

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

令和 7 年 12 月 43 号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

【第 155 回研究会 令和 6 年 8 月 30 日（金曜日） オンライン開催】

<維持会員ニュース>

オリエンタル酵母株式会社

<トピックス>

「カニクイザル生殖工学における基盤技術と応用」

中家 雅隆（滋賀医科大学動物生命 科学研究センター）----- 1

<講演> テーマ：遺伝子組換え動物が紐解く生命の始まり

1. 「発生工学技術を用いて見直す胎盤の役目と母子間相互作用」

磯谷 綾子（奈良先端科学技術大学院大学）----- 2

2. 「遺伝子組換え動物を用いた受精メカニズム解析と発生工学研究支援」

藤原 祥高（国立循環器病センター研究所）----- 8

【第 156 回研究会 令和 6 年 12 月 20 日（金曜日） 於：京都教育文化センター103 会議室】

<維持会員ニュース>

エフ・シー・アール・アンドバイオ株式会社

<会員の発表>

1. 優秀発表賞応募演題

S-1 「ラット食餌誘発性 NASH の肝線維化病態における CD44 の寄与」

宇野 絹子（京都大学 大学院農学研究科生体機構学分野）----- 13

S-2 「肺線維症モデルの確立と胎児肺由来細胞の移植の検討」

北室 皓平（奈良先端科学技術大学院大学）----- 14

S-3 「ガラクトース転移酵素遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを用いた IgA 腎症発症機構の解析」

馬場 智子（京都大学 大学院生命科学研究科）----- 15

S-4 「軸索変性を呈する Hspa8 遺伝子変異ラットの病態進行と軸索輸送に着目した中枢神経病変の解析」

関口 隆寛（大阪公立大学 獣医病理）----- 16

S-5 「異種間キメラの体内で作成したラット肺は呼吸機能を獲得する目前まで成熟している」

村田 大和（奈良先端科学技術大学院大学）----- 17

S-6 「肥満糖尿病モデル ZFDM ラットの糖尿病発症における性差の解明－臍島の形態および遺伝子発現に関する検討－」

伊藤 佑奈（京都大学 大学院農学研究科）----- 18

S-7 「Study on the role of glycosylation in embryogenesis」

	Shuang Li (Institute of Laboratory Animals, Graduate School of Medicine, Kyoto University) -----	19
S-8	「Optimizing CRISPR Precision in Mouse Embryos via MMEJ-Dominant Targeting」 Khanui Lkhagvadorj (Department of Stem Cells and Human Disease Models, Research Center for Animal Life Science, Shiga University of Medical Science) ---	20
S-9	「アデノ随伴ウイルスを用いた Trophectoderm 特異的遺伝子導入法の開発」 中川 達哉 (大阪大学 微生物病研究所) -----	21

2. 一般演題

G-1	「霊長類に特有な胎盤形成機構の解明」 武藤 真長 (滋賀医科大学 動物生命科学研究センター) -----	22
G-2	「ロルラチニブによる ROS1 活性阻害は雄マウスの生殖能力を可逆的に抑制する」 宮田 治彦 (大阪大学 微生物病研究所遺伝子機能解析分野) -----	23
G-3	「希少疾患 NGLY1 欠損症モデル動物の樹立と治療方法の開発」 朝比奈 誠 (Takeda-CiRA Joint Program (T-CiRA)) -----	24
G-4	「Filobacterium 属菌のゲノムはなぜコンパクトなのか？ 肺パスツレラのゲノムとの 比較から見えること」 池 郁生 (理化学研究所) -----	25

<トピックス>

	「ゲノム編集マウス作製技術の開発」 水野 聖哉 (筑波大学 生命科学動物資源センター) -----	26
--	--	----

<特別講演 2>

1.	「適正な動物実験の実施を目指して」 佐加良 英治 (兵庫医科大学 病態モデル研究センター) -----	28
2.	「遺伝子改変マウスが教えてくれたこと」 浅野 雅秀 (京都大学 大学院医学研究科附属動物実験施設) -----	36

【第 157 回研究会 令和 6 年 3 月 14 日 (金曜日) 於：京都教育文化センター302 会議室

<維持会員ニュース>

ハムリー株式会社 東京営業所
エーテック株式会社

<特別講演>

1.	「実験動物から脳の進化と生成 AI を考える」 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) -----	55
2.	「遺伝子改変マウスの解析から紐解く病原体センサーを介したサイトカイン産生誘導機構」 佐々木 泉 (和歌山県立医科大学 先端医学研究所) -----	65

3. 「三毛猫遺伝子探索プロジェクト～60年間の謎に挑む～」

佐々木 裕之（九州大学 高等研究院）----- 70

関西実験動物研究会 幹事・評議員・維持会員名簿----- 74

【第 155 回研究会 令和 6 年 8 月 30 日（金曜日） オンライン開催】

＜トピックス＞

「カニクイザル生殖工学における基盤技術と応用」

中家 雅隆（滋賀医科大学動物生命 科学研究センター）

＜講演＞ テーマ：遺伝子組換え動物が紐解く生命の始まり

1. 「発生工学技術を用いて見直す胎盤の役目と母子間相互作用」

磯谷 綾子（奈良先端科学技術大学院大学）

2. 「遺伝子組換え動物を用いた受精メカニズム解析と発生工学研究支援」

藤原 祥高（国立循環器病センター研究所）

カニクイザル生殖工学における基盤技術と応用

中家 雅隆

滋賀医科大学 動物生命科学研究センター

医学・生物学の基礎研究には、繁殖管理と遺伝子改変の容易さから小型げっ歯類が頻用されてきた。しかしながら、アルツハイマー病などの神経難病、インフルエンザなどの感染症、循環器疾患などについて、げっ歯類モデルではヒト病態を再現できない例が多数あった。さらに新型コロナウイルス感染症パンデミックの教訓から「ワクチン開発・生産体制強化戦略」が閣議決定されたことも相まって、ヒトに最も近いモデル動物として非ヒト霊長類実験動物であるカニクイザルの需要が急速に高まっている。一方で、国際情勢の悪化など社会的要因に起因し、カニクイザル輸入コストが大幅に増加している。このため、研究資源であるカニクイザルの「供給数の減少ならびに個体価格の急激な上昇」が生じており、我が国の前臨床研究活動が圧迫されている。

滋賀医科大学動物生命科学研究センターではこれらの社会的要求に答えるために、カニクイザルの人工繁殖及び、遺伝子改変による病態研究モデルザルの作出に力を注いできた。カニクイザルは高度な社会性を持ち、性周期が約 30 日、排卵痕が黄体として機能する完全周期である。その生物学的特性のため、家畜やマウスを中心として発展してきた生殖工学技術をそのままカニクイザル人工繁殖、モデルザル作出に応用することは難しい。今回、当センターで実施しているカニクイザル人工繁殖及び遺伝子改変モデルザル作出について、「成熟卵子を安定して得るための卵巣周期の制御」、「腹腔鏡を用いた低侵襲的な採卵技術」、「受精卵・胚の体外培養と胚移植」、「産仔獲得と人工保育、成獣までの育成」について、一連の流れを概説する貴重な機会を頂いた。本邦の前臨床研究を支えるカニクイザル研究資源の維持、開発についての理解への助けに繋がれば幸いである。

滋賀医科大学動物生命科学研究センターにおけるカニクイザル生殖工学技術は、これまでの地道なカニクイザル生殖生理についての知見の蓄積をもとに、支えられた技術体系である。その技術体系を基幹とし、最新の分子生物学手法を取り入れることで、近年報告したノックアウトモデルカニクイザル(Tsukiyama, T., Kobayashi, K., Nakaya, M. *et al.*, *Nat Commun.* 2019)や非ウイルス性トランスジェニックカニクイザル(Nakaya, M. *et al.*, *Nat Commun.* 2025)の作出が可能となった。カニクイザルにおける生殖工学は発展の途上にある。我々は現行技術を見直し更に発展させることで、国内の限られたサル研究資源を最大限活用できるように、より効率的なカニクイザル室内繁殖技術の確立を目指しております。

発生工学技術を用いて見直す胎盤の役目と母子間相互作用

磯谷 綾子

奈良先端科学技術大学院大学

胎盤は、母体の体内で育つ哺乳類において、誕生後には、その役割を終えます。しかし、受精胚が子宮内膜に着床した後、胚から胎児へと個体が発生していく過程で、胎児へ栄養供給したり、ガスを交換したりなど、なくてはならない器官でもあります。この胎盤は、着床前の胚盤胞期胚に、最外層を取り囲む栄養芽細胞へと、分化の運命が決定されます。一方、胚盤胞の内腔に局在する内部細胞塊は、胎児組織へと分化しますが、特定の培養条件下では、胚性幹細胞（ES 細胞）として、多能性を維持したまま増殖することができます。この ES 細胞は、単独では、個体として誕生することできませんが、胎盤機能を補完してやることで、個体として誕生する事が可能となります。

本稿では、発生工学技術を用いて、① 胎盤機能を補完する方法とその応用例、② 異種間における母子間相互作用の研究について紹介いたします。

① 胎盤機能を補完する方法とその応用例

発生工学技術を用いた胎盤機能を補完する方法として、1990 年代に開発された 2 細胞期胚の 2 つの割球を融合させ 4 倍体にした受精胚を用いる 4 倍体胚補完法が挙げられます。4 倍体胚は、胎盤系列細胞としては、機能を持って分化しますが、着床後に胎児組織になる細胞（エピブラスト）に分化した細胞はアポトーシスが誘導されます。このため、4 倍体胚は単独では発生を進めることはありませんが、ES 細胞を注入すると、ES 細胞由来の仔を誕生させることができます。この手法を 4 倍体胚補完法といい、遺伝子改変を行った ES 細胞を用いることで、F0 解析が可能となります（図 1）。

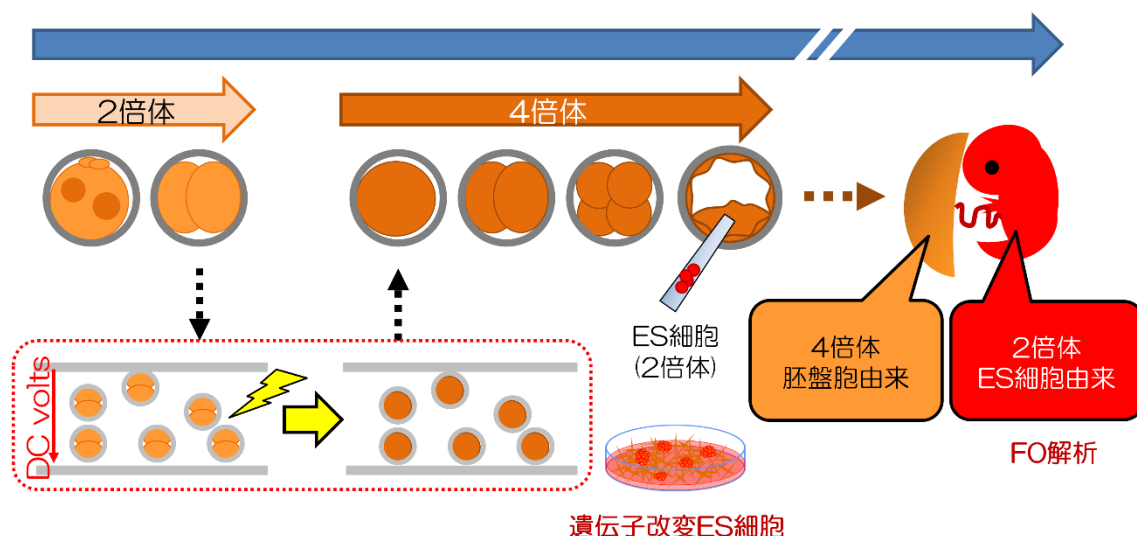


図 1 4 倍体胚補完法の概説

応用例 1: Y 染色体上に全身性発現 RFP トランスジーンを持つマウスモデルの作製

蛍光蛋白質による着床前の雌雄判別モデルは、性決定や性分化、性染色体の役割などを解明するのに有用なモデルです。これまでに緑色蛍光タンパク質 (GFP) を性染色体に挿入されたモデルはいくつか報告されていましたが、赤色蛍光タンパク質 (RFP) を性染色体に挿入したモデルは報告されていませんでした。そこで、蛍光の輝度が高く、全身性発現のマウスモデルも報告されていた RFP の tdTomato に注目し、tdTomato を全身で発現するトランスジーンを Y 染色体上に挿入したマウスモデル (Y-RFP マウス) を作製するために、Y-RFP ES 細胞を樹立し、4 倍体胚に注入して、Y-RFP マウスモデルを作製しました。しかし、残念ながら、この F0 の Y-RFP マウスは、誕生後 4 週齢までに致死となりました。これは、DsRed などのイソギンチャク由来の RFP は高発現すると細胞毒性をもつことが知られており、tdTomato でも同様の事が起こったと考察しました。続いて、細胞毒性を低減する目的で、ミトコンドリア以降シグナルをつけた tdTomato のトランスジーン(Y-mtRFP)をノックインした ES 細胞を用い、4 倍体胚補完法を行いました。F0 の Y-mtRFP マウスは、誕生後致死になることなく、野生型の雌マウスと交配させると、得られた受精卵は、着床前のステージで RFP のシグナルを持つ XY 型の雄の胚と、シグナルの無い XX 型の雌の胚を見分ける事ができるようになりました (参考文献 1, 図 2)。受精卵にゲノム編集を用いたノックインでは、Y-RFP マウスの誕生後致死の可能性を予測することは難しく、細胞株として確立された遺伝子改変 ES 細胞で F0 解析ならではの成果となりました。

