

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成27年12月 37号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

<第123回研究会（平成26年 9 月27日）>

テーマ：循環器研究の新たな展開

1. ゼブラフィッシュを用いた心臓・血管形成のイメージングによる研究
福原茂朋・中嶋洋行・福井 一・望月直樹（国立循環器病研究センター
研究所 細胞生物学部）…………… 1
2. SPring-8放射光を用いた小動物心血管機能のin vivoイメージング
白井 幹康（国立循環器病研究センター研究所 心臓生理機能部）…… 9

<第124回研究会（平成26年12月 5 日）>

特別講演

1. 非コードRNAによる遺伝子発現制御機構を利用した遺伝子組換えアデ
ノウイルスの開発
櫻井 文教（大阪大学大学院 薬学研究科・分子生物学分野）………… 11
2. サルレトロウイルスによるニホンザル血小板減少症
岡本 宗裕（京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター）… 18

<一般講演>

- 会員の発表14題…………… 19

<第125回研究会（平成27年 3 月 6 日）>

テーマ：関西実験動物研究会へようこそ

1. 幹細胞の多能性維持と分化の分子機構研究
依馬 正次（滋賀医科大学 動物生命科学研究センター 幹細胞・ヒト疾
患モデル研究分野、科学技術振興機構 さきがけ）…………… 35
2. 糖鎖はさまざまな生命現象の鍵となっている
浅野 雅秀（京都大学大学院 医学研究科附属動物実験施設）………… 38

<第126回研究会（平成27年 6 月12日）>

テーマ：エピジェネティクス研究の最前線

1. 膵β細胞機能のエピゲノム制御

木戸 良明（神戸大学大学院 保健学研究科病態解析学領域 分析医科学分野）…………… 43

2. 発生・分化におけるエピジェネティクス

仲野 徹（大阪大学大学院 生命機能研究科・時空生物学／医学系研究科・病理学）…………… 44

<トピックス>

創薬の隘路「Phase 2 Attrition」の克服に向けて－実験動物学の進展への期待

樽林 陽一（日本医療研究開発機構 創薬支援戦略部）…………… 48

<関西実験動物研究会だより>…………… 49

<幹事会、評議員会、総会の議事概要>…………… 50

<維持会員名簿>…………… 55

<評議員名簿>…………… 56

<会長、幹事、監事名簿>…………… 57

<収支・予算、会則>…………… 58

<第123回研究会（平成26年 9 月27日）>

テーマ：循環器研究の新たな展開

1. ゼブラフィッシュを用いた心臓・血管形成のイメージングによる研究
福原茂朋・中嶋洋行・福井 一・望月直樹（国立循環器病研究センター
研究所 細胞生物学部）
2. SPring-8放射光を用いた小動物心血管機能のin vivoイメージング
白井 幹康（国立循環器病研究センター研究所 心臓生理機能部）

ゼブラフィッシュを用いた心臓・血管形成のイメージングによる研究

国立研究開発法人国立循環器病研究センター研究所 細胞生物学部

福原茂朋・中嶋洋行・福井 一・望月直樹

要旨：

生体での循環器は、心臓の拍動・血流など動的であるために、生きたままの観察により生理学的な新たな知見が得られる。発生時に心臓や血管を構築する心筋前駆細胞の移動、血管内皮・壁細胞の移動や運動により初期臓器が形成され、さらにリモデリングによって成熟循環器となる。この動態を観察するためには、ゼブラフィッシュのような体外発育、成長速度の速さ、透明性があるモデル動物が有効である。透明性を利点として、蛍光蛋白質を遺伝子改変により導入することで、循環器構築細胞を蛍光蛋白で生きた胚を用いて観察が可能である。本稿ではゼブラフィッシュを用いたイメージングにより、如何に心臓初期形成が生じるのか、また、如何に血管形成の新規の情報伝達を明らかにしたかを例にして、イメージングの利点を概説する。

Key words：ゼブラフィッシュ、イメージング、初期発生、心臓、血管

—はじめに—

循環器は、心臓と脈管（血管とリンパ管）によって構成される器官である。閉鎖系の循環システムのないショウジョウバエでは、酸素や栄養素は拡散によって組織に行き渡るが、心臓と血管を有するゼブラフィッシュでは、閉鎖系循環システムが発生する。初期発生で観察できるゼブラフィッシュ心臓形成や血管形成は、哺乳類と同様に、時期・部位特異的な遺伝子発現によって厳密に制御される。これらの遺伝子群は、ゼブラフィッシュと哺乳類では、ほぼ保存されていると言える。従ってゼブラフィッシュが発生メカニズムを探るモデル生物として広く利用されている。

ゼブラフィッシュ胚は、体外で発育し、かつ、その発生速度は速く、数日以内に他の臓器形成に先駆けて循環システム（心臓・血管）が構築される。なお、胚が透明であるために発生を容易に観察できるだけでなく、遺伝子導入も簡単である。蛍光蛋白質の発現も可能であり、発生時の臓器特異的あるいは時期特異的な観察もできる。これまでに心筋細胞特異的に活性化されるプロモーターとして cardiac myosin light chain 2 (cmlc2, myl7)、血管内皮細胞では flt1, flk1、リンパ管では flt4、周細胞では pdgfrb が明らかにされている。遺伝子導入には、めだかトランスポゾン(Tol2) を用いることができるので、プロモーター下流に蛍光蛋白質やプローブをコードする遺伝子を挿入し、胚に注入することで目的分子を発現するトランスジェニック個体の作成が可能である。また詳細は後述するが、Gal4-UAS システムを用いる工夫もある(1)。組織特異的に Gal4/VP16 を発現させ、UAS の下流にプローブや蛍光蛋白質をコードする遺伝子をつなげたレポーターフィッシュと交配することにより組織特異的に分子を高発現するシステムである。

本稿では、臓器特異的に蛍光蛋白質を発現させて形態を観察するとともに、転写の活性化をモニターするプローブを発現させることによりシグナルを可視化して形態形成と情報伝達を見た例を報告する。特に、心臓形成と血管形成の新たな知見を紹介する。

—原始心筒形成のための心筋前駆細胞の移動メカニズムのイメージング技術による説明—

両側の側板中胚葉から心臓前駆細胞が生まれ、左右の心臓前駆細胞が中央に遊走して原始心筒を形成する。この心臓前駆細胞の正中線への移動には、細胞の運動性のみならず、細胞が移動する足場となる環境も重要と考えられていた。内胚葉が中胚葉組織である心臓前駆細胞の足場となる可能性が考えられる。以前、我々は、スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)輸送体 Spns2 の変異体が二股心臓を呈すること(2)、Stainier 博士のグループも S1P の受容体 S1P2 の変異体が二股心臓を呈することを報告している。発生期の S1P シグナルが心臓の移動に重要であることを想定していた。しかし、どのように S1P シグナルが心臓の移動を調節しているのかは明らかでなかった。S1P の下流で機能し、臓器サイズ決定因子でもある転写共役因子 Yap1 に着目して S1P シグナルによる心臓前駆細胞の正中への移動を検討した(3)。

Yap1 の発現抑制を行うと、予想どおり二股心臓を呈したことから、S1P-Yap1 を介したシグナルの重要性は確認できた。Spns2 は卵黄合胞体層に発現するために S1P が作用するのは、直接心臓前駆細胞に作用するかあるいはこれまでに S1P2 を発現すると報告されている内胚葉のいずれかである。そこで、Yap1 の発現抑制個体内胚葉の形態を *Tg(sox17:EGFP)* (内胚葉特異的プロモーターsox17 依存性に EGFP を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ) で観察したところ、野生型とは異なり内胚葉に大きな欠損が生じた。また、心筋細胞を *Tg(myh7:nls-mCherry)* (心筋細胞で活性化される心筋ミオシン軽鎖のプロモーター依存性に mCherry を発現するトランスジェニックフィッシュ) と交配することにより、内胚葉と心筋細胞を同時に観察すると、内胚葉の欠損が見られる個体で、同時に二股心臓となっていることから(図1)、内胚葉欠損により両側側板中胚葉の心臓前駆細胞が正中に移動するには、S1P-Yap1 のシグナルが必須であることがわかった。しかも、内胚葉で、このシグナル伝達系が機能することが重要であることが明らかとなった。さらに、Yap1 の核内移行が中胚葉で起きているのかを Yap1 依存性に転写が活性化される *Tg(eef1a1l1:galdb-hTEAD2deltaN);Tg(uas:GFP)* (すべての細胞の中で Yap1 が核内に移行してアミノ末端を欠く human TEAD2 に結合すると、レポーターの GFP が発現する個体) を作製した(図2)。本トランスジェニックフィッシュは、Gal4 DNA 個の結合配列と human TEAD のアミノ末端を

融合しているために、Gal4 依存性に uas に結合することで GFP の転写が生じることになる。この個体と Tg(sox17:mCherry) を交配して観察したところ mCherry 陽性の内胚葉細胞に GFP を検出したために、内胚葉で Yap1 が核内移行することがわかった。以上のように、内胚葉と心筋細胞の配置や移動を形態学的に経時的に観察するとともに、転写活性もモニターすることで内胚葉での S1P2-Yap1 シグナルが内胚葉の形態維持に必要で、これが無いと心筋前駆細胞の移動が障害されることをイメージングによって証明できた。

—尾側静脈叢から尾側静脈を形成するシグナル伝達の解明—

ゼブラフィッシュの 24 時間胚では、尾側にまず静脈叢が形成され背側大動脈からの血流を尾側から頭側に還流する。その後、静脈叢がリモデリングを経て一本の尾側静脈となる。この過程は、ゼブラフィッシュの血管形成過程でも不明な点が多かった。大動脈から節間血管が伸張する時には、背側に向って大動脈内皮細胞が運動・遊走するが、尾側静脈叢形成時にも、腹側にむかって静脈内皮細胞が伸張しながら移動する。2 日目胚では、さらに、この静脈叢から未熟な尾側静脈が形成され、4 日目胚では管腔を有する成熟尾側静脈となる。

β カテニンは、内皮細胞間接着を制御する内皮細胞カドヘリンに結合し、アクチン骨格系の制御に関わる。しかし、これだけではなく、Wnt の下流で機能する転写共役因子である。静脈血管内皮細胞では、静脈層のリモデリング（細胞間接着の減弱や増強の繰り返し）に β カテニンシグナルが関与するのではないかと考えた。このため、 β カテニン依存性に GFP が転写されるシステムを Yap1 と同様に Gal4-uas システムを用いて構築した（図 2）。

Tg(fli1:tcf-deltaC/gad4DBD) フィッシュは転写因子 Tcf の C 末端を欠損する代わりに Gal4 DNA 結合ドメインを融合している（図 2）。このためにこのフィッシュと Tg(uas:gfp) と交配することで、GFP が発現する細胞では β カテニンが核内移行したことをモニターできることになる。

この β カテニン転写モニターリングフィッシュの GFP 発現部位を観察したところ、尾側静脈叢の最も腹側側で GFP が強く発現しており、この細胞群が未熟尾側静脈構成細胞となることが判った（図 3）。さらに、成熟過程でもこの尾側静脈内皮細胞では持続的に GFP が陽性であった。尾側静脈叢では、bone

morphogenetic protein (BMP) が必須であることが報告されていたので、BMP を強制発現させたところ、通常見られる腹側への静脈細胞の遊走だけではなく、背側への過剰な静脈内皮細胞の増殖・遊走が観察された。これらの過剰遊走細胞では、GFP の発現が亢進していた。一方、noggin を発現させて BMP シグナルを抑制すると静脈叢の形成が阻害されるとともに、GFP の発現も抑制された。このことから、BMP が β カテニンの局在を決定する上流因子として、尾側静脈叢形成から尾側静脈の成熟過程に必要であることがわかった。

β カテニンと転写が on Tg になっている尾側静脈腹側細胞でどのような遺伝子が転写されているのかを調べた。(fli1:tcf-deltaC/gal4DBD): (uas:gfp);Tg(flk1:mCherry) フィッシュの mCherry+GFP+ (β カテニンの転写が on になっている血管内皮細胞) と mCherry+GFP- (β カテニンの転写が off になっている血管内皮細胞) のそれぞれの遺伝子発現を RNA-seq で解析した。その結果、前者では、BMP によって発現が増加する遺伝子、静脈内皮細胞で発現するといわれている遺伝子が同定された。さらに Aggf1 遺伝子(血管異常と骨の肥厚が特徴的な Klippel-Tranauny 症候群の原因遺伝子)の発現が増加していた。正常では、BMP 遺伝子の下流で Aggf1 の発現が制御され、骨形成・静脈形成にかかわることが示唆された(4)。

—おわりに—

本稿では、ゼブラフィッシュを用いた蛍光イメージングにより、心臓・血管の形態観察とともに情報伝達機構を明らかにすることができた。組織特異的に活性化するプロモーターで蛍光蛋白質を発現させて、組織内の特定の細胞を可視化する技術は繁用されている。しかし、ゼブラフィッシュを生きたまま時間経過とともに観察することで、さらに詳細な形成機構を解析することができる。また、蛍光色を複数使用することにより、いくつかの臓器・組織を同時に観察することで、臓器間—組織間の相互調節機構を予測することもできる。

臓器・組織形成時には個々の細胞の機能や動きを調節する情報伝達系が重要であり、形態変化と同時に情報伝達分子の活性化や転写の増減を見ることで形態形成における調節機構の解明に繋がる。実際我々は、今回は 2 例を取り上げて紹介したが、それ以外にも血管新生に置け先導端細胞の動きとそれを調節す

る細胞骨格調節分子を同時に観察して、先導端細胞の遊走機構を解明している (5)。他にも血液の流れによる shear stress と転写因子の調節機構、心筋細胞の細胞分裂と増殖促進因子の同定に挑戦している。なお、本稿で紹介した成果は review としても報告している (6)。

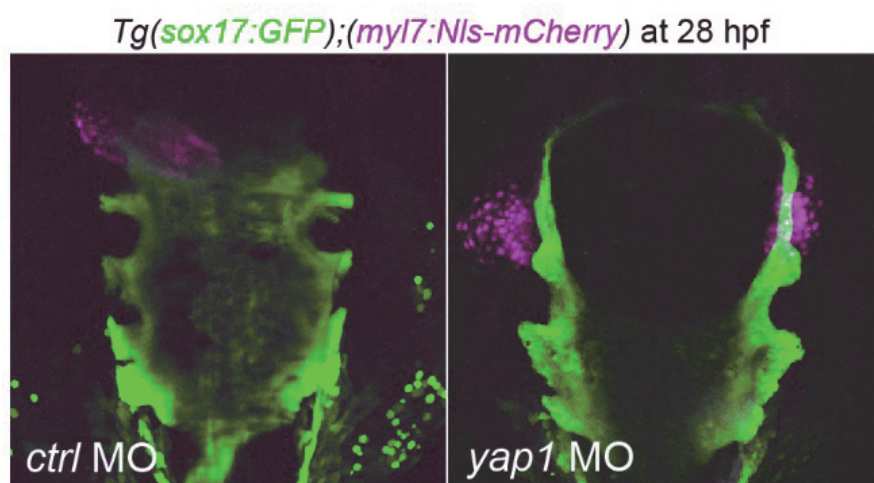


図1. 内胚葉細胞は *sox17* プロモーターによって GFP で標識され、心筋細胞は nuclear localization signal タグ付 mCherry で標識されるトランスジェニックフィッシュに control (ctrl) morpholino (MO) : 左、*yap1* MO : 右を注入して内胚葉と心筋前駆細胞の位置を調べた (受精後 28 時間胚 28 hours post-fertilization (hpf))。Yap1 の発現抑制個体では GFP で標識される内胚葉が大きく欠損していることがわかる。

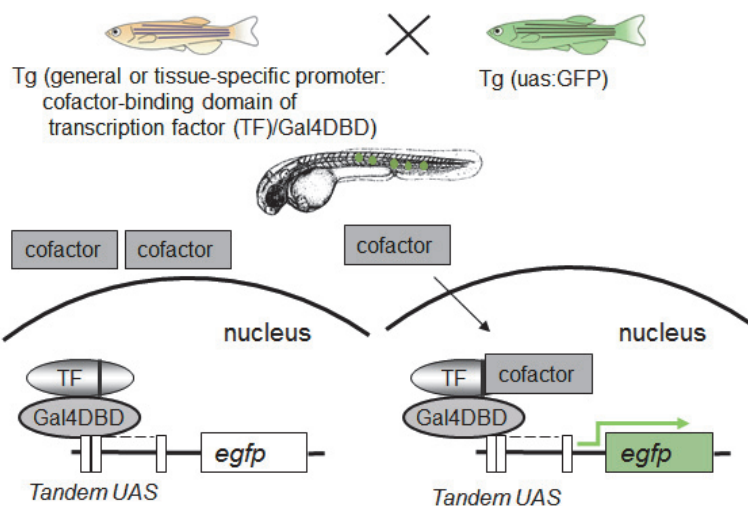


図 2. Gal4 DNA binding domain (DBD)と転写因子 TF 融合蛋白を発現させ転写共役因子(cofactor)が核内に移行すると EGFP が発現するシステム。心臓発生の場合には Yap1 を、尾側静脈の形成では、βカテニンを cofactor とすることでそれぞれの内因性因子の核内移行を観察できた。

Tg(fli1:Gal4db-TdeltaC);(uas:GFP);
(fli1:Myr-mCherry)

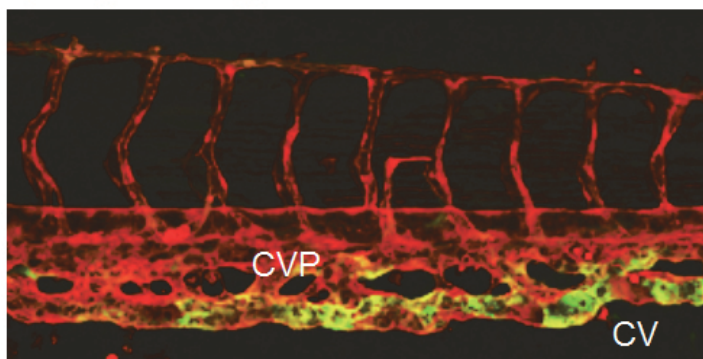


図 3. T (Tcf) と Gal4DBD の融合蛋白質にβカテニンが結合すると緑色蛍光が光るトランスジェニックフィッシュを観察した。血管内皮細胞は mCherry で光るので、最腹側の血管内皮細胞が緑色になっているので、ここの細胞ではβカテニンが核内に移行していることがわかる。CV, caudal vein; CVP caudal vein plexus

参考文献

- (1) Halpern, M.E., J.Rhee, M.G.Goll, C.M.Akitake, M.Parsons, and S.D.Leach. 2008. Gal4/UAS transgenic tools and their application to zebrafish. *Zebrafish*. **5**: 97-110.
- (2) Kawahara, A., T.Nishi, Y.Hisano, H.Fukui, A.Yamaguchi, and N.Mochizuki. 2009. The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science* **323**: 524-527.
- (3) Fukui, H., K.Terai, H.Nakajima, A.Chiba, S.Fukuhara, and N.Mochizuki. 2014. S1P-Yap1 signaling regulates endoderm formation required for cardiac precursor cell migration in zebrafish. *Dev. Cell* **31**: 128-136.
- (4) Kashiwada, T., S.Fukuhara, K.Terai, T.Tanaka, Y.Wakayama, K.Ando, H.Nakajima, H.Fukui, S.Yuge, Y.Saito, A.Gemma, and N.Mochizuki. 2015. beta-catenin-dependent transcription is central to Bmp-mediated formation of venous vessels. *Development* **142**: 497-509.
- (5) Wakayama, Y., S.Fukuhara, K.Ando, M.Matsuda, and N.Mochizuki. 2015. Cdc42 Mediates Bmp-Induced Sprouting Angiogenesis through Fmn13-Driven Assembly of Endothelial Filopodia in Zebrafish. *Dev. Cell* **32**: 109-122.
- (6) Fukuhara, S., Fukui, H., Wakayama, Y., Ando, K., Nakajima, H., and Mochizuki, N. 2015. Looking back and moving forward: recent advances in understanding of cardiovascular development by imaging of zebrafish. *Dev. Growth Differ.* **57**: 333-340.

