

「誰でも」「簡単に」「効率よく」モデルラットを作出できる技術を開発

概要

ラットは基礎・医学研究に幅広く利用され、私達に多くの知見と恩恵をもたらしています。最近ではゲノム編集技術^{*1}の発達によって比較的簡単に遺伝子改変が可能となり、多くの疾患モデルラットが作製され病気の原因解明や治療法の開発に役立っています。しかしながら、マウスに比べると過排卵^{*2}や体外受精^{*3}の技術開発が遅れているため、遺伝子変異ラットの作製には高い技術と予算そして多くのラットの犠牲が必要不可欠でした。

今回、京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設 本多新 特定准教授と浅野雅秀 同教授らの研究グループは、「誰でも」「簡単に」「効率よく」モデルラットを作出できる技術開発に成功しました。まずラットに投与するホルモンの組み合わせを工夫して、試した全てのラット系統で高効率な（最大約 19 倍）過排卵を実現しました。次に、それらの卵子で体外受精法の開発を行いました。これまで複数の研究グループがラットでの体外受精に成功していますが、実際は再現が非常に困難でほとんど普及していませんでした。本研究グループはラットから卵を取り出す方法を工夫することで、再現よく体外受精が成功することを発見しました。さらに、それら体外受精卵子を使って遺伝子破壊（KO）^{*4}を行ったところ、その全て（100%）の個体で遺伝子が完全に破壊されていました。最後にウイルスベクターを用いた簡便な遺伝子置換（KI）^{*5}を行ったところ、やはり非常に高効率（33~47%）に達成できることを発見しました。特に本研究で用いられている遺伝子改変法は、高額な器機を必要とせず、わずかなトレーニングで習得できる技術を活用していることから、「誰でも」「簡単に」「高効率」なモデルラットの作出を可能とするものと言えます。

今後はこの技術を研修により積極的に普及する予定です。我が国は iPS 細胞などを利用して異種の臓器を作出するような研究^{*6}でも世界をリードしており、今回開発された一連の技術が再生医療や絶滅危惧種の保存などにも貢献することが期待されます。

本研究成果は、2019 年 8 月 9 日に、国際学術誌「Scientific Reports」のオンライン版に掲載されました。

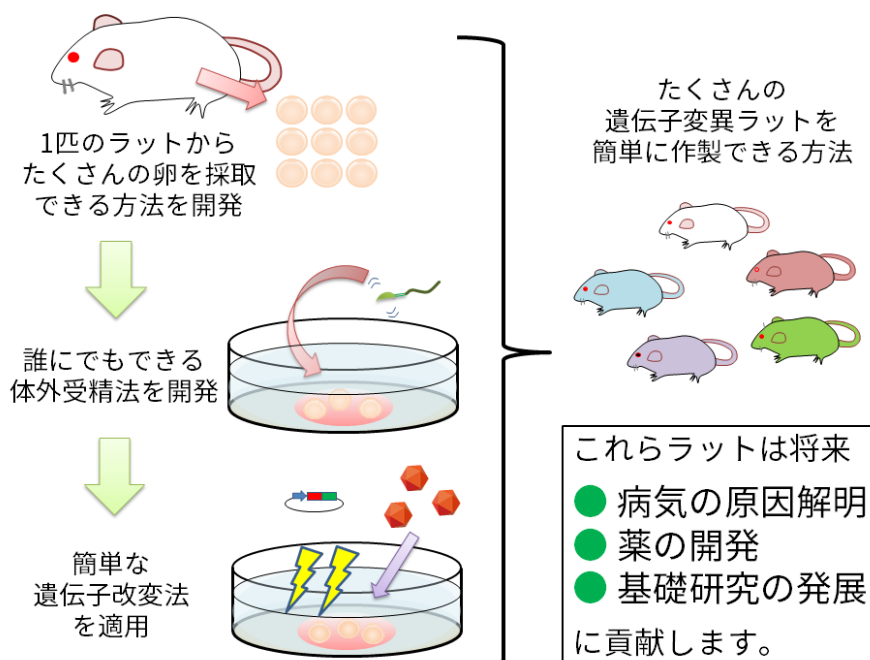


図 1: 本研究の概要図

研究のポイント

- ほとんど採卵できないとされていたラットからの過排卵に成功
- 再現困難とされていたラット体外受精法を誰でも再現可能なものに改良
- ラット体外受精卵子での遺伝子破壊(KO)では 100%の効率を実現
- ラット体外受精卵子での遺伝子置換(KI)も簡便かつ高効率(33-48%)に達成