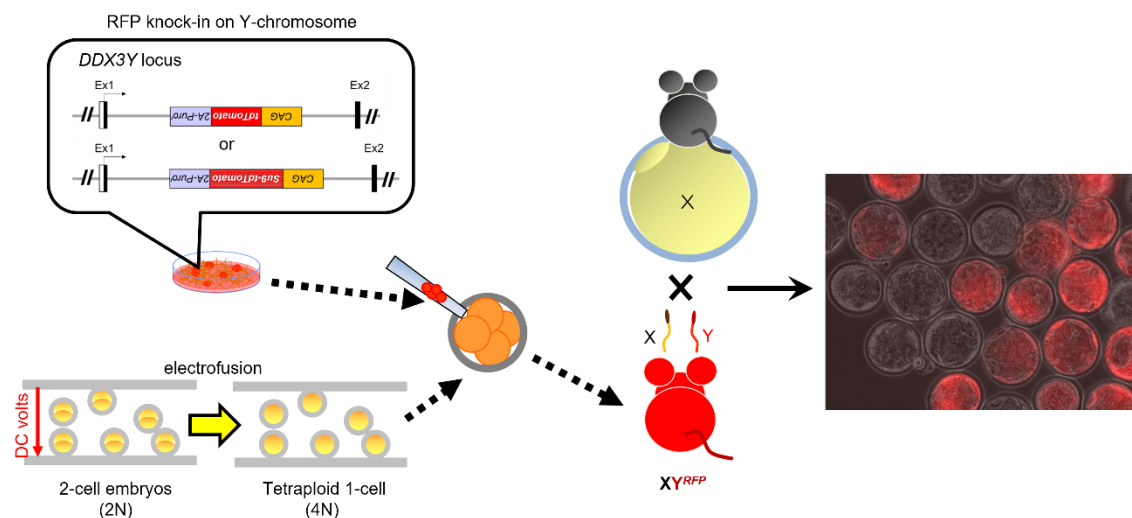


図 2 4 倍体胚補完法を用いた Y-mtRFP マウスの F0 解析と着床前の性判定

応用例 2-胎盤形成異常モデルの作製と表現型解析

胎盤の機能のみが欠損しているマウスモデルは、胎盤機能欠損の細胞治療モデルとして有用なモデルになります。*Ets2* 遺伝子のエキソン 9 とエキソン 10 を欠失した *Ets2* *db1* ホモ変異マウスは、自然交配では、胎生致死となりますが、4 倍体胚補完法により、胎盤機能をレスキューすると、産仔が誕生し、縮毛の表現型を持つことが知られています。

私たちは、新たにゲノム編集によってエキソン 8 をターゲットにフレームシフト変異を持った *Ets2*^Δ マウスの系統を樹立しました。この *Ets2*^Δ ホモ変異マウスは、自然交配では誕生せず、胎生

8.5 日頃から発育不全による胎生致死となることが分かりました。そこで、*Ets2*^{Δ4}ホモ変異の ES 細胞を樹立し、4 倍体胚補完法を行ったところ、*Ets2*^{db1}ホモ変異と異なり縮毛の表現型が認められず、直毛であることが分かりました。一方、*Ets2* の ORF の全領域を欠損した ES を樹立し、4 倍体胚補完法を行ったところ、*Ets2*^{db1}ホモ変異と同様の縮毛の表現型が認められ、直毛の表現型は、エキソン 8 のフレームシフト変異特異的であることが分かりました。そこで、皮膚における *Ets2* の mRNA と蛋白質を調べたところ、エキソン 8 のフレームシフト変異では、エキソン 8 がスキップされたコドンフレームが通る mRNA と蛋白質が発現している事が分かり、この変異蛋白質が皮膚における *Ets2* の機能を代償している事が分かりました (参考文献 2、図 3)。

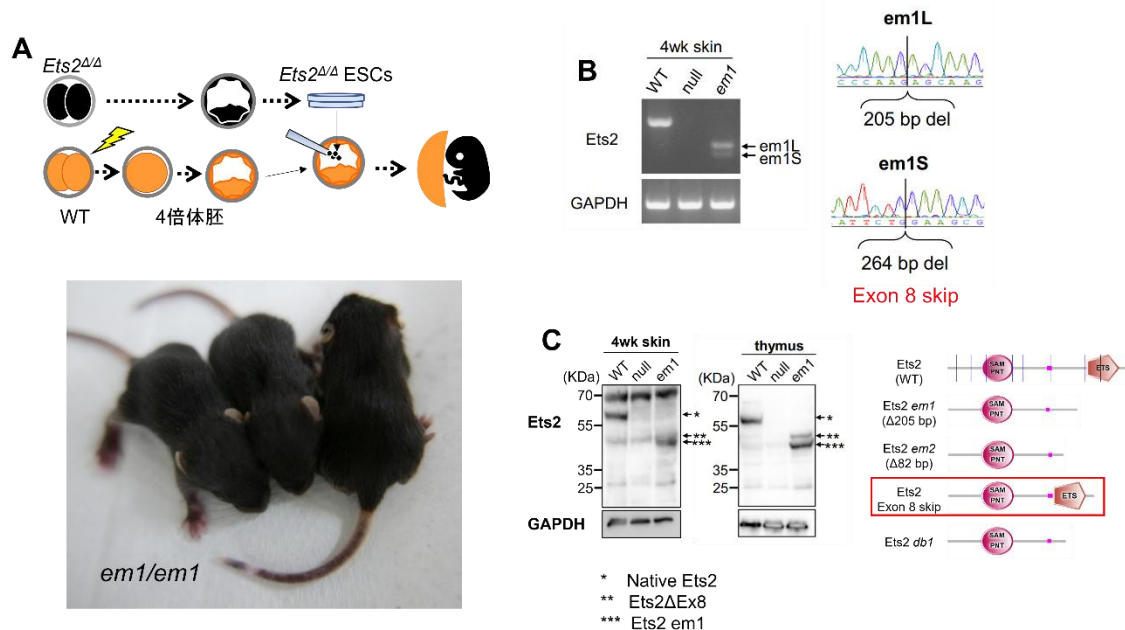


図 3 新規 *Ets2* フレームシフト変異モデルの表現型解析

- A. 4 倍体胚補完法で胎盤機能をレスキューした新規 *Ets2* フレームシフト変異マウス
- B. エキソン 8 スキップが起こっている mRNA の検出
- C. エキソン 8 スキップが起こった mRNA より翻訳されたタンパク質の検出

応用例 3: 異種間キメラ動物を用いた胚盤胞補完法による臓器の作製

ES 細胞は、胎盤以外のどのような細胞にも分化する能力があります。このことから ES 細胞は、分化した細胞や組織、臓器を作る再生医療研究の発展、さらには、分化細胞を脱分化させた iPS 細胞の誕生に貢献してきました。一方、この再生医療研究において、ドナー臓器不足の解消は、大きな課題の 1 つであります。近年、多能性幹細胞由来の臓器を動物の体内で作る胚盤胞補完法という方法が注目されています。胚盤胞補完法は、任意の臓器を欠損する遺伝型を持つ受精卵に多能性幹細胞を注入することで、キメラ胚が発生していく過程で、任意の臓器を多能性幹細胞から分化して作らせるという方法です。この方法では、臓器を欠損する遺伝型を持つ受精卵が必要不可欠ですが、臓器を欠損する遺伝型であれば、なんでもいいという訳ではありません。どのような遺伝子変異が胚盤胞補完法に適している臓器欠損かを調べる必要があります。しかし、受精卵を用いる方法では、多くの動物を準備する必要があり、維持コストや労力を伴います。そこで、

遺伝子改変した ES 細胞を野生型の受精卵に注入する逆胚盤胞補完法を用いれば、野生型マウスの維持のみでよく、かつ蛍光蛋白質などで標識された ES 細胞を用いれば、遺伝子変異細胞の局在も追跡することが可能となります。*Fgfr2b*-KO マウス ES 細胞を野生型マウスの受精卵に注入したところ、*Fgfr2b*-KO マウス ES 細胞由来の細胞は、肺上皮細胞には寄与しない肺欠損モデルであることが分かりました。次に、4 倍体胚に *Fgfr2b*-KO マウス ES 細胞を注入し、さらにラットの ES 細胞を注入することで、マウスとラットの異種間キメラを作製することに成功しました。この異種間キメラでは、肺上皮細胞は、すべてラット ES 細胞に由来することが明らかになりました。すなわち、4 倍体胚補完法を用いれば、遺伝子変異受精卵を用いなくても異種間キメラによる胚盤胞補完法ができる事が示されました（参考文献 3、図 4）。

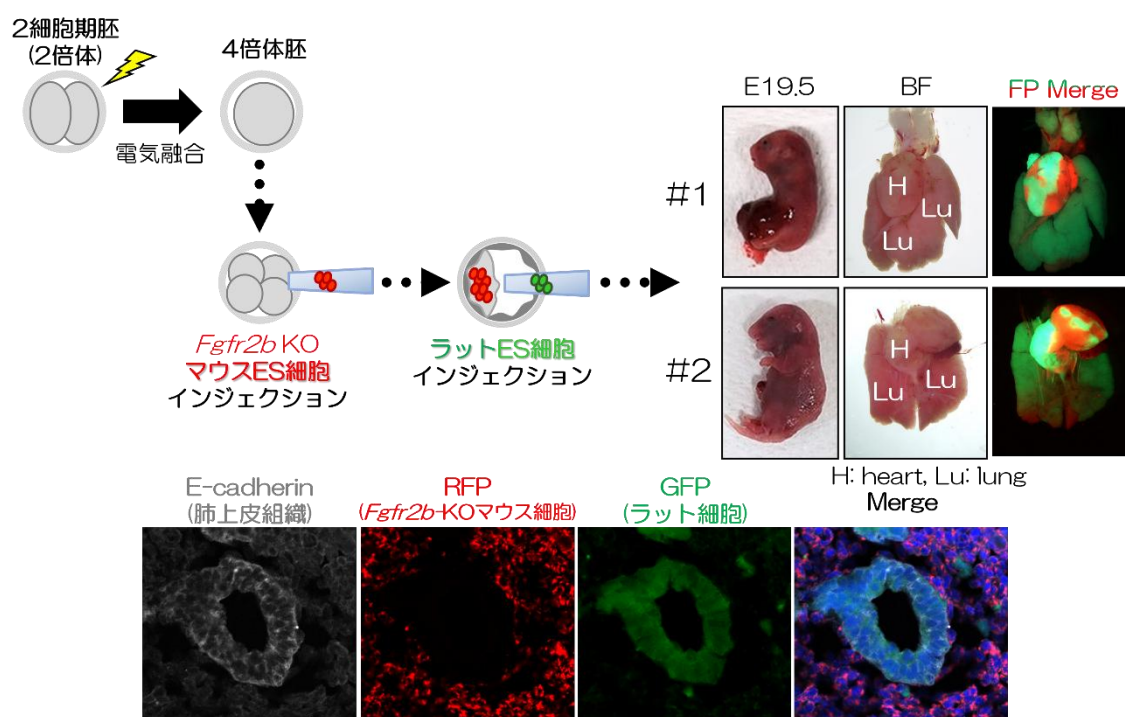


図 4 4 倍体胚補完法を用いて作出した胚盤胞補完法により肺上皮細胞を補完した異種間キメラ

② 異種間における母子間相互作用の研究

胎盤が正常に発生し、機能するためには、母体の子宮内膜との相互作用が重要な鍵になります。一般的に、同種間であれば、代理母が成立しますが、異種間になると、発生ステージの早い段階で胎生致死になり、種間差バリアの存在が示唆されています。

4 倍体胚補完法を用いた異種胚妊娠モデル

マウスとラットの異種間キメラ動物では、それぞれの細胞から胎盤系列細胞が発生する 8 細胞期胚を混ぜ合せた集合キメラ法では、誕生しなかった事に対し、胎盤に分化しない ES 細胞を用い受精胚と代理母を同種にすれば、誕生します。また、先述してきましたように 4 倍体胚補完法は、胎盤の機能を完全に補完し、ES 細胞から仔を誕生させることができます。これらのことは、マウスの 4 倍体胚にラット ES 細胞を注入した胚をマウスの代理母に移植すれば、ラット ES 細胞由来の産子が得られることを予想させました。しかしながら実際は、臍帯の融合が起こらず、胎生