—謝辞—

本稿を終えるにあたり、2014 年大阪大学で講演の機会をいただきました関西実験動物研究会皆様、また今回このようにまとめるきっかけを頂戴いたしました三重大学 山本好男先生、国立循環器病研究センター 塩谷恭子先生に深謝申し上げます。

SPring-8 放射光を用いた小動物心血管機能の in vivo イメージング

白井 幹康

独立行政法人 国立循環器病研究センター研究所 心臓生理機能部

近年の分子生物学の発展により、種々の細胞の特性が遺伝子・タンパク質レベルで次々に明らかにされてきた。他方、このような要素的知識を統合して生体を有機的にとらえる研究が益々重要となっている。

マウスなどの小動物は、遺伝子導入や欠損などの遺伝子操作技術が確立し、また、短期間での病態モデル作成が容易であることから、要素的知識を個体レベルに還元して検証する研究において重要な位置をしめている。しかし、小動物において、循環調節に直結する心筋機能や脳、心臓、肺、腎などの血管機能の in vivo 解析は決して容易とはいえない。特に、高速で拍動している小動物の心臓(400~600 拍/分)では、冠動脈の応答異常を大小血管のネットワーク上で捉えることはできなかった。また、心筋の収縮・弛緩機能障害を微細な心筋局所で検出することも困難であった。このような心・血管機能の観察限界は、循環調節や病態の分子機序解明に、遺伝子改変技術や病態モデル作製技術を十分に活かせない一要因であった。

本発表では、私共が進めてきた SPring-8 高輝度放射光による麻酔下小動物での心・血管運動機能の解析法を紹介する。一つは、X 線散乱・干渉を利用した心筋 X 線回折法で、ナノレベルの心筋収縮タンパク質分子のクロスブリッジ動態が、心室の様々な心筋部位において、ピンポイント(0.2 x 0.2 mm)で評価できる。つまり、病的な心室における収縮タンパク質機能異常の程度が、心室壁の異なる部位間(前壁と後壁間や心基部と心尖部間など)のみならず、同部位でも異なる心筋層間(外、中、内層間)で比較でき、心室での心筋機能異常の詳細な分布を知ることができる。また、iPS 細胞などによる再生心筋組織の機能評価にも応用できる。現在、拍動心臓から、収縮タンパク質機能を非侵襲的にリアルタイムで計測できる手法は本法しかない。

二つ目は、X 線吸収を利用した高解像度微小血管造影法で、固定臓器の微小血管(内径 ~30 μ m)はもちろん、高心拍数のマウス心臓の冠細動脈(内径 ~50 μ m)の応答も、臓器を露出することなく撮影可能である。本法のメリットは、臓器表層から内層にわたる、あるがままの血管ネットワーク上において、大血管と小血管の応答の差異を同一画面で同時に評価できることである。また、臓器内の血流分布や循環時間も計測できる。遺伝子改変マウスへの応用によって、循環調節や病態の分子機序の解明が進むものと期待される。また、虚血性疾患後の血管新生の機序解明や、血管再生治療の評価にも応用できる。

参考文献: Shirai M et al. Circ Res 112(1): 209-221, 2013.

<第124回研究会（平成26年12月 5 日）>

特別講演

1. 非コードRNAによる遺伝子発現制御機構を利用した遺伝子組換えアデノウイルスの開発

櫻井 文教（大阪大学大学院 薬学研究科・分子生物学分野）

2. サルレトロウイルスによるニホンザル血小板減少症

岡本 宗裕（京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター）

<一般講演>

会員の発表14題

非コード RNA による遺伝子発現制御機構を利用した遺伝子組換え アデノウイルスの開発

櫻井 文教

大阪大学大学院薬学研究科 分子生物学分野 准教授

1. はじめに

治療上、有効なタンパク質などをコードした遺伝子を医薬品として投与することにより疾患を治療する遺伝子治療は、癌や先天性遺伝子疾患等の各種難治性疾患に対する革新的治療法として大きな期待を集めている。世界で最初の遺伝子治療臨床研究は、1990年、米国にてアデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損による重症複合型免疫不全症の患者に対して、レトロウイルスベクターを用いて実施された。その後、遺伝子治療臨床研究において死亡事故や白血病発症などの有害事象が発生するなど、遺伝子治療の安全性・有効性を疑問視する声も上がったが、地道な基礎研究の積み重ねの結果、遺伝子治療は着実な進歩を遂げ、有効症例も数多く報告されるようになってきた。また 2012 年には先進国で初めての遺伝子治療薬（リポ蛋白リパーゼ発現アデノ随伴ウイルスベクター、商品名；Glybera、適応症：脂質代謝異常症）が承認された。今後、遺伝子治療の対象が先天性遺伝子疾患のみならず、感染症、生活習慣病などの後天性疾患にも広がり、遺伝子治療がますます広がっていくものと期待されている。遺伝子治療薬の実用化に向けては、治療遺伝子を安全かつ高効率に標的細胞に導入し、かつ治療に必要な量のタンパク質を発現可能な遺伝子導入ベクターが必要不可欠である。すなわち、高機能かつ安全な遺伝子導入ベクターの開発が遺伝子治療成功の鍵を握っている。これまでに遺伝子導入ベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルス（Ad）ベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、プラスミド DNA ベクターなど、様々なタイプのベクターが開発されてきた。これらの遺伝子導入ベクターの基本骨格は、その多くが 1990 年以前に開発されている。その後、基礎研究の積み重ねによりその遺伝子導入特性が明らかとなるとともに、これらを基盤とした様々な改良型ベクターが開発されている。現在ではその遺伝子導入特性の違いより、疾患に応じて使い分けられているのが現状である。

2. アデノウイルスベクターについて

5 型ヒトアデノウイルス（Ad）を基本骨格とする Ad ベクターは、遺伝子治療臨床研究の約 22% で使用されるなど、最も汎用されている遺伝子導入ベクターである。Ad ベクターは、高タイターのウイルスが回収可能であること、物理的に安定であること、分裂細胞・非分裂細胞の両者に高効率に遺伝子導入可能であることなど、遺伝子導入ベクターとして多くの特長を有していることから、遺伝子治療研究のみならず、遺伝子機能

解析をはじめとする基礎研究においても汎用されている。

Ad は約 36kb の二本鎖 DNA をゲノムとして有しており、自己増殖に必須の E1 遺伝子を遺伝子工学的に欠失させることにより、理論上、他の Ad 遺伝子が発現せず、自己増殖不能となっている。しかしながら実際には、E1 遺伝子非依存的にわずかながら Ad 遺伝子が発現することにより¹⁾、Ad タンパク質そのものによる細胞障害や Ad タンパク質に対する細胞性免疫が誘導され、Ad ベクター投与後、組織障害が誘導されてしまう。特に Ad ベクターは全身投与後、そのほとんどが肝臓に集積し遺伝子発現を示すため、強い肝障害を誘導することが問題となっている。これらの問題点を克服するため、E1 遺伝子のみならず E2A 遺伝子や E4 遺伝子（の一部）を欠損させた第 2 世代の Ad ベクター、さらにほぼ全ての Ad 遺伝子を欠失させた Helper-dependent Ad ベクターが開発されている。しかしながら、これらの改良型 Ad ベクターは、その調製に特別なパッケージング細胞が必要であることや高タイターのベクターが回収できないことなどといった問題点を有しており、広く普及するのに至っていないのが現状である。

3. マイクロ RNA について

マイクロ RNA (miRNA) は、21~25 塩基長の一本鎖非コード RNA で、真核生物で広く発現しており、mRNA の転写後段階において標的遺伝子の発現を抑制する。miRNA はゲノムより主に pol II promoter によって前駆体 (pri-miRNA) として転写される。Pri-miRNA では、配列内部に存在する相補配列が塩基間水素結合により二本鎖を形成することでヘアピンループ構造をとる。Pri-miRNA は、核内にて Drosha によって Pre-miRNA へとプロセシングされたのち、Exportin-5 によって細胞質へと輸送される。Pre-miRNA は、60~90 塩基長のステムループ構造を有しており、細胞質の RNaseIII 酵素である Dicer によって切断されることにより、miRNA duplex となる。その後、Argonaute 2 を基本コンポーネントとする RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれたのち、一方の鎖が放出されることにより、成熟した RISC となる。RISC は、miRNA と部分的相補配列を有する mRNA の 3' 非翻訳領域に結合することにより、翻訳抑制もしくは mRNA の分解を誘導することにより遺伝子発現を抑制する (メカニズムとしては様々なモデルが報告されている)。一種の miRNA は 100 以上の遺伝子を制御するとともに、全遺伝子の約 30% が miRNA の発現制御を受けると考えられている。miRNA は、既にヒトでは 1000 種以上が同定されており、細胞増殖、アポトーシス、免疫応答など様々な細胞活動を制御することが報告されるなど、生命活動におけるその重要性はますます大きなものとなりつつある。さらに miRNA の多くは、細胞特異的な遺伝子発現プロファイルを示す。それにより遺伝子発現を精巧に制御することで、個々の細胞特有の遺伝子発現プロファイルならびに機能・恒常性維持に寄与している。

近年、この miRNA を利用して遺伝子導入ベクターにより導入された外来遺伝子の発

現を制御する”Post-transcriptional De-targeting”に関する研究が活発に行われている。その方法としては、複数コピーの miRNA 標的配列（多くの場合、miRNA の完全相補配列）を外来遺伝子の 3'非翻訳領域に挿入することにより、その miRNA が発現している細胞特異的に導入遺伝子の発現が抑制されるというものである。これによって標的細胞以外の細胞における導入遺伝子の発現を抑制することで、導入遺伝子の発現を原因とする副作用を抑制することが可能となる。我々は既に遺伝子組換え Ad を用いた癌遺伝子治療研究において、肝細胞を含む正常細胞における導入遺伝子の発現を抑制することで、副作用を軽減することに成功している^{2,4)}。

4. マイクロ RNA を利用して Ad 遺伝子の発現を抑制可能な Ad ベクターの開発

我々は、miRNA による Post-transcriptional De-targeting を利用することで、Ad ベクター作用後の E1 遺伝子非依存的な Ad 遺伝子の発現を抑制することを試みた⁵⁾。すなわち、Ad ベクター作用後、主に遺伝子発現を示した E2A、E4、pIX 遺伝子の 3'非翻訳領域に、遺伝子工学的に miRNA 標的配列を 4 コピー挿入することにより、たとえばこれらの Ad 遺伝子の転写が起こっても、miRNA が miRNA 標的配列に結合することで mRNA の分解を誘導し、発現を抑制できると考えた（図 1）。Ad ベクターは全身投与後、投与量のほとんどが肝臓に集積することから肝臓特異的 miRNA である miR-122a の標的配列、および Ad ベクターによる免疫応答に重要な役割を果たしている脾臓で特異的に高発現している miR-142-3p の標的配列を挿入することとした。miR-122a および miR-142-3p は、Ad ベクターのパッケージング細胞（Ad ベクターを作製する細胞）である 293 細胞ではほとんど発現していない。そのため、作製した Ad ベクターは 293 細胞を用いて従来の Ad ベクターと同程度の高タイターの Ad ベクターが回収可能であった。

次に実際に miRNA 標的配列を Ad ゲノムに挿入することで Ad 遺伝子の発現が抑制されるか検討するため、作製した Ad ベクターをマウスに尾静脈内投与し、肝臓における Ad 遺伝子の発現量（mRNA 量）を測定した。その結果、肝臓における Ad 遺伝子の発現量は従来型 Ad ベクターである Ad-L2 と比較して、各 Ad 遺伝子の 3'非翻訳領域に miR-122a 標的配列を挿入した Ad ベクター（Ad-E2A-122aT-L2、Ad-E4-122aT-L2、Ad-pIX-122aT-L2）では E2A、E4、pIX の発現量がそれぞれ 5%以下に減少していた（図 2）。特に E4 遺伝子の 3'非翻訳領域に miR-122a 標的配列を有する Ad-E4-122aT-L2 では、他の Ad ベクターと比較して、E4 遺伝子だけでなく検討した全ての Ad 遺伝子の発現が大きく減少していた。E4 遺伝子産物は他の Ad 遺伝子の発現に関与するため、E4 遺伝子の発現が減少したことで他の Ad 遺伝子の発現も減少したものと考察された。以上の結果より、miRNA による Post-transcriptional De-targeting により各 Ad 遺伝子の発現を抑制可能であることが示された。

さらに、肝臓での Ad 遺伝子の発現を抑制することで肝障害を軽減可能か検討した。肝障害は、Ad ベクターによる主要な副作用の一つである。Ad ベクターをマウスに尾静脈内投与後、肝障害の指標である血清中 alanine aminotransferase (ALT) 値を経時的に測定したところ、すべての Ad ベクター投与群において、投与 10 日後をピークに血清中 ALT 値が上昇した (図 3)。しかしながら、Ad-E4-122aT-L2 投与群では血清中 ALT 値が Ad-L2 と比較して 1/2 以下に減少しており、開発した Ad ベクターの中で最も肝障害が低かった。さらに組織切片を作製し組織学的に肝障害を評価したところ、Ad-L2 投与群では肝細胞の細胞質に強い空胞化および細胞死が観察されたが、Ad-E4-122aT-L2 投与群ではそのような空胞化が見られず、肝障害が大きく軽減していた。これらの結果より、E4 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miR-122a 標的配列を挿入した Ad ベクター (Ad-E4-122aT) は従来型 Ad ベクターと比較して肝障害性が低く安全性が高いこと、そして肝臓での E4 遺伝子の発現を抑制することが Ad ベクターによる肝障害の抑制に重要であることが示された。

さらに Ad-E4-122aT が従来型 Ad ベクターよりも肝障害性が低いメカニズムの解明を試みた。Ad ベクターによる肝障害には、Ad タンパク質に対する細胞性免疫応答が大きく関与することから、Ad タンパク質に対する細胞性免疫に着目し検討を進めた。まず、脾臓における Ad 特異的な細胞傷害性 T 細胞数および肝臓に浸潤した CD8 陽性 T 細胞数を検討したところ、Ad-L2 と Ad-E4-122aT-L2 との間に有意な差は認められなかった。そこで、Ad-E4-122aT-L2 投与群では肝細胞における Ad タンパク質の発現が抑制されるために Ad タンパク質の抗原提示が低下しているのではないかと考え、Ad-L2 もしくは Ad-E4-122aT-L2 を作用させたマウス初代肝細胞を、脾臓より回収した細胞傷害性 T 細胞と共培養し、その細胞障害レベルを評価した。その結果、Ad-E4-122aT-L2 作用群における細胞障害レベルは、従来型 Ad ベクターより有意に低いものであった。したがって、Ad-E4-122aT 投与群では、肝細胞での Ad 遺伝子の発現量が低いために、その抗原提示量が低く、細胞障害性 T 細胞による攻撃を受けにくいことが示唆された。また、Ad タンパク質はそれ自身が獲得免疫非依存的に細胞障害を誘導することが報告されている。そこで Ad タンパク質による獲得免疫非依存的な肝障害性について検討するため、T 細胞および NK 細胞が欠損している免疫不全マウスである Rag2/Il2ryc 欠損マウスに Ad ベクターを投与したところ、Ad-L2 投与群では血清中 ALT 値が有意に上昇した。一方で、Ad-E4-122aT-L2 投与群では全く上昇しなかった。以上の結果より、Ad-E4-122aT では、獲得免疫非依存的な経路による肝障害も軽減されることが明らかとなった。

