



ナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」

第18回ラットリソースリサーチ研究会

講演抄録集

令和7年2月7日（金） 13:00 – 17:30



第18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： 井橋 俊哉（京都大学）

成瀬 智恵（京都大学）

ラットリソース

1. はじめに：第5期 NBRP ラットの後半に向けての取り組み 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. AAV ドナーを用いた簡便な長鎖ノックインラット作製方法の開発 13:15-13:45
阿部 学
新潟大学 脳研究所モデル動物開発分野
3. オペラント行動の学習・意欲の神経基盤解析における Cre 発現ラットの利用 13:45-14:15
井口 義生
福島県立医科大学 生体機能研究部門
4. 重症免疫不全ラットによる膵癌 PDX モデルの開発とモデル動物での
IVR 治療および抗癌剤治療の効果判定とオーダーメイド治療の実用化 14:15-14:45
影山 健
大阪公立大学 医学部放射線診断学・IVR 学

休憩 14:45-15:00

第2部

座長： 成瀬 智恵（京都大学）

浅野 雅秀（京都大学）

ラットリサーチ

- | | |
|---|-------------|
| 5. ボリューム電子顕微鏡を活用したラットの腎糸球体の 3D 超微形態解析
市村 浩一郎
順天堂大学 医学部 解剖学・生体構造科学講座 | 15:00-15:30 |
| 6. 粘り強さの神経メカニズム
ーラットの利点を活かした神経回路機能研究ー
小川 正晃
滋賀医科大学 生理学講座 生体システム生理学部門 | 15:30-16:00 |
| 7. 肥満糖尿病モデル ZFDM ラットが有するリポカリン 2 (Lcn2) 遺伝子の
ナンセンス変異はラット系統に広く存在する
横井 伯英
京都大学 大学院農学研究科 動物遺伝育種学分野 | 16:00-16:30 |
| 8. 遺伝子改変ラットを用いた体温調節と肥満発症の中樞神経メカニズム
の解明
中村 和弘
名古屋大学 大学院医学系研究科 統合生理学 | 16:30-17:00 |
| 9. 総合討論
座長 浅野 雅秀
成瀬 智恵 | 17:00-17:30 |

抄 録

1. はじめに：第5期 NBRP ラットの後半に向けての取り組み

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、2024年12月時点で1,000系統を収集し、約1,600件を国内外に提供してきました。おかげを持ちまして第5期も折り返し点を過ぎて、中間評価では「本事業は順調に進捗しているものの一部に課題がある(A-)」との評価をいただきました。

第5期の重点課題として「ラット生殖工学技術の開発と研修による普及」を掲げておりますが、2019年から始めたラット生殖工学研修は、韓国からの3名を含めて32研究機関から44名の参加をいただきました。また、昨年10月には国動協の高度技術研修でも10名の受講生を迎えて実施しました。今後も続けますので、受講したい方はNBRPラット事務局までご連絡ください。

2023度からは基盤技術整備プログラム(中間評価はA)の支援をいただき、「Creドライバーラットの網羅的/局所的/機能的な解析技術の開発」を進めております。代表機関(京都大学・浅野)は「機能的な解析技術の開発」として、行動解析やMRI解析を、分担機関(東京大学・真下先生)は「網羅的な解析技術の開発」として、網羅的な発現解析を行います。もう一つの分担機関(愛知医科大学・松下先生)は「局所的な解析技術の開発」として、AAVベクターを用いることで交配を行わず、局所的な発現解析を行います。同じプロモーターを用いても導入方法によって、Creの発現部位の正確性が異なったり、一部のCreマウスでは行動に異常が見られるなどが明らかとなり、Creドライバーラットの多面的な特性解析を実施して高品質のラットの提供を行います。現在提供可能なCreラットは15種類、22系統あり、今後益々増えていく予定です。