致死になることが分かり、着床期だけでなく発生の途中にも胎盤と胎児の間に種間差のバリアがあることがわかりました (図 5)。

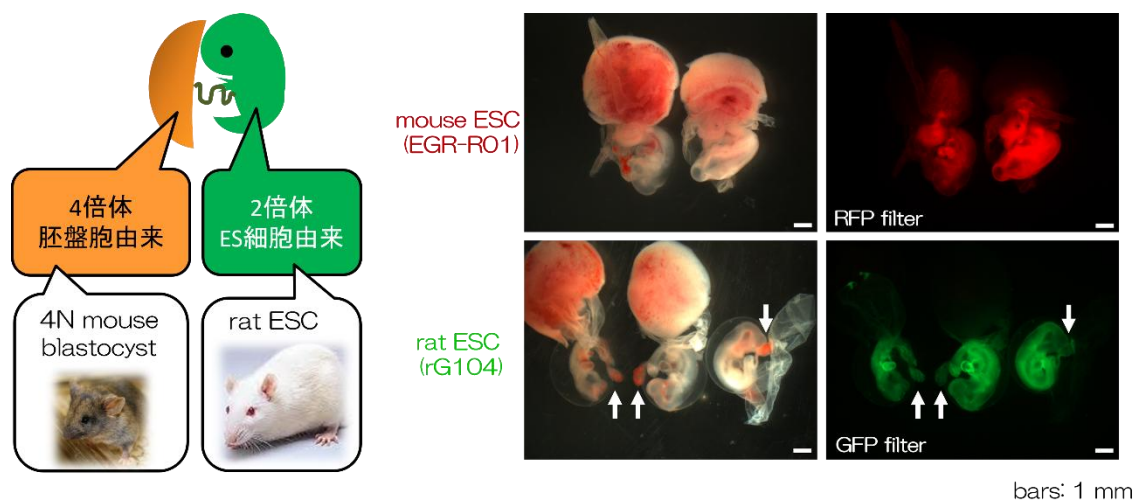


図 5 4 倍体胚補完法を用いマウスの母体内で発生した ES 細胞由来の胎生 10.5 日胚
右側上段：マウス ES 細胞由来胚、右側下段：ラット ES 細胞由来胚。絨毛膜に結合しなかった臍帯 (矢印)。

免疫不全代理母を用いた異種胚妊娠モデル

妊娠初期の種間差バリアの要因として、これまで母体の免疫応答による異種胚の拒絶と考えられてきました。このことが事実なら、免疫不全マウスを代理母に異種胚 (ラット胚) を移植すれば、着床が成立し、個体発生が進むのではないかという考えに至ります。そこで、妊娠初期の脱落膜に豊富に存在する uNK 細胞とキラー T 細胞を欠失し、ラットの細胞を拒絶しない *Il2rg*-KO マウスの代理母の子宮にラットの受精卵を移植しました。*Il2rg*-KO マウスの子宮へのラット胚の着床は脱落膜形成と胎生 5.5 日目の胚の存在より確かめられましたが、ラット胚は、同時期のマウス胚よりもサイズが小さく、胎生 6.5 日目までに発生遅延が起こり、胎生致死になることが明らかになりました。このことは、妊娠初期の種間差バリアは、免疫拒絶以外にも存在していることを示唆しました。また、*Il2rg*-KO マウスの代理母の子宮に移植された胎生 5.5 日目のラット胚では、将来胎盤になる栄養芽細胞に由来する細胞が少ない傾向も認められました。このことは、異種胚の妊娠が継続できない要因として、栄養芽細胞の増殖不全が起こっている可能性が考えられました。そこで、異種の栄養芽細胞の増殖力を調べるために、集合法によって作製した異種間キメラ胚をラット細胞が免疫拒絶されないように *Il2rg*-KO マウスの代理母の子宮に移植し、胎盤へのラット細胞の寄与を調べました。その結果、ラットの細胞は内部細胞塊由来の細胞にのみ寄与が認められ、胎盤組織の細胞に分化したラット細胞は認められませんでした (図 6)。このことから、代理母の脱落膜から動物種特異的に栄養芽細胞を増殖させる因子が分泌されている可能性が示唆されました。栄養芽細胞の増殖制御が、妊娠初期の種間差バリアの鍵になると思われ、今後さらに研究を進めていきたいと思ひます。

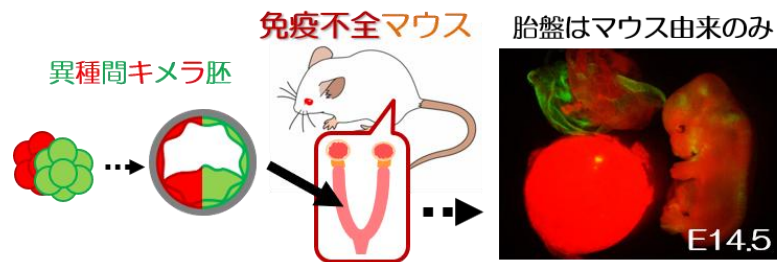


図 6 免疫不全代理母マウスに移植した集合法で作製した異種間キメラ胎児とその胎盤

参考文献：

1. Hirata W, et al. Generation of the Y-chromosome linked red fluorescent protein transgenic mouse model and sexing at the preimplantation stage. *Exp Anim.* 2022 Feb 9;71(1):82-89.
2. Kishimoto Y, et al. A novel tissue specific alternative splicing variant mitigates phenotypes in Ets2 frame-shift mutant models. *Sci Rep.* 2021 Apr 15;11(1):8297.
3. Yuri S, et al. Generation of rat-derived lung epithelial cells in Fgfr2b-deficient mice retains species-specific development. *Development.* 2024 Jan 1;151(1):dev202081.

遺伝子組換え動物を用いた受精メカニズム解析と発生工学研究支援

藤原 祥高

国立循環器病研究センター研究所

2024 年度から関西実験動物研究会へ入会させていただきました。本稿では、入会のご挨拶と私の研究内容についてご紹介させていただきます。以後、お見知りおきのほどよろしくお願いたします。

まずは研究経歴についてご紹介します。私は、2004 年に神戸大学農学部（指導教官：三宅正史 教授）を卒業し、2010 年に大阪大学大学院（指導教官：岡部勝 教授）で学位を取得しました。その後三年間、大阪大学微生物病研究所（阪大微研）の岡部先生の研究室に所属し、遺伝子組換え動物作製に関するイロハを学びました。2013 年からは阪大微研の伊川正人教授（本研究会幹事長）の研究室で助教として、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子組換え動物開発法の確立に携わりました。2019 年には、JR 岸辺駅直結の好立地に移転した国立循環器病研究センター（国循）に異動しました。独立して間もない頃は、塩谷恭子先生（本研究会幹事）に全面的なサポートをしていただき、現在まで教室員や共同研究の先生方のおかげで研究が続けられています。この場を借りて、御礼申し上げます。

私のライフワークになりつつある哺乳類の受精研究へ進んだきっかけは、岡部先生と大学院生の頃にご指導いただいた柳町隆造先生（ハワイ大学名誉教授、2023 年ご逝去）の薫陶を受けたことです。生命誕生の瞬間である受精には未解明な部分が多く残されていて、遺伝子組換え動物を武器に分子メカニズムの一端を明らかにしたいと思い、受精研究を開始して十五年が経ちました（文献#1）。次に、ゲノム編集技術の応用例を交えて最近の研究成果をお話します。

哺乳類の受精メカニズム解析

2013 年に、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 が哺乳類ゲノムを容易に改変できることが報告（文献#2, 3）されて、これまで年単位で作っていた遺伝子ノックアウト（KO）マウスが月単位で効率良く作出できるようになりました。その特徴のひとつは、従来の胚性幹（ES）細胞を介することなく、受精卵へ直接変異導入できる点です。つまり、ES 細胞を樹立できない、もしくは樹立できても生殖系列へ寄与しない多くの動物種に対しても遺伝子改変の裾野を広げた点が最大の功績かもしれません。2020 年には、この革新的技術の開発者二名にノーベル化学賞が与えられたことは記憶に新しいです。

私たちは KO マウスを月単位で作製できる利点を活かして、バイラー医科大学の Martin M. Matzuk 教授と共同で精巣特異的な発現を示しヒトにも保存される遺伝子を抽出して KO マウスを順次開発しました（文献#4）。雄性不妊の判定方法は非常にシンプルで、KO 雄マウスを交配させて産仔が得られるか否かです。少し前の結果ですが、299 遺伝子のうち 100 遺

伝子が雄性不妊であることを見つけました。つまり、KO 遺伝子の 2/3 が単独では生殖に重要な機能を持たないことを示しますが、KO マウスの表現型を隅々まで解析していないので、私たちは理研 BRC や熊大 CARD へ寄託しています。雄性不妊と判明した KO マウスについては、さらに詳細な表現型解析から分子メカニズム解析へと迫っていきます。

私たちの経験では、ヒト疾患モデルとして重宝される点変異導入は、欠失や挿入変異による KO に次ぐ作出効率であることが分かりました（文献#5；①点変異導入）。遺伝子の中には、同じ染色体上の近傍に位置して同じような発現（局在）パターンを示す遺伝子があります。CMTM2A と CMTM2B は精巣特異的で、かつ精子頭部に局在することから、これらの機能を調べるために CRISPR-Cas9 を使ってダブル KO マウスを作製しました。それぞれの遺伝子に対するガイド RNA を同時導入することで、複数の遺伝子へ変異導入できることを示しました（文献#6；②複数遺伝子破壊）。次に、二つの標的遺伝子間の距離が大きい場合はどうなるのか、欠失サイズの上限を調べるために遺伝子クラスターに着目しました。似た配列を持ち、同じ発現パターンを示す遺伝子群が一箇所に集約された遺伝子クラスターの機能解析はこれまで困難でした。その理由は、遺伝子ひとつを破壊しても他のクラスター遺伝子が機能補完して解析の妨げになる可能性があるため、研究があまり進んでいませんでした。そこで、二種類の遺伝子クラスター（CSTs, PATEs）に着目して KO マウスを作出したところ、114kb と 841kb の欠失に成功しました（文献#7；③遺伝子クラスター欠失）。さらに、精緻なゲノム編集にもトライしたところ、細胞膜貫通ドメインをコードするゲノム領域（0.25kb）のみを欠失させて精子膜タンパク質 FIMP を分泌型に改変したマウスを開発して生理機能を明らかにできました（文献#8；④機能ドメイン欠失）。これまでは引き算のゲノム編集を進めてきましたが、次にコンディショナル KO（Floxexed）や外来遺伝子をノックイン（KI）する足し算のゲノム編集マウス開発を試みました。1-2kb の一本鎖オリゴと受精卵へのエレクトロポレーション法を組み合わせたワンステップ KI マウス作製法を導入したところ、上記のゲノム編集に比べて低効率ですが作出することに成功しました（文献#9；⑤Floxexed/KI アリル導入）。一方で、予想外だったのは CRISPR-Cas9 とマウス ES 細胞との相性は非常に良く、7 割以上の導入効率で両アリル変異を持つ KO-ES 細胞を樹立できたため、KO キメラマウスを作製して表現型解析を迅速に、かつ交配を介さずに実施できることを示しました（文献#10；⑥KO キメラ解析）。

上記のゲノム編集技術を駆使することで、受精に至るまでに必要な関連因子群の同定に成功しました。引き続き、受精メカニズムの全容解明に向けて精進したいと思います。

【受精までの各種イベントと関連因子群】

精子形成：SPATA16, PDCL2（文献#5, 11）、精巣上体での精子成熟：LY6G5B/C, OVCH2（文献#12, 13）、精子の子宮・卵管移行：CMTM2A/B, CSTs, LYPD4, NELL2, PATEs（文献#6, 7, 12）、精子の先体反応：FER1L5（文献#14）、精子の透明帯通過：SPACA4, TEX46（文献#9, 15）、精子の卵子細胞膜融合：DCST1/2, FIMP, SOF1, SPACA6, TMEM95（文献#8, 16, 17）

国循での発生工学研究支援

阪大微研で岡部先生や伊川先生が続けて来られた発生工学研究支援を踏襲して、国循でも塩谷先生と私の前任の荒井勇二先生にご協力いただいて研究支援システムを立ち上げました。

弊センターは 2019 年 7 月に完全移転したため、当初半年間は凍結胚や凍結精子から遺伝子組換え動物の復元に注力しました。2020 年からゲノム編集動物作製支援を開始し、現在に至ります。実験動物技術者を含む技術職員の協力もあって、五年間で 400 系統の個体復元、300 系統の凍結保存、そして 250 系統を超える動物作製を実施しました。

しかし、前述の⑤一本鎖オリゴを用いた Floxed/KI アリル導入に関しては、①点変異導入効率 90% (18/20 遺伝子) に比べて 55% (22/40 遺伝子) と改善の余地がありました。そこで、先行論文 (文献#18) を参考に、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて作出したところ、65% (48/74 匹) の個体に 1.1kb の KI アリルを導入できました (未発表データ)。AAV 作製に少しコストは掛かりますが、一本鎖オリゴ導入の代替法として 2024 年より提供を開始しました。その他に、実験動物種の幅を広げるために、ラット (文献#19) やブタ (文献#20) のゲノム編集にも取り組んでいます。どちらもマウスのように簡単ではないので、共同研究の先生方と密に連携して「発生工学研究支援体制の更なる充実」を目指して、「動物実験施設の管理運営」との両輪で試行錯誤の日々を送っています。今後とも、ご指導ご鞭撻のほどよろしくお願いいたします。