次に、レポーター遺伝子として murine secreted embryonic alkaline phosphatase (mSEAP) 遺伝子を搭載した Ad ベクターを作製し、肝障害の軽減により導入遺伝子の発現プロファイルが改善するか検討した。従来型 Ad ベクター (Ad-AHASEAP) と、最も肝障害性が低い Ad-E4-122aT (Ad-E4-122aT-AHASEAP) をマウスに静脈内投与し、血中 mSEAP 量を測定したところ、従来型 Ad ベクターである Ad-AHASEAP 投与群では血中 mSEAP

量が投与 10 日後をピークに徐々に低下していった（図 4）。一方で、Ad-E4-122aT-AHASEAP 投与群では投与半年後に至ってもなお高い血中 mSEAP 量を維持しており、その発現量は従来型 Ad ベクターと比較して約 30 倍高いものであった。以上の結果より、mR-122a 標的配列を E4 遺伝子の 3' 非翻訳領域に挿入した Ad-E4-122aT は、高い安全性と遺伝子導入活性を兼ね備えた次世代型ベクターであることが示された。

5. 今後の展望

Ad ベクターは、近年では癌治療用ベクターもしくはワクチンベクターとしての応用に関して盛んに研究が進められているが、上述のように安全性を高めることによって全身投与による先天性遺伝子欠損による疾患にも応用可能になると思われる。先天性遺伝子欠損症では新生児期および幼少期における治療が必要な場合があるが、Ad-E4-122aT は新生仔マウスにおいても高い遺伝子発現を示すことを、我々は最近明らかにしている。また Ad-E4-122aT は肝臓における遺伝子機能解析等にも極めて有用なツールになるものと期待される。

6. 謝辞

本研究は、水口裕之教授が主宰する大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野において行われたものであり、水口裕之教授をはじめ、本研究にご協力いただいた多くの先生方、学生に深く御礼申し上げます。特に *in vivo* における Ad ベクターの機能解析に関しては清水かほり先生（当時、大学院生、現・大阪大谷大学助教）、組織切片の解析においては中村紳一郎先生（滋賀医科大学准教授）に多大なご協力を賜りました。この場を借りて御礼申し上げます。

7. 参考文献

- 1) Shimizu K., Sakurai F., *et al.*, ***Molecular Pharmaceutics***, 8; 1430-1435. (2011)
- 2) Suzuki T., Sakurai F., *et al.*, ***Molecular Therapy***, 16; 1719-1726. (2008)
- 3) Sugio K., Sakurai F., *et al.*, ***Clinical Cancer Research***, 17; 2807-2818. (2011)
- 4) Bennett D., Sakurai F., *et al.*, ***Molecular Pharmaceutics***, 9; 3452-3463. (2012)
- 5) Shimizu K., Sakurai F., *et al.*, ***Molecular Therapy Methods and Clinical Development***, 1; 14035. (2014)

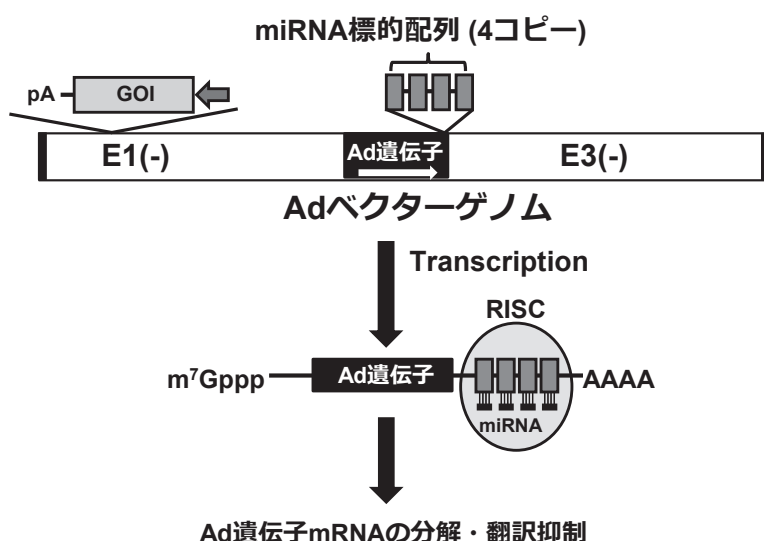


図1. miRNA 標的配列を Ad 遺伝子の 3'非翻訳領域に挿入した Ad ベクター.

Ad ベクター作用後、遺伝子発現を示した E2A、E4、pIX 遺伝子の 3'非翻訳領域に肝臓特異的 miRNA である miR-122a、もしくは脾臓特異的 miRNA である miR-142-3p の標的配列 4 コピーを遺伝子工学的に挿入した。これにより、Ad ベクター作用後、Ad 遺伝子の転写が起こっても、miRNA 標的配列に miRNA が結合することで翻訳が抑制され、Ad 遺伝子の発現が抑制される。

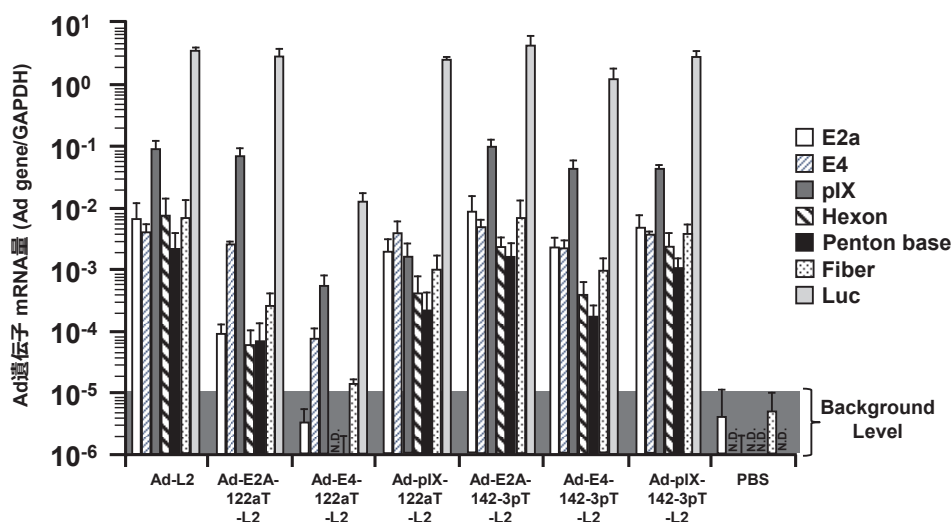


図2. 各種 Ad ベクター投与後の肝臓における Ad 遺伝子の発現量.

マウスに各種 Ad ベクターを投与し、48 時間後肝臓を回収した。その後、定量的 RT-PCR により各種 Ad 遺伝子 mRNA 量を定量した。(文献5) より引用、改変)

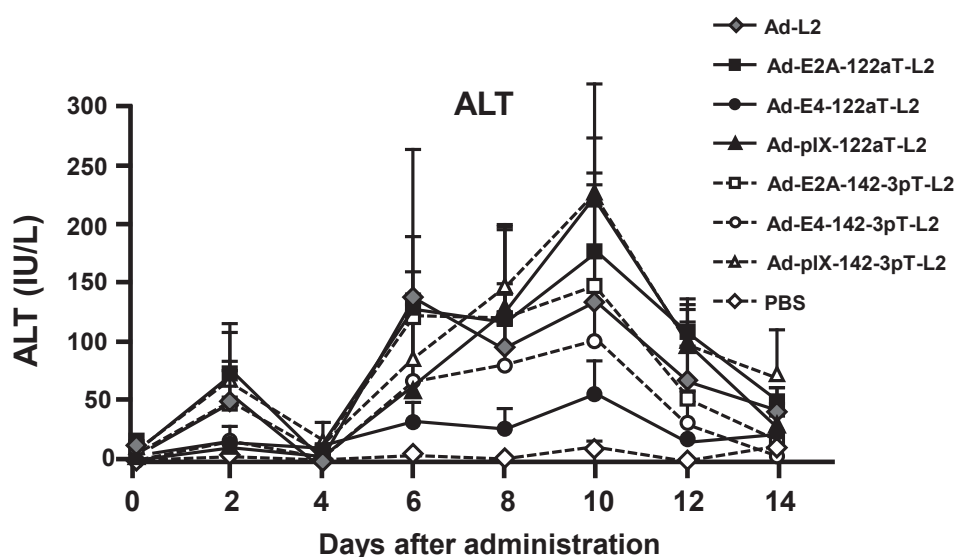


図 3. 各種 Ad ベクター投与後の血清中 ALT 値.

作製した各種 Ad ベクターをマウスに尾静脈内投与した。その後経日的に採血し、血清中 ALT 値を測定した。(文献 5) より引用)

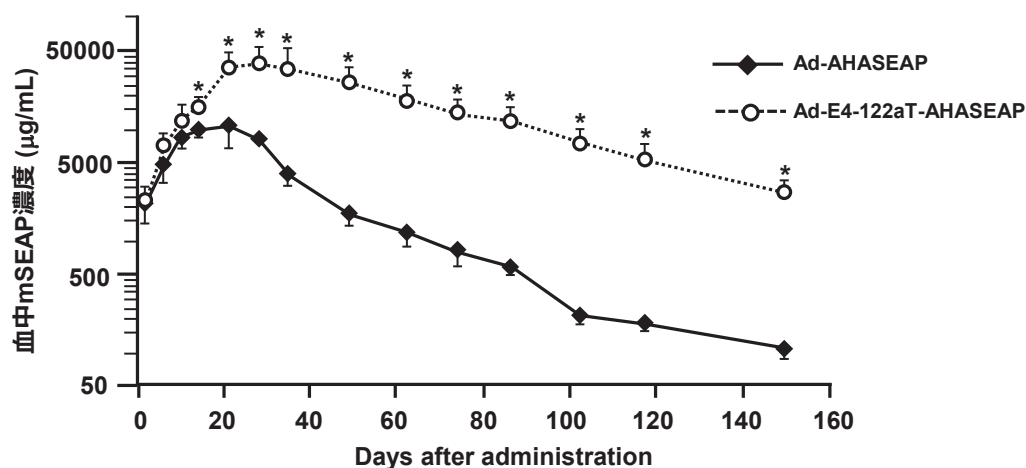


図 4. Ad-E4-122aT による長期にわたる遺伝子発現.

mSEAP を発現する従来型 Ad ベクター (Ad-AHASEAP) および miR-122a 標的配列を E4 遺伝子の 3'非翻訳領域に挿入した Ad ベクター (Ad-E4-122aT-AHASEAP) をマウスに尾静脈内投与した。Ad ベクター投与後、経日的に採血し血中 mSEAP 量を測定した。(参考文献 5) より引用、改変)

サルレトロウイルスによるニホンザル血小板減少症

京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター

岡本 宗裕

本疾病が初めて観察されたのは、2001年のことで、その年に2頭、翌2002年に5頭が発症し、うち6頭が死亡した。その後6年間発生は見られなかったが、2008年3月に再び発症個体が発見され、2011年2月までの間に43頭が発症し、42頭が死亡した（安楽殺個体を含む）。発症した個体は、顔面蒼白、鼻粘膜・歯茎・皮下の出血、褐色の粘血便等を呈し、一旦発症すると致死率は極めて高い。血小板数の激減、それに続く赤血球並びに白血球数の低下が発症個体共通にみられ、死亡時にはほとんどの場合血小板数はゼロになる。

国内の複数の研究機関の協力のもと、さまざまな方法で原因の究明にあたった結果、本症はサルレトロウイルス4型（SRV-4）と深い関連があることが明らかとなってきた。そこで、発症ニホンザルより分離したSRV-4をニホンザルに投与したところ、感染後1月ほどで全ての個体において血小板の急激な減少が認められ、歯茎からの出血等が確認された。これらの症状は、血小板減少症を発症したニホンザルと同様であり、さらに実験感染個体全てのPBMC、リンパ節等からSRV-4が分離できた。このことから、ニホンザル血小板減少症はSRV-4の単独感染で引き起こされることが確認された。

所内に保存されていた血漿等についてのウイルス検査の結果から、病因となったSRV-4は1991年に導入されたカニクイザルと共に霊長類研究所に持ち込まれたと推定された。また、カニクイザル、ニホンザルともに、ウイルス血症となっても発症しない個体がいることが明らかとなり、ウイルスの伝播にはこれらの無症候性キャリアが深く関与したと考えられた。霊長類研究所におけるニホンザル血小板減少症は、SRV-4感染をコントロールすることにより撲滅できたと考えられるが、発症機序、持続感染機序、自然宿主等不明な点が多く、引き続き研究が必要である。

第 124 回関西実験動物研究会

平成 26 年 12 月 5 日(金)10:00 ~17:00 京都大学 楽友会館

1. ENU ミュータジェネシスにより得られた歩行異常ラットの遺伝学的ならびに病理学的解析

○由利 梓 1、田中大資 1、芹川忠夫 1、2、田中美有 3、桑村 充 3、庫本高志 1 (1 京大院・医・動物実験施設、2 大阪薬大、3 大阪府大・獣医病理)

2. VF ラットにおけるオリゴデンドロサイトの分化・成熟異常

○田中美有 1、井澤武史 1、山手丈至 1、Robin J.M. Franklin 2、庫本高志 3、芹川忠夫 4、桑村 充 1 (1 大阪府大・獣医病理、2 Wellcome Trust-MRC Cambridge Stem Cell Institute, University of Cambridge、3 京大院・医・動物実験施設、4 京大院・医 / 大阪薬大)

3. 新たなアトピー性皮膚炎ラットモデルの開発

樋口裕城 1、横江繭子 1、由利 梓 1、田中大資 1、日合 弘 2、芹川忠夫 2,3、○庫本高志 1 (1 京大院・医・動物実験施設、2 京大・医、3 大阪薬大)

4. 新規肥満・糖尿病モデル ZFDM ラットの表現型解析

○横井伯英 1、グブルジャン ゲニ 1、別府正悠 1、山口拓郎 1、日高志保美 1、川畑綾子 1、星野貴一 2、星野雅行 2、清野 進 1 (1 神戸大院・医・分子代謝医学、2 星野試験動物飼育所)

5. 免疫不全(X-scid)ラットにおける縮小条虫の動態

○大野民夫 1、石井 明 2、甲斐巧也 1、前川智樹 1、記野秀人 2 (1 名大院・医・実験動物、2 浜松医大・感染症学)

6. ラット胚の凍結保存および融解後の産子への発生について

○竹鶴 裕亮、金子 武人 (京大院・医・動物実験施設)

7. CRISPR/Cas9 system で作製した ApoE KO マウスの表現型解析

○田中貴雄 1、大口悦宏 2、島田俊雄 2、中里清一 2、三浦義記 1、2、金智蓮 3、中井綾 3、井戸基治 1、2 (1 株式会社ケー・エー・シー GE 動物事業室、2 株式会社ケー・エー・シー バイオサイエンス事業部、3 株式会社アプロサイエンス バイオ事業部)

8. マウス系統間のストレプトゾトシン誘発糖尿病感受性の遺伝的解析

○前川智樹 1、小林美里 2、伊藤美佳子 3、大野欽司 3、馬場谷成 4、上田裕紀 5、池上博司 4、堀尾文彦 2、高橋雅英 6、大野民生 1 (1 名大院・医・実験動物、2 名大院・生命農・動物栄養、3 名大院・医・神経遺伝情報、4 近畿大・医・内分泌代謝糖尿病内科、5 阪大院・医・分子内分泌、6 名大院・医・腫瘍病理)

9. 系統差による癌型 K-Ras 依存的な肺発癌感受性遺伝子座の探索

○齋藤浩充、鈴木昇 (三重大・生命科学研究支援センター・動物機能ゲノミクス)

10. 遺伝子改変動物モデルから探る多形型横紋筋肉腫のオリジン

○鈴木昇、齋藤浩充 (三重大・生命科学研究支援センター・動物機能ゲノミクス)

11. てんかん〜うつ・不安障害の発症に関わるシアル酸転移酵素について

○加藤啓子、パイトゥーン シーモントリー(京都産大・総合・動物生命)

12. 行動量や探索行動に影響する成長ホルモンの Arc 発現量の調節(英語で発表)

○パイトゥーン シーモントリー、廣田暖奈、加藤啓子(京都産大・総合・動物生命)

13. 冠動脈病変が冠スパズムおよび狭心症発症に及ぼす影響、WHHLMI ウサギを用いた実験的検証

○田村姿央理1、小池智也2、ユウイン2、塩見雅志1, 2(1神戸大院・医・疾患モデル動物病態生理学、2附属動物実験施設)

14. CAR パチルスに学名をつけるぞ

○池 郁生1、坂本光央1、小久保年章2 (1理研バイオリソースセンター、2放医研基盤技術センター)

1

ENU ミュータジェネシスにより得られた歩行異常ラットの遺伝学的ならびに病理学的解析

○由利 梓¹、田中大資¹、芹川忠夫^{1, 2}、田中美有³、桑村 充³、
庫本高志¹（¹京大・医・動物実験施設、²大葉大、³大府大・獣医病理）

我々は、F344/NSlc ラットを用いたエチルニトロソウレアミュータジェネシスにおいて、若齢時に後肢の歩行異常を示し、次第に消瘦して死亡する個体を発見した。そこで、本病態の遺伝性の確認、系統の確立、中枢神経系の病理検査、および連鎖解析による原因遺伝子のマッピングを行った。

