ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」

第 15 回ラットリソースリサーチ研究会

講演抄録集

令和 4 年 2 月 18 日（金）　13:00 – 17:30

Web 開催

第 15 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）
　　　　梲嶋　克哉　（京都大学）

ラットリソース

1. はじめに：NBRP ラット第 4 期の総括と第 5 期に向けて　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. ラットリソース業務の効率化と利用者拡大に向けた生殖工学技術の開発　13:15-13:45
守田　昂太郎（京都大学大学院　医学研究科　附属動物実験施設）

3. ラット多能性幹細胞からの機能的な生殖細胞作製　13:45-14:15
小林　俊寛（東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター再生発生学分野）

4. GABA ニューロン研究のための遺伝子改変ラット　14:15-14:45
柳川　右千夫（群馬大学大学院医学系研究科）

休　憩　　14:45-15:00

第 2 部

座長： 浅野　雅秀　　（京都大学）
守田　昂太郎　（京都大学）

ラットリサーチ

4. OLETF ラットを用いたケストースの二型糖尿病予防効果の解析　15:00-15:30
北浦　靖之（東海国立大学機構名古屋大学大学院生命農学研究科）

5. ヒト iPS 細胞由来間葉系幹細胞移植による X-SCID ラット甲状軟骨再生研究　15:30-16:00
大西　弘恵（京都大学　医学部附属病院　耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

6. 完全ヒト iPS 細胞由来人工肝臓の作成と免疫不全ラットを用いた iPS 由来肝細胞大量培養システム構築による肝不全治療への展開　16:00-16:30
武石　一樹（九州大学　消化器・総合外科）

7. ラット生殖工学の基盤技術開発から不妊症研究へ　16:30-17:00
本多　新（自治医科大学医学部先端医療技術開発センター）

8. 総合討論　17:00-17:30

抄　　録

1. はじめに：NBRP ラット第４期の総括と第５期に向けて

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」を行ってきた。世界最大規模のラットリソースセンターとして，2022 年 2 月時点で 929 系統を収集し，1532 件を国内外に提供した。2017 年度からスタートした第４期も５年間の活動の総括を行う時期となった。
第４期では，特に以下を重点課題として取り組んできた。
①広報活動を活発に行い，ラットリソースの利用拡大を図る。
②ラットの生殖工学技術を確立して，研修により開発した技術の普及を図る。
③X-SCID などの重度免疫不全ラットの繁殖を行い提供数の増大を図る。
国内の関連学会での発表や展示だけでなく，アジア実験動物学会（AFLAS）や国際ラットゲノム学会（CTC-RG）などでの発表，関連団体のメーリングリストを用いた宣伝，企業の講演会や BioJapan への出展を行なった。また，コロナのために学会などがオンライン開催となったため，科学雑誌（Nature 日本印刷版，実験医学）や学会抄録集への広告掲載などを行なってきた。本研究会も毎年開催し，多くの研究者にラットを用いた素晴らしい研究を発表していただき，ラットコミュニティに研究交流の場を提供してきた。第３期に比べて寄託数は減少していたが，2020 年度あたりからゲノム編集ラットの寄託が増加し，V 字回復の傾向が見られる。また，提供数は 2017，18 年では第３期を上回ったが，コロナの感染拡大に伴い，NBRP-Rat の活動も中断を余儀なくされ，その後の提供数はまだ回復をしていないのが現状である。
　マウスに比べて遅れていたラットの生殖工学技術であるが，NBRP 基盤技術整備プログラム（2019-20 年度）に採択され，本多らを中心に標準的なラット系統において高効率の過排卵と IVF の技術開発に成功し，高効率の KO と KI にも成功した。詳しくは次の講演者の守田が報告する。また，これらの技術を普及させるために，ラット生殖工学研修を 11 回開催し，22 機関から 27 名の参加者を得た。
　第４期から新たに分担機関（途中で阪大から東大に移動）となった真下らは，重度免疫不全ラットの繁殖・提供を行い，順調に提供数を増加させて５年間の目標値 55 件を大きく超える 72 件の提供ができた。
　以上の活動の結果，中核的拠点整備プログラムは「我が国のライフサイエンスの発展に大きな貢献が期待される成果」，基盤技術整備プログラムは「計画を超えて大きな進捗」が認められたとの評価をいただいた。この５年間の経験と実績を踏まえて，第５期へとさらに発展させていく所存であるので，第５期へ向けての計画についても最後に述べる予定である。