参考文献

1. Fujihara Y, Miyata H, Ikawa M., Factors controlling sperm migration through the oviduct revealed by gene-modified mouse models, **Exp Anim.** 67(2):91-104. 2018, PMID: 29353867
2. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F., Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, **Science.** 339(6121):819-23. 2013, PMID: 23287718
3. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM., RNA-guided human genome engineering via Cas9, **Science.** 339(6121):823-6. 2013, PMID: 23287722
4. Miyata H, Castaneda JM, Fujihara Y, Yu Z, Archambeault DR, Isotani A, Kiyozumi D, Kriseman ML, Mashiko D, Matsumura T, Matzuk RM, Mori M, Noda T, Oji A, Okabe M, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Ramirez-Solis R, Satouh Y, Zhang Q, Ikawa M, Matzuk MM., Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice, **Proc Natl Acad Sci U S A.** 113(28):7704-10. 2016, PMID: 27357688
5. Fujihara Y, Oji A, Larasati T, Kojima-Kita K, Ikawa M., Human globozoospermia-related gene Spata16 is required for sperm formation revealed by CRISPR/Cas9-mediated mouse models, **Int J Mol Sci.** 18(10):2208. 2017, PMID: 29065458
6. Fujihara Y, Oji A, Kojima-Kita K, Larasati T, Ikawa M., Co-expression of sperm membrane proteins CMTM2A and CMTM2B is essential for ADAM3 localization and male fertility in mice, **J Cell Sci.** 131(19):jcs221481. 2018, PMID: 30209135
7. Fujihara Y, Noda T, Kobayashi K, Oji A, Kobayashi S, Matsumura T, Larasati T, Oura S, Kojima-Kita K, Yu Z, Matzuk MM, Ikawa M., Identification of multiple male

- reproductive tract-specific proteins that regulate sperm migration through the oviduct in mice, **Proc Natl Acad Sci U S A.** 116(37):18498-18506. 2019, PMID: 31455729
8. Fujihara Y, Lu Y, Noda T, Oji A, Larasati T, Kojima-Kita K, Yu Z, Matzuk RM, Matzuk MM, Ikawa M., Spermatozoa lacking Fertilization Influencing Membrane Protein (FIMP) fail to fuse with oocytes in mice, **Proc Natl Acad Sci U S A.** 117(17):9393-9400. 2020, PMID: 32295885
 9. Fujihara Y, Miyata H, Abbasi F, Larasati T, Nozawa K, Yu Z, Ikawa M, Matzuk MM., Tex46 knockout male mice are sterile secondary to sperm head malformations and failure to penetrate through the zona pellucida, **PNAS Nexus.** 3(3):pgae108. 2024, PMID: 38516277
 10. Oji A, Noda T, Fujihara Y, Miyata H, Kim YJ, Muto M, Nozawa K, Matsumura T, Isotani A, Ikawa M., CRISPR/Cas9 mediated genome editing in ES cells and its application for chimeric analysis in mice, **Sci Rep.** 6:31666. 2016, PMID: 27530713
 11. Fujihara Y, Kobayashi K, Abbasi F, Endo T, Yu Z, Ikawa M, Matzuk MM., PDCL2 is essential for sperm acrosome formation and male fertility in mice, **Andrology.** 11(5):789-798. 2023, PMID: 36278277
 12. Kiyozumi D, Noda T, Yamaguchi R, Tobita T, Matsumura T, Shimada K, Kodani M, Kohda T, Fujihara Y, Ozawa M, Yu Z, Miklossy G, Bohren KM, Horie M, Okabe M, Matzuk MM, Ikawa M., NELL2-mediated lumicrine signaling through OVCH2 is required for male fertility, **Science.** 368(6495):1132-1135. 2020, PMID: 32499443
 13. Sakurai N, Fujihara Y, Kobayashi K, Ikawa M., CRISPR/Cas9-mediated disruption of lipocalins, *Ly6g5b*, and *Ly6g5c* causes male subfertility in mice, **Andrology.** 12(5):981-990. 2024, PMID: 36428102
 14. Morohoshi A, Miyata H, Tokuhiko K, Iida-Norita R, Noda T, Fujihara Y, Ikawa M., Testis-enriched ferlin, *FER1L5*, is required for Ca^{2+} -activated acrosome reaction and male fertility, **Sci Adv.** 9(4):eade7607. 2023, PMID: 36696506
 15. Fujihara Y, Herberg S, Blaha A, Panzer K, Kobayashi K, Larasati T, Novatchkova M, Theussl HC, Olszanska O, Ikawa M, Pauli A., The conserved fertility factor SPACA4/Bouncer has divergent modes of action in vertebrate fertilization, **Proc Natl Acad Sci U S A.** 118(39):e2108777118. 2021, PMID: 34556579
 16. Noda T, Lu Y, Fujihara Y, Oura S, Koyano T, Kobayashi S, Matzuk MM, Ikawa M., Sperm proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 are required for sperm-oocyte fusion in mice, **Proc Natl Acad Sci U S A.** 117(21):11493-11502. 2020, PMID: 32393636
 17. Noda T, Blaha A, Fujihara Y, Gert KR, Emori C, Deneke VE, Oura S, Panzer K, Lu Y, Berent S, Kodani M, Cabrera-Quio LE, Pauli A, Ikawa M., Sperm membrane proteins DCST1 and DCST2 are required for sperm-egg interaction in mice and fish, **Commun Biol.** 5(1):332. 2022, PMID: 35393517
 18. Mizuno N, Mizutani E, Sato H, Kasai M, Ogawa A, Suchy F, Yamaguchi T, Nakauchi

- H., Intra-embryo gene cassette knockin by CRISPR/Cas9-mediated genome editing with adeno-associated viral vector, **iScience**. 9:286-297. 2018, PMID: 30447647
19. Kaneko T, Sakuma T, Yamamoto T, Mashimo T., Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos, **Sci Rep**. 4:6382. 2014, PMID: 25269785
20. Tanihara F, Takemoto T, Kitagawa E, Rao S, Do LT, Onishi A, Yamashita Y, Kosugi C, Suzuki H, Sembon S, Suzuki S, Nakai M, Hashimoto M, Yasue A, Matsuhisa M, Noji S, Fujimura T, Fuchimoto D, Otoi T., Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs, **Sci Adv**. 2(9):e1600803. 2016, PMID: 27652340

【第 156 回研究会 令和 6 年 12 月 20 日（金曜日） 於：京都教育文化センター103 会議室】

＜会員の発表＞

1. 優秀発表賞応募演題

- S-1 「ラット食餌誘発性 NASH の肝線維化病態における CD44 の寄与」
宇野 絹子（京都大学 大学院農学研究科生体機構学分野）
- S-2 「肺線維症モデルの確立と胎児肺由来細胞の移植の検討」
北室 皓平（奈良先端科学技術大学院大学）
- S-3 「ガラクトース転移酵素遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを用いた IgA 腎症発症機構の解析」
馬場 智子（京都大学 大学院生命科学研究科）
- S-4 「軸索変性を呈する Hspa8 遺伝子変異ラットの病態進行と軸索輸送に着目した中枢神経病変の解析」
関口 隆寛（大阪公立大学 獣医病理）
- S-5 「異種間キメラの体内で作成したラット肺は呼吸機能を獲得する目前まで成熟している」
村田 大和（奈良先端科学技術大学院大学）
- S-6 「肥満糖尿病モデル ZFDM ラットの糖尿病発症における性差の解明－膵島の形態および遺伝子発現に関する検討－」
伊藤 佑奈（京都大学 大学院農学研究科）
- S-7 「Study on the role of glycosylation in embryogenesis」
Shuang Li（Institute of Laboratory Animals, Graduate School of Medicine, Kyoto University）
- S-8 「Optimizing CRISPR Precision in Mouse Embryos via MMEJ-Dominant Targeting」
Khanui Lkhagvadorj（Department of Stem Cells and Human Disease Models, Research Center for Animal Life Science, Shiga University of Medical Science）
- S-9 「アデノ随伴ウイルスを用いた Trophectoderm 特異的遺伝子導入法の開発」
中川 達哉（大阪大学 微生物病研究所）

2. 一般演題

- G-1 「霊長類に特有な胎盤形成機構の解明
武藤 真長（滋賀医科大学 動物生命科学研究センター）
- G-2 「ロルラチニブによる ROS1 活性阻害は雄マウスの生殖能力を可逆的に抑制する」
宮田 治彦（大阪大学 微生物病研究所遺伝子機能解析分野）
- G-3 「希少疾患 NGLY1 欠損症モデル動物の樹立と治療方法の開発」
朝比奈 誠（Takeda-CiRA Joint Program (T-CiRA)）
- G-4 「Filobacterium 属菌のゲノムはなぜコンパクトなのか？ 肺パスツレラのゲノムとの比較から見えること」
池 郁生（理化学研究所）

<トピックス>

- 「ゲノム編集マウス作製技術の開発」
水野 聖哉（筑波大学 生命科学動物資源センター）

<特別講演2>

1. 「適正な動物実験の実施を目指して」
佐加良 英治（兵庫医科大学 病態モデル研究センター）
2. 「遺伝子改変マウスが教えてくれたこと」
浅野 雅秀（京都大学 大学院医学研究科附属動物実験施設）

ラット食餌誘発性 NASH の肝線維化病態における CD44 の寄与

○ 宇野 絹子¹、太田 毅¹

¹ 京都大学大学院農学研究科・生体機構学分野

【背景と目的】非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は脂肪肝に加え、炎症や線維化を呈する肝疾患で、メタボリックシンドロームの肝臓表現型の 1 つであり、肝硬変や肝がんを発症するリスクを有する。NASH における肝線維化はその程度に比例して肝関連死を増加させるため、当該病態の制御が重要となる。CD44 は炎症性細胞やがん幹細胞などにおける発現が報告されている因子であり、NASH の肝炎症への寄与も報告されている。本発表は、顕著な肝線維化を含む NASH 病態を誘発するコリン欠乏メチオニン低減アミノ酸（CDAA）食モデルラットの肝線維化における CD44 の発現解析をすることを目的とした。また、強い抗酸化性を有するラカンカ果実の抽出物を CDAA 食モデルラットに投与した際の、肝病変及び CD44 発現の変動を解析した。

【方法】以下の 2 試験を実施した。

試験 1：雄性 6 週齢の Fischer344（F344）ラットに、CDAA 食または通常食を 2 週間から 52 週間給餌した。給餌期間中は体重を測定し、解剖時、採血及び肝臓の摘出を行い、血液生化学検査、分子生物学的解析及び病理組織学的解析を実施した。

試験 2：雄性 6 週齢の F344 ラットに、CDAA 食または通常食を 13 週間給餌し、ラカンカ果実抽出物（0.06%、0.2%、0.6%）を、飲水にて自由摂取で投与した。試験 1 と同様の解析を行った。

【結果と考察】CDAA 食は、給餌 2 週間より、血中肝障害パラメータ値の上昇、炎症関連遺伝子や線維化関連遺伝子発現の上昇を呈し、肝細胞の脂肪化や炎症性細胞の浸潤を示した。給餌 4 週間より微細な肝線維化が観察され、給餌 13 週間においては著明な線維化像を示した。給餌 52 週間では、1 例肝細胞がんを呈した。CD44 は給餌 2 週間より顕著な遺伝子発現増加がみられ、給餌 13 週間では、一部の肝内細胆管における陽性像が観察された。当該胆管は肝線維化領域と一致して分布し、周囲へのヒアルロン酸の沈着も観察された。CD44 陽性胆管は細胞増殖活性が高い状態にあり、肝線維化の亢進に伴って増生した可能性を示唆した。NASH の肝線維化において、CD44 陽性の肝内細胆管が肝線維化の亢進に寄与したものと考えられた。

ラカンカ果実の抽出物は、0.2%以上の飲水投与によって、血中肝障害パラメータ、肝臓病態関連遺伝子発現、炎症性細胞浸潤、さらに肝線維化も減弱させた。肝内細胆管の CD44 陽性率もまた同様に低下させた。ラカンカ果実抽出物は、CD44 を介した NASH 肝臓病態の軽減作用を示唆した。

肺線維症モデルの確立と胎児肺由来細胞の移植の検討

○ 北室 皓平 1、磯谷 綾子 1

1 奈良先端科学技術大学院大学

【背景と目的】特発性肺線維症（IPF）は、肺の間質に細胞外マトリクス（ECM）が過剰に合成されることで、肺の機能が障害され、最終的に呼吸不全を引き起こす進行性の致死的な慢性肺疾患である。生存率を改善する唯一の治療法として、肺移植が挙げられるが、移植に適した肺が不足していることや移植後の死亡リスクが高いことが問題視されている。

移植の代わりとなる治療法を調べる為、様々な肺線維症の動物モデルが開発されてきた。マウスを用いたブレオマイシンによって誘発される肺線維症モデルは、線維芽細胞が ECM を合成する筋線維芽細胞へと分化する為、ヒトの IPF の病理学的特徴を模倣している。