【材料・方法】遺伝性の確認と系統の確立は、発症個体が発見された同腹子同士またはその親の別腹の子との交配により行った。発症個体については発症週齢及び死亡週齢の記録と体重測定を行った。中枢神経系の病理検査は、7 週齢と 9 週齢の発症個体を用いて、HE 染色と電子顕微鏡による観察を行った。原因遺伝子のマッピングには BN/SsNSlc 系統との交配により得た F2 の発症個体と SSLP マーカーを用いた。

【結果・考察】系統確立の過程において得られた産子の合計は 332 頭であり、そのうち 74 頭(雄 36 頭、雌 38 頭)が、歩行異常を発症した。雌雄の発症率に有意な差はなく、発症率は 22.3%となり、本疾患の遺伝様式は常染色体劣性遺伝と推定された。非発症個体と比べて発症個体では 4 週齢頃から体重減少が認められ、6～7 週齢頃に発症し、発症後約 3 週間で死に至った。中枢神経系の病理検査では、脊髄背索を中心に軸索の腫大が観察され、腫大軸索内には変性したミトコンドリア様構造、膜状構造、管状構造が集積していた。このことから、本疾患を神経軸索ジストロフィー(neuroaxonal dystrophy; NAD)と診断した。原因遺伝子は、第 8 番染色体の 43.3～44.0 Mb の範囲にマッピングされた。この領域には 7 個の遺伝子が存在するが、NAD の原因遺伝子として報告されているものはない。本ミュータントラットの解析により NAD の発症機序に新たな知見がもたらされると期待される。

VFラットにおけるオリゴデンドロサイトの分化・成熟異常

○田中美有¹、井澤武史¹、山手丈至¹、Robin J.M. Franklin²、庫本高志³、
芹川忠夫⁴、桑村 充¹

(¹ 大阪府大・獣医病理、² Wellcome Trust-MRC Cambridge Stem Cell Institute, University of Cambridge、³ 京大院・医・動物実験施設、⁴ 京大院・医 / 大阪薬大)

【背景・目的】VFラットは、生後10日齢前後から全身の振戦を示すミエリンミュータントで、中枢神経系における軸索周囲の異常な空胞形成とミエリン低形成を特徴とする。我々はこれまでに、VFラットの原因遺伝子として *Dopey1* を同定し、VFラットのオリゴデンドロサイト (OL) の機能評価を行ってきた。今回は、VFラットにおける、OLとオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の動態に着目した解析を行った。

【材料・方法】2、4、10、20週齢のミュータントホモ型 *vf/vf*ラットおよび対照 (ヘテロ型・野生型) ラットの脊髄を用いた。病変部位におけるOLの動態を解析するため、PLP (成熟OL) に対するプローブを用いた *in situ* hybridization を行った。さらに、*Pdgfra*、*Olig2*、*Nkx2.2* といった、OLの分化・成熟に重要な転写因子に対するリアルタイムPCR法と免疫染色により、OPCの動態を経時的に解析した。

【結果・考察】10週齢以降の *vf/vf*ラットでは、小型で細胞突起の乏しい未分化なOLが多数認められた。*vf/vf*ラットの *Olig2* mRNA 発現量は、10週齢で有意な上昇が、*Nkx2.2* mRNA 発現量は全週齢において低下傾向を示した。*Pdgfra* mRNA 発現量は、4週齢で増加、10週齢以降で低下した。*Olig2* に強陽性を示すOPC数は、10週齢以降で明らかに増加した。以上の結果から、VFラットでのOLの成熟異常が示唆され、それがミエリン低形成に関与していると考えられた。また、ミエリン再生に向けたOPC数、OLの分化に関わる各種転写因子の発現変動が認められ、OLの成熟異常によるミエリン再生の障害が示唆された。

新たなアトピー性皮膚炎ラットモデルの開発

樋口裕城¹、横江繭子¹、由利 梓¹、田中大資¹、日合 弘²、芹川忠夫^{2,3}、○庫本高志¹

(¹ 京大院・医・動物実験施設、² 京大・医、³ 大阪薬科大学)

アトピー性皮膚炎は、1) かゆみのある湿疹、2) アトピー素因(家族歴、IgE 抗体を産生しやすい体質など)、3) 皮膚バリアの機能障害、以上3点を主な特徴とする。厚生労働省の調査(平成12-14年度)によると、小学生の有症率は約11%であり、成長に従って減少傾向にあるが20、30代でも8%を越える。

近年、我々は、愛玩ラット由来の近交系(KFRS4/Kyo)が、かゆみを伴う皮膚炎を自然発症することを見出した。そこで、アトピー性皮膚炎モデルとして確立することを目的に、KFRS4/Kyoの皮膚炎症状、掻痒行動、および血中IgEの経時的変化について調べた。

【材料と方法】

雄8頭、雌8頭のKFRS4/Kyoを準備し、8週齢から毎週、体重測定、皮膚炎の観察を行った。具体的には、身体各部位について、発赤、丘疹、水疱、びらん、かさぶたなどの病変とそれらの各部位に占める割合を記録し、スコア化した。また、4週ごとに、血中IgEの測定、身震いと引っ掻き行動の記録を行った。

【結果と考察】

皮膚炎は、雌雄ともに約4ヵ月齢から発症した。皮膚炎の進展には、雌雄差があり、雌より早かった。雌では、6~8ヵ月齢にかけて急速に重篤化し、顕著な身震い・引っ掻き行動を伴った。血中のIgE濃度は、皮膚炎の発症に先駆けて上昇した。以上のことから、KFRS4/Kyoはアトピー性皮膚炎の新たなモデルとして利用できると思われる。

○横井伯英¹、グプルジャン ゲニ¹、別府正悠¹、山口拓郎¹、日高志保美¹、川畑綾子¹、
星野貴一²、星野雅行²、清野 進¹

(¹神戸大院・医・分子代謝医学、²星野試験動物飼育所)

【目的】 Zucker fatty (ZF) ラットはレプチン受容体 (*Lepr*) に突然変異 (*fatty, fa*) を有する肥満モデルである。最近、我々は ZF ラットを起源として、新たな肥満・糖尿病モデル Zucker fatty diabetes mellitus (ZFDM) ラット (正式名称 Hos:ZFDM-*Lepr^{fa}*) を確立した。今回、ZFDM ラットの詳細な表現型解析について報告する。

【方法】 ZFDM 系統の *fa/fa* ホモと対照の *fa/+*ヘテロおよび ZF 系統の *fa/fa* ホモと対照の *+/+*ワイルドのオスについて、7 週齢および 11 週齢時に糖負荷試験、インスリン負荷試験、単離膵島を用いたインスリン分泌実験により、両系統の病態や膵島からのインスリン分泌能を評価した。

【結果】 ZFDM 系統の *fa/fa* ホモは 7 週齢時に重度のインスリン抵抗性を示し、耐糖能は 7 週齢から 11 週齢にかけて悪化した。肥満モデル ZF 系統の *fa/fa* ホモは同程度のインスリン抵抗性を示したが、経時的な耐糖能の悪化が認められなかった。単離膵島からのインスリン分泌において、両系統の *fa/fa* ホモは、7 週齢時ではグルコースおよびインクレチン (GLP-1) に対する応答が認められたが、11 週齢時にはインクレチンに対する応答が認められなかった。

【結語】 新規肥満・糖尿病モデル ZFDM ラットでは、経時的に膵島構造が消失することを踏まえると、重度のインスリン抵抗性とインクレチン応答性の欠如に加えて膵島の脆弱性が糖尿病発症の原因と考えられる。

免疫不全 (X-scid) ラットにおける縮小条虫の動態

○大野民生¹、石井明²、甲斐巧也¹、前川智樹¹、記野秀人²

(1 名大院・医・実験動物、2 浜松医大・感染症学)

縮小条虫 (*Hymenolepis diminuta*) は、その全生活環を終宿主となるラットと中間宿主となる甲虫 (*Tribolium confusum*) を用いて実験室内で容易に維持できることから、腸管内寄生条虫と宿主の相互作用を解析するための貴重な実験的モデルである。しかし、縮小条虫の特性については不明な点が多い。そこで本研究では、ゲノム編集技術により京大 (NBRP-Rat) で作出されたX-scidラットを用いて、本寄生虫の免疫不全ラット体内での動態を解析し、その基礎特性を把握する事を目的とした。

解析により以下の結果を得た。1) 実験的感染に使用される他の *Hymenolepis* 属の 2 種 (*H. nana*, *H. microstoma*) は少なくとも免疫不全終宿主体内で自家感染能を有するが、X-scid ラットでは縮小条虫の自家感染は認められなかった。2) 初感染においてはX-scid と正常ラットの虫体サイズに差は認められなかった (X-scid ラットで虫体の成長が促進されなかった)。3) 正常ラットは縮小条虫の再感染に対し抵抗性を呈するが、X-scid ラットには再感染抵抗性が全く認められなかった。

縮小条虫はマウスに感染しても感染後 10 日以内に排虫され成虫になることはできないが、ラット体内では宿主の免疫状態に関わらず成長できることからラットの腸管内環境に極めて良く適応していると考えられた。マウスでは初感染、再感染を問わず排虫できるが、ラットでは初感染においてのみ排虫できない原因を解明することが縮小条虫のラットへの適応機構解明の鍵になると考えられる。腸管内寄生線虫の排虫には肥満細胞や杯細胞が重要な役割を果たしていることが知られていることから、現在、縮小条虫の排虫機構についてマウスとラットで肥満細胞の役割に着目した比較解析に着手している。また、今回の解析を通じて、X-scid ラットは縮小条虫などラットを好適宿主とする寄生虫の基礎特性を解明する上で、有用なツールになりうると考えられた。

6

ラット胚の凍結保存および融解後の産子への発生について

○竹鶴 裕亮、金子 武人

(京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設)

【目的】胚のガラス化保存法は、簡易で短時間に凍結保存が可能であり、凍結－融解したラット 2 細胞期胚から産子が得られている。しかしながら、発生ステージの異なる胚の凍結保存に関する情報は少ない。近年、遺伝子改変ラットの作製技術の発展により、前核期胚や桑実胚の利用が多くなっている。これらの胚を保存胚として遺伝子改変ラット作製へ利用することは、作業の効率化に有効である。そこで本研究では、ラット前核期胚、2 細胞期胚および桑実胚のガラス化保存を行い、融解後の産子への発生について検討した。

【方法】8 週齢以上の Wistar 雌ラットを過排卵処理 (PMSG: 150 IU/kg および hCG: 75 IU/kg) した後、同系統の成熟した雄ラットと交配した。前核期胚および 2 細胞期胚は卵管灌流、桑実胚は子宮灌流により採取した。採取した胚は、前処理液 (10%プロピレングリコール) および凍結保存液 (10%プロピレングリコール、30%エチレングリコール、20%パーコール、0.3 M スクロース) を用いて、液体窒素中に凍結保存した。0.3 M スクロースを用いて融解後、生存した胚は偽妊娠雌の卵管内に移植し、産子への発生について検討した。

【結果および考察】凍結－融解した前核期胚、2 細胞期胚および桑実胚の産子への発生率は、それぞれ 16%、33%および 52%であった。以上の結果より、本研究で用いた発生ステージのラット胚は、本保存液を用いて凍結保存が可能であり、融解後の産子への発生率は胚の発生ステージが進むごとに向上する傾向が見られた。

CRISPR/Cas9 system で作製した ApoE KO マウスの表現型解析

○田中貴雄¹、大口悦宏²、島田俊雄²、中里清一²、三浦義記^{1,2}、金智蓮³、
中井綾³、井戸基治^{1,2}

(¹株式会社ケー・エー・シー GE 動物事業室、²株式会社ケー・エー・シー
バイオサイエンス事業部、³株式会社アプロサイエンス バイオ事業部)

CRISPR/Cas9 を用い、高脂血症モデルとしての ApoE (Apolipoprotein E) KO マウスが効率よく作製できるかどうかを検討した。

【方法】

体外受精により得た C57BL/6JJcl マウスの前核期胚に Guide RNA および Cas9 mRNA を injection 後、2 細胞期胚を偽妊娠マウスに移植した。F0 および F1 の総コレステロール(TC)値の測定と DNA sequence 解析を行った。さらに、7 か月齢で病理検査を行い、動脈硬化発症の有無を検証した。

【結果および考察】

305 個の前核期胚に Guide RNA および Cas9 mRNA を injection して、217 個の 2 細胞期胚を得た (71.1%)。そのうち 93 個を偽妊娠マウスに移植した結果、39 匹の産仔 (F0) を得た (42.0%)。F0 において indel 変異によりフレームシフトを起こした個体の TC 値は wild 個体の 4 倍以上に達していた。

病理検査の結果、7 か月齢で動脈硬化像を検出できた。

CRISPR/Cas9 を用い、高脂血症モデルとしての ApoE KO マウスが作製できたと考えられる。

マウス系統間のストレプトゾトシン誘発糖尿病感受性の遺伝的解析

○前川智樹¹、小林美里²、伊藤美佳子³、大野欽司³、馬場谷成⁴、上田裕紀⁵、池上博司⁴、堀尾文彦²、高橋雅英⁶、大野民生¹

(1 名大院・医・実験動物、2 名大院・生命農・動物栄養、3 名大院・医・神経遺伝情報、4 近畿大・医・内分泌代謝糖尿病内科、5 阪大院・医・分子内分泌、6 名大院・医・腫瘍病理)

ストレプトゾトシン (STZ) は膵 β 細胞に対する特異的な細胞毒性を有することから、マウス・ラットの実験的糖尿病モデルの作製に汎用されている。マウスでは STZ 誘発糖尿病の感受性に系統差が存在することが知られているが、その原因遺伝子の解析は乏しい。我々は、A/J と SM/J 系統を起源とする体系的遺伝解析系を用いた解析により、STZ 単回投与 (175mg/kgBW) における両系統間の感受性差は、Chr.11 に存在する *Mpg* (N-methylpurine-DNA glycosylase) 遺伝子のアミノ酸置換を伴う変異 (A132S) に起因する可能性が高い事を明らかにした。今回は、この変異が他の STZ の投与方法や他のマウス系統の感受性にも関与しているかどうかを検証した。

解析により、以下の結果を得た。1) STZ 少量連続投与 (40mg/kgBW×5 回) に対して A/J、SM/J、A.SM-Chr.11K 系統は何れも糖尿病抵抗性を示した。2) STZ 単回投与 (175mg/kgBW) による 14 系統の糖尿病感受性には大きなバリエーションが存在し、変異型 *Mpg* 遺伝子を有する系統 (A/J, NZW, MSM 等) は比較的高感受性を示したが、正常型 *Mpg* 遺伝子でも比較的高い感受性を示す系統 (C57BL/6J, NOD, NSY) が存在した。以上より、*Mpg* 遺伝子の変異は STZ 少量連続投与による糖尿病の感受性には関与せず STZ 単回投与の感受性のみに関与している事と、マウス系統間には *Mpg* 遺伝子の変異以外にも STZ 単回投与における糖尿病の感受性に関与する遺伝子が存在することが判明した。

そこで、正常型 *Mpg* 遺伝子を有するにもかかわらず STZ 単回投与による糖尿病感受性を示す NSY 系統に着目し、NSY、C3H/HeN、C3H/HeN-11^{NSY} の STZ 感受性を解析したところ、NSY > C3H/HeN-11^{NSY} > C3H/HeN となり、NSY 系統の Chr.11 には *Mpg* 遺伝子以外の STZ 感受性に関与する遺伝子が存在する事が判明した。今後、C3H/HeN-11^{NSY} 系統を起源として NSY 由来の Chr.11 を断片化させたコンジュニック系統群の STZ 感受性を解析し、原因遺伝子の存在領域を限局する予定である。

○齋藤浩充、鈴木昇

(三重大学生命科学研究支援センター・機能ゲノミクス分野・動物機能ゲノミクス部門)

(背景) *K-Ras* 変異は肺癌全体の 30% を占めるにもかかわらず *K-Ras* に対する临床上利用可能な分子標的薬は無く、治療につながる新たな標的遺伝子の探索が重要な課題である。我々は、化学発がん系における発がん物質の投与から遺伝子の異常までのプロセスをスキップし、*K-Ras* 遺伝子変異から腫瘍が出現するまでの発症過程（変異後過程）に焦点をあてるため、Cre 組み換え酵素発現により、任意の時期、細胞で癌型 *K-Ras* 遺伝子を発現可能な *Ryr2^{tm1Nobs}* マウスを作製した。Cre 発現アデノウイルスを用いた肺気管支上皮細胞特異的な癌型 *K-ras* 遺伝子発現によりヒトの肺胞上皮 2 型様腺がんを発症する遺伝子改変肺がんモデルを作製した。

(目的) 異なる近交系マウスの遺伝子背景をもち、異なる癌型 *K-Ras* 誘導肺発癌感受性をもつ *Ryr2^{tm1Nobs}* マウスの作製と QTL 解析により、癌型 *K-Ras* 変異を原因とし、変異後過程において肺発癌の抑制、促進にかかわる因子を生体レベルで探索するシステムができると考え作製を試みた。