MEMO

2. AAV ドナーを用いた簡便な長鎖ノックインラット作製方法の開発

阿部 学¹, 夏目 里恵¹, 竹鶴 裕亮², 中務 胞¹

1. 新潟大学 脳研究所 モデル動物開発分野

2. 東京大学 医科学研究所 実験動物研究施設 先進動物ゲノム研究分野

ゲノム編集により遺伝子改変動物を作製するためには主にマイクロインジェクション法（微量注入法）が用いられていたが、熟練した技術と高価な設備が不要であるエレクトロポレーション法（電気穿孔法）も普及してきている。しかし試薬を直接注入するマイクロインジェクション法と異なり、エレクトロポレーション法では十分量のドナーDNA 分子を核内まで送達することが物理的に難しいためノックイン配列の長さにも限界があると考えられていた。採取した初期胚へ体外でエレクトロポレーションにてゲノム編集試薬を導入する方法では、一本鎖ドナーDNA により効率的にノックインできることも示されているが、AAV（アデノ随伴ウイルス）ベクターが透明帯を透過して胚に感染し相同組み換えのドナーDNA として機能しうることが明らかとなり、現在では AAV ベクターへ搭載可能な四千塩基程度までのノックインが比較的容易となっている。ノックイン配列の長さが千塩基程度までであれば蛍光タンパクや DNA 組換え酵素などの比較的小型の一つの遺伝子に制限されるが、四千塩基程度であればより大きな遺伝子や複数遺伝子、プロモーター等も加えた遺伝子発現カセットなどで精巧な遺伝子改変が可能になることから、この差は非常に大きいと考えられる。一方で、受精卵を有する妊娠メス動物の卵管内にゲノム編集試薬を注入し、卵管全体に対してエレクトロポレーションを行う GONAD 法が確立された。胚を体外に取り出すことなく簡便に遺伝子改変動物を作製できる非常に優れた方法であり、数百塩基程度までのノックインが可能であることは示されていたが、ドナーDNA として AAV ベクターを機能させる場合は感染に長時間の受精卵との共培養が必要であるため、単純に GONAD 法へ適用することは困難であると我々は予想していた。しかし AAV がエレクトロポレーションにより核内まで物理的に移行する可能性を考慮し、AAV ベクターをゲノム編集試薬に加え共培養の時間を置くことなく生体外および生体卵管内の受精卵に対しエレクトロポレーションを行うことで、実際に長鎖ノックイン動物が作製可能であることを確認できた。我々はこの手法により複数のラット系統でノックイン動物を作製し、さらにマウスでは flox 変異の導入にも成功しているため、今後のラットリソースの拡充に寄与できることを期待している。

MEMO

3.オペラント行動の学習・意欲の神経基盤解析における Cre 発現ラットの利用

井口 善生

福島県立医科大学 生体機能研究部門

ヒトを含む動物は，“自らの欲求に基づいて行動を自発し目標を達成すること”を試行錯誤しながら学習する。動物が絶えず変化する環境に適応する上でエッセンシャルなこの学習のプロセスを実験室内でシミュレートしたものが、実験動物のオペラント条件づけである。オペラント条件づけの実験心理学的解析を、ラットを被験体として研究したことに端を発した発表者の関心は、精神疾患モデルの表現型として利用した研究などを経て、オペラント条件づけの脳神経回路基盤の解明を目指した現在の行動神経科学の研究へと繋がっている。

脳機能解析の技術は総じて、最初期の吸引や電流による標的脳領域のバルク破壊から、局所的薬物注入による神経細胞特異的な破壊を経て、遺伝学的な技術に基づく標的細胞種特異的な破壊へと進歩し、loss-of-function の解析精度が飛躍的に向上した。より近年においては、光遺伝薬や化学遺伝学のシステムを利用することで、標的細胞種特異的な活動を *in vivo* で操作（活動亢進や活動抑制）したり、あるいは計測・可視化したりすることも可能となっている。このような今日の先端的な神経科学研究を支える上で、Cre 発現ラットはきわめて重要な技術的リソースの一角を成している。

発表者は、各種の Cre 発現ラットを利用して、大脳基底核の入力層を形成する線条体と、線条体の機能を修飾する中脳に起始するドーパミン系が、オペラント条件づけをどのように支えているのかを研究している。当日は、オペラント行動の学習（報酬と連合した適切な行動に関する“知識の獲得”プロセス）と、オペラント行動の意欲（特に、報酬を得るための“エフォートの管理”プロセス）に関する我々の最新の知見について、各種 Cre 発現ラットをどのように利用しているのか、というテクニカルな点を説明しながら、紹介する。さらに、オペラント行動の学習や意欲の神経基盤の包括的理解をより一層進展させ、オペラント条件づけを素過程とする精神疾患の病態解明や治療法開発に資する研究を展開するための Cre ラットの今後の利用方略について展望する。