MEMO

2. ラットリソース業務の効率化と利用者拡大に向けた生殖工学技術の開発

守田昂太郎
京都大学大学院　医学研究科　附属動物実験施設

NBRP「ラット」は、2002 年度から始まり、ラットリソースの「収集」・「保存」・「提供」の事業を今日まで行ってきた。これらの業務を円滑に進めるためには、胚・精子での凍結保存や個体復元などの生殖工学技術が必要不可欠である。しかしながら、ラットの生殖工学技術の開発がマウスよりも遅れたために、遺伝子組換えラットの作出効率はマウスほど高くはなく、また、精子からの個体復元に関しては凍結保存技術が十分に整備されていないため、非効率な顕微授精に頼るしかないのが現状であった。そこでこれらの基盤を整備するため、2019〜2020 年度の基盤技術整備プログラムの支援の下で効率の良いラットリソースの保存法の開発と新規利用者の拡大を目指した。

初年度は、前任の本多らの成果により、再現性良く様々な系統から過排卵を誘起させ、ラットの体外受精卵から産仔を得ることに成功した（Honda et al., Sci. Rep., 2019）。驚くべきことに、体外受精卵を用いると非常に高効率でゲノム編集ができることも分かった。これらの成果を普及させ、ラットの利用者を拡大するために、同年からラットの生殖工学研修を始め、現在までに 11 回の研修で 27 名の参加者に技術移転を行うことができた。コロナ禍ではあったものの、目標の 10 回以上の研修を終えることができた。

次年度以降は、理化学研究所バイオリソース研究センターの小倉先生・持田先生の協力により、卵黄成分に依存しない凍結精子の保存法の開発に成功した。卵黄を用いた保存液はロット差が大きく、微生物汚染のリスクもあるが、今回の成果により、安全に精子を凍結保存することが可能となった。さらに、運動性のある凍結融解精子を用いることで効率よく体外受精卵を得ることに成功し、得られる産仔も通常の新鮮精子と同等の割合であることが分かった。

以上より、マウスと比べて遅れていたラットの生殖工学技術はマウスに近づいたと言え、研修も目標を達成することができたため、本基盤技術整備プログラム事業は AMED から高い評価をいただいた。ラットの生殖工学研修は第 5 期 NBRP「ラット」でも引き続き行い、ラットの利用者拡大とリソースの発展に努めていく予定である。

MEMO

3. ラット多能性幹細胞からの機能的な生殖細胞作製

小林 俊寛
東京大学医科学研究所 再生発生学分野

ゲノム編集技術の急速な発展に伴い、ラットにおいても受精卵へ直接遺伝子操作を施し遺伝子改変ラットを作製することが可能になった。一方で、マウスから遅れること 30 年近くを経てようやく確立されたラット多能性幹細胞を用いた遺伝子改変ラットの作製も、細胞として遺伝子型・表現型を担保してから確実に動物作製へ進めることができる利点や、複雑な多重遺伝子操作および人工染色体など細胞を介した遺伝子導入の必要性から、遺伝子改変技術の双璧として欠かすことができないと考えられる。しかしながら、多能性幹細胞を用いた遺伝子改変動物作製は、細胞を胚盤胞に注入した後のホスト胚中におけるキメラ形成、特に生殖系列への寄与の可否に大きく依存しており、ラット多能性幹細胞がマウスほど安定的でないことからも、未だマウスほど広く普及していない現状であると言わざるを得ない。仮にラット多能性幹細胞をホスト胚中で確実に生殖系列に寄与することができれば、あるいはキメラ形成を介さずとも in vitro で受精および個体発生可能な生殖細胞を作り出すことができれば、効率的かつ迅速な遺伝子改変ラット作製に繋がると考えられる。

そこで本講演では、これまで我々が取り組んできた in vivo および in vitro におけるラット多能性幹細胞からの生殖細胞作製法を紹介したい。

MEMO

4. GABA ニューロン研究のための遺伝子改変ラット

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

脳を構成するニューロンは、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンに大別される。興奮性ニューロンはグルタミン酸を神経伝達物質として用いるグルタミン酸ニューロンが知られており、GABA を神経伝達物質として用いる GABA ニューロンが抑制性ニューロンの代表である。GABA はグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD; GAD65 と GAD67 の２型存在）により合成され、小胞型 GABA トランスポーター（VGAT）によってシナプス小胞内に蓄積された後にシナプス間隙に放出され、シナプス後膜にある GABA 受容体に結合し、ニューロンからニューロンへ情報を伝達する（GABA 神経伝達）。GAD65、GAD67 および VGAT の各分子は GABA ニューロンに特異的に発現することから GABA ニューロンのマーカーとしても利用されている。