(結果と考察) 高感受性系統 C57BL/6J(B6)-*Ryr2^{tm1Nobs}* 及び低感受性系統 A/J-*Ryr2^{tm1Nobs}* を樹立した。2 系統において癌型 *K-Ras* 発現誘導に用いているアデノウイルス感染効率、および組み替え直後の癌型 *K-Ras* 発現量に差は検出されず、2 系統間には癌型 *K-Ras* により誘導される肺発癌感受性を調節する因子に差があることが示唆された。また、正常な *K-Ras* 遺伝子による肺発癌抑制効果が報告されているため検討を行ったが、我々の系において内在性の正常 *K-Ras* 遺伝子発現は、感受性の差に関与していないことが示された。次に、このシステムの有効性を検討する目的で、化学発癌モデルにおける発癌感受性 QTL が報告されている第 11 染色体 (*Par1*(59.8cM), *Pas5*(*Sluc4*)(42.9cM)) と、報告が無い第 3 染色体において約 20 cM 間隔で、polymorphism マーカーを設定し、F2 マウス 96 匹による QTL 解析 (単点解析) を行った。その結果、第 11 染色体上のマーカー *D11Mit20* (27.23cM) で A/J 由来の遺伝子座が B6 由来の遺伝子座に対して有意に肺発癌を抑制し ($P = 0.042$)、第 3 染色体上のマーカー *D3Mit19*(87.6cM)、*D3Mit45*(72.4cM) は、有意に促進する ($P = 0.030, 0.040$) ことを見出した。いずれも新規の QTL 遺伝子座であり、癌型 *K-Ras* 依存的かつ、化学発癌モデルでは検出されない肺発癌感受性遺伝子の探索に有効であることが示唆された。

○鈴木昇、斉藤浩充

(三重大学生命科学研究支援センター・機能ゲノミクス分野・動物機能ゲノミクス部門)

「はじめに」

ヒト多形型横紋筋肉腫(pleomorphic rhabdomyosarcomas, pRMS と略記)は、成人の骨格筋に原発し極めて予後不良を呈する希少癌である。希少性ゆえに、これまで、pRMS の発生メカニズムや有効な治療法も未解明である。これまで、私たちは、Cre/Lox システムを応用して pRMS 動物モデルの開発し、癌型 K-ras 遺伝子発現と p 5 3 遺伝子機能欠損との協調によって、マウスの大腿骨格筋に pRMS が発生することを示し、病態を解析してきた。今回は、細胞株を樹立し pRMS オリジンについて考察を試みた。

「方法と結果」

floxK-rasG12Vp53^{-/-}マウスの大腿骨格筋に Cre 発現プラスミドをエレクトロポレーションで導入し、約 10 週後に pRMS を得た。これをトリプシン処理して、DMEM +10%FCS 培地で培養し、細胞株 RMS3 を得た。RMS3 は、皮下移植により pRMS を形成し、また、静脈経由の移植によって肺に転移性コロニーを形成した。この転移性コロニーを培養し、限界希釈法によって、細胞株 RMS310 を得た。さらに、GFP 発現レトロウィルスをトランスデュースした RMS3 の肺転移性コロニーを株化した細胞株 RMS3g2 を得た。各細胞株の RNA を抽出し、これまでに報告されている筋再生をつかさどる細胞集団に特異的なマーカー遺伝子の発現組み合わせを RT-PCR 法にて調べた。結果、幹細胞抗原 Sca1、CD34、PDGF 受容体 α 型、メタロプロテアーゼ Adam12、間質細胞マーカー TCF4 の組み合わせの遺伝子が発現していた。正常な筋再生の主役であるサテライト細胞のマーカー Pax7 および Myf5 はいずれも発現を認めなかった。また、CD45 も陰性であった。

「考察」

したがって、floxK-rasG12Vp53^{-/-}マウスに誘導さえる pRMS のオリジンは非骨髄由来の間葉系幹細胞である可能性が示唆された。

○加藤啓子, パイトゥーン シーモントリー

(京都産大・総合・動物生命)

側頭葉てんかんは、扁桃体・海馬・側頭葉に発作の発火点を持つ、難治性てんかんの約 50%を占めるてんかんである。また側頭葉てんかんは、うつ、不安障害、統合失調症等の精神疾患の併存率が高く、発作に起因するものと、薬剤副作用に起因するものが混在する。このてんかん～併存症の発症メカニズムに関わる分子基盤を明らかにするために、新規モデル動物の開発は有用である。今回、側頭葉てんかんモデルマウスの発作が伝搬する神経回路上で、発現亢進を示すシアル酸転移酵素 (ST3Gal IV) の遺伝子欠損マウスを作成し、てんかん～辺縁系に関わる神経症状を観察した。

【材料と方法】

C57Bl/6J 由来の MS12 細胞から、常法に従い、ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスを作成した。一連の実験には、10 代以上の C57Bl/6J への戻し交配をおこなったマウスを用いた。8 週齢雄マウスの扁桃体 (情動学習の中核) に刺激電極を挿入し、1 日 1 回約 2 週間軽微な刺激を導入することで、てんかん発作を誘導した。また、9～13 週齢の雄マウスを対象に、情動系に関わる行動試験 (オープンフィールド試験, 恐怖条件付け試験, 強制水試験, 睡眠計測)をおこなった。さらに、てんかん発作に連動した著しい発現亢進を示し、てんかん発作の閾値を下げる、脳成長ホルモンの発現レベルを定量 RT-PCR 法により検討した。

【結果と考察】

ST3Gal IV 遺伝子を欠損したマウスは、てんかん誘導刺激に応答しない、てんかんを発症しないマウスであることがわかった。しかしながらこのマウスは、環境適応力の低下 (オープンフィールド試験), 恐怖記憶の増強に基づく不安様症状の亢進 (恐怖条件付け試験), うつ様症状の亢進 (強制水試験), REM 睡眠の低下 (脳波睡眠計測)を示した。また、ST3Gal IV 遺伝子を欠損したマウスは、脳成長ホルモンの発現を減少した。

以上のことから、ST3Gal IV が、てんかん及び、不安やうつ様行動の誘導に関与する重要な分子であり、神経細胞で発現する成長ホルモン量に影響することがわかった。また ST3Gal IV 遺伝子を欠損したマウスは、てんかん発作を消失した副作用である、うつや不安症を示すモデルマウスとして、有用性の高いことが示唆された (*J. Neurochem.* 2014, in press)。

12

行動量や探索行動に影響する成長ホルモンの *Arc* 発現量の調節（英語で発表）

○パイトゥーン シーモントリー，廣田 暖奈，加藤 啓子
（京都産大・総合・動物生命）

成長ホルモンは、代謝に作用することで成長を促すが、脳においても、神経発生、認知、神経保護等に作用することが知られている。我々はマウスモデルを用いて、神経細胞で発現する成長ホルモンが、てんかん発作に連動した著しい発現亢進を示し、その結果、発作の閾値を下げ、てんかんの発症を早めることを示した。てんかん患者における、うつ、不安障害といった精神疾患の出現は、一般の集団に比べて3倍高いことが知られている。そこで、てんかんに作用する成長ホルモンが、情動行動にも影響するかどうかについて検討すると共に、てんかん応答性・最初期遺伝子 (*Arc*, *Npas4*, *Nr4a1*, *Fos*) の発現への影響を調べた。

【材料と方法】

8週齢 ddY 雄マウスの海馬 CA3 領域にカニューレを挿入し、成長ホルモン (90 pmol/ μ l, 1 μ l), ペグビソマント (成長ホルモン受容体拮抗薬, 90 pmol/ μ l, 1 μ l), 緩衝液を、2日に1度6回注入した。注入日を含む11日間、活動量の観察（8日目と10日目）、オープンフィールド試験と高架式十字迷路試験（1日目, 5日目, 9日目）、明暗試験（2日目, 6日目, 10日目）を実施し、活動性と探索行動を観察した。また、11日目に脳を摘出し、定量 RT-PCR 法と蛍光抗体法により、成長ホルモン投与による、成長ホルモン受容体と最初期遺伝子の発現レベルを解析した。

【結果と考察】

成長ホルモン投与が、脳内の *Arc* と *Nr4a1* の mRNAs 発現を亢進し、ペグビソマントが *Npas4* mRNAs の発現を低下した。蛍光抗体法により海馬 CA3 領域を観察したところ、成長ホルモン投与が、成長ホルモン受容体と *Arc* の発現亢進を、ペグビソマントが *Npas4* の低下を示した。また成長ホルモン投与によりマウスは、グルーミングの亢進（オープンフィールド）とオープンアームへの移動亢進（高架式十字迷路）を、ペグビソマント投与により、活動量の低下を示した。これらの結果を多項式回帰と判別解析に当てはめたところ、*Arc*（シナプス活性の強化に作用）の発現が活動量と相関関係を示し、成長ホルモン投与群、ペグビソマント投与群、緩衝液投与群間で判別することができた。

以上のことから成長ホルモンは、てんかんに加え、過活動～低活動をも制御し、特に、*Arc* の発現量を変えることで活動量に作用することを示唆した (*Exp. Brain Res.* 2014, 232:2957)。

冠動脈病変が冠スパズムおよび狭心症発症に及ぼす影響、WHHLMI ウサギを用いた実験的検証

○田村姿央理¹、小池智也²、ユウイン²、塩見雅志^{1,2}

(神戸大学医学研究科 疾患モデル動物病態生理学¹、附属動物実験施設²)

WHHLMI ウサギは、動脈硬化の進展による冠動脈の閉塞によって心筋梗塞を自然発症するウサギである。このウサギに、冠動脈スパズムを誘発し、冠動脈スパズム発生とそれによる急性冠症候群の発生について調べた。

【材料と方法】

12-29 月齢の WHHLMI ウサギ (n=34) と JW ウサギ (n=7) を用いた。麻酔下で、耳静脈からノルエピネフリン (12 nmol/kg/min) を持続投与中にエルゴノビン (0.45 μ mol/kg) を急速投与した。冠スパズムの発生は、心電図と血管造影で確認した。冠スパズムが解消しない場合、エルゴノビン投与から 30 分後にニトログリセリン (10 μ g/kg) を投与した。実験期間中に心電図、心エコー、血圧 (大腿動脈) を測定し、実験前後に採血して心筋虚血マーカー (H-FABP、cTroponin-I、Myoglobin) の測定を行った。実験終了後、安楽死を行い、心臓を摘出し、冠動脈を病理組織学的に解析した。

【結果】

冠スパズムの誘発により、心電図で ST 低下、ST 上昇、陰性 T 波、T 波増高、Q 波出現、R 波減高、心室性期外収縮、左脚ブロックが認められた。WHHLMI ウサギは、JW ウサギに比べ、冠動脈スパズム発生頻度が有意に高かった。また、WHHLMI ウサギのうち冠動脈狭窄率が 75%以上であったウサギと 75%未満であったウサギ、JW ウサギの 3 群の冠スパズム発生率の比較を行ったところ、狭窄率 75%以上のウサギで冠スパズムの発生率が有意に高く、次に 75%未満のウサギが高かった。観察した冠動脈 segment の中で 75%以上の狭窄を示した割合は、冠スパズムが発生した WHHLMI ウサギ ($32 \pm 6\%$, mean $\pm$ SEM) は発生しなかった WHHLMI ウサギ ($8 \pm 6\%$) の約 4 倍であった。心エコーにより、エルゴノビン投与後に収縮期の左心室の直径が増大し、Fractional Shortening [= (拡張期直径 - 収縮期直径) / (拡張期直径) $\times$ 100] は有意に低下した。血清心筋虚血マーカーは、スパズム誘発後に顕著に増加した。

【結論】

以上の結果より、冠スパズムの発生に冠動脈病変の進行が関係していることが示唆された。また、冠スパズムの誘発によって、狭心症および心筋の虚血傷害の発生が示唆され、WHHLMI ウサギは急性冠症候群のモデル動物になると考えられた。

CAR バチルスに学名をつけるぞ

○池 郁生¹、坂本光央¹、小久保年章²(1理研バイオリソースセンター、²放医研基盤技術センター)

通称 CAR(カー)バチルスは、齧歯類の気管などの線毛上皮細胞に主に感染し慢性呼吸器疾患を起こすことから命名された(Cilia-Associated Respiratory)、グラム陰性フィラメント状桿菌である。我々は哺乳類細胞の培養上清を用いて本菌を効率よく増殖させる方法を開発し、バイオフィーム形成など本菌の相変異といえる現象を見出した。本菌の完全ゲノム塩基配列を決定したが、類縁菌情報は非常に少ない。今回は培養性状や生化学検査、菌体脂質成分解析、16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹の再解析から本菌に学名をつける試みについて発表する。

【材料と方法】 CAR バチルスのラット分離 SMR 株を、Vero E6 細胞で作成した conditioned medium を用いて培養した。生化学検査は Rapid ID 32A (bioMérieux Inc.)、脂質解析は菌体脂肪酸組成分析システム(MIDI Inc.)、系統樹解析は Genetyx-Mac、Clustal W、MUSCLE、PHYLP を用い近隣結合法、最大節約法ならびに最尤法による系統樹を描画した。

【結果と考察】 CAR バチルス SMR 株は、16S rRNA 遺伝子解析から cytophaga-flavobacteria-bacteroides (CFB)門に属すとされる。今回、生化学検査と脂質成分解析から本菌は最近縁種である Chitihophaga 属の各菌と著しく異なることが分かり、系統樹の再解析結果と合わせ、本菌が独立した種・属(あるいはさらに科)を構成することが明らかとなった。

<第125回研究会（平成27年3月6日）>

テーマ：関西実験動物研究会へようこそ

1. 幹細胞の多能性維持と分化の分子機構研究

依馬 正次（滋賀医科大学 動物生命科学研究センター 幹細胞・ヒト疾患モデル研究分野、科学技術振興機構 さきがけ）

2. 糖鎖はさまざまな生命現象の鍵となっている

浅野 雅秀（京都大学大学院 医学研究科附属動物実験施設）

幹細胞の多能性維持と分化の分子機構研究

依馬正次

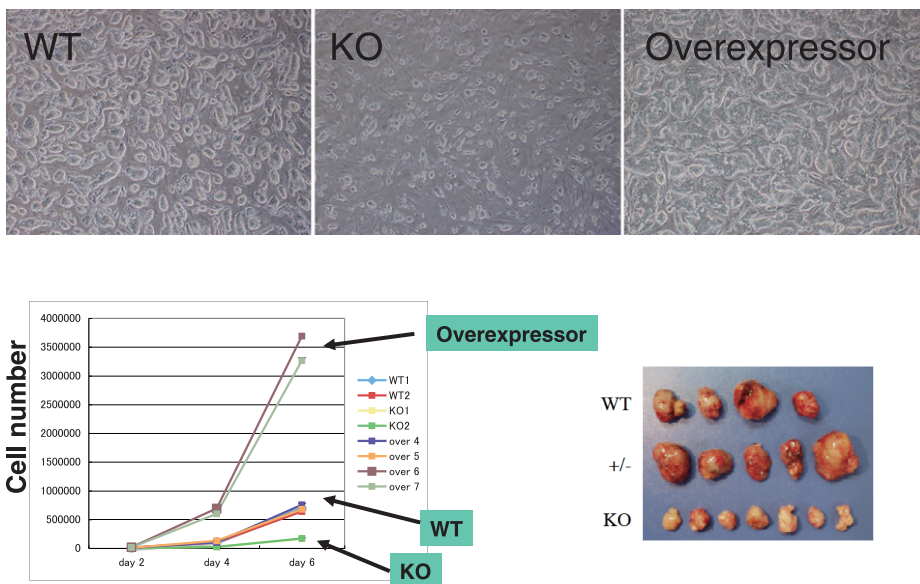
滋賀医科大学、動物生命科学研究センター、幹細胞・ヒト疾患モデル研究分野

胚性幹（ES）細胞は、胚盤胞期の内部細胞塊から単離される多能性幹細胞であるが、発生過程においてどのような分子機構で多能性が獲得されるのか不明な点が多い。我々がKlf (Kruppel-like factor) family memberの一つであるKlf5についてノックアウトES細胞を作製したところ、ノックアウトES細胞は顕著な増殖低下傾向を呈した（図1参照）¹⁾。さらにノックアウトマウスは胚盤胞期に胚致死となることを見出した¹⁾。表現型を解析する過程で、多能性マーカーであるNanogを発現する段階前に細胞周期異常が起こることを見出した。このような表現型を引き起こす分子機構はこれまで不明であったが、Fgf-Fgfr- MAPK経路が過剰に活性化されていることを示唆する遺伝子発現変化が起きていた。このシグナル経路を遮断する化合物の添加により、初期胚の表現型がほぼレスキューできることから、Klf5は初期胚においてFgf経路を抑制することで多能性獲得を保證する鍵分子として機能することを明らかにしたと考えられる（浅見ら、未発表）。

一方、我々はマウスES細胞を用いた循環器系細胞への分化研究から、血管の発生機構に興味を持ち研究を行っている^{2) 3)}。血管新生の分子メカニズムを包括的に理解することを目指して、血管内皮細胞のトランスクリプトームを把握することを試みたところ、遺伝子名は既知であるものの血管内皮細胞における機能については未知である遺伝子、また遺伝子名すら付与されていない未知遺伝子群を多く含んでいた。パイロット的にヒト培養血管内皮細胞におけるノックダウンを行ったところ、VEGF依存性の管腔形成を顕著に阻害する遺伝子を見出した。3遺伝子についてノックアウトマウスを作製し、2遺伝子について網膜血管新生の安定化に寄与することを見出した（図2）⁴⁾。以上の事から、我々の手法により、個体レベルで血管新生に寄与し得る遺伝子が探索可能であることが示された。同定された遺伝子には、ヒト腫瘍においても高発現しているものが含まれており、生理的血管新生のみならず腫瘍血管新生に寄与するかどうか今後の課題である。