近年では、ブレオマイシン投与により肺傷害を誘発したマウスモデルで、細胞を移植する治療法の開発が検討されている。実際、多能性幹細胞より分化させた肺前駆細胞は、肺線維症モデルに移植すると、傷害を受けた肺に生着し、肺上皮 I 型細胞と肺上皮 II 型細胞に性質を変化することが知られている。しかし、この肺前駆細胞の生着に、致死性を回避できるほどの治療効果があるかどうかは分かっていない。

今回、様々な濃度のブレオマイシンで肺線維症モデルを作製し、致死性について検討した。また、致死性のあるブレオマイシン濃度で作製した肺線維症モデルに、肺前駆細胞を含んだ胎児期の肺の細胞を移植し、肺損傷により誘発される致死を回避できるかどうかを調べた。

【方法】ブレオマイシンによる肺線維症モデルは、6 週齢の雄マウス（B6D2F1 系統：以下 BDF1）に、実験開始日を 0 日目とし、0, 3, 7, 10 日目にブレオマイシン（0, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ）を経鼻投与することで作製した（以降、それぞれの条件を BLM-0, -25, -50, -100 と表記）。細胞移植は、14-17 日目に、BDF1 と BDF1 mix（全身の細胞で GFP を発現しているトランスジェニックマウス）の交配で得られた GFP 陽性の胎生 16.5 日のマウス胎児肺より細胞を調製し、1 匹あたり約 1.0×10^6 個の細胞を経鼻投与した。70 日目に解剖し、GFP の蛍光観察と肺切片の組織学的解析を行った。

【結果と考察】BLM-0, -25, -50, -100 で作製したマウスモデルの生存率について調べた結果、BLM-50, -100 で作製したマウスモデルにおいては、28 日目までに死亡する個体が認められ、70 日目の生存率は、いずれも 50 %以下であった。

BLM-50, -100 で作製したマウスモデルに、胎児期の肺の細胞を移植した結果、それぞれ 5/6 匹、4/4 匹で、GFP の局在を確認した。また細胞移植を行った集団の生存率は、それぞれ 100 %、67 %で、細胞移植を行っていない集団よりも高くなった。しかし、BLM-100 で作製したマウスモデルで、細胞移植（14-17 日目）以降に死亡する個体も認められた。以上より、移植した胎児期の肺の細胞には、死亡を回避できる治療効果がある可能性が示された。一方で、高濃度のブレオマイシンでは、細胞移植による治療が難しい可能性も示された。

ガラクトース転移酵素遺伝子の コンディショナルノックアウトマウスを用いた IgA 腎症発症機構の解析

○ 馬場 智子^{1,2}, 成瀬 智恵², 松崎 朋子², PAN XUCHI², 浅野 雅秀²

¹京都大学大学院生命科学研究科、²京都大学大学院医学研究科 動物実験施設

【背景と目的】IgA 腎症は主要な原発性糸球体腎炎のひとつであり、発症から 20 年で約 40% の患者が末期腎不全まで移行する指定難病である。ヒトの場合、ガラクトースとシアル酸が欠損した O 型糖鎖不全 IgA1 の増加が確認されているが、発症機序はよくわかっておらず確立された治療法はない。当研究室では、ガラクトース転移酵素ファミリー(B4GalTs)に着目し、その欠損マウスを作製して生体内での糖鎖機能解析を行っている。その中の B4GalT-1(GT1)を全身で欠損させたマウスは、血中 IgA 濃度の上昇および IgA の凝集が認められ、IgA 腎症様の症状を発症した(Nishie *et al*, *Am J Pathol*, 2007)。そこで責任臓器を特定するため、IgA の産生に関わる組織に特異的なコンディショナルノックアウトマウスを作製し、病態の解析を行うことにした。

【方法】Cre/loxP システムを用いて腸管上皮特異的(GT1fl/VillinCre)、B 細胞特異的(GT1fl/AIDCre)なコンディショナルノックアウトマウスをそれぞれ作製した。その後 6 か月齢から 18 か月齢までそれぞれの系統のマウスから経時的に尿、血清、糞便を採取し、尿中アルブミン/クレアチニン比や血清 IgA 濃度、糞便 IgA 濃度を全身 GT1 欠損マウスと比較した。FACS を用いて、末梢血、パイエル板、脾臓における活性化 B 細胞と IgA 産生細胞の割合を解析した。IgA 腎症の所見の一つに血液中の糖鎖修飾異常を伴う多量体 IgA の増加があることから、採取した血清を用いて Western blotting を行い、多量体 IgA の有無を調べた。また、12 か月齢および 18 か月齢で脾臓、腎臓、小腸を採取し、IgA や B 細胞の免疫組織学的解析や HE 染色による組織観察を行った。

【結果と考察】全身 GT1 欠損マウスと比較すると穏やかな変化ではあるものの、腸管上皮特異的欠損マウスでは明らかな尿中アルブミン/クレアチニン比の増加や血清 IgA 濃度の上昇および多量体 IgA の産生が認められた。一方、B 細胞特異的欠損マウスではコントロール群と比較して血清 IgA 濃度が低下した。また、活性化 B 細胞の割合は全ての系統でコントロール群と変わらず、IgA 産生細胞の割合は両コンディショナルノックアウトマウスでコントロール群と比較してわずかに増加した。よって血清 IgA 濃度の上昇は、主に腸管上皮における GT1 欠損が原因と考えられた。IgA 腎症ではメサンギウム領域を主体とする IgA の沈着や、メサンギウム細胞と基質の増殖性変化が見られるが、両コンディショナルノックアウトマウスの一部個体でもそれらの変化が観察された。また、腸管上皮特異的欠損マウスの一部個体の小腸の粘膜固有層で全身 GT1 欠損マウスよりも強い IgA のシグナルが見られた。

軸索変性を呈する *Hspa8* 遺伝子変異ラットの病態進行と軸索輸送に着目した中枢神経病変の解析

○ 関口 隆寛¹, 田中 美有¹, 藤川 諒子¹, 井澤 武史¹, 桑村 充¹

¹大阪公立大学 獣医病理

【背景・目的】神経軸索ジストロフィー (neuroaxonal dystrophy: NAD) は、腫大軸索の形成を伴う軸索変性を特徴とする遺伝性神経変性疾患である。後肢の歩行異常を呈する KK ラット (F344-*Hspa8*^{m1Kyo}) において、熱ショック蛋白 HSPA8/HSC70 (Heat shock cognate 71 kDa protein) をコードする *Hspa8* (heat shock protein family A (Hsp70) member 8) のミスセンス変異 (V95E) が新たに原因遺伝子として同定されたが、本変異による NAD の病態発生機序は十分に解明されていない。我々は、*Hspa8*^{V95E} ノックイン (KI) ラット (F344-*Hspa8*^{em1Opu}) を新たな NAD モデルとして確立し、神経病変の解析を行ってきた。本研究では、*Hspa8*^{V95E} KI ラットが示す NAD の詳細な病態および HSC70 の機能の 1 つである軸索輸送と神経病変の形成との関連を明らかにすることを目的とし、神経病変の経時的な解析を行った。

【材料・方法】① 3~13 週齢ホモ型ラットの体重測定および歩様観察を行った。② 15 週齢ホモ型ラットの中枢神経系 (大脳, 小脳, 脳幹, 脊髄) と末梢神経系 (坐骨神経) について、HE 染色および軸索傷害マーカー APP (amyloid beta precursor protein) に対する免疫染色を行った。③ 3~13 週齢ホモ型ラットの後部脊髄背索 (薄束) における腫大軸索の数を計測し、比較した。④ 3 および 13 週齢ホモ型ラットの脊髄について、HSC70, APP, シナプス小胞マーカー Synaptophysin, キネシン蛋白 KLC1 (kinesin light chain 1) および KIF5A (kinesin heavy chain isoform 5A), オートファゴソームマーカー LC3B に対する免疫染色と PAS (過ヨウ素酸シッフ) 反応を行った。⑤ 3~13 週齢野生型・ホモ型ラットの脊髄における HSC70 蛋白発現レベルを、ウェスタンブロット法により調べた。

【結果・考察】① *Hspa8*^{V95E} KI ラットは、3 週齢から体格が小さく低体重を示し、5~6 週齢で明らかな後肢の歩行異常を発症した。9 週齢以降で後軀を中心とする消瘦がみられ始め、体重減少、歩行異常の急速な進行の後、歩行困難 (完全横臥) を呈した。② 腫大軸索や軸索傷害は中枢および末梢神経系の全域で認められ、延髄背側 (薄束核, 楔状束核) や脊髄背索 (薄束, 楔状束) で特に顕著であった。③ 脊髄背索において、腫大軸索は歩行異常の発症前である 3 週齢で少数認められ、その後週齢が進むとともに増加した。④ 腫大軸索は APP, Synaptophysin, KLC1, KIF5A, LC3B, PAS 反応に様々な程度で陽性を示した。HSC70 の免疫染色性については検討中である。⑤ ホモ型ラットの脊髄における HSC70 蛋白発現レベルは、いずれの週齢においても野生型ラットと比較して低下していた。以上より、後軀の深部固有感覚の伝導路 (薄束) を中心とする軸索傷害 (腫大軸索形成) の進行に伴って後肢の歩行異常が重篤化することが示された。また *Hspa8*^{V95E} KI ラットでは、ミスセンス変異によって生じる HSC70 蛋白の機能変化に加えて、若齢時からの中枢神経系における HSC70 蛋白の発現低下によって、軸索内でのシナプス小胞やオートファゴソームの輸送が進行性に障害されていることが示唆された。

異種間キメラの体内で作成したラット肺は呼吸機能を獲得する目前まで成熟している

○ 村田 大和(1)、由利 俊祐(3)、伊川 正人(2)、磯谷 綾子(1)

1.奈良先端大 バイオ 2.阪大 微研 3.長寿研

【背景と目的】肺は生命維持に必要な不可欠な臓器であるが、再生能力が低いため、重篤な損傷からの回復は困難である。そのような患者に対する究極的な治療法は肺移植のみだが、国内における移植割合は20%を下回っており、移植臓器の不足が大きな問題となっている。そこで、動物の体内で移植用ヒト臓器を作成する試みがなされている。臓器欠損の表現型を示す胚に多能性幹細胞を注入することで、多能性幹細胞由来の臓器を作成することができる胚盤胞補完法は、移植用臓器の新たな供給源として期待されている。我々は肺欠損の表現型を示す *Fgfr2b* 欠損マウス胚にラット ES 細胞を注入し肺上皮細胞がラット細胞のみで構成される異種間キメラ（以下、肺補完キメラ）を作出した。しかしながら肺補完キメラは呼吸ができずに死亡した。ラットの発生期間はマウスより2日間長い。種固有の発生時間は細胞レベルで自律的に制御されていることが報告されており、マウス胚に注入したラット細胞もラットの発生時間を維持している可能性がある。肺補完キメラの代理母にはマウスを用いたため、発生期間が不足し肺が未熟な状態で誕生したと考えられる。そこで本研究では肺補完キメラにおける肺上皮細胞の成熟状態を遺伝子発現及び組織学的解析から評価した。

【方法】遺伝子発現解析：野生型ラットの出生2日前（rE19.5）と出生直後（rE21.5）の肺においてシングル RNA シークエンス解析を行い、それぞれの時期の肺上皮細胞で高発現している遺伝子を抽出した。さらに、マウス新生仔の肺上皮細胞において成熟時に高発現することが報告されている遺伝子を加えた、合計12個の遺伝子についてリアルタイム qPCR にて発現量を解析し主成分分析を行った。組織学的解析：野生型ラットの rE19.5 から rE21.5 まで1日ごとの肺と肺補完キメラの肺の組織切片の HE 染色を行い肺胞が占める面積の割合について、画像解析ソフトを用いて定量化した。rE21.5 の野生型ラットに関しては呼吸の有無により肺胞が膨らむため蘇生前と蘇生後の2条件を行った。

【結果と考察】遺伝子発現解析：肺補完キメラは野生型ラットの出生前日（rE20.5）と類似した発現を示した。組織学的解析：肺補完キメラは rE19.5-20.5 の間の値を示した。以上の結果を踏まえ肺補完キメラの肺上皮細胞は野生型ラットの rE19.5 よりも成熟している可能性が示唆された。

肥満糖尿病モデル ZFDM ラットの糖尿病発症における性差の解明 ー 臍島の形態および遺伝子発現に関する検討ー

○ 伊藤 佑奈¹、肖 玉婷¹、重中 咲希¹、中田 千陽¹、水野 智花¹、星野 貴一²、横井 伯英¹

¹ 京都大学大学院農学研究科 動物遺伝育種学分野、² (株) 星野試験動物飼育所

【背景と目的】Zucker fatty diabetes mellitus (ZFDM) ラットは、レプチン受容体遺伝子 (*Lepr*) のミスセンス変異 (*fatty, fa*) を有する肥満モデル Zucker fatty (ZF) ラットを起源として確立された肥満糖尿病モデルである。オスの *fa/fa* ホモ型個体 (以下 *fa/fa* 個体) は全例が重度の糖尿病を発症するのに対して、メスの *fa/fa* 個体は肥満を呈するものの生涯糖尿病を発症しない。今回、ZFDM ラットの糖尿病発症における性差の解明を最終目標として、臍島の形態および遺伝子発現における性差について検討した。