1. 背景

ラットは古くから優れたモデル動物として研究に活用されてきました。自然発症や遺伝子変異導入あるいはゲノム編集により、数多くのモデルラットが作出され、私達の健康維持や疾病の克服などに貢献しています。我が国ではナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) ^{*7}により、数多くの生物種について、その生物資源が厳重な管理体制の元に維持されており、ラットも NBRP-ラット (代表者：京都大学 浅野雅秀教授) の事業により貴重なラット資源が寄託・保存・提供されて世界中の研究に役立てられています。一方、同じげっ歯類のマウスはラットに比べて圧倒的にモデル動物作製に関する基盤技術整備が進んでいることから、ラット以上に多くの貴重な生物資源が日々開発され続けており、基礎・応用研究発展に寄与しています。ラットにはヒト疾患モデル開発あるいは記憶・学習の研究などにおいて、マウスと異なる利便性があることが知られており、マウスと同レベルの基盤技術整備を進めることが求められていました。モデルラットを作製する際には、できるだけ多くのラット受精卵が必要ですが、ラットの場合はたくさんの卵子を得ることが困難であるだけでなく、得られた卵子を体外で受精させることもほとんどできませんでした。一度に体外でたくさんのラット受精卵を得ることができるようになれば、遺伝子改変も容易になるばかりか、ラットの犠牲も最小限に抑えることが可能となります。

2. 研究手法・成果

研究グループは、ラットで「誰でも」「簡単に」「効率よく」遺伝子改変し、モデル動物を作出できるような技術を開発することを目標に研究を開始しました。まず目指したのはラットでの過排卵です。いくつかの主要系統では過排卵が可能であることが知られていましたが、ラットのゲノム解読に用いられた Brown Norway (BN) という系統では、一頭からたった平均 2.2 個程度しか卵子が得られないことが報告されていました。そこで研究グループは、どのような系統からでもたくさん卵子が得られるような方法を開発するために、性周期の同期化^{*8}や排卵抑制ホルモンの制御を組み合わせることにより、2.2 個程度しか採卵できない BN ラットから平均 42 個もの卵子が得られることを発見しました。さらに、この方法を活用すれば、他の系統でも排卵数が増加することを突き止めました。

次に研究グループは、そのように過排卵させた卵子で体外受精をさせることを目指しました。これまで複数の論文からラットの体外受精が可能であることは証明されていましたが、それを再現できる研究グループはごく少数に限られており、一般的に普及させるには高いハードルがありました。研究グループはラットの安楽死に原因があることを突き止め、麻酔下で寝ているラットから卵子を採取して体外受精に用いることで、再現よくそこから産仔が得られることを見出しました。本研究の目的は、簡便で効率の良いモデルラットを作製する方法を開発することであるため、そのように得られた体外受精卵子でゲノム編集 (遺伝子の破壊や置換) ができるか否かを検討しました。さらにそれらは、できるだけ簡便かつ低予算で実現できるように、エレクトロポレーション^{*9}による遺伝子破壊とウイルスの感染による遺伝子置換を試しました。驚いたことに、体外受精卵子を用いて遺伝子破壊を行うと、これまで報告のあった、自然交配卵子を用いたどの方法よりも高効率(100%)に遺伝子が破壊されていることが判明しました (図 2)。さらにウイルスベクターを用いた遺伝子置換実験も