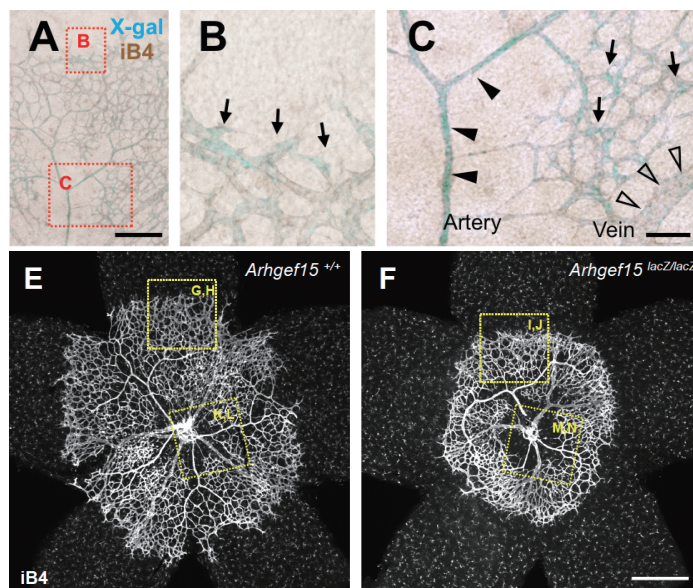
1. Ema et al., Krüppel-like factor 5 is essential for blastocyst development and the normal self-renewal of mouse ES cells. *Cell Stem Cell* 3, 555-567 (2008)
2. Ema et al., Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev.* 17:380-393 (2003)
3. Ishitobi et al., Molecular basis for Flk1 expression in hemato-cardiovascular progenitors in the mouse. *Development* 138, 5357-5368 (2011)
4. Takase et al., Genome-wide identification of endothelial cell-enriched genes in the mouse embryo. *Blood* 120:914-923. (2012)

図1 Klf5はES細胞の増殖に寄与する



Ema et al., Cell Stem Cell (2008)

図2 Arhgef15は網膜血管新生に寄与する



Takase et al., Blood (2012)

糖鎖は様々な生命現象の鍵となっている

浅野 雅秀

京都大学医学研究科附属動物実験施設

糖鎖は核酸やタンパク質と同様に生体情報を担う分子であり、第3の生命鎖と呼ばれている。分子と分子あるいは細胞と細胞の相互作用に関わっており、生命現象の様々な局面に登場すると共に、その異常はいくつかの疾患を引き起こすことが知られている。

β 1-4 結合にガラクトースを転移する酵素は7つの遺伝子 (β 4GalT-1~-7) が存在し、それぞれに役割分担があると思われる。我々の研究室ではこれまで β 4GalT-1, -2, -5 の欠損マウスを作出して解析を行ってきた。 β 4GalT-1 は神経系以外でユビキタスに最も強く発現しており、我々が最初にそのノックアウトマウスを作製したところ、上皮系細胞の増殖と分化に異常が観察された。また、血清糖タンパク質の糖鎖構造を β 1-4Gal を認識する RCA-1 レクチンと末端の N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を認識する PVL レクチンを用いて調べたところ、ほとんどのタンパク質においてガラクトースが欠損して GlcNAc が露出していたが、一部のタンパク質ではガラクトースが残存しており、他にも β 4GalT が存在する可能性が示唆された¹⁾。その後、 β 4GalT-1 は免疫系では白血球の細胞接着に関与するセレクトインのリガンド糖鎖の生合成に重要な役割を果たしていることがわかった。セレクトインのリガンド糖鎖は O 型糖鎖のコア2側鎖の末端に形成されるシアリルルイス X (sLe^x) がその代表的なものであるが、このマウスの脾臓白血球のコア2側鎖の構造を HPLC で解析したところ、そのほとんどにガラクトースが欠損しており、 sLe^x が形成されていないことがわかった。そのため、このマウスでは炎症時の好中球やマクロファージの遊走が低下して皮膚の炎症反応が減弱していた²⁾。また、皮膚の創傷時の好中球やマクロファージの浸潤も低下しており、創傷治癒が遅延することもわかった³⁾。

さらに、 β 4GalT-1 欠損マウスは腎臓にも異常を生じて短命であった。このマウスは若齢より顕著なアルブミン尿が検出され、一部に血尿も観察された。組織学的解析からは、腎糸球体のメサンギウム基質の顕著な増生 (PAS 染色) と IgA や補体 C3 のメサンギウム領域への沈着 (蛍光免疫染色)、パラメサンギウム領域への免疫複合体の沈着 (電顕) が観察され、IgA 腎症を自然発症することがわかった。IgA 腎症患者と同様に、血中の IgA 濃度が顕著に高く、IgA が多量体を形成していた。患者では IgA 分子の O 型糖鎖のガラクトース欠損が報告されている。マウスの IgA 分子には O 型糖鎖は結合しないが、このマウスでは IgA の N 型糖鎖のガラクトースが完全に欠落しており、患者と同様に

IgA 分子の糖鎖不全が IgA 腎症を引き起こしたのではないかと考えられた⁴⁾。

一方、脳神経系で発現している $\beta 4\text{GalT-2}$ の欠損マウスには外見上の異常が見られなかったので、テストバッテリー方式の行動解析を行なった。その結果、空間学習・記憶と協調運動に障害が見られ、脳神経系での機能的な糖鎖として知られている HNK-1 糖鎖の発現が脳皮質や海馬で顕著に減少していた⁵⁾。以前に HNK-1 糖鎖の合成を担うグルクロン酸合成酵素 (GlcAT-P) の欠損マウスを京大薬学部の川寄先生や岡先生との共同研究で作製したが、GlcAT-P 欠損マウスも空間学習・記憶と海馬の神経可塑性に障害があったので⁶⁾、 $\beta 4\text{GalT-2}$ 欠損マウスの空間学習・記憶障害は、HNK-1 糖鎖の発現低下が原因と考えられた。逆に、 $\beta 4\text{GalT-2}$ は HNK-1 糖鎖の形成に必須であり、脳神経系の機能に関与することがわかった。一方、GlcAT-P 欠損マウスは協調運動には問題がなかったので、 $\beta 4\text{GalT-2}$ 欠損マウスの協調運動障害は HNK-1 糖鎖とは別の糖鎖構造の欠損に原因があると思われた。小脳の組織学的解析から、プルキンエ細胞の数と配列に異常が観察され、 $\beta 4\text{GalT-2}$ はプルキンエ細胞の形成に重要であることが示唆された。

$\beta 4\text{GalT-5}$ も脳神経系で強い発現が見られたが、 $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスは予想に反して胎生期 (E10.5 あたり) に致死となった。E7.5~E9.5 の胚の解析を行ったところ、三胚葉のマーカーは正常に発現しており、胚よりは胚体外組織に異常が見られた。そこで、テトラプロイドレスキュー実験を行ったところ、野生型のテトラプロイド (4 倍体) 胚と 2 倍体の $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損胚とのキメラ胚は、少なくとも E12.5 までは正常に発生してレスキューされた。テトラプロイド胚は胚体外組織にしか分化できないので、胚体外組織は野生型、胚は $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損となっている上記のキメラ胚が正常に発生した場合は、胎生致死の原因は胚体外組織にあると言える。したがって、 $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損胚は、胚自身よりも胚体外組織の異常で致死となることがわかった。タンパク質にガラクトースを転移する最も主要な $\beta 4\text{GalT-1}$ の欠損マウスも胎生致死にはならなかったので、 $\beta 4\text{GalT-5}$ はタンパク質糖鎖ではなく、スフィンゴ糖脂質の合成起点となるラクトシルセラミド (LacCer) の合成を担う可能性が考えられた。LacCer 合成酵素はラットの脳では $\beta 4\text{GalT-6}$ が担うことがすでに報告されているが、 $\beta 4\text{GalT-5}$ は $\beta 4\text{GalT-6}$ と最も相溶性が高いので、 $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損胚での LacCer 合成酵素活性を測定したところ、野生型の 10% 程度に激減していた。以上のことからマウスの胚では $\beta 4\text{GalT-5}$ が主要な LacCer 合成酵素であり、 $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損胚は LacCer とその下流のガングリオシドの合成がほとんど消失するために、胎生致死となることがわかった⁷⁾。なお、 $\beta 4\text{GalT-6}$ 欠損マウス (正常に発生する) を名大の古川先生から分与していただき、我々の脳神経特異的 $\beta 4\text{GalT-5}$ 欠損マウスと交配して、脳神経系における $\beta 4\text{GalT-5}$ と $\beta 4\text{GalT-6}$ の機能について研究を進めている。

以上のように同じファミリーに属するガラクトース転移酵素でも、それぞれ免疫系、脳神経系、発生過程と役割分担があり、生体にとって重要な役割を担っていることがわかってきた⁸⁾。

昨年 12 月から京都大学に研究の場を移し、これまでの糖鎖研究をさらに発展させると共に、ヒストン修飾に注目したエピジェネティクス研究も進めるつもりである。どちらも翻訳後に修飾されるものであり、前者はグライココード、後者はヒストンコードとして、重要な機能を果たしており、この 2 つのコードの解読を進めていく予定である。今後とも関西実験動物研究会の皆様のご指導・ご鞭撻をよろしくお願い致します。

参考文献

- 1) Asano, M., Furukawa, K., Kido, M., Matsumoto, S., Umesaki, Y., Kochibe, N. and Iwakura, Y. Growth retardation and early death of β -1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells. *EMBO J.* 16: 1850-1857, 1997.
- 2) Asano, M., Nakae, S., Kotani, N., Shirafuji, N., Nambu, A., Hashimoto, N., Kawashima, H., Hirose, M., Miyasaka, M., Takasaki, S., and Iwakura, Y. Impaired selectin ligand biosynthesis and reduced inflammatory responses in β -1,4-galactosyltransferase-I-deficient mice. *Blood* 102: 1678-1685, 2003.
- 3) Mori, R., Kondo, T., Nishie, T., Oshima, T., and Asano, M. Impairment of skin wound healing in β -1,4-galactosyltransferase-deficient mice with reduced leukocyte recruitment. *Am. J. Pathol.* 164: 1303-1314, 2004.
- 4) Nishie, T., Miyaishi, O., Azuma, H., Kameyama, A., Naruse, C., Hashimoto, N., Yokoyama, H., Narimatsu, H., Wada, T., and Asano, M. Development of immunoglobulin A nephropathy-like disease in β -1,4-galactosyltransferase-I deficient mice. *Am. J. Pathol.* 170: 447-459, 2007.
- 5) Yoshihara, T., Sugihara, K., Kizuka, Y., Oka, S., and Asano, M. Learning/memory impairment and reduced expression of the HNK-1 carbohydrate in β 4-galactosyltransferase-II-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 284: 12550-12561, 2009.
- 6) Yamamoto, S., Oka, S., Inoue, M., Shimuta, M., Manabe, T., Takahashi, H., Miyamoto, M., Asano, M., Sakagami, J., Sudo, K., Iwakura, Y., Ono, K., and Kawasaki, T. Mice deficient in nervous system-specific carbohydrate epitope HNK-1 exhibit impaired synaptic plasticity and spatial learning. *J. Biol. Chem.* 277: 27227-27231, 2002.
- 7) Nishie, T., Hikimochi, Y., Zama, K., Fukusumi, Y., Ito, M., Yokoyama, H., Naruse, C., Ito,

M. and Asano, M. β 4-Galactosyltransferase-5 is a lactosylceramide synthase essential for mouse extra-embryonic development. *Glycobiology* 20: 1311-1322, 2010.

- 8) 浅野雅秀 総説「ガラクトース糖鎖と炎症，発生，神経」生化学 86: 382-390, 2014.

<第126回研究会（平成27年 6 月12日）>

テーマ：エピジェネティクス研究の最前線

1. 膵 β 細胞機能のエピゲノム制御

木戸 良明（神戸大学大学院 保健学研究科病態解析学領域 分析医科学分野）

2. 発生・分化におけるエピジェネティクス

仲野 徹（大阪大学大学院 生命機能研究科・時空生物学／医学系研究科・病理学）

<トピックス>

創薬の隘路「Phase 2 Attrition」の克服に向けて－実験動物学の進展への期待

樽林 陽一（日本医療研究開発機構 創薬支援戦略部）

膵β細胞機能のエピゲノム制御

木戸良明

神戸大学大学院保健学研究科 病態解析学領域 分析医科学分野

私たちはこれまでに、膵β細胞においてインスリンシグナルが、膵β細胞の生存・維持には必須のシグナルであり、その数とサイズを制御することにより、膵β細胞量を調節していることを明らかとした(Nat Genet, 2006; Mol Cell Biol, 2008)。近年、膵β細胞量調節にエピジェネティクス制御が関与していることが報告され、注目を集めている。私たちは、膵β細胞におけるインスリンシグナルが様々な環境下でエピジェネティクス制御により発現調節を受けていることを見出した。

また、近年日本人2型糖尿病候補遺伝子として、GWASによるSNP解析で有意な変異が報告された*KCNQ1*遺伝子について解析を行った。*KCNQ1*は電位依存性Kチャンネルとして細胞膜の再分極を担っており、膵β細胞においてインスリン分泌に関与していることが知られている。また*KCNQ1*遺伝子はインプリンティング遺伝子の1つであり、その遺伝子領域において発現しているノンコーディングRNAである‘*KCNQ1OT1*’が、DNAメチル化やヒストンメチル化を介して近傍遺伝子の発現を制御している。全身性*Kcnq1*ノックアウトマウスを用いて*Kcnq1*の機能を欠損させた検討では、耐糖能、膵β細胞機能に関する明らかな表現型を示さない。そこで*Kcnq1*遺伝子のインプリンティング機構における影響を検討するために、父方変異マウス(PH)、母方変異マウス(MH)、野生型マウス(WT)に分けて解析した結果、PH群においてのみ有意な出生時の膵β細胞量の減少を認めた。*Kcnq1ot1*の発現量は、PH群においてのみ有意に低下しており、その結果、近傍遺伝子群の一つである細胞周期調節因子*Cdkn1c* (p57)のプロモーター領域のヒストンメチル化が変化して、p57の発現量が亢進する結果、膵β細胞量減少をもたらすものと考えられた。私たちはこれまでに、細胞周期調節因子p27が膵β細胞に蓄積することによって膵β細胞不全ならびに2型糖尿病を発症することを報告しているが(Nat Med, 2005)、p57においても同様の役割があるものと考えられる。

また私たちは、高脂肪食負荷により、転写因子C/EBPβが膵島に蓄積し、分子シャペロンGRP78の発現を低下させることで小胞体ストレスに対し脆弱となり、膵β細胞量減少を来すことを報告している (J Clin Invest, 2010)。

*Kcnq1ot1*の発現が低下するような状態では、*Cdkn1c*のプロモーター領域がユークロマチン化していると考えられ、このような状態で過食や肥満を呈すると、蓄積したC/EBPβが*Cdkn1c*のプロモーター領域に結合しやすくなることで、*Cdkn1c*の発現がさらに亢進し、膵β細胞量のさらなる減少を引き起こすことを見いだした。これらのことから、遺伝素因がある状態で高脂肪食や過食といった生活習慣が加わることが2型糖尿病の発症要因につながる事が明らかとなった。

発生・分化におけるエピジェネティクス

大阪大学大学院・生命機能研究科・仲野 徹

<はじめに>

エピジェネティクスとは、ヒストン修飾と DNA メチル化による遺伝子発現制御機構である。すべての生命現象に関わっているともいえるエピジェネティクスであるが、多細胞体の発生・分化においても極めて重要な役割を果たしている。なかでも、受精後すぐの初期発生、および、生殖細胞の発生においては、ゲノム全体における DNA の脱メチル化から *de novo* DNA メチル化が生じるという、非常にダイナミックなプロセスをとる。我々の研究室では、初期胚における DNA 脱メチル化の制御機構、および、胎生期雄性生殖細胞におけるレトロトランスポゾン遺伝子の *de novo* DNA メチル化についての研究をおこなってきた。

<Stella と初期胚の DNA 脱メチル化>

Stella は、未分化な生殖細胞である始原生殖細胞、卵細胞、および初期胚において発現するタンパクである。Stella 遺伝子破壊マウスは、メスのみが不妊になる。その異常が生じるタイミングを詳細に解析すると、受精直後において機能することが明らかになった。

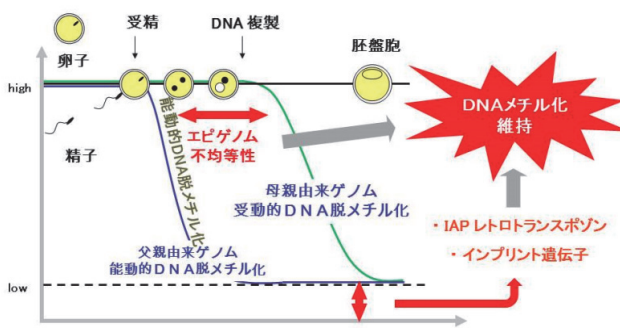


図1：エピジェネティック不均等性と Stella の機能

受精後すぐにゲノム全体に DNA 脱メチル化が生じるが、父親に由来する雄性ゲノムと母親に由来する雌性ゲノムでは、そのタイミングに違いがある。雄性ゲノムは DNA

複製が開始される前に能動的な DNA 脱メチル化が生じるのに対して、雌性ゲノムは DNA 複製に依存した受動的なメカニズムによって脱メチルが生じる。そして、この違いはエピジェネティック不均等性と呼ばれている。

Stella を欠損する初期胚では、エピジェネティック不均等性が崩れて、雌性ゲノムも能動的 DNA 脱メチル化機構によって脱メチル化を受けることが明らかになった。また、同じく Stella 欠損胚では、維持されるはずの、インプリンティング遺伝子や IAP レトロトランスポゾン遺伝子の DNA メチル化も消失することが明らかになった。これらのことから、Stella は初期胚において DNA メチル化を保護する機能を有することがわかった¹ (図 1)。

