



ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」

# 第 12 回ラットリソースリサーチ研究会

## 講演抄録集

平成 31 年 3 月 1 日（金） 13:00 – 17:30

京都大学医学部 芝蘭会館 稲盛ホール





## 第12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： 成瀬 智恵 (京都大学)  
守田 昂太郎 (京都大学)

#### ラットリソース

1. はじめに：第4期ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」の展開 13:00-13:15  
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. ラット生殖工学技術の課題とその克服に向けた歩み 13:15-13:45  
本多 新  
(京都大学大学院 医学研究科 附属動物実験施設)
3. gpt delta ラット：突然変異、発がん研究のためのトランスジェニックラット 13:45-14:15  
能美 健彦  
(国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
4. ラットリソースを使いこなす 14:15-14:45  
庫本 高志  
(東京農業大学 農学部 動物科学科)

休憩 14:45-15:00

## 第2部

座長：横井 伯英（神戸大学）  
真下 知士（大阪大学）

### ラットリサーチ

- |   |             |
|---|-------------|
| 5. ビタミンC生合成不能の ODS ラットを用いた<br>ビタミンC生理機能の探究<br>堀尾 文彦<br>(名古屋大学大学院 生命農学研究科 動物栄養科学研究室) | 15:00-15:30 |
| 6. Txn1 遺伝子ミスセンス変異ラットにおける脳-腎-心関連解析<br>大守 伊織<br>(岡山大学大学院 教育学研究科 特別支援教育講座)            | 15:30-16:00 |
| 7. 精神疾患の認知機能障害モデルとしての<br>GAD67 ノックアウトラット<br>藤原 和之<br>(群馬大学大学院 医学研究科 遺伝発達行動学分野)      | 16:00-16:30 |
| 8. 神経障害性疼痛メカニズムの研究：光遺伝学からのアプローチ<br>津田 誠<br>(九州大学大学院 薬学研究院 ライファイノベーション分野)            | 16:30-17:00 |
| 9. 総合討論   | 17:00-17:30 |

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

【懇親会のご案内】

時間：18:00-20:00

場所：京都大学 楽友会館 レストラン「近衛 Latin」

〒606-8501 京都市左京区吉田二本松町

懇親会費：6000円（当日受付でお支払下さい）





# 抄 録

## 1. はじめに：第4期ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」の展開

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、これまでに870系統を保存し、1328件を国内外に提供して参りました。ラット研究コミュニティの皆様のご支援により、2017年度から第4期をスタートすることができました。

第4期では以下の3点を重点的に展開しております。

- ① 世界最大規模のラットリソースをより多くの研究者に利用していただけるよう、広報活動を活発に行い、提供件数の拡大を図っていく所存です。お陰様で今年度は目標の70件をすでにクリアして、80件を超える提供依頼がありました。この調子で今後も提供件数を増やす努力をして参ります。
- ② ラットでもゲノム編集により遺伝子改変ができるようになりましたが、マウスと比較すると生殖工学技術が遅れており、実用的な体外受精(IVF)や精子の凍結保存の技術開発が喫緊の課題となっております。第4期では本多らを中心にラットの生殖工学技術の整備に全力を注ぎます。詳しくは本多の発表をお聞きください。
- ③ ゲノム編集技術で開発したX-SCIDなどの重症免疫不全ラットは、ヒトの様々な細胞の移植が可能なので、再生医療研究での需要が見込まれます。第4期から分担機関として参加した大阪大学において、供給体制が整いましたので、これから多くの研究者に利用していただけることを願っています。