33.3%~47.4%と高効率で実現できることが明らかになりました（図3）。

本研究ではどのような系統からでも効率よく卵子を集め、それら卵子から再現良く体外受精で産仔が得られる技術を開発しました。その技術を活用しながら、できるだけ簡便な方法でゲノム編集を行ったところ、非常に高効率で遺伝子改変できることが明らかになりました。このことから「誰でも」「簡便に」「効率よく」ラットでの遺伝子改変が可能となり、今後は有用なモデルラットの作製やそれらを用いた研究がより活発化すると期待されます。



図2: 色素遺伝子の破壊により白いラットのみが産まれた

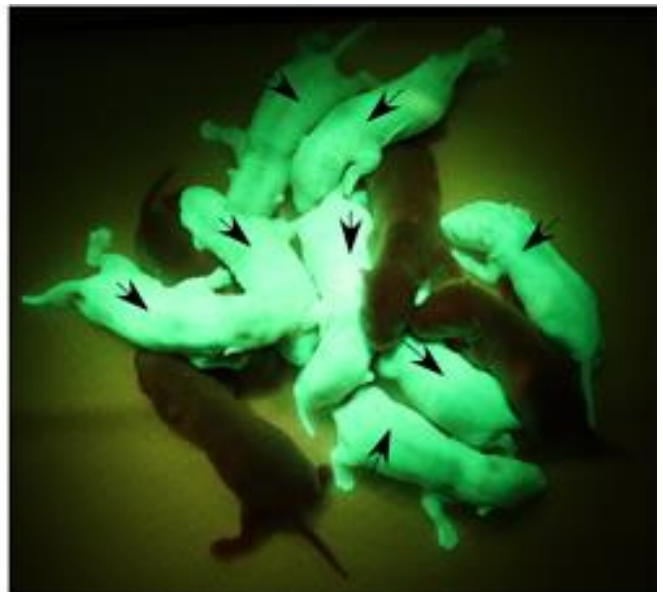


図3: 遺伝子置換により産まれた緑色蛍光遺伝子導入ラット

3. 波及効果、今後の予定

本研究成果により、これまでは限られた研究グループのみで可能だったラットでのモデル動物作製に関して、その難易度は大幅に下がったことから、ラットを用いた研究の裾野がこれまで以上に広がることが期待されます。今後は、より多くの研究グループが自らモデルラットを作製できるよう、本技術の研修などを積極的に行って、ラットを用いた研究を推進させます。具体的には、マウスでは再現できないヒトの疾患研究や、iPS細胞を用いてラットの体内に異種の臓器を作出して再生医療に役立てる研究、あるいはラットの体内に絶滅危惧種の精子や卵子を作出する研究などでの貢献が期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

- 科学研究費補助金・新学術領域研究「性スペクトラムー連続する表現型としての雌雄一」公募研究（課題名：性染色体XO型の絶滅危惧種アマミトゲネズミの性スペクトラム、代表者：本多新、平成30年度～令和元年度）
- 国立研究開発法人日本医療研究開発機構ナショナルバイオリソースプロジェクト（課題名：ナショナルバイオリソースプロジェクトーラット（第四期）、代表者：浅野雅秀、平成28年度～令和3年度）
- 国立研究開発法人日本医療研究開発機構ナショナルバイオリソースプロジェクト基盤整備プログラム（課題名：ラット生殖工学基盤技術開発によるリソース保存の効率化と新規利用者の拡大、代表者：浅野雅秀、令和元年度～令和2年度）

<用語解説>

※1『**ゲノム編集**』：CRISPR/Cas9に代表される遺伝子改変技術の総称。細胞や受精卵などにゲノム編集酵素複合体（標的となる遺伝子の特定の部位に結合する旗と、その旗を認識して遺伝子を切断するハサミのようなもの）を導入するだけで、狙った遺伝子の特定の場所に変異を導入することができる。遺伝子を破壊した受精卵を発生させれば、その遺伝子が破壊された産仔が得られる。