精子と卵子の形成過程の違いから、初期胚において、雄性クロマチンと雌性クロマチンで、一部のヒストン修飾が異なっている。抑制的なヒストン修飾である H3K9me2 (ヒスト

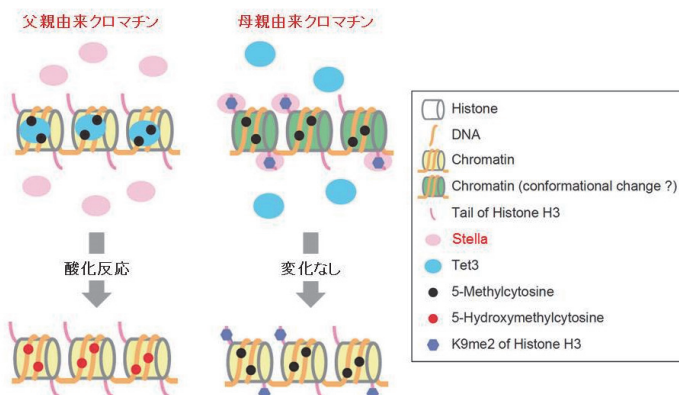


図 2 : H3K9me2 を介した Stella による DNA メチル化保護の分子機構

ン H3 の 9 番目のリジンのジメチル化) もそのひとつであり、雌性クロマチンにおいてのみ認められる。種々の解析から、Stella は H3K9me2 を含むクロマチンに結合して、能動的 DNA 脱メチル化から DNA メチル化を保護する機能を発揮することを明らかにした² (図 2)。

＜胎生期雄性生殖細胞における *de novo* DNA メチル化と piRNA＞

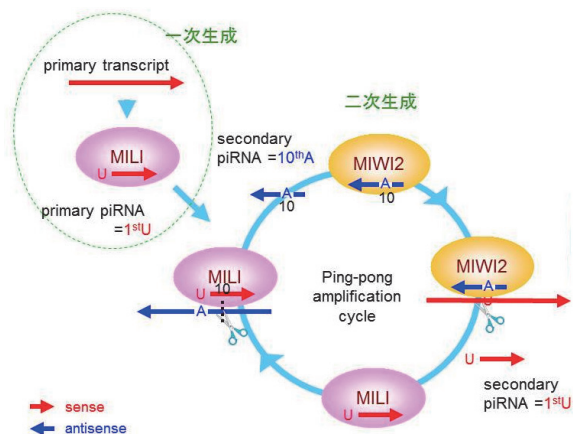


図 3 : piRNA 生成における MILI と MIWI2 の機能

piRNA (Piwi interacting RNA) は生殖細胞特異的に発現する非コード小分子 RNA であり、胎生期の雄性生殖細胞における piRNA は、その大部分がレトロトランスポゾンの塩基配列に対応するものであることがわかっている。そして、その段階における piRNA の産生には、

三つあるマウス PIWI ファミリータンパクのうち MILI と MIWI2 が関与している（図 3）。我々は、MILI と MIWI2 の機能を中心に、piRNA の分子機能についての解析をおこなってきた。

MILI あるいは MIWI2 を欠損するマウスでは、パキテン期において生殖細胞がアポトーシスで死滅するため不妊になる³。また、これらのマウスでは、IAP や Line-1 といったレトロトランスポゾンの発現が更新すること、その発現更新はレトロトランスポゾン遺伝子の制御領域の DNA メチル化低下によること、そして、その DNA メチル化の低下は *de novo* DNA メチル化の異常によること、などを明らかにした⁴。

我々や他の研究グループの結果から、胎生期の雄性生殖細胞においては、piRNA 依存的にレトロトランスポゾン遺伝子に DNA メチル化が生じ、その結果、発現が抑制されると考えられている。また、図 3 にあるように、piRNA の産生には、センス鎖とアンチセンス鎖の RNA が必要であることもわかっている。これらの成果から、レトロトランスポゾン以外の遺伝子であっても、胎生期の雄性生殖細胞においてセンス鎖とアンチセンス鎖が存在していれば、piRNA 依存的な DNA メチル化を誘導できるのではないかと考え、トランス

ジェニックマウスを利用した実験をおこなった。

その結果、EGFP トランスジーンを用いたモデル実験においても、胎生期雄性生殖細胞において発現し、*de novo* DNA メチル化に関与する内在性の遺伝子である DNMT3L においても、piRNA の産生および、それ

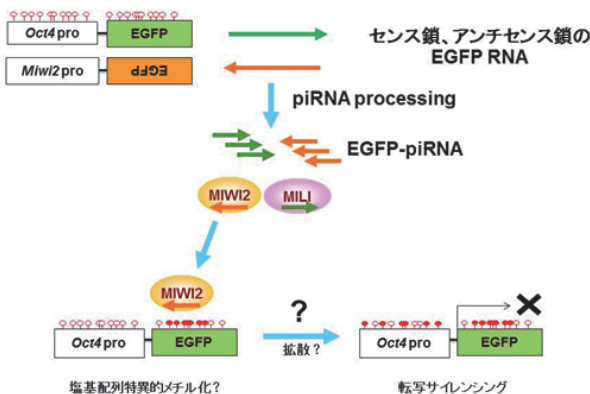


図 4 : piRNA 生成における MILI と MIWI2 の機能

に依存する遺伝子発現の抑制を誘導することができた（図 4）⁵。この方法論は、いま話題の、世代を超えたエピジェネティック遺伝の解析に利用できるのではないかと期待し、実験を続けている。

<おわりに>

DNA メチル化は多くの生命現象において極めて重要であり、その制御機構は非常に複雑である。ここに紹介した、初期胚と生殖細胞における DNA メチル化のダイナミクスだけでも、まだまだわからないことが多く残されている。

<参考文献>

1. Nakamura T, Arai Y, Umehara H, Masuhara M, Kimura T, Taniguchi H, Sekimoto T, Ikawa M, Yoneda Y, Okabe M, Tanaka S, Shiota K, Nakano T
PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis
Nature Cell Biol, 9: 64-71, 2007
2. Nakamura T, Liu YU, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, Tachibana M, Ogura A, Shinkai Y, Nakano T. .
PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5MeC to 5HmC in early embryos
Nature, 486: 415-9, 2012
3. Kuramochi-Miyagawa K, Kimura T, Ijiri T, Asada N, Fujita Y, Ikawa M, Isobe T, Iwai N, Okabe M, Deng W, Lin H, Matsuda Y, Nakano T
mili, a mammalian member of *piwi* family gene, is essential for spermatogenesis
Development, 131:839-849, 2004
4. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri T, Hata K, Li E, Matsuda Y, Kimura T, Okabe M, Sakaki Y, Sasaki H, Nakano T
DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes.
Genes Dev, 22:918-30, 2008
5. Ito D, Shiromoto Y, Shin-ya Y, Ishii C, Nishimura T, Ogonuki N, Ogura A, Kuramochi-Miyagawa, Nakano T.
Induction of DNA methylation by artificial piRNA production in male germ cells.
Current Biol, 25: 901-906, 2015

創薬の隘路「Phase 2 Attrition」の克服に向けて－実験動物学の進展への期待

樽林 陽一

国立研究開発法人 日本医療研究開発機構

医薬品産業の研究開発に関する調査によれば、新薬開発における生産性は低下する一途であり、その最も重要なファクターはPhase 2における淘汰（Phase 2 attrition）の増加であることが指摘されている。Phase 2 attritionは、研究仮説の検証（Proof of Concept : POC）における失敗を意味するものであるが、その原因として最も頻度の高かった事象は、有効性を証明することができなかったというものであることが明らかにされている。Phase 2 attritionの多くは、探索プロジェクトの開始にあたってターゲットの選択を誤った、あるいは臨床開発への移行にあたって開発候補品の選択を誤ったことによって引き起こされたものであることを示唆している。こういった傾向は、最近の公表データでも変わっておらず、Phase 2 attritionが依然として世界的な問題となっていることがわかる。

Phase 2 attritionが増加した原因については、「創薬が容易なターゲットの枯渇」から「研究開発プロセス全般にわたるミスオペレーション・ミスマネージメント」といった問題に至るまで、多岐にわたる要因が議論されている。また、製薬産業界を中心としてPhase 2 attritionを改善することを目的とした様々な方策が模索されてきたが、最近では、新しい疾患バイオマーカーの探索や病態モデルの開拓など、臨床効果の予測性に優れた前臨床データを臨床研究者に提供することを目指した一連の取り組みが注目されている。このようなアプローチはtranslational medicineと呼ばれ、基礎研究と臨床研究が融合した研究領域として重視されている。今回は、Phase 2 attritionを中心として新薬の研究開発に関わる生産性の推移についてまとめて解説し、医薬品産業の継続的な発展を支える切り札として期待されているtranslational medicineが将来向かうべき方向について、実験動物学への期待という視点から述べてみたい。

関西実験動物研究会だより

<その他>

関西実験動物研究会だより

関西実験動物研究会会報第 36 号に掲載した第 122 回研究会以降、以下の研究会が開催された。

1) 第 123 回研究会 (平成 26 年 9 月 27 日 (土)、大阪大学 銀杏会館)

<講演会> テーマ：循環器研究の新たな展開

1. ゼブラフィッシュを用いた心臓・血管形成のイメージングによる研究

望月 直樹 (国立循環器病研究センター研究所 細胞生物学部)

2. SPring-8 放射光を用いた小動物心臓血管機能の in vivo イメージング

白井 幹康 (国立循環器病研究センター研究所 心臓生理機能部)

<トピックス>

名古屋議定書についての詳細説明

中川原 秀樹 (文部科学省 研究振興局 ライフサイエンス課)

鈴木 睦昭 (国立遺伝学研究所 知的財産室 ABS 学術対策チーム)

<維持会員ニュース>

1. PCR を活用した微生物モニタリングの提案

日本チャールス・リバー株式会社

2. 新しい洗浄器の提案 “減圧沸騰式洗浄器 RQ 型”

三浦工業株式会社

2) 第 124 回研究会 (平成 26 年 12 月 5 日 (金)、京都大学 楽友会館)

<特別講演>

1. 非コードRNAによる遺伝子発現制御機構を利用した遺伝子組換えアデノウイルスの開発

櫻井 文教 (大阪大学大学院薬学研究科 分子生物学分野)

2. サルレトロウイルスによるニホンザル血小板減少症

岡本 宗裕 (京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター)

<会員の発表> 14 題

3) 第 125 回研究会 (平成 27 年 3 月 6 日 (金)、京都大学 楽友会館)

<講演会> テーマ：関西実験動物研究会へようこそ

1. 幹細胞の多能性維持と分化のメカニズム

依馬 正次 (滋賀医科大学 動物生命科学研究センター 幹細胞・ヒト疾患モデル研究分野、
科学技術振興機構・さががけ)

2. 糖鎖は様々な生命現象の鍵となっている

浅野 雅秀 (京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設)

<維持会員ニュース>

実験動物としての豚の位置付けおよびハンドリング (ゲッチングミニブタ)

オリエンタル酵母工業株式会社 伊那 MP 生産センター (林 直木)

4) 第 126 回研究会（平成 27 年 6 月 12 日（金）、神戸大学医学部会館 シスメックスホール）

＜講演会＞ テーマ：エピジェネティクス研究の最前線

1. 膵β細胞機能のエピゲノム制御

木戸 良明（神戸大学大学院保健学研究科 病態解析学領域 分析医科学分野）

2. 発生分化におけるエピジェネティック制御

仲野 徹（大阪大学大学院 生命機能研究科・時空生物学／医学系研究科・病理学
科学技術振興機構・CREST）

＜トピックス＞

創薬の隘路「Phase 2 Attrition」の克服に向けて—実験動物学の進展への期待

樽林 陽一（国立研究開発法人 日本医療研究開発機構）

＜維持会員ニュース＞

行動実験用の防音シールド室について

小原医科産業株式会社（小原 喜一）

《幹事会、評議員会、総会の議事概要》

幹事会の概要

日時：平成 27 年 2 月 9 日（水）、午後 3 時～5 時

場所：京都府立医科大学 基礎 3 階会議室

出席者：喜多、桑村、庫本、横井、岡田、久保、近藤、佐加良、塩谷、田島、中井、中村、松田、
山本

欠席者：宮嶋、伊川、池田、黒澤、塩見、坪田、真下、山添

議事：

1. 平成 26 年度事業報告及び決算報告

- ・平成 26 年度の事業報告及び決算報告について確認した。参加費（非会員）の費目を会費とは別建てにすること、収支決算書と繰越決算書の整合性を確認することとした。

2. 第 11 期（平成 26～28 年度）評議員及び幹事の異動

- ・喜多会長より、黒澤幹事が平成 26 年度をもって幹事および評議員を辞退すること、浅野雅秀氏（京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設）が平成 27 年度から評議員および幹事となることについて説明があった。
- ・喜多会長より、前会長の芹川忠夫氏が名誉会員に推薦され、全会一致で承認された。

3. 平成 27 年度事業計画（案）

- ・平成 27 年度の事業計画（案）について確認した。第 128 回および第 129 回の日程について確認することとした。

4. 平成 27 年度予算（案）

- ・平成 27 年度の予算（案）について確認した。参加費（非会員）の費目を会費とは別建てにすること、機関誌発行経費の費目および予算の修正を行うこととした。

5. メーリングリスト利用に関する申し合わせ

- ・メーリングリスト利用に関する申し合わせについて確認した。第 33 回評議員会および第 32 回総会にて説明することとした。

6. その他

- ・日本生化学会近畿支部例会の協賛について、喜多会長より説明があり、全会一致で承認された。
- ・研究会会報別刷について、必要性を協議した結果、廃止することとした。
- ・会費未納入者について、事務局から督促を行うとともに関係者からの依頼をお願いすることとした。

日時：平成 27 年 11 月 6 日（金）、午後 3 時～5 時

場所：京都府立医科大学実験動物センター 会議室

出席者：喜多、桑村、庫本、横井、浅野、近藤、田島、坪田、中井、真下、山添、山本

欠席者：宮嶋、伊川、池田、岡田、佐加良、久保、塩見、塩谷、中村、松田

議事：

1. 第 128 回研究会（平成 27 年 12 月 4 日）について

- ・一般演題 10 題と特別講演 2 題の時間割および座長を決定した。

2. 第 129 回研究会（平成 28 年 3 月 4 日）について（担当幹事：庫本、真下、久保、山本）

- ・庫本幹事から研究会企画の進捗状況について説明があった。

3. 来年度の予定について

- ・各回の担当幹事を決定した。9 月の大阪は今年度と同様に土曜日開催とすることとした。

第 130 回（平成 28 年 6 月 金曜日）神戸、担当：桑村、佐加良、塩見、坪田、横井

第 131 回（平成 28 年 9 月 土曜日）大阪、担当：伊川、塩谷、田島、真下、松田

第 132 回（平成 28 年 12 月 9 日 金曜予定）京都、担当：岡田、喜多、近藤、中井、山
添

第 133 回（平成 29 年 3 月 金曜日）京都、担当：浅野、久保、庫本、中村、山本

4. その他

- ・学部学生および大学院生の研究会参加費について検討した結果、研究会主催大学の所属に限らず学部学生および大学院生の参加費を無料とすることとした。

- ・NPO 法人 関西 BS 交流会 齋藤學先生御執筆本「実験小動物の病気と病原体の検査法」の紹介について検討した結果、第 128 回研究会（平成 27 年 12 月 4 日）の際に受付横に展示することとした。
- ・本会と日本実験動物技術者協会との合同開催の研究会について今後検討することとした。
- ・本会の土曜日開催の是非について会員にアンケートを行うこととした。

評議員会の概要

第 33 回関西実験動物研究会評議員会

日時：平成 27 年 3 月 6 日（金）12:00～13:00

場所：京都大学 楽友会館 2 階講演室

出席：44 名

浅野雅秀、阿部敏男、今井良悦、上田正次、海野 隆、大野民生、岡田利也、岡本宗裕、沖本一夫、加藤啓子、金子武人、喜多正和、北田一博、久保 薫、倉林 譲、庫本高志、黒木宏二、桑村 充、小池智也、近藤友宏、近藤 靖、佐藤 浩、塩谷恭子、鈴木 昇、芹川忠夫、高木貞明、高島俊行、竹之下誠、田島 優、千葉 薫、坪田裕司、中井伸子、中村紳一郎、橋本正晴、平川公昭、平沢 勉、星 信彦、増岡通夫、松田潤一郎、宮嶋宏彰、森島英喜、山中 久、山本好男、横井伯英

議事：

1. 平成 26 年度事業報告及び決算報告

- ・桑村幹事より、平成 26 年度の事業報告があった。
- ・山本幹事より、会報第 36 号の発行について報告があった。
- ・庫本幹事より、平成 26 年度収支決算書について報告があった。
- ・海野評議員より、会員数について質問があった。
- ・喜多会長より、会員数について説明があった。
- ・橋本監事より、繰越決算書の監査の結果について報告があった。
- ・平成 26 年度収支決算報告が全会一致で承認された。

2. 第 11 期（平成 26～28 年度）評議員及び幹事の異動

- ・喜多会長より、第 11 期（平成 26～28 年度）評議員及び幹事の異動について説明があった。
- ・喜多会長より、芹川評議員を名誉会員として推薦し、幹事会での議決を受け、本人の承諾を得たことの報告があった。
- ・第 11 期（平成 26～28 年度）評議員及び幹事の異動について全会一致で承認された。