このように第4期NBRP-Ratはさらに多くの研究者に利用していただけるよう努力して参ります。ご支援のほどよろしく申し上げます。

MEMO

## 2. ラット生殖工学技術の課題とその克服に向けた歩み

本多 新

京都大学大学院 医学研究科 附属動物実験施設

ラットをほとんど扱ったことのない私が、NBRP ラットの生殖工学部門で業務と研究に携わり1年半が経過した。昨年度のラットリソースリサーチ研究会で私は、少なくとも生殖工学技術開発において、ラットは10年以上マウスより遅れていることを紹介した。たとえば“ラットは体外受精が(ほとんど)できない”という事実がある。一方で、そのように体外受精がほとんどできない動物であっても、日本の研究者達は優れた研究発表を続けている。自然交配卵子を活用したゲノム編集は、NBRP ラットに携わってこられた真下先生や金子先生らの貢献が大きく、その技術はマウスなどにも応用され、研究や医療の発展に寄与している。さらに最近では GONAD 法の開発とラットへの適用により、やはり自然交配卵子でより簡便なゲノム編集技術も開発された。昨年度の発表で私は「最近ではラットでもマウスと同じようにできるようになりました。と紹介できるような技術を開発したい。」と述べたが、少しずつではあるものの、確実に前進していると感じている。本講演では、現在の NBRP ラット生殖工学の業務がどのように行われているのか、そしてその過程でどのようなことが可能になってきたのかについて紹介したい。

MEMO

### 3. *gpt delta* ラット：突然変異、発がん研究のためのトランスジェニックラット

能美 健彦

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター

我々の環境中には多数の化学物質が存在しており、その中にはヒトのゲノム DNA に突然変異を起こす物質が少なからず含まれている。タバコの煙の中の多環芳香族炭化水素や自動車排ガスに含まれるニトロピレン、また生体内で生成する活性酸素種や脂質過酸化物質も DNA と反応して突然変異を誘発する変異原物質である。こうした変異原への曝露は、ヒトの発がんリスクを高めるものと考えられており、新規化学物質の多くは、事前にその変異原性を試験により評価することが義務付けられている。変異原性試験の中でも、細菌を用いる遺伝子突然変異試験（Ames テスト）と、ラット、マウスを用いるトランスジェニック遺伝子突然変異試験は、DNA と反応する発がん物質（遺伝毒性発がん物質）を同定する上で特に重要な試験と考えられている。

私達のグループは、これまでに遺伝子突然変異検出用のトランスジェニックラットとマウスを開発し、その有用性について検討を進めてきた。これらのトランスジェニック動物の染色体には、突然変異のレポーター遺伝子（大腸菌 *gpt* 遺伝子と  $\lambda$ ファージの *red/gam* 遺伝子）を組み込んだファージ DNA ( $\lambda$ EG10) が挿入されている。化学物質を投与した後、各臓器から DNA を抽出し、*in vitro* パッケージング法によりファージ粒子を回収して大腸菌に感染させ、ラット、マウスの体内で突然変異を起こしたレポーター遺伝子を変異コロニー、変異プラークとして検出する。また、レポーター遺伝子をシークエンスすることで変異を分子レベルで解析する。*gpt* 遺伝子により点突然変異（塩基置換など）を検出し、*red/gam* 遺伝子により欠失変異(deletion)を検出することから、*gpt delta* ラット、*gpt delta* マウスと称している。*gpt delta* ラットは F344、S.D.、Wistar-Hannover、*gpt delta* マウスは C57BL/6J を遺伝的背景としており、日本 SLC から市販されている (<http://www.jslc.co.jp/animals/mouse.php#mouse-cat-08>; <http://www.jslc.co.jp/animals/rat.php#rat-cat-05>)。 *gpt delta* ラット、*gpt delta* マウスを用いる遺伝子突然変異試験は、OECD テストガイドライン(TG488)にも収載され、国内外で汎用されている。F344 ラットは、一般毒性試験に使われる頻度が高いため、F344 *gpt delta* ラットを用い一般毒性と変異原性を同一個体で検索する試みが進められている。

#### 文献

1. T. Nohmi, K. Masumura and N. Toyoda- Hokaiwado, Transgenic rat models for mutagenesis and carcinogenesis, *Genes and Environ.*, 39, 11 (2017)  
<https://genesenvironment.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41021-016-0072-6>
2. T. Nohmi, Past, present and future directions of *gpt delta* rodent gene mutation assays, *Food Safety*, 2016,  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/foodsafetyfscj/advpub/0/advpub\\_2015024/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/foodsafetyfscj/advpub/0/advpub_2015024/_article/-char/ja/)