※2『**過排卵**』：一頭の動物からたくさん未受精卵を採取する技術。一般的に動物は性周期に従って限られた数の卵子が卵巣から排出されるが、排卵に関与するホルモンを投与することにより、排卵するタイミングを調整したり、その数を増加させたりすることができる。

※3『**体外受精**』：体外で精子と卵子を混ぜて受精卵を得る技術。ラットでは再現が困難とされており、実際にこれまでラットで行われてきた全てのゲノム編集実験は体内受精卵（雄との交配由来）が用いられてきた。

※4『**遺伝子破壊（KO）**』：遺伝子を破壊すること。ゲノム編集による遺伝子破壊は、標的となる遺伝子の一部に数塩基の挿入や欠失を誘起し、遺伝子の機能を消失させる。

※5『**遺伝子置換（KI）**』：KOとは異なり、標的となる遺伝子の一部を別の遺伝子と入れ替える技術。入れ替えることにより標的遺伝子に別の性質を獲得させたり、壊れた遺伝子の機能を修復させたりすることが可能となる。

※6 『異種の臓器を作り出す研究』：キメラ動物作製関連技術。ゲノム編集により特定の細胞や臓器を生じないようにした胚に、その胚とは異なる動物種の iPS 細胞を注入して異種間キメラ（異なる動物種の細胞からなる一つの個体）を作製すると、注入した iPS 細胞が本来であれば生じないはずの臓器に分化することで、iPS 細胞からなる細胞や臓器を作製することができる。我が国でもこれまでにマウスとラットでの異種間補完で複数の成功報告があり、例えばラットの体内でマウスのすい臓が作製され、そのすい臓は別のマウスに移植すれば、血糖値の制御で機能することも確認されている。

※7 『性周期の同期化』：ほ乳動物の雌は一定期間で排卵周期を繰り返している。ヒトならば28日、ラットで4～5日、マウスで4日である。ラットでは黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）を投与することにより、その排卵周期をコントロールすることができる。

※8 『ナショナルバイオリソースプロジェクト』：バイオリソースとは生物資源のことを意味する。マウス、ラット、ニホンザル、ニワトリ、植物、微生物など多岐にわたる生物資源が存在する。これらは一度失われてしまえば、完全に復活させることは困難を極める。そこで、我が国では貴重な生物資源を収集・維持・管理・提供することで、保存しながら他の研究者に活用させる事業が存在する。現在は国立研究開発法人日本医療研究開発機構の推進事業としてナショナルバイオリソースプロジェクトが行われている。

※9 『エレクトロポレーション』：電気穿孔法のこと。細胞や受精卵に電気を与えて瞬間的に細胞膜をゆるめることにより、細胞外にあるゲノム編集核酸酵素複合体を細胞内に導入する技術。金子武人（現：岩手大学准教授）らによって開発された本方法により、一度に処理できる受精卵の数が飛躍的に増加した。

<研究者のコメント>

●ラットはマウスと同じ“ネズミ”ですが、記憶、学習、糖代謝、初期発生などでマウスとは異なる角度から真実に迫ることができます。たくさんの受精卵から効率よく遺伝子改変ラットを作出できる技術は、多くの研究者が待ち望んでいたものの一つです。今後ラットを用いた研究が活発になれば、より効果的に生命現象の解明や病気の克服が進展するでしょう。本発表で公開した技術は積極的に普及いたしますので、お気軽にお問い合わせ下さい。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Efficient derivation of knock-out and knock-in rats using embryos obtained by in vitro fertilization（体外受精卵による効率的な遺伝子破壊・遺伝子置換ラットの作出）

著者：Arata Honda, Ryoma Tachibana, Kazuya Hamada, Kohtarō Morita, Naoaki Mizuno, Kento Morita, and Masahide Asano.

掲載誌：Scientific Reports DOI：未定

<共同研究グループ>

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

本多新、橘亮磨、濱田和弥、守田昂太郎、森田健斗、浅野雅秀

東京大学医科学研究所 幹細胞治療部門

水野直彬