MEMO

4.重症免疫不全ラットによる膵癌 PDX モデルの開発とモデル動物での IVR 治療および抗癌剤治療の効果判定とオーダーメイド治療の実用化

影山 健

大阪公立大学 放射線診断学・IVR 学

従来、抗癌剤開発において培養皿のヒト癌細胞株で抗癌剤の抗腫瘍効果判定試験が行われてきた。しかし、抗癌剤スクリーニング検査では、培養皿で効果が認められても、ヒト臨床試験では効果が見られないことが多い。新規に開発された抗癌剤のうち、およそ 80%の薬剤がヒト臨床試験で抗腫瘍効果がないと判定される。近年、ヒト腫瘍異種移植 (Patient-Derived tumor Xenograft: PDX) 動物モデルで、抗癌剤の効果判定をする動きがある。PDX モデルとは、手術や生検で摘出された患者腫瘍を、直接免疫不全動物に異種移植したモデルを指す。PDX モデルは、患者に代わり前もって癌治療を動物上で行うことができる癌治療スクリーニング法である。実臨床において、同じ抗癌剤を用いても患者毎にその効果は異なる。患者自身は限られた生命で、幾重もの抗癌剤の使用は不可能である。したがって、PDX モデルを用いて、一人一人の患者にふさわしい抗癌剤を見つけ出すことは、オーダーメイド医療の実践の一助になり得る。

2016 年、患者から取り出された新鮮な肝臓腫瘍 (ぶどう膜悪性黒色腫肝転移) 組織を用いて、ヒト腫瘍を直接肝臓に移植するマウス PDX モデルの作成に成功した。ほとんどの PDX モデルは、マウス皮下に腫瘍異所移植したモデルであるが、本来腫瘍が存在すべき場所に同所移植した PDX モデルでは、抗癌剤の薬物効果判定を期待できるモデルとなった。

2018 年、手術で摘出した患者由来膵癌を一旦凍結保存し、その膵癌組織を解凍して、免疫不全マウスの肝臓に移植する膵癌肝転移 PDX マウスモデルの作成に成功した。この実験では、患者原発膵癌切除後に多発肝転移が出現する前に、患者の転移再発を見越したモデルを作成することができた。また、この実験では一旦凍結保存した腫瘍をモデル作成の必要性に応じて、腫瘍を解凍し意図的に PDX モデルを作成可能にした。凍結保存の成功は、腫瘍バイオバンキングの構築に貢献したと言える。

2020 年、手術で摘出された直後の患者由来膵癌を一旦凍結保存し、その膵癌組織を解凍して、免疫不全ラットの肝臓に移植する膵癌肝転移 PDX ラットモデルの作成に成功した。ラットモデルの実現においては、NBRP と免疫不全ラット開発者の真下先生のご好意によるラット提供の賜物である。マウスより体格の大きいラット PDX モデルは、薬物治療のみならず侵襲的治療が可能となる。カテーテルによる動脈内での抗癌剤動脈注入療法が可能となる。抗癌剤の投与方法においても、静脈あるいは動脈でより良い投与方法を選択できることは、患者治療に還元できる恩恵が大きい。

2023 年、患者原発膵癌を肝臓に移植したラット PDX モデルにシスプラチンをカテーテルから肝動脈に投与する動注療法と尾静脈からの静注療法の比較試験を行った。投与方法で腫瘍制御効果に差が見られることがわかった。中動物のラットであるからこそ、ヒトと同様の侵襲的治療が可能となった。

現在は、原発膵癌皮下移植ラットモデルにおいて、実臨床で頻用されている多剤化学療法をラット PDX モデルで試験を行っている。膵癌の代表的治療法である FOLFIRINOX 療法と GnP 療法をモデル上で行い、抗腫瘍効果を検討している。現在、遂行中の実験は、患者治療に直結する抗癌剤治療であり、将来患者治療に還元できると考える。多数の抗癌剤があるにも関わらず、患者個人に相応しい抗癌剤を見つけ出す作業は非常に困難である。その点、動物に患者癌組織をラットに移植できるとなると、多数の抗癌剤を一斉に評価することが可能となり、患者個人のための抗癌剤選択試験が実施できる。結果として最良の抗癌剤を患者に提供でき、患者個人に特化したオーダーメイド治療の実践が可能となる。

MEMO

5. ボリューム電子顕微鏡を活用したラットの腎糸球体の 3D 超微形態解析

市村 浩一郎

順天堂大学 医学部 解剖学・生体構造科学講座

透過電顕 (TEM) は糸球体の病理変化を評価するうえで重要な手法である。しかし、通常の TEM 解析では少数の切片を観察するに留まるため、低密度や限局性の病変を見逃してしまう可能性が高い。また、糸球体の特定の部位 (例えば、輸入・輸出細動脈やレニン細胞など) を狙って観察することも難しい。このような問題を解決し、糸球体の全体の超微形態解析を可能とするのがボリューム電顕の一種であるアレイトモグラフィ (AT) 法である。