MEMO

#### 4. ラットリソースを使いこなす

庫本 高志

東京農業大学 農学部 動物科学科

多様な実験材料(リソース)にアクセスできることは、研究を進める上で強みとなる。さらに、それらリソースが独自に開発したものであれば、研究の独自性は増大する。ラットリソースの整備・開発に携わってきたものとして、このような観点をもつことを提案したい。

まず、多様なリソースへのアクセスに関して、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」(NBRP-Rat)の果たした役割は大きい。具体的には、NBRP-Rat は 800 系統以上のラットリソースを収集し、それらのゲノム情報、特性情報を整備し、公開している。特に、約 170 系統からなる収集系統のゲノム DNA パネルは、既存の近交系の多くを網羅しており、利用価値が高い。例えば、疾患に関する変異のスクリーニングによって、その変異のラット近交間の分布状況が判明した。

次に、リソースの開発であるが、これは大きく3つに分けられる。第一は、突然変異体の発見。第二は、野生やペットのラットの実験動物化。そして、遺伝子改変である。本研究会では、私自身がそれぞれの手段で開発・利用してきたリソース(疾患モデル)を紹介し、独自のリソースを開発・利用する重要性に言及したい。

MEMO

## 5. ビタミン C 生合成不能の ODS ラットを用いたビタミン C 生理機能の探究

堀尾 文彦

名古屋大学大学院 生命農学研究科 動物栄養科学研究室

ビタミン C (L-アスコルビン酸、AsA、以後 AsA と略す) はヒトを含む霊長類やモルモットでは生合成されず、必須な栄養素である。しかし、AsA はラットおよびマウスでは肝臓で生合成され、必須な栄養素ではない。AsA の生理機能研究にはモルモットが用いられてきたが、ラットは栄養学研究においての利用の歴史は長く研究成果も極めて豊富であることから、AsA 生合成不能のモデルラットの作出が期待されていた。そのような背景の中で、ODS ラットはヒトと同様に AsA 生合成経路の最終酵素である L-gulonolactone oxidase を欠損した AsA 生合成不能のモデル動物として確立された<sup>(1)</sup>。

我々は、この ODS ラットを栄養学実験に初めて導入し、第一にこのラットの AsA 要求量を検討した。その結果、このラットでは AsA 欠乏症の発症を防ぎ、最大成長を得るためには飼料中の AsA は約 300 mg/kg が必要であることが明らかとなった<sup>(2)</sup>。AsA はその生理機能として、抗酸化ビタミンであることや、多くの水酸化酵素のコファクターであることが知られているが、我々は ODS ラットの種々の条件下での AsA 欠乏症状を解析することによって AsA の生理機能を解析してきた。その結果として、AsA 欠乏時には、①肝臓のシトクローム P-450 量が低下する、②胆汁酸生合成が低下し、血中コレステロール濃度が上昇する、③血中の低密度リポタンパク質(LDL)-コレステロール濃度が上昇する、④高血圧病態を変化させることなどが明らかとなった。

さらに、AsA の新たな生理機能を探究するために、ODS ラットの AsA 欠乏時の血中および各組織のタンパク質の変動を調べた結果、肝臓で炎症時に発現誘導される急性期タンパク質などの発現が上昇しており炎症様変化が起こることを見出した<sup>(3,4)</sup>。これらの発現を上昇させる炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6)の血中濃度も AsA 欠乏により上昇が見られた<sup>(4)</sup>。最近、腸管でのこれらの炎症性サイトカインの発現が上昇していることが明らかとなり、このことが肝臓での急性期タンパク質発現の上昇に寄与しているものと推定している。上記のように AsA 欠乏時には炎症様変化が起こることから、AsA の抗炎症作用も検討した。ODS ラットの AsA 無添加飼料群(欠乏群)、300 mg/kg AsA 添加飼料群(通常要求量投与群)、3,000 mg/kg AsA 添加飼料群(高用量投与群)に炎症を誘発する Lipopolysaccharide を投与したところ、生存率は 5.5%、39%、61%と AsA 摂取量に依存して有意に改善され、AsA が抗炎症作用を持つことを示すことができた<sup>(5)</sup>。