【方法】実験 1) 雌雄の *fa/fa* 個体および非肥満対照の *fa/+* 個体 (各 n=3) について 5 週齢から毎週 1 回体重および血糖値を測定した。*fa/+* 個体は 7 週齢で、*fa/fa* 個体は 9 週齢で臍島を単離し、48 時間培養後に臍島長径を測定した。糖尿病発症基準は、随時血糖値が 300 mg/dL 以上とした。実験 2) 上記の臍島から Total RNA を抽出し、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を実施した。臍島で発現が認められたすべての遺伝子の発現量のデータを用いて主成分分析を行なった。また、遺伝子型ごとに雌雄間で発現差のある遺伝子群 (DEG) を抽出し、KEGG pathway 解析および GO (Gene Ontology) 解析を実施した。さらに、一部の遺伝子の発現量については定量 PCR (qPCR) により確認した。

【結果】実験 1) オスの *fa/fa* 個体は 9 週齢で全個体が糖尿病発症と診断された。雌雄それぞれにおいて、*fa/+* 個体と比較して *fa/fa* 個体の臍島の肥大化が顕著であった。遺伝子型ごとに雌雄間で比較すると、メスの *fa/fa* 個体と比較してオスの *fa/fa* 個体の方が肥大化した臍島の割合が高かった。実験 2) 遺伝子発現データを用いた主成分分析の結果、遺伝子型および性別ごとにクラスターが形成され、遺伝子発現プロファイルが異なることが示唆された。また、遺伝子型ごとに DEG を抽出した結果、メスの *fa/+* 個体と比較してオスの *fa/+* 個体において発現上昇が 200 個および発現低下が 22 個みられ、特に臍外分泌に関連する遺伝子群がオスで発現上昇していた。一方、メスの *fa/fa* 個体と比較してオスの *fa/fa* 個体において発現上昇が 176 個および発現低下が 202 個みられ、特に IL17 シグナル経路などの炎症に関わる遺伝子群がオスで発現上昇していた。さらに、遺伝子型にかかわらず雌雄間で顕著な発現差がみられた遺伝子は 24 個あり、その中には *Kdm5d* や *Uty* などの Y 染色体上の遺伝子が含まれていた。以上のことから、オスの *fa/fa* 個体では臍島の肥大化が顕著に認められ、オスに特異的な Y 染色体上の遺伝子群およびオス特異的に発現が変化する遺伝子群の影響により炎症が惹起され、インスリン分泌不全をきたし糖尿病発症に至ると考えられた。

Study on the role of glycosylation in embryogenesis

○ Shuang Li, Chie Naruse, Heng Wei, Kazushi Sugihara, Masahide Asano

Institute of Laboratory Animals, Graduate School of Medicine, Kyoto University

【背景と目的】 The Beta-1,4-galactosyltransferase (B4GALT) family have seven members in mice and humans, and are enzymes mainly involved in transferring UDP-galactose to terminal N-acetylglucosamine, playing a pivotal role in various biological processes. However, the specific impact and underlying mechanisms of B4GALTs on placental and fetal development remain underexplored. This study marks the first discovery of embryonic lethality in double-knockout (DKO) mice of B4galt1 and B4galt3, although each single KO mice were not embryonic lethal.

【方法】 We performed comprehensive dissections and analyses conducted at diverse embryonic stages (from E7.5 to E18.5). Tetraploid rescue experiments helped us to identify the potential causes of embryonic death. Through RNA-Seq experiments, we analyzed the genes that were significantly changed in the placenta on the DKO fetal side.

【結果と考察】 The DKO embryos began showing apoptosis at E9.5, ceased development around E10.5, and eventually died by E11.5. Compared to control counterparts, these embryos were smaller in size with abnormal heart morphology. Crucially, the DKO placentas on the fetal side was significantly thinner and had poorly developed capillaries. The tetraploid rescue experiments indicated that embryonic lethality originates from placentation defects. Immunostaining experiments demonstrated that DKO placental trophoblast cells (TCs) had early differentiation disorders. This research uncovers the essential role of B4GALTs in early placental development, offers novel insights into the biological mechanisms underlying placental abnormalities and spontaneous abortions.

Optimizing CRISPR Precision in Mouse Embryos via MMEJ-Dominant Targeting

○ Khanui Lkhagvadorj¹, Eiichi Okamura¹, Yasushi Itoh², Knut Woltjen³, Masatsugu Ema¹

¹Department of Stem Cells and Human Disease Models, Research Center for Animal Life Science, Shiga University of Medical Science, Otsu, Shiga, Japan

²Division of Pathogenesis and Disease Regulation, Shiga University of Medical Science, Otsu, Shiga, Japan

³Department of Life Science Frontiers, Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, Japan

[Background and Purpose] CRISPR/Cas9 has become a powerful tool for gene editing due to its ability to cleave DNA with high efficiency. However, subsequent DNA repair, particularly via non-homologous end joining (NHEJ), often leads to uncontrolled mutation patterns, including in-frame mutations and diverse allelic outcomes. In recent years, in silico programs have emerged to predict the genotypic outcomes of CRISPR editing. By leveraging these predictive tools, it may be possible to prioritize targets that favor microhomology-mediated end-joining (MMEJ) pathways, which tend to produce more predictable and homogeneous mutation patterns. The aim of this study is to use MMEJ-dominant target sequences in mammalian embryos to produce animals with homogenous genotypes, thereby reducing the number of animals required for genetic studies.

[Methods] The *tyr* gene in mice, which affects albino phenotype, was initially targeted. Using InDelphi, we randomly selected 14 gRNAs. To validate the efficacy of genotype prediction, we also used a competing method in mouse ESCs. Edited ESCs and C57BL/6Jms embryos at the blastocyst stage were analyzed by next-generation sequencing and compared with InDelphi predictions. Edited embryos were then transplanted and dissected at E11.5 for retinal pigmentation. In a follow-up, the *fgf10* gene was targeted and analyzed at E15.5 for the limbless phenotype. Next, we targeted the WRN gene in monkey embryos and used T-vector cloning to check the mutation pattern.

[Results] The Pearson correlation between InDelphi predictions and blastocyst results was moderate ($r = 0.57$), while the correlation between mESC and blastocyst was higher ($r = 0.81$), indicating greater reliability of mESC-based predictions. At E11.5, seven gRNA3 embryos achieved nearly 100% editing efficiency, resulting in a complete loss of pigmentation. In the offspring, all eight gRNA3 pups showed albinism. Targeting FGF10 resulted in all six embryos exhibiting the expected limbless phenotype. In monkey embryos, 10 out of 23 alleles have the desired mutation pattern consistent with InDelphi expectations.

[Conclusion] Our approach generates gRNAs through InDelphi based on desired mutation outcomes. Testing in cell culture provides editing efficiency and mutation patterns for gRNA selection in animal studies. This information allows us to select the most effective gRNAs for animal studies, increasing the accuracy of genotypic results and minimizing the number of animals required.

アデノ随伴ウイルスを用いた Trophectoderm 特異的遺伝子導入法の開発

○ 中川 達哉^{1,2}、江森 千紘¹、伊川 正人^{1,2}

¹ 大阪大学微生物病研究所、² 大阪大学薬学研究科 遺伝子機能解析分野

【背景と目的】胚盤胞期胚の栄養膜細胞（Trophectoderm : TE）は、着床時に母体と接する細胞であり、着床後は胎盤を形成し、母体と胎仔の間で栄養の供給、ガス交換などを担う胎仔の発育に欠かせない機能を持つ哺乳類特有の臓器である。胎盤の機能不全は胎仔発育不全や早産、流産を含む胎仔期の様々な異常を引き起こす原因になりうる。TE や胎盤の機能の解析には TE 特異的な遺伝子改変が望ましいが、一般的な遺伝子改変動物は、受精卵で遺伝子改変を施すため TE 以外のゲノムも改変される問題があった。これまでにレンチウイルスを用いた TE 特異的な遺伝子改変法が用いられてきたが、透明帯を除去する必要があるため、胚同士が接着しやすくなり、一度に多くの胚を処理することが難しい。そこで我々は、近年透明帯を通過して受精卵に感染することが報告され、ヒトの遺伝子治療においても広く応用されているアデノ随伴ウイルス（AAV）を用いた新たな TE 特異的な遺伝子導入法の確立を試みた。

【方法】mTmG マウス（通常は tdTomato を発現し、Cre が発現した細胞は EGFP の発現に切り替わるレポーターマウス）の 2 細胞期胚を回収し 2 日間培養した胚盤胞を、 1×10^{10} vg/ml に調整した CAG プロモーターで Cre をコードする各セロタイプ（1, 6, 9, DJ, DJ/8, PHP.eB）の AAV を含む培地で 5 時間培養した。実験 1) 胚を洗浄後、E5.5 まで培養し蛍光を観察した。実験 2) 実験 1 で遺伝子導入効率が高かった AAV1 と 6 について、胚を洗浄後、E2.5 の偽妊娠マウスに移植し、E14.5 で胚を取り出して胎仔と胎盤の蛍光を観察した。さらに胎盤切片の免疫蛍光染色により AAV 感染細胞の胎盤組織への寄与を確認した。

【結果と考察】実験 1) EGFP 蛍光を示す胚が最も多く観察されたのは AAV1 と 6 感染胚で 99% の胚で EGFP の蛍光が見られた。AAV9 や DJ, DJ/8, PHP.eB の EGFP 陽性胚率はそれぞれ 48%, 95%, 5%, 65% で、EGFP 陽性細胞は胚のごく一部の細胞だった。さらに、AAV6 を感染させた一部の胚盤胞では TE だけでなく、将来胎仔に分化する内部細胞塊にも EGFP の蛍光が観察された。実験 2) AAV1 感染胚の EGFP の蛍光は 86% の胚に観察できた。これらの胚の EGFP 蛍光は全て胎盤のみに観察され、胎仔には観察されなかった。AAV6 感染胚の EGFP 蛍光は胎盤のみが 75%、胎仔と胎盤両方 EGFP の蛍光が確認されたものは 9% であった。また、AAV1 と 6 のどちらも胎盤組織全体に EGFP 陽性細胞が確認された。以上より、AAV1 を用いれば透明帯を除去することなく TE 特異的に遺伝子導入できることを明らかにした。

霊長類に特有な胎盤形成機構の解明

○ 武藤 真長¹、松本 翔馬¹、岡村 永一¹、依馬 正次^{1,2}

¹滋賀医科大学 動物生命科学研究センター、²京都大学 高等研究院ヒト生物学高等研究拠点

【背景と目的】 哺乳動物の妊娠期において最初に形成される臓器である胎盤は栄養供給・ガス交換を介して妊娠の維持や胎仔の発育を担う。マウスを使った先行研究から、受精卵から発生が進んだ胚盤胞期胚では外側に位置する栄養芽細胞（Trophectoderm; TE）が胎盤に局限して分化し、内側にある内部細胞塊（Inner Cell Mass; ICM）は、胎仔の全ての細胞に貢献するエピブラスト細胞となり、胎盤には貢献しないことが分かっている。霊長類においても胎盤の細胞は胚盤胞の TE 層から発生することが推測されているが、実験的な検証はされていない。そこで本研究では、ヒトに最も近縁な実験動物であるカンクイザルを用いて、霊長類初期胚の細胞運命を明らかにすることを目的とした。

【方法】 蛍光タンパク質（Kusabira Orange; KuO）を発現するレンチウイルス（LV）ベクターをカンクイザル胚盤胞に感染させ、TE 層のみを蛍光標識し共焦点顕微鏡により観察した。また光シート顕微鏡を用いたライブイメージングによりカンクイザル胚盤胞における TE および ICM の細胞動態を解析した。さらに LV ベクター感染胚を仮親カンクイザルへ移植し、得られた胎盤および胎仔組織の KuO 発現パターンを解析した。

【結果と考察】 LV ベクターで標識した胚盤胞を蛍光観察したところ、ICM に接する Polar TE 層の KuO 陽性率が、ICM に接していない Mural TE 層に比べて有意に低いことがわかった。ライブイメージングにより、カンクイザル胚盤胞の ICM において内側に留まる細胞だけでなく、TE 層へ移動している細胞も存在していた。これらの結果から、カンクイザル胚盤胞における ICM の一部の細胞は TE へ分化しながら Polar TE 層へ供給されていることが考えられた。また、LV ベクター感染胚の移植実験で得られた胎仔では KuO の発現は全く見られなかったが、胎盤では KuO 陽性細胞だけでなく、陰性細胞も多く検出された。これまでのマウス研究により胎盤を形成する TE と、胎仔を形成する ICM の細胞運命は胚盤胞期の段階で決定されていると考えられていたが、本研究から霊長類では胎盤を構成する細胞は胚盤胞期の TE だけでなく ICM にも由来することが示された。今後は、霊長類の ICM に存在することが示唆される TE 前駆細胞の性状を単一細胞レベルの遺伝子発現解析により取り組んでいく予定である。