大脳皮質や海馬などの領域では、GABA ニューロンは散在し、少数であり、形態も多様なので、生きているスライス標本の中で同定するのは容易ではない。そこで、GABA ニューロンの特徴を理解するために、VGAT 遺伝子が含まれている BAC クローンを用いて、GABA ニューロン特異的に Venus 黄色蛍光タンパク質が発現する VGAT-Venus トランスジェニックラットを作製した 1。このトランスジェニックラットを用いて脳腫瘍グリオーマの腫瘍周囲組織における細胞レベルおよび分子レベルでの変化についてアプローチしているので、紹介する。

GABA 神経伝達を理解するために、GAD65 と GAD67 の各遺伝子についてノックアウトラットを作製し、表現型について解析している 2-4。GAD65 ノックアウトラットでは、3 週齢で痙攣発作が観察され、生後 23 日齢までに 80%以上が死亡した。GAD67 ノックアウトラットでは野生型ラットに比較して 35%の体重減少を観察した。また、モリス水迷路テストや放射状迷路テストの成績が悪く、空間記憶の障害が示唆された。さらに、GAD65/GAD67 ダブルノックアウトラットでは脳内 GABA 含量がゼロになり、全例で口蓋裂を示し、出生日に死亡した 5。これらのノックアウトラットの表現型とこれまで報告されているノックアウトマウスの表現型との類似性や相違点について紹介するが、いずれのノックアウト動物も GABA 研究に有用であると結論した。

（発表論文）

1: Uematsu M et al., Cereb Cortex 18: 315-30, 2008
2: Fujihara K et al., Transl Psychiatry 10: 426, 2020
3: Kakizaki T et al., FASEB J. 35: e21224, 2021
4: Fujihara K et al., Front Pharmacol. 12: 646088, 2021
5: Jiang W et al., FASEB J. 36: e22123, 2022

MEMO

5. OLETF ラットを用いたケストースの二型糖尿病予防効果の解析

北浦靖之
東海国立大学機構名古屋大学大学院生命農学研究科

ケストース（Kes）はスクロースに 1 分子のフルクトースが結合した三糖類の難消化性糖質で、タマネギやアスパラガス、ニンニク、大麦、ライ麦など野菜や穀物にも含まれている。砂糖に似たまろやかな甘味を有し、摂食後は消化されることなく大腸まで届き、ビフィズス菌、乳酸菌、酪酸産生菌などの有用菌の栄養源となることが示されている。Kes 摂取によりビフィズス菌や酪酸産生菌が特異的に増加すると共に、酢酸や酪酸が増えること、これらの作用により、アトピー性皮膚炎の改善等、様々な疾病の改善に寄与することが示されている。

糖尿病は主に一型糖尿病と二型糖尿病に分類され、インスリンを作る膵 β 細胞が壊された結果、インスリン分泌量が低下し、血糖値が上昇するのが一型糖尿病である。一方、二型糖尿病はインスリンによる血糖値低下作用が弱くなるとともにインスリン分泌も不十分となった結果、血糖値が上昇する疾病である。二型糖尿病は遺伝因子とともに生活習慣・外部要因などが関与して発症すると考えられているが、主たる原因は肥満であるとされている。肥満になると、血糖降下ホルモンであるインスリンに対する感受性が低下し、インスリン濃度に見合ったインスリン作用が得られていない状態「インスリン抵抗性」となる。この状態では、体内のインスリンの量に比して血糖降下作用が弱くなるため、血糖値を低く維持するために多くのインスリンが必要となり、血中インスリン濃度が高くなる「高インスリン血症」を示す。この状態が長期間続くと、徐々に膵臓からのインスリン分泌量が低下し、血糖値が上昇する。

OLETF ラットは、大塚製薬株式会社において Long-Evans 系ラットから選抜育成により確立された二型糖尿病のモデル動物であり、過食により肥満を呈するラットである。若齢期で高インスリン血症となり、加齢に伴い血中インスリン濃度が低下し、血糖値が上昇する特徴を示す。OLETF ラットを用いて、Kes による二型糖尿病の発症に対する影響を調べたところ、若年期の血中インスリン濃度が低値を示し、その後、血中インスリン濃度の低下が見られず、血糖値は正常の範囲内であった。また、Kes により腸内のビフィズス菌、酪酸産生菌、酢酸および酪酸が高値を示した。以上の結果より、Kes による腸内環境の変化により、OLETF ラットのインスリン抵抗性および二型糖尿病の進行を抑制する可能性が示唆された。

