (物体再認) でも、要する場面 (物体位置再認) と同様に海馬の NMDA 受容体活性化が不可欠なのか、記憶項目数 (物体数) の負荷や記憶保持時間の長さ (物体への暴露からテストまで) はどのように影響するのか等の解析を行っているので、紹介する。

MEMO

8. 精神疾患と動物モデル -有用性と問題点

廣瀬 毅

大塚製薬株式会社 Qs'研究所 精神疾患ユニット

新薬開発において、最も重要な側面は開発化合物がヒトの臨床で目的とする薬理作用を狙った通りに発揮できるかどうかという点である。この命題をクリアするための一つの方法として、しばしば疾患特異的な病態モデルが利用される。しかし、中枢分野における各疾患の病態を正確に反映する疾患特異的な動物モデルは依然として確立されていない。

従って、比較的距離が近いと考えられる薬理学的側面での仮説を基にした薬原性モデルや、現在判明しつつある遺伝因子の異常を反映した遺伝子改変（又はノックアウト）動物モデル、もしくは近似性が高いと考えられる仮説に基づくモデルにおける評価のいずれかを組み合わせて、設定した薬理作用プロフィールで目的の治療効果を発揮するか慎重に見極めるというのが現在の作業の中心である。

各種動物モデルの薬効評価における最終的なパラメーターとしては、その動物が示す行動異常ということになる。こうしたモデルを用いた行動評価の手法はその目的に応じて様々に開発されているが、基本的には自発的もしくは課題負荷により変容した動物の行動量を指標にしている点は共通している。その理由として各疾患の病態を反映する決定的なトランスレーショナルマーカーが未だ特定されていないという点がある。

このようにヒトの精神疾患を完全に演繹する動物モデルの確立はなされていない現状で、いかに精神疾患への効力を開発段階で見極めることができるかが現状での最重要課題であるといっても過言ではない。

講演では統合失調症を中心に関連する動物モデルの背景と特徴を紹介しながら、治療薬開発との関わりについて言及したい。

MEMO