(1) *Experientia*, 40:359-61 (1984)

(2) *J.Nutr.*, 115:1630-40 (1985)

(2) *J.Nutr.*, 128:832-8 (1998)

(4) *Nutrition*, 31:373-9 (2015)

(5) *J.Nutr.Sci.Vitaminol.* in press

MEMO

## 6. Txn1 遺伝子ミスセンス変異ラットにおける脳-腎-心連関解析

大守 伊織

岡山大学大学院 教育学研究科 特別支援教育講座

Txn1 (チオレドキシン) は、相互作用を持つ蛋白質のシステイン残基が形成するジスルフィド結合を還元し、自らは酸化されることによって抗酸化物質として機能する。細胞内外の酸化還元を調節し、細胞増殖、炎症、アポトーシスなど様々な生命現象に関与している。ENU-mutagenesisによって作製されたTxn1遺伝子ミスセンス変異ラットの表現型解析により、チオレドキシンの機能低下が及ぼす様々な臓器障害が明らかになった。障害臓器は主に脳と腎臓であり、腎機能低下に伴って心血管病変が顕在化した。臓器連関の病態を解明する上で、有用なモデル動物と考えられ、そのユニークな表現型を紹介する。

当該ラットは、年齢に伴って症状が変化する。まず生後 4-5 週齢にてんかん発作が集積し、その後自然消失する。脳病変は視床～下丘に限局して空胞変性が認められ、7 週齢以降に自然治癒していた。その後、野生型と変異型ラットにおいて、生後 1 ヶ月から 2 ヶ月毎に生化学検査を行い、自然経過を観察した。若年期にはてんかん発作以外全身状態は良好であるものの、その後は早発老化様の症状が出現する。ホモ接合体で 112 日、ヘテロ接合体で 349 日の平均寿命であった。生化学検査および病理組織検査により、死因は慢性腎不全であり、衰弱した時点での病理解剖で、硬化した糸球体が多くみられ、一部は石灰化を伴い、半月体形成もみられた。間質では、尿細管萎縮・拡張、線維化が認められた。心筋では、炎症細胞の浸潤と線維化、血管では中膜の変性、石灰化を認められた。野生型と変異型 Txn1 の cDNA 発現ベクターを作製し、精製蛋白の酵素活性を検討したところ、変異型 Txn1 チオレドキシンは、基質蛋白のジスルフィド結合を還元する活性が野生型に比し低下していた。免疫組織学的検討では、8-OHdG 染色 (DNA 酸化損傷マーカー)、4-HNE 染色 (脂質酸化損傷マーカー) で脳や腎臓の障害臓器が変異型において濃染された。

当該ラットの特徴は、4-5 週齢の限られた期間にのみ発現するてんかんとその後の進行する慢性腎臓病である。慢性腎臓病に関しては、尿中アルブミン、Bun、コレステロール等の生化学データの個体差が小さい。また、慢性腎臓病の合併症として、心血管障害、高血圧、貧血やミネラル代謝異常が高率に出現するため、臓器連関の病態解析に有用なモデル動物であるばかりでなく、慢性腎臓病やその合併症に対する薬物治療の前臨床試験に適していると考えられた。

MEMO

## 7. 精神疾患の認知機能障害モデルとしての GAD67 ノックアウトラット

藤原和之、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

統合失調症は人口の約 1%が発症する頻度の高い精神疾患である。統合失調症では、幻覚や妄想、まとまりのない会話・行動、感情平板化などの多彩な症状が見られるが、認知機能障害を伴うことも着目されてきた。認知機能障害は、作業記憶障害をはじめとして様々な側面に及び、機能的な予後に重大な影響を与えることが分かっている。ドパミン D2 受容体の遮断を主作用とする既存の統合失調症治療薬では、この認知機能障害の改善は不十分であるため、障害が起こるメカニズムの解明やそれに基づいた新規治療法の開発が求められている。