ロルラチニブによる ROS1 活性阻害は雄マウスの生殖能力を可逆的に抑制する

○ 宮田 治彦¹、大山 裕貴¹、伊川 正人¹

¹大阪大学微生物病研究所 遺伝子機能解析分野

【背景と目的】 精巣上体における精子成熟過程は、短期間で効果があり可逆的な男性避妊薬の有望な標的だと考えられている。受容体チロシンキナーゼである ROS1 は精巣上体上皮の分化や精子成熟過程に関与し、雄マウスの生殖能力に必須である。しかしながら、ROS1 の阻害が雄マウスの生殖能力を可逆的に抑制するのかは不明であった。本研究では、ROS1 阻害剤の投与がマウスの精子機能と生殖能力に及ぼす影響について検討した。

【方法】 ロルラチニブは ROS1 を標的とする抗がん剤である。10 週齢の野生型雄マウスにロルラチニブを 3 週間投与し、交配試験、組織学的解析、体外受精、ウェスタンブロット解析を行った。また、ロルラチニブの投与を中止して 3 週間後にも同様の解析を行った。

【結果と考察】 ロルラチニブを 3 週間投与すると雄マウスの生殖能力が抑制された。ロルラチニブ投与マウスでは精巣に明らかな異常は認められなかったが、精巣上体イニシャルセグメントの上皮の退縮を認めた。ウェスタンブロット解析を行ったところ、精巣上体で発現している OVCH2、RNASE10、ADAM28 のタンパク質量が低下していた。また、ロルラチニブ投与マウスの精子は、卵子の周りにある細胞外マトリックス（透明帯）に結合する能力を失っていた。さらに、精子の膜タンパク質である ADAM3 のプロセッシング異常を認めた。これらの機能不全は、薬剤投与を中止して 3 週間後には回復した。以上の結果から、ロルラチニブによる ROS1 の阻害は、精巣上体上皮の分化や精子成熟過程、雄性生殖能力を可逆的に抑制することが分かった。ROS1 や ROS1 シグナル伝達経路を特異的に阻害する分子を探索することで、短期間で効果があり可逆的な男性避妊薬の開発につながる可能性が示された。

希少疾患NGLY1欠損症モデル動物の樹立と治療方法の開発

○ 朝比奈 誠^{1, 2}、藤縄 玲子^{1, 3}、平山 弘人^{1, 3}、兎沢 隆一^{1, 2}、鈴木 匡^{1, 3}

¹ Takeda-CiRA Joint Program (T-CiRA)、² 武田薬品工業株式会社リサーチ部門、

³ 理化学研究所開拓糖鎖生化学研究室

【背景と目的】 NGLY1欠損症は2012年に発見された世界で100人程度の希少疾患で、発育不全、四肢の筋力低下、不随意運動、てんかん、脳波異常、無涙症、新生児肝機能障害等を引き起こす重篤な疾患である。C57BL/6マウスでNgly1を欠損すると胎生致死を示し、モデル動物が樹立できず、発症の詳細なメカニズムの解明や治療法の開発の障害となっている。今回、NGLY1欠損症患者の症状と類似した表現型を示す動物モデルを開発し、AAVを用いた遺伝子治療の可能性について検討した。

【方法と結果】

実験1) 全身性Ngly1欠損マウス・ラットの樹立

C57BL/6背景Ngly1ヘテロ欠損マウスとJF1背景Ngly1ヘテロ欠損マウスを交配させ、雑種強勢により胎生致死を回避し、JF1B6F1 Ngly1ホモ欠損マウスを取得することに成功した。また、クローズドコロニーのSDラットからゲノム編集技術によりNgly1ホモ欠損ラットを得ることに成功した。これらNgly1欠損マウス・ラットは、発育不全、側彎症、運動機能障害、記憶・学習能力の低下、脳波異常、てんかん様行動、不随意運動など患者と同様の症状を示した。また病理解析により中枢神経系にユビキチン陽性の沈着物、視床外側核と腹側後核に壊死性病変、鈣化、好酸球小体、ミクログリオースisおよび成熟ニューロンの著しい消失、坐骨神経に軸索の萎縮が観察された。加えて、NGLY1欠損患者において特異的に観察される血液・尿中Aspartylglycosamineの上昇もNgly1欠損マウス・ラットにおいて観察された。

実験2) AAVを用いた遺伝子治療の可能性の検討

3週齢のNgly1ホモ欠損ラットに1.6E10 vgのAAV9-hNGLY1を脳室内投与した。5, 8, 10週齢においてRota-rodやGait analysisで運動機能を評価したところ、AAV9-hNGLY1投与Ngly1ホモ欠損ラットは、コントロールAAV9投与Ngly1ホモ欠損ラットと比べ8週齢以降に明確な運動機能の改善を示した。hNGLY1は主としてニューロンで、脳全体で発現し、NGLY1酵素活性も野生型と同レベルまで回復した。

【結論】

- Ngly1では背景系統を雑種にすると胎生致死を回避できることが示された。
- Ngly1欠損マウス・ラットはヒト患者症状と類似した表現型を示し、NGLY1欠損症モデルとして樹立された。
- AAVを用いた遺伝子治療によりNGLY1欠損症への治療の可能性が示された。

Filobacterium 属菌のゲノムはなぜコンパクトなのか？ 肺パスツレラのゲノムとの比較から見えること

○ 池 郁生¹, 梶田 亜矢子¹, 小倉 淳郎¹, 目加田 和之², 小久保 年章³

¹理研 BRC, ²岡山理科大学理学部, ³元 量子科学技術研究開発機構

マウスやラットの慢性呼吸器感染症病原体である通称 CAR(カー)バチルスはグラム染色陰性のフィラメント形状を示し、感染部位である呼吸器上皮細胞の線毛と酷似して銀染色によく染まる。本菌は寒天培地で増殖せず正式分類は遅れていたが、我々はラット分離株の単独液体培養に成功し、本菌を 2016 年に新属 *Filobacterium* の新種 *Filobacterium rodentium* として報告した(基準株 SMR-C^T)。 *F. rodentium* のゲノムは全長 1.44 Mb とグラム陰性菌として極めてコンパクトであり(大腸菌の 1/3)、ファージやインテグラーゼなどの外来遺伝子挿入の痕跡は見られない。

最近我々は、岡山理科大で飼育維持されている野生由来ギンターハタネズミ (*Microtus guentheri*) に *F. rodentium* が自然感染していることを見つけ昨年の本研究会で発表した。本菌は呼吸器検体の病理検査で肺の線毛上皮細胞上に認められ、周囲に炎症性細胞が集簇していた。これらにより、ギンターハタネズミの *F. rodentium* 感染は 16S rRNA の PCR およびアンプリコン配列(調べた 1,045 b について 100%一致)、本菌に対する抗体検査、そして病理検査により確定することができた。ここで強調したいのは、ギンターハタネズミとマウス、ラットとそれぞれ宿主が異なるのに感染する *Filobacterium* 属菌の 16S rRNA 配列はいずれも同じことである。

マウス・ラットで呼吸器感染症を起こす肺パスツレラ (*Rodentibacter* 属菌) の場合、感染する種として genomospecies と呼ばれるものも含め 10 種以上が知られる。それなのになぜ *Filobacterium* 属菌では齧歯類に感染する種が *F. rodentium* に限られるのだろうか？

Rodentibacter 属菌の各種分離株のゲノムを読むと(ゲノム長 2–2.5 Mb)、本属菌では同種内であつても株によってゲノムに多種多様なファージ遺伝子と各種インテグラーゼなど水平遺伝子転移に関わる可動性遺伝因子が多数挿入されていることがわかった。

Rodentibacter 属菌は腸管内容物からも検出されるが *F. rodentium* は呼吸器検体からしか検出されない。私はいま、*Rodentibacter* 属菌の生息する腸管のような環境(同居細菌や各種遺伝子断片がリッチ)とは異なり、*F. rodentium* は感染環境が呼吸器の特定部位に限られるゆえに遺伝子圧力が弱く(あるいは水平遺伝子転移を受け入れる機構を持つこともなく)、*F. rodentium* はコンパクトなゲノム構造を維持できたのではないかと考えている。

ゲノム編集マウス作製技術の開発

水野 聖哉

筑波大学 医学医療系 トランスボーダー医学研究センター
生命科学動物資源センター 実験動物学分野

我々は筑波大学生命科学動物資源センターでは遺伝子改変マウスの受託作製事業を実施しており、国内の研究機関や民間製薬企業はもとより海外の研究機関からの依頼を受け、新規の遺伝子改変マウスを作製・供給しています。遺伝子改変マウス作製の主流は受精卵ゲノム編集であり、そのゲノム編集マウスの作製は大きく分けると①ゲノム編集戦略のデザイン、②ゲノム編集因子やドナーDNAのマウス受精卵への導入とその胚移植、③遺伝子操作した胚から発生・誕生したマウスの遺伝型の3つの工程があります。我々はその3つの工程を全て実施することにより、質の高い遺伝子改変マウスの作製を目指しています。

我々は2018年から2024年において、各年で100～150系統を作出しています。この受託作製事業では単純なノックアウトマウスだけでなく、点変異マウス・1 kbを超えるDNAフラグメントのノックインマウス・floxマウスも作出可能ですが、依頼のおよそ4割はノックインマウス作製です。単純なノックアウトマウスの依頼が少ない理由は、本邦の研究者が開発した優れた受精卵ゲノム編集法であるTAKE法¹やGONAD法²が広まり、国内の多くの研究機関がインハウスでKOマウスを作製できるようになったためと考えられます。

エレクトロポレーション法を利用したゲノム編集では作出することが難しいノックインマウスやfloxマウスの作製に関し、我々はSRINT-CRISPR³をベースとした顕微注入法を採用しています。その詳細については我々のビデオ論文⁴をご参照ください。この手法を用いることで、C57BL/6Jの遺伝背景にてノックインマウスが約8～40%の効率で、floxマウスも約2～20%の効率で作出できています。点変異マウスについてはエレクトロポレーション法にて作出しています。出生率は標的遺伝子が胚発生に必須か否かに大きく左右されますが、変異誘導効率は約10～80%と高いです。点変異マウスの遺伝型解析においては、モザイクや意図しないsmall indel変異の中から目的の点変異を検出する必要があります。この課題を解決するため、我々は低出力次世代シーケンサーを利用しています。標的サイトを含む300塩基対以下のPCR産物のアンプリコンシーケンスを行い、そのデータをCRISPResso2で解析する⁵ことで、明確に点変異アレルを特定することができます。

講演させていただいた2024年度においては、先端モデル動物支援プラットフォームやAMED-BINDSなどの公的な遺伝子改変マウス作製支援も展開されており、関西実験動物研究会の会員の皆様におかれまして、是非この様な支援のご利用を検討いただけると幸いです。また、営利目的で使用するゲノム編集マウスの作製ではCRISPR-Cas9の知財面についても検討すべきであるため、アカデミア機関でもあっても企業への導出が当初より予定されるゲノム編集マウスを作出される場合には、そのCRISPR-Cas9のライセンスを有する実験動物関連企業への依頼を検討することもお勧めします。

前述の通り、ゲノム編集マウス作製には3つの工程がありますが、我々はそれぞれに関する技術開発研

究を実施しています。まず①ゲノム編集戦略のデザインについて紹介します。ゲノム編集にて遺伝子欠損(Knock-out、以下、KO)マウスを作出する場合、i)タンパク質コーディング配列に small indel 変異を導入する方法、ii)イントロンを含む遺伝子全長を染色体から切除する方法、iii)critical exon(s)とよばれるその遺伝子の機能を担保するために必須のエキソンのみを切除する方法があります⁶。i)の small indel 導入では、欠失・挿入する配列を予測することができないため、3 の倍数の small indel 変異は数アミノ酸に挿入か欠失しか誘導せず、また系統化後の遺伝型解析が煩雑であるなどの問題があります。ii)の遺伝子全長欠損では標的遺伝子のみならず、その近傍遺伝子の発現にも影響を及ぼしてしまうことを我々も報告しており⁷、多数のエキソンから構成される大きな遺伝子を標的する場合には不向きであると言えます。これらの i)と ii)の弱点を補うのが iii)の critical exon(s)を標的にする手法です。しかしながら、各標的遺伝子における critical exon(s)を正しく選択するためには高度な逆遺伝学的知識が必要となります。そこで、生命科学動物資源センターの久野博士が遺伝子名を入力すると critical exon(s)を自動で抽出するソフトウェアである KOnezumi(<https://www.md.tsukuba.ac.jp/LabAnimalResCNT/KOanimals/konezumi.html>)を開発しました⁸。KOnezumi は exon の自動抽出だけでなく、sgRNA や遺伝型解析のための primer も自動でデザインし、表示する機能を持っています。

続いて、多様な近交系マウス背景での受精卵ゲノム編集法の検証について紹介をします。会員の皆さんは既にご承知のことかと存じますが、実験用マウスにはそれぞれ異なる特性をもつ多くの近交系統が存在しており、その特性に応じた各研究分野で利用されています。我々は入手が容易な8つの汎用近交系統(BALB/c, NC, CBA, C3H, SJL, DBA1, DBA2, B6N)について、統一プロトコルで KO マウスが作出可能であるかを検討しました。TAKE 法¹をベースとした体外受精胚へのエレクトロポレーション法にて critical exon の除去による KO マウス作出を実施したところ、検証した全8系統で意図した KO アレルをもつファウンダーマウスを作出することができました⁹。興味深いことに意図した領域のみを欠失した変異の出現頻度とそれ以上のゲノム領域が欠失したアレルの出現頻度は系統間にばらつきがありました。更に我々は受託作製においてこれらの8系統以外の NZB, PWK, SJL, NOD や遺伝子変異系統での受精卵ゲノム編集にも成功しています。

最後になりましたが、今回はこのような発表機会を頂戴できたこと、関西実験動物研究会会長の横井先生を初めてとする会員・スタッフの皆様に心から感謝申し上げます。

引用

- 1: Methods Mol Biol . 2017;1630:81-89. doi: 10.1007/978-1-4939-7128-2_7.
- 2: Genome Biol . 2018 Feb 26;19(1):25. doi: 10.1186/s13059-018-1400-x.
- 3: Cell Rep . 2020 May 19;31(7):107653. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107653.
- 4: J Vis Exp . 2022 Jun 24;(184). doi: 10.3791/64161.
- 5: Nat Biotechnol . 2019 Mar;37(3):224-226. doi: 10.1038/s41587-019-0032-3.
- 6: Nature . 2011 Jun 15;474(7351):337-42. doi: 10.1038/nature10163.
- 7: Elife . 2021 May 5;10:e50346. doi: 10.7554/eLife.50346.
- 8: Bioinformatics . 2019 Sep 15;35(18):3479-3481. doi: 10.1093/bioinformatics/btz090.
- 9: Biol Open . 2023 Sep 15;12(9):bio059970. doi: 10.1242/bio.059970.