MEMO

6. ヒトiPS細胞由来間葉系幹細胞移植によるX-SCIDラット甲状軟骨再生研究

大西弘恵
京都大学　大学院医学研究科　耳鼻咽喉科・頭頸部外科

喉頭気管は呼吸の際の空気の通り道として非常に重要であり、軟骨はそこに力学的強度を与え通路を確保する枠組みとしての機能を担っている。外傷や悪性腫瘍などによる切除により生じた欠損への対策として、ポリプロピレンメッシュをコラーゲンスポンジで被覆した人工気管を作製し、臨床研究を行ってきたが、ポリプロピレンは非吸収性素材であるため小児への適応が難しい。そこで細胞を用いた組織再生を目指し、研究を行った。移植に用いる細胞源として、軟骨への分化能を持ち、扱いが簡便で他の組織での臨床応用実績が有る自家間葉系幹細胞（MSC）が第一候補として考えられたが、採取に侵襲を伴うこと、増殖能や分化能がロットごとに異なり品質が安定しないなどいくつかの問題がある。そこで、我々はこれらの問題に対する解決法として、理論上無限の増殖能を有するiPS細胞からMSCを分化誘導し、良質なストックを大量に作製して移植に用いることで移植細胞の質を安定させることを考え、ヒトiPS細胞由来MSC（iMSC）細胞塊をX-SCIDラットの甲状軟骨欠損部へ移植し、軟骨組織再生能について検討を行った。

ヒトiPS細胞からのMSC分化誘導法はiPS細胞研究所、池谷真先生からご教示頂いた。将来の臨床応用を念頭にフィーダーレスで樹立された細胞株をゼノフリーの培養条件で誘導した。甲状軟骨は神経堤細胞由来MSCを起源とすることから、まず未分化iPS細胞から神経堤細胞を誘導し、表面マーカーであるCD271に対する抗体でセルソーティングして目的細胞のみを分取し、一定期間増殖させて凍結ストックを作製した。この凍結ストックをMSC培地で培養することによりMSCを誘導し、FACS解析によりMSCマーカーの発現を確認し、品質確認されたヒトiMSCから細胞塊を作製した。

X-SCIDラットの甲状軟骨両翼に生検用パンチで直径1㎜の欠損を作製し、左側にのみiMSC細胞塊を移植した。移植後4週間後と8週間後に喉頭を採取し、軸位断での凍結切片による組織評価を行った。HE染色で左右の欠損部を比較したところ、移植側にのみ細胞周囲に小腔を形成した軟骨様組織の再生が見られた。免疫蛍光染色の結果、抗ヒト核抗体でラベルされる細胞の大部分が軟骨マーカーSOX9陽性であり移植細胞が軟骨細胞系統の細胞に分化していることが示された。さらにこの移植細胞周辺の再生部分は正常甲状軟骨と同様にSafranin O及びコラーゲンII陽性、コラーゲンI陰性であり、移植されたiMSCが硝子軟骨再生に寄与していることが示唆された。

本研究の結果から、iMSC移植による軟骨欠損部における硝子軟骨再生治療の可能性が示された。今後は生着及び軟骨分化効率の良いiMSCの誘導法や分化ステージの検討、3Dバイオプリンターを用いた複雑な形状のグラフトの作製や大型動物を用いた気管軟骨やへの応用などを目指したい。

MEMO

7. 完全ヒト iPS 細胞由来人工肝臓の作成と免疫不全ラットを用いた iPS 由来肝細胞大量培養システム構築による肝不全治療への展開

武石一樹 1、吉住朋晴 1、冨山貴央 1、伊勢田憲史 1、森永哲成 1、真下知士 2、
Alejandro Soto-Gutierrez3、
1. 九州大学大学院　消化器・総合外科
2. 東京医学研究所実験動物研究施設先進動物ゲノム研究分野
3. Department of Pathology, School of Medicine, University of Pittsburgh

【背景】iPS 技術は再生医療への応用が期待されるが、肝移植に代わる人工肝臓の作成には至っていない。それは、iPS 由来肝細胞（iPS-Hep）の未熟さと移植可能な 3D 培養ができないからである。今回、Scaffold を使用した iPS 由来人工肝臓（iPS-Liv）を作成し、臨床応用するために免疫不全ラットを用いた iPS-Heps の大量培養システム構築を目的とする。