AT 法では、糸球体の完全連続切片を基盤に貼り付けて回収し、走査電顕の自動撮影システムを使って全ての切片から糸球体の断面像 (TEM 像と同等の画質) を取得できる。さらに、連続切片像からは任意の構造を 3D 再構築し、その立体構造を観察することも可能である。しかし、実際には糸球体の完全連続切片を作成・回収するうえで、従来法にはいくつかの問題があり、新たな切片作成・回収デバイスの開発が必要であった。そこで、私たちは簡単かつ安定的に完全連続切片を作成・回収できるダイヤモンドナイフデバイスを独自開発し、活用している。

本発表では、新型デバイスの有用性や糸球体の解析のために最適化した AT 法のワークフローを紹介するとともに、最適化 AT 法を活用したラットの糸球体の解析例をお示ししたいと考えている。

MEMO

6. 粘り強さの神経メカニズム —ラットの利点を活かした神経回路機能研究—

小川 正晃

滋賀医科大学 生理学講座生体システム生理学部門

繰り返し失敗しても粘り強く取り組む能力は、目的達成のために不可欠である。例えば自然界の報酬は多くの場合得られるかどうかが不確実であり、行動の選択肢も限られるため、その報酬を長期的に最大にするには、期待通りに報酬が得られず期待外れが生じてもそれを乗り越える「粘り強さ」が必要である。ヒトでこの機能が不足すると失敗した後のうつ状態につながる。一方、この機能が過剰だと負けが込んでも執拗に取り返そうとするギャンブル依存などにつながる。しかしこれまで、粘り強さを支える神経メカニズムは不明であった。中脳・腹側被蓋野 (ventral tegmental area: VTA) のドーパミン細胞は、報酬を目的とした学習・行動において中心的な役割を果たす。従来、典型的な VTA のドーパミン細胞は、予想以上に報酬を獲得すると活動が増加する一方、期待外れな結果に対して活動が低下することで、報酬価値の予測に反した結果 (= 報酬予測誤差) を基にした即時的な行動調整に寄与すると考えられてきた。一方、我々は最近、期待外れな結果を乗り越える報酬追求行動を定量的に評価できるラットモデルを独自に開発し、さらに遺伝子改変ラットを用いたドーパミン神経細胞・回路特異的な神経活動計測法・操作法と組み合わせた。その結果、期待した報酬が無い期待外れのときに活動が増加しその後の行動継続に寄与する、すなわち粘り強さを担う VTA ドーパミン細胞・回路を見出した (Ishino et al., *Science Advances*, 2023)。さらに最近では、1.この新規なドーパミン活動が報酬獲得までに乗り越えるべき心理的距離に関する予測誤差を担うこと、2.さらに主要な投射先の側坐核において、この新規ドーパミン信号によって活動が形成され期待外れを乗り越える行動に寄与すると考えられる D1 受容体陽性細胞を見出している (未発表)。また独自開発したラット行動モデルを活かし、ドーパミン以外のニューロモジュレーター神経回路研究も行っている (未発表)。本講演では、以上のようなラットの利点を活かした神経回路機能研究とその展望について紹介すると共に、ヒト臨床への応用に向けた研究展望についても紹介する。

MEMO

7. 肥満糖尿病モデル ZFDM ラットが有するリポカリン 2 (*Lcn2*) 遺伝子のナンセンス変異はラット系統に広く存在する

横井 伯英

京都大学 大学院農学研究科 動物遺伝育種学分野

糖尿病などの多因子疾患の遺伝素因や発症・進展機構を解明するには、遺伝的および環境的に統御可能な動物モデルを用いた解析が有力な手段となる。我々は 2013 年に、レプチン受容体のミスセンス変異 (*fatty, fa*) により肥満を呈する Zucker fatty (ZF) ラットを起源として、新たに肥満性の 2 型糖尿病を発症する Zucker fatty diabetes mellitus (ZFDM) ラットを確立した。ZFDM ラットは肥満に伴うインスリン抵抗性を呈するとともに、個々の膵β細胞からのインスリン分泌量の不足 (質的障害) と膵β細胞量の減少 (量的障害) に伴うインスリン分泌不全による糖尿病を発症する。