一方、近年の統合失調症の死後脳研究により、抑制性ニューロンである GABA 神経系の異常が報告されるようになってきている。GABA 合成酵素は GAD65 と GAD67 の 2 つのアイソフォームが存在するが、統合失調症では特に GAD67 の発現量の減少が再現性よく報告され、GABA 神経伝達の障害が確実視されるようになった。一方、臨床神経生理学的な研究から、作業記憶課題等を遂行する際に誘発される  $\gamma$ -oscillation (脳波の中でも 30Hz~100Hz の速い周波数の活動)も、統合失調症において減弱していることが報告された。 $\gamma$ -oscillation の発生には大脳皮質の興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの相互結合が重要な役割を果たしていると考えられていることから、GAD67 発現低下が  $\gamma$ -oscillation の障害を通じて認知機能障害の基盤となる可能性が示唆される。

しかし、こうしたヒト対象の研究では、GAD67 の発現減少が本当に認知機能障害をもたらしたのかどうか、明確な因果関係の証明にはならない。そこで我々は、GAD67 遺伝子を人工的に欠損させたモデル動物を作ることによって、GAD67 の発現減少が認知機能障害を誘発するための十分条件であることを示すことにした。我々が作製した GAD67 ノックアウトラットの大脳皮質では、野生型に比べて GABA 含量が有意に低下しており、GAD65 が残存していても GABA 合成をすべて代償することはできない。また、GAD67 ノックアウトラットは生後直後に約 60%が死亡する。しかし、残りは成体になるまで生存可能であり、その後の死亡率は野生型と変わらないことから、2ヶ月齢以降に行動テストバッテリーを実施した。その結果、明確な空間参照記憶障害や空間作業記憶障害が観察され、我々の予想は的中した。さらに認知機能障害以外の様々な行動学的変化も伴っていることから、本発表では、精神疾患モデルという観点からこのラットの表現型について議論したい。

MEMO

## 8. 神経障害性疼痛メカニズムの研究：光遺伝学からのアプローチ

津田 誠

九州大学大学院 薬学研究院 ライフイノベーション分野

神経障害性疼痛は糖尿病やがんなどに伴う神経損傷や変性により発症する慢性疼痛であり、軽度な触刺激で強い痛みを発症する「アロディニア」を主症状とする。この痛みはモルヒネなど鎮痛薬に抵抗性を示す場合があり、その発症維持メカニズムの解明と有効な治療薬の開発は重要な課題である。

皮膚などからの触覚情報は一次求心性神経の主に A $\beta$  線維、痛覚情報は A $\delta$  や C 線維を介して脊髄後角の深層（主に第 III 層）と表層（主に第 I 層）にそれぞれ入力し、各々区別された経路で脳まで到達する。それ故、通常、触刺激で痛みは起こらない。しかし、上述のように神経の障害等によりそれは起こる。なぜ触覚が痛覚に誤変換されてしまうのか？その根源的問いは未だ解かれていない。

そこで我々は、そのメカニズムの解明を目指して、一次求心性神経の中で A $\beta$  線維を含む大型神経選択的に Channelrhodopsin-2 (ChR2) を発現するトランスジェニックラット (W-TChR2V4 ラット) を用いて研究を開始した。同ラットの神経を損傷させた神経障害性疼痛モデルを作製し、その足底部に青色光を照射したところ、ラットが光から足を退けるといふ疼痛様行動を示すことを見出した。また、この疼痛様行動はモルヒネに抵抗性であり、足底部の光刺激で不快情動反応も観察された。これらの結果から、W-TChR2V4 ラットを利用することで、より臨床に近い神経障害性アロディニアの新しい評価モデルを確立できたといえる。さらに我々は、神経を損傷した W-TChR2V4 ラットを用いることで、A $\beta$  線維刺激で脊髄後角第 I 層神経（脳へ痛覚情報を伝達する）が複数の神経を介して興奮することも見出した。正常時は、第 I 層神経は A $\beta$  線維刺激で興奮することはない。したがって、神経損傷後の A $\beta$  線維から第 I 層神経への興奮入力のアロディニアに重要で、両神経間に存在する神経回路の動作異常がその中核を担うと推察される。現在、W-TChR2V4 ラットを用いてそのメカニズムに関する研究を進めている。

MEMO