【方法】1)ヒト iPS 由来細胞の作成：iPS-Hep、iPS 由来胆管細胞(iPS-C)、iPS 由来血管内皮細胞(iPS-V)、iPS 由来星細胞(iPS-S)を作成し、それぞれの細胞の分化度を評価。2)iPS-Liv 作成：ラット肝を脱細胞化した Scaffold に iPS 由来細胞を再細胞化し、iPS-Liv を作成。iPS-Liv を生体内に移植し、生体内での機能を評価。3)iPS-Heps の免疫不全ラットへの細胞移植：IL-2/Rac2 ダブルネガティブ免疫不全ラットに iPS-Heps を細胞移植し、iPS-Heps の再分布を評価。

【結果】1)：iPS-Heps、iPS-C、iPC-V、iPS-S はそれぞれ特異的マーカーの発現を認め、iPS-Hep はα1 アンチトリプシンや尿素代謝を認めた。次に iPS-Hep を iPS-C、iPS-V、iPS-S と共培養すると、iPS-Heps 単独培養と比べ、尿素代謝は有意に増加し、iPS-Heps の増殖速度は有意に増加した。2)iPS-Liv は 3D 培養することで ZO-1 やインテグリン 1 などの接着因子の発現を認め、2D 培養に比べ尿素代謝量は有意に増加し、Ki67 の発現も認めた。免疫抑制ラット（n=5）に移植したところ、移植 4 日目のラットの血中からヒト特異的アルブミンとα1 アンチトリプシン（32ng/ml）を検出し、iPS-Liv が生体内でも肝特異的タンパク質を発現した。3) iPS-Heps を免疫不全ラットに細胞移植すると、ラット肝内で 80%以上の再分布を認めた。gDNA を抽出し、ヒトおよびラット特異的配列にて PCR を行ったところ、移植したラット肝はヒトおよびラットのキメラとなっていた。さらに細胞移植したラットの血中にて、ヒトアルブミンを検出した。

【結論】ヒト iPS より移植可能な iPS-Liv を作成し、生体内でも機能することが明らかになった。また、iPS-Heps は免疫不全ラット内で再分布することができ、ラットを Bioreactor としてで大量培養できる可能性が示唆された。今後、さらなる研究を進めることで、iPS-Liv は臨床応用可能な肝不全の新たな治療方法になる可能性がある。

MEMO

8．ラット生殖工学の基盤技術開発から不妊症研究へ

本多　新
自治医科大学医学部先端医療技術開発センター

NBRP ラットの第 4 期では、体外受精が困難とされていたラットで誰でも簡単に効率よくラットの体外受精やノックアウト/ノックインを可能とする技術開発を成し遂げた。一番のブレイクスルーは「体外受精ができるようになったこと」であったわけだが、その秘訣をこれまで「麻酔下で採卵すること」と述べてきた。この事実に間違いはない。しかしながら、真に重要なことは麻酔下で採卵することではなく、「安楽死処置の際に二酸化炭素を使わないこと」である。ラットの体外受精の歴史は古く、複数発表されていたものの再現困難とされてきた。論文に記載のあるとおりに追試しても成功せず、諦めた研究者も多く存在する。一方で、体外受精が成功している術者もなぜ自分たちが成功しているのに再現が困難とされているのか理解できない状況が続いている。答えは明快で、頸椎脱臼などの二酸化炭素を用いない方法を経由して採卵すれば体外受精が成功するが、二酸化炭素を使う場合、その卵子は受精するものの産仔への発生能を消失しているからである。我が国は体重が 200g を越えるラットは頸椎脱臼による安楽死処置を推奨していない。また、交尾により体内で受精した受精卵を採取する際に二酸化炭素を用いた場合、そのようにして得られた受精卵の発生能力にはなんら影響がないことから、この事実は気づかれないままとなってきた。私はこの事実に気づき、麻酔下で採卵することを提唱し論文発表した（Honda A. et al, Sci. Rep. 2019）傍ら、二酸化炭素に暴露した場合、ラットの卵子にどのようなことが起こっているのか追い続けてきた。本講演では、我々がラットで見いだした新しい不妊症（HDV：Hidden Degradation of Viable oocytes）の詳細についてだけでなく、それがある不妊症の原因であったこと、そしてその治療法についても発表する。単なる技術開発だけにとどまらず、そこから生命現象の深淵に迫り、疾患の治療法にまで繋げることができるラットの魅力を紹介したい。

MEMO