これまで、ZFDM ラットの膵島に焦点をあてたトランスクリプトーム、エクソーム、メタボロームおよびプロテオーム解析から、インスリン分泌不全の分子機構の一端を明らかにしてきた。とくにトランスクリプトームおよびエクソーム解析から、ZFDM ラットはリポカリン 2 (*Lcn2*) 遺伝子のナンセンス変異を有することを見出した。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により、ZFDM ラットが有する当該変異を野生型塩基に置換し、糖尿病発症について観察したが、ゲノム編集された 2 系統の ZFDM ラットは、オリジナルの ZFDM ラットと比較して糖尿病の発症週齢や発症率には相違が認められなかった。また、ZFDM ラットと ZF ラットの交配により作出した戻し交雑仔を用いた遺伝解析において、当該変異と糖尿病発症との関連はみられなかった。興味深いことに、当該変異は 1 型糖尿病モデル BB ラット、アジュバント誘発関節炎モデル DA ラットや正常系統として頻用される F344 ラットなど、多数のラット系統に広く存在することがわかった。当該変異は機能欠失変異と考えられるため、これらのラット系統が *Lcn2* 欠損ラットとして利用できる可能性が示唆される。

本講演では、*Lcn2* 変異の病態発症における役割および ZFDM ラットの糖尿病の遺伝素因について最新の知見を紹介したい。

- 1) Yokoi et al. bioRxiv 2024 doi:10.1101/2024.09.13.609843
- 2) Yoshida M et al. Biochem Biophys Res Commun 605:90-96, 2022
- 3) Hayami et al. J Diabetes Investig 11:1434-1447, 2020
- 4) Nakanishi et al. Exp Anim 66:91-98, 2017
- 5) Gheni et al. J Diabetes Res Article ID 261418, 2015
- 6) Yokoi N et al. J Diabetes Res Article ID 103731, 2013

MEMO

8. 遺伝子改変ラットを用いた体温調節と肥満発症の中枢神経メカニズムの解明

中村 和弘

名古屋大学大学院医学系研究科統合生理学

体温と代謝の恒常性は哺乳類の生命維持に不可欠である。視床下部の視索前野には、体温調節の中枢が存在することが知られている。しかし、体温調節中枢の司令塔として機能する神経細胞群は長らく不明であった。我々は最近、遺伝子改変ラットを用いた実験によって、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) の EP3 受容体を発現する視索前野のニューロン (EP3 ニューロン) が体温調節に重要な司令塔であることを発見した。EP3 ニューロンの活動は環境温度の上昇に反応して活性化される一方で、低温環境では抑制され、また、発熱メディエーターである PGE₂ によっても抑制された。化学遺伝学 (DREADD) を用いた手法によって、室温で EP3 ニューロンを選択的に刺激すると、皮膚血管の拡張が誘導され (熱放散が促進され)、体温が低下した。一方、EP3 ニューロンを抑制すると、褐色脂肪組織の熱産生を伴う体温上昇が誘導され、あたかも発熱が生じたかのようになった。また、EP3 ニューロンは軸索末端から GABA を放出し、緊張性の (tonic な) 抑制シグナルを発して、視床下部背内側部の交感神経駆動ニューロンを上位から制御していることも見いだした。したがって、視索前野の EP3 ニューロンは環境温度 (皮膚温度) の情報にもとづいて、視床下部背内側部や他の交感神経駆動部位に tonic な GABA 作動性の抑制伝達を行うことによって、正常な体温の調節ならびに感染時の発熱惹起を担うという、体温調節の基本原則を解明した (Nakamura, Y. *et al. Science Advances* 8:eadd5463, 2022)。

また我々は最近、視床下部背内側部の交感神経駆動ニューロンが、抗肥満シグナルであるレプチン-メラノコルチンシグナルを受容するメラノコルチン 4 型受容体 (MC4R) を発現していること、そして MC4R タンパク質がこれらのニューロンの一次繊毛に局在していることを見出した。さらに驚くべきことに、これらの視床下部ニューロンの MC4R 局在一次繊毛は、加齢とともに徐々に短くなることを発見した。我々は、遺伝子改変ラットを用いて、この MC4R 局在一次繊毛を選択的に退縮させることに成功し、退縮させたラットは、若くして代謝低下を示して肥満になるとともに、ヒトの肥満患者で見られるようなレプチン抵抗性を示した。我々は、この「加齢性繊毛症」が、メラノコルチンシグナルに対する感受性の鈍化を引き起こし、褐色脂肪組織の熱産生と全身代謝を低下させ、その結果、加齢性肥満とレプチン抵抗性を発症させるという、これまでにない肥満発症メカニズムを提唱した (Oya, M. *et al. Cell Metabolism* 36:1044–1058, 2024)。

本講演では、我々の最近の知見を紹介し、体温調節と代謝恒常性の基本的な回路メカニズムについて議論したい。

MEMO