3. 平成 27 年度事業計画（案）

- ・桑村幹事より、平成 27 年度の事業計画（案）について説明があり、全会一致で承認された。

4. 平成 27 年度予算（案）

- ・庫本幹事より、平成 27 年度予算（案）について説明があり、全会一致で承認された。

5. メーリングリスト利用に関する申し合わせについて

- ・喜多会長より、メーリングリスト利用に関する申し合わせについて説明があり、全会一致で承認された。

6. その他

- ・喜多会長より、会費未納入者について報告があった。
- ・喜多会長より、第 62 回日本実験動物学会総会（平成 27 年 5 月 28 日～30 日 京都テルサ）の案内があった。

総会の概要

第 32 回関西実験動物研究会総会

日時：平成 27 年 3 月 6 日（金）13:10～14:00

場所：京都大学 楽友会館 2 階講演室

司会の久保幹事より、総会の開催にあたり議長の推薦が求められた。
塩谷幹事が議長に選出された。

議事

1. 平成 26 年度事業報告及び決算報告

- ・桑村幹事より、平成 26 年度の事業報告があった。
- ・山本幹事より、会報第 36 号の発行について報告があった。
- ・庫本幹事より、平成 26 年度収支決算書について報告があった。
- ・橋本監事より、繰越決算書の監査の結果について報告があった。
- ・平成 26 年度収支決算報告が全会一致で承認された。

2. 第 11 期（平成 26～28 年度）評議員及び幹事の異動

- ・喜多会長より、第 11 期（平成 26～28 年度）評議員及び幹事の異動について説明があった。
- ・喜多会長より、芹川評議員を名誉会員として推薦し、幹事会での議決を受け、本人の承諾を

得たことの報告があった。

- ・第 11 期（平成 26～28 年度）評議員及び幹事の異動について全会一致で承認された。

3. 平成 27 年度事業計画（案）

- ・桑村幹事より、平成 27 年度の事業計画（案）について説明があり、全会一致で承認された。

4. 平成 27 年度予算（案）

- ・庫本幹事より、平成 27 年度予算（案）について説明があり、全会一致で承認された。

5. メーリングリスト利用に関する申し合わせについて

- ・喜多会長より、メーリングリスト利用に関する申し合わせについて説明があり、全会一致で承認された。

6. その他

- ・喜多会長より、第 62 回日本実験動物学会総会（平成 27 年 5 月 28 日～30 日 京都テルサ）の案内があった。

関西実験動物研究会 維持会員名簿(平成27年度)

(あいうえお順)

アステラスリサーチテクノロジー株式会社
EPS益新株式会社
小原医科産業株式会社
オリエンタル酵母工業株式会社
株式会社アイセイ
株式会社イナリサーチ 大阪支所
株式会社イブバイオサイエンス
株式会社エイチ・エス・ピー
株式会社エーテック
株式会社大塚製薬工場 研究開発センター
株式会社オリエンタル・バイオサービス
株式会社ケー・エー・シー
株式会社新日本科学
株式会社精研
株式会社特殊免疫研究所
株式会社夏目製作所
株式会社日本医科学動物資材研究所
株式会社ビオスタ
株式会社美濃ラボ
株式会社レナテック
北山ラベス株式会社
財団法人動物繁殖研究所
三協ラボサービス株式会社
清水実験材料株式会社
白井松器械株式会社
大日本住友製薬株式会社
高塚ライフサイエンス株式会社
日精バイリス株式会社
日本エスエルシー株式会社
日本クレア株式会社
日本新薬株式会社
日本チャールス・リバー株式会社
ハムリー株式会社
株式会社ビッグバン
丸石製薬株式会社株式会社
三浦工業株式会社
有限会社キョウエー
有限会社メディア

関西実験動物研究会 評議員名簿(平成26-28年度)

氏 名	所 属
浅野 雅秀	京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
阿部 敏男	前 株式会社武田ラビックス光事業所
伊川 正人	大阪大学微生物病研究所 附属感染動物実験施設
池田 克己	武庫川女子大学 薬学部
池田 卓也	
今井 良悦	武田薬品工業株式会社 湘南研究所
上田 正次	株式会社特殊免疫研究所 宇都宮事業所
海野 隆	株式会社JCLバイオアッセイ
大野 民生	名古屋大学大学院医学系研究科 附属医学教育研究支援センター
岡田 利也	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 実験動物学
岡本 宗裕	京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター
沖本 一夫	株式会社新日本科学 大阪病理センター
春日 久男	株式会社武田ラビックス
加藤 啓子	京都産業大学総合生命科学部 動物生命医科学科
金子 武人	京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
喜多 正和	京都府立医科大学大学院医学研究科 実験動物センター
北田 一博	北海道大学大学院理学研究院
久保 薫	奈良県立医科大学先端医学研究機構 動物実験施設
倉林 譲	岡山大学医学部
庫本 高志	京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
黒木 宏二	大日本住友製薬株式会社
桑村 充	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 獣医病理学
小池 智也	神戸大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
小林 欣滋	株式会社新日本科学 安全性研究所病理研究部
近藤 玄	京都大学再生医科学研究所 附属再生動物実験施設
近藤 友宏	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 実験動物学
近藤 靖	田辺三菱製薬株式会社
佐加良 英治	兵庫医科大学 動物実験施設
佐藤 浩	自然科学研究機構 生理学研究所
塩見 雅志	神戸大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
塩谷 恭子	国立研究開発法人国立循環器病研究センター研究所 動物実験管理室
鈴木 昇	三重大学生命科学研究支援センター 機能ゲノミクス分野
芹川 忠夫	京都疾患モデル研究所
高木 貞明	日本エスエルシー株式会社
高島 俊行	ハムリー株式会社国際事業部 大阪出張所
竹田 潤二	大阪大学大学院医学系研究科
竹之下 誠	株式会社イブバイオサイエンス
田島 優	大阪大学大学院医学系研究科 実験動物医学教室
千葉 薫	株式会社ITクリエイティブサービス高槻事業所 動物管理課
坪田 裕司	大阪府崎リハビリテーション大学 リハビリテーション学部
中井 伸子	日本新薬株式会社 研開企画統括部研開業務部 研開管理課
中村 紳一朗	滋賀医科大学 動物生命科学研究センター
橋本 正晴	株式会社ケー・エー・シー
原田 正史	大阪市立大学大学院医学研究科 動物実験施設
平川 公昭	株式会社新日本科学 大阪病理センター
平沢 勉	
星 信彦	神戸大学大学院農学研究科 応用動物学講座
真下 知士	大阪大学大学院医学系研究科 実験動物医学教室
増岡 通夫	株式会社トランスジェニック
松田 潤一郎	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 疾患モデル小動物研究室
宮下 信泉	香川大学総合生命科学研究センター 動物実験部門
宮脇 宏彰	株式会社ケー・エー・シー
宮嶋 正康	和歌山県立医科大学 実験動物施設
森島 英喜	武田薬品工業株式会社 湘南研究所
山添 裕之	住友化学株式会社 生物環境科学研究所
山田 宜永	新潟大学農学部農業生産科学科 動物遺伝学
山中 久	株式会社イナリサーチ
山本 博	富山大学医学部ウイルス学教室
山本 好男	三重大学社会連携研究センター 伊賀研究拠点
横井 伯英	神戸大学大学院医学研究科 分子代謝医学

関西実験動物研究会 会長・幹事・監事名簿

(平成26～28年度、平成27年10月現在)

	氏 名	所 属
会 長	喜多 正和	京都府立医科大学大学院医学研究科 実験動物センター
庶 務 ・ 会 計	庫本 高志	京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
	宮嶋 正康	和歌山県立医科大学 動物実験施設
	横井 伯英	神戸大学大学院医学研究科 分子代謝医学
集 会 (幹 事 長)	桑村 充	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 獣医病理学
	浅野 雅秀	京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
	伊川 正人	大阪大学微生物病研究所 附属感染動物実験施設
	池田 卓也	
	岡田 利也	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 実験動物学
	久保 薫	奈良県立医科大学先端医学研究機構 動物実験施設
	近藤 玄	京都大学再生医科学研究所 附属再生動物実験施設
	佐加良 英治	兵庫医科大学 動物実験施設
	塩見 雅志	神戸大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
	塩谷 恭子	国立研究開発法人国立循環器病研究センター研究所 動物実験管理室
	田島 優	大阪大学大学院医学系研究科 実験動物医学教室
	坪田 裕司	大阪河崎リハビリテーション大学 リハビリテーション学部
	真下 知士	大阪大学大学院医学系研究科 実験動物医学教室
	松田 潤一郎	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 疾患モデル小動物研究室
	山添 裕之	住友化学株式会社 生物環境科学研究所
編 集 (委 員 長)	山本 好男	三重大学社会連携研究センター 伊賀研究拠点
	中井 伸子	日本新薬株式会社 研開企画統括部研開業務部 研開管理課
	中村 紳一朗	滋賀医科大学 動物生命科学研究センター
監 事	清水 英男	清水実験材料株式会社
	橋本 正晴	株式会社ケー・エー・シー

平成26年度 収支決算書

費目		平成26年度決算	平成26年度予算	
		金額(円)	金額(円)	対比(円)
繰越金		1,652,423	1,652,423	0
収入の部	会費収入	1,703,000	2,100,000	△ 397,000
	普通会员 (口)	360,000 (120)	600,000 (200)	△ 240,000
	普通会员前受金 (口)	3,000 (1)	0 (0)	3,000
	評議員会員 (口)	285,000 (57)	300,000 (60)	△ 15,000
	評議員会員前受金 (口)	5,000 (1)	0 (0)	5,000
	維持会員 (団体)	1,020,000 (34)	1,200,000 (40)	△ 180,000
	維持会員前受金 (団体)	30,000 (1)	0 (0)	30,000
	当日参加 (口)	154,000 (77)	160,000 (80)	△ 6,000
	会報代金	0	1,500	△ 1,500
	預金利息	101	100	1
収入計		1,857,101	2,261,600	△ 404,499
収入総計		3,509,524	3,914,023	△ 404,499
支出の部	事務局経費	528,958	560,000	△ 31,042
	人件費	270,000	350,000	△ 80,000
	通信費	107,904	120,000	△ 12,096
	事務費	68,241	40,000	28,241
	印刷費	82,813	50,000	32,813
	機関誌発行経費	600,364	580,000	20,364
	編集費	0	30,000	△ 30,000
	印刷費(PDF化を含む)	600,364	550,000	50,364
	集会経費	636,048	1,021,600	△ 385,552
	会場費	80,678	120,000	△ 39,322
	講演者招待費	317,060	551,600	△ 234,540
	幹事会・評議員会	208,310	300,000	△ 91,690
	アルバイト費	30,000	50,000	△ 20,000
	予備費	0	100,000	△ 100,000
	支出計	1,765,370	2,261,600	△ 496,230
繰越剰余金		1,744,154	1,652,423	91,731
支出総計		3,509,524	3,914,023	△ 404,499

<参考>

年度内収支 (収入 - 支出) = (1,857,101 - 1,765,370) = 91,731 円

平成27年度 関西実験動物研究会予算書

(普通会員費:3,000 円)

(評議員会員費:5,000 円)

(維持会員費:30,000 円)

(当日参加費:2,000 円)

費目		平成27年度予算(案)	平成26年度決算	平成26年度予算
繰越金		1,744,154	1,652,423	1,652,423
収入の部	会費収入	1,740,000	1,703,000	2,100,000
	普通会員 (口)	390,000 (130)	360,000 (120)	600,000 (200)
	普通会員前受金 (口)	0 (0)	3,000 (1)	0 (0)
	評議員会員 (口)	300,000 (60)	285,000 (57)	300,000 (60)
	評議員会員前受金 (口)	0 (0)	5,000 (1)	0 (0)
	維持会員 (団体)	1,050,000 (35)	1,020,000 (34)	1,200,000 (40)
	維持会員前受金 (団体)	0 (0)	30,000 (1)	0 (0)
	当日参加 (口)	160,000 (80)	154,000 (77)	160,000 (80)
	会報代金	0	0	1,500
預金利息		100	101	100
収入計		1,900,100	1,857,101	2,261,600
収入総計		3,644,254	3,509,524	3,914,023
支出の部	事務局経費	590,000	528,958	560,000
	人件費	350,000	270,000	350,000
	通信費	110,000	107,904	120,000
	事務費	50,000	68,241	40,000
	印刷費	80,000	82,813	50,000
	機関誌発行経費	630,000	600,364	580,000
	編集費	30,000	0	30,000
	印刷費(PDF化を含む)	600,000	600,364	550,000
	集会経費	630,100	636,048	1,021,600
	会場費	100,000	80,678	120,000
	講演者招待費	300,100	317,060	551,600
	幹事会・評議員会	200,000	208,310	300,000
	アルバイト費	30,000	30,000	50,000
	予備費	50,000	0	100,000
支出計		1,900,100	1,765,370	2,261,600
繰越剰余金		1,744,154	1,744,154	1,652,423
支出総計		3,644,254	3,509,524	3,914,023

関西実験動物研究会会則

I. 総則

- (1) 本会は関西実験動物研究会 (Kansai Laboratory Animal Research Association) という。
- (2) 本会は関西地区において実験動物学ならびに関連諸科学の発達を図る事を目的とする。
- (3) 本会はその目的を達成するために以下の諸事業を行なう。
 - ① 学術集会の開催
 - ② 会誌の発行
 - ③ 関係諸機関・諸学会との情報交換・連絡
 - ④ 会員相互の連絡
 - ⑤ その他必要と認められる事業

II. 会員

- (4) 本会の会員は個人からなる普通会員と法人及びこれに準ずる団体からなる維持会員からなる。
- (5) 会員は本会の趣旨に賛同し、本会を維持するために会費を支払う。
- (6) 会費は前納とし、普通会員は年額 3,000 円、評議員は 5,000 円、維持会員は 30,000 円とする。
- (7) 会員は会誌の配付を受ける。
- (8) 本会に名誉会員をおくことができる。

III. 役員

- (9) 本会の役員は、会長 1 名、評議員若干名及び 監事 2 名とする。
- (10) 会長は評議員の互選によって選出する。
- (11) 評議員は普通会員 3 名以上の推薦によって選出し、総会の承認を受ける。
- (12) 監事は評議員の推薦によって選出し、会長が委嘱する。
- (13) 会長は本会を代表し、会務を統理する。会長に支障があるときは評議員の互選により 1 名を選出し、会長の職務を代行する。
- (14) 会長は評議員会を召集し、その議長となる。
- (15) 評議員は評議員会を組織し、本会に関する重要な事項を審議・決定する。また、評議員の互選により選ばれた幹事は、幹事会を組織し、会長の補佐及び庶務、会計、集会、会誌発行などの会務を実行する。
- (16) 監事は会計を監査する。
- (17) 役員の任期は 3 年とし、再任を妨げない。

IV. 総会

- (18) 会長は毎年 1 回普通会員で構成される総会を召集し、会務の必要事項を報告し、承認を受ける。

V. 会計

- (19) 本会の事業年度は毎年 1 月 1 日より 12 月 31 日までとする。
- (20) 本会の経費は会費、寄付金その他の収入をもってあてる。

VI. 附則

- (21) 本会則は昭和 59 年 3 月 16 日より施行する。
- (22) 本会則の改正は評議員会の議決を経て総会の承認を受ける。
- (23) 本会の事務局は京都市上京区河原町通広小路上る梶井町 465、京都府立医科大学実験動物センターに置く。

VII. 附則

- (24) 本会則は平成 2 年 3 月 9 日より施行し、平成 2 年 1 月 1 日より適用する。
- (25) 本会則は平成 8 年 3 月 9 日より施行し、平成 8 年 1 月 1 日より適用する。
- (26) 本会則は平成 14 年 3 月 8 日より施行し、平成 14 年 1 月 1 日より適用する。
- (27) 本会則は平成 25 年 3 月 1 日より施行し、平成 25 年 4 月 1 日より適用する。
- (28) 本会則は平成 26 年 3 月 7 日より施行し、平成 26 年 4 月 1 日より適用する。

平成27年12月15日 印 刷
平成27年12月15日 発 行

編集兼発行者 喜 多 正 和
発 行 所 関西実験動物研究会
〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上る梶井町465
京都府立医科大学 実験動物センター
印 刷 所 プラスエー株式会社
〒525-0047 滋賀県草津市追分5丁目4番11号

関西実験動物研究会会報 第37号

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成27年12月

第123回研究会：循環器研究の新たな展開

福原 茂朋：ゼブラフィッシュを用いた心臓・血管形成のイメージングによる研究 1

白井 幹康：SPRING-8放射光を用いた小動物心血管機能のin vivoイメージング 9

第124回研究会

＜特別講演＞

櫻井 文教：非コードRNAによる遺伝子発現制御機構を利用した遺伝子組換えアデノウイルスの開発 11

岡本 宗裕：サルレトロウイルスによるニホンザル血小板減少症 18

＜一般講演＞

会員の発表 14題 19

第125回研究会：関西実験動物研究会へようこそ

依馬 正次：幹細胞の多能性維持と分化の分子機構研究 35

浅野 雅秀：糖鎖はさまざまな生命現象の鍵となっている 38

第126回研究会：エピジェネティクス研究の最前線

木戸 良明：臍β細胞機能のエピゲノム制御 43

仲野 徹：発生・分化におけるエピジェネティクス 44

＜トピックス＞

樽林 陽一：創薬の隘路「Phase 2 Attrition」の克服に向けて - 実験動物学の進展への期待 48

〈関西実験動物研究会だより〉 49

幹事会、評議員会、総会の議事概要 50 維持会員名簿 55

評議員名簿 56 会長、幹事、監事名簿 57

収支・予算 58 会則 60