適正な動物実験の実施を目指して

佐加良 英治

兵庫医科大学 病態モデル研究センター

医学部 西宮病態モデル研究センター

医学部 医学教育センター

(講演時の所属)

(現所属：兵庫医科大学 医学部 医学科)

はじめに

2025 年 6 月 22 日に第 217 回通常国会が閉幕した。本国会では、動物の愛護及び管理に関する法律（以下「動物愛護管理法」）の改正が予想されており、2005 年以来、20 年ぶりとなる動物実験に関する大幅な規制強化の年になると見られていた。しかしながら、他の重要な政治案件の影響もあってか、動物愛護管理法の改正は見送られた。6 月 10 日には、「犬猫の殺処分ゼロをめざす動物愛護議員連盟」の第 20 回総会が開催され、同会合において「12 月の臨時国会での成立を目指す」との方針が報告された¹⁾。したがって、本稿が関西実験動物研究会の皆さまのお手元に届く頃には、動物愛護管理法の改正が新たな段階に入っている可能性もある。

現在の動物実験に関する規制は、2005 年の動物愛護管理法改正に端を発している。改正法は 2006 年 6 月 1 日に施行され、これに伴い多くの指針等が告示された。

21 世紀の初めに動物実験が大きく変わった

2006 年 6 月 1 日は、日本の動物実験において重要な転換点となった日である。この日に施行された改正動物愛護管理法では、条文中に 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement) の原則が明記され、文部科学省の「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（以下「基本指針」）」が告示された。加えて、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」および「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」が通知され、さらに日本学術会議による「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」も公表された。また、同年 4 月 28 日には、1980 年に総理府から告示された「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」が四半世紀ぶりに改正され、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（以下「飼養保管基準」）」として新たに告示された。

これまでの動物実験の規制

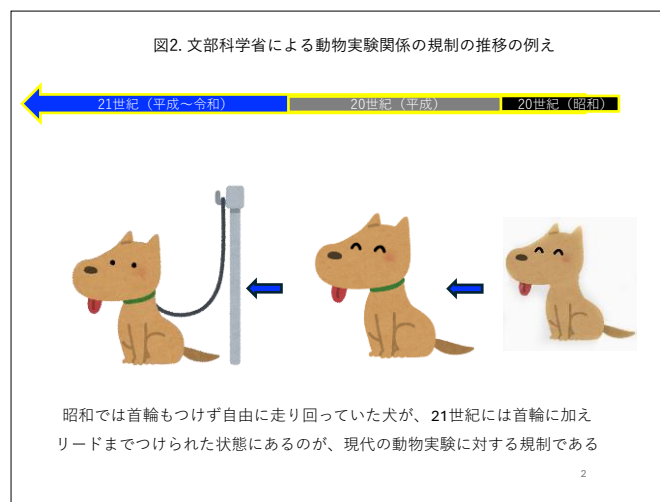
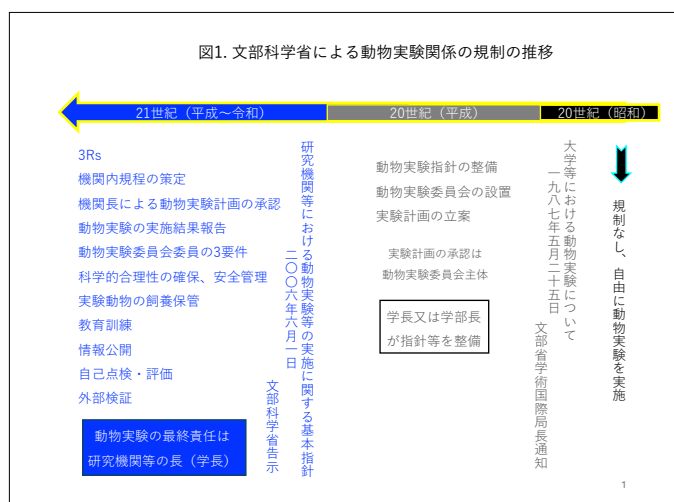
大学等における動物実験の規制は、1987 年 5 月に文部省学術国際局長より通知された「大学等における動物実験について」²⁾を契機として始まった。これを受け、各大学等が自ら動物実験指針を策定し、動物実験を行う体制が整えられていった。この指針策定の根拠となったのが、学術審

議会学術情報資料分科会学術資料部会による報告「大学等における動物実験の実施に関する基本的な考え方について」³⁾である。同報告では、動物実験が研究活動にとって重要な手段であること、欧米諸国では動物福祉や動物保護の観点から様々な法律や指針が整備されていること、国際的な学会や学術雑誌での研究発表の際に、当該国の動物実験基準への適合性が求められていることなどが指摘された。適切な基準が示されていない場合には、論文掲載が拒否される事例もあり、動物福祉に配慮した動物実験の実施がますます重要となっている。また、大学等の現場では共通基準がなかったため、対応に困惑する事例が多く見られたことから、動物実験指針の策定が必要であると結論づけられた。このように、日本の動物実験規制は欧米諸国からの影響を受けつつも、研究者自らが必要と判断し、国に策定を働きかけたものであり、この経緯は基本指針の前文にも記載されている。しかしながら、一部の研究者においてはこの背景の理解が十分ではないようである。後述するが、環境省のアンケート結果からも、遵守が求められる基準等が十分に守られていない実態が明らかになっている。研究者自身が必要と判断して始まった規制であるならば、その遵守は当然のことと思われるが、現実には様々な事情があるのかもしれない。

1987年の通知では、現在の基本指針で定められている情報公開や自己点検・評価については触れられていなかった。当時の実験動物の飼養保管基準は1980年に総理府から告示された基準⁴⁾に基づいており、現行の飼養保管基準と比較すると極めて簡素な内容であった。それ以前には、国による動物実験に関する通知や告示はなく、実験計画書の承認も不要で、動物実験は自由に行われていた。

2006年の基本指針の告示により、動物実験は「機関管理」のもとで実施されることになり、研究機関等の長（例：学長）が最終責任者とされた。そのため、機関等の長による承認がなければ動物実験は実施できなくなった。これ以降、3Rsの導入、動物実験規程の整備、動物実験計画の承認、実験結果の報告、動物実験委員会の設置（3要件を満たす構成）、科学的合理性の確保、安全管理、飼養保管基準に則った飼養保管、役割別の教育訓練の確保、情報公開、自己点検・評価、外部検証の実施などが、努力義務も含めて制度化された（図1参照）。

このような状況を、あえて例えるならば、かつて首輪もつけず自由に走り回っていた犬が、現在では首輪に加えリードまでつけられた状態にあるのが、現代の動物実験に対する規制である（図2）。



適正な動物実験の実施とは

先述のとおり、2006年の法令等の改正により、動物実験は研究機関等の長が最終責任者となる機関管理体制のもとで実施されるようになった。これらの一連の規制は、「動物実験等の実施に関する透明性を確保すること」を目的としており、その社会的透明性を担保するために求められるのが、以下の3つのステップである。

- (1) 基本指針への適合性について、自己点検・評価を行うこと
- (2) 自己点検・評価の結果について、第三者による外部検証を受けること
- (3) 自己点検・評価および外部検証の結果を情報公開すること

この一連のプロセスを通じて、動物実験が基本指針に適合し、飼養保管基準を遵守していることが明らかになれば、適正な実施と判断される。仮に外部検証において適正ではないと判断された場合でも、指摘や助言を踏まえて機関内で改善を進めることで、適正に近づく仕組みとなっている。この過程は、PDCA サイクル⁵⁾と類似しており、Check（評価）を経て Action（改善）を行い、不十分であれば Plan（計画）を立てて Do（実行）し、再び Check へと進む。このサイクルを継続的に回すことで、適正な動物実験の実施が可能になる。

なお、自己点検・評価、外部検証、情報公開に関する根拠条文については、図3～7に示した。

図3. 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（環境省）

第1 一般原則

3 周知

実験動物の飼養及び保管並びに科学上の利用が、客観性及び必要に応じた透明性を確保しつつ動物の愛護及び管理の観点から適切な方法で行われるように管理者は本基準の遵守に関する指導を行う委員会の設置又はそれと同等の機能の確保、本基準に即した指針の策定等の措置を講じる等により、施設内における本基準の適正な周知に努めること。また、管理者は、関係団体、他の機関等と相互に連携を図る等により当該周知が効果的かつ効率的に行われる体制の整備に努めること。

4 その他

管理者は、定期的に、本基準及び本基準に則した指針の遵守状況について点検を行い、その結果について適切な方法により公表すること。なお、当該点検結果については、可能な限り、外部の機関等による検証を行うように努めること。

改正された動物愛護管理法（2020年6月1日施行）

第7条により、飼養保管基準の遵守義務が定められた

3

図4. 研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省）

第6 その他

2 基本指針への適合性に関する自己点検・評価及び検証

研究機関等の長は、動物実験等の実施に関する透明性を確保するため、定期的に、研究機関等における動物実験等の基本指針への適合性に関し、自ら点検及び評価を実施するとともに、当該点検及び評価の結果について、当該研究機関等以外の者による検証を実施することに努めること。

3 情報公開

研究機関等の長は、研究機関等における動物実験等に関する情報（例：機関内規程、動物実験等に関する点検及び評価、当該研究機関等以外の者による検証の結果、実験動物の飼養及び保管の状況等）を、毎年1回程度、インターネットの利用、年報の配付その他の適切な方法により公表すること。

4

図5. 厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針

第2 実施機関の長の責務

1 実施機関の長の責務

実施機関の長は、実施機関における動物実験等の実施に関する最終的な責任を有し、本指針に定める措置その他動物実験等の適正な実施のために必要な措置を講じること。

7 自己点検及び評価並びに検証

実施機関の長は、定期的に、実施機関における動物実験等の本指針及び機関内規程への適合性について、自ら点検及び評価を行うとともに、当該点検及び評価の結果について、当該研究機関等以外の者による検証を実施することに努めるものとする。

8 動物実験等に関する情報公開

実施機関の長は、機関内規程及び7の規定に基づく点検及び評価の結果等について、適切な方法により公開すること。

厚生労働省が所管する実施機関であっても、機関内規程と

自己点検・評価等については情報公開の義務（形式は自由）がある

5

図6. 農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針

第2 研究機関等の長の責務

1 研究機関等の長の責務

研究機関等の長は、研究機関等における動物実験等の実施に関する最終的な責任を有し、動物実験委員会の設置、2に規定する機関内規程の策定その他動物実験等の適正な実施のために必要な措置を講ずるものとする。

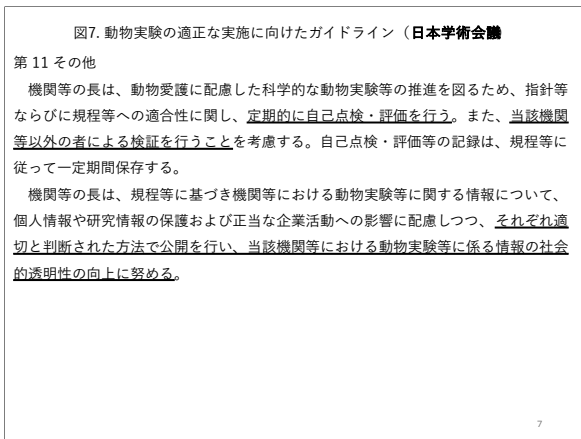
6 点検及び評価並びに検証

研究機関等の長は、動物実験等の実施に関する透明性を確保するため、定期的に、研究機関等における動物実験等のこの基本指針への適合性に関し、自ら点検及び評価を行うとともに、当該点検及び評価の結果について、当該研究機関等以外の者による検証を実施することに努めるものとする。

7 情報公開

研究機関等の長は、研究機関等における動物実験等に関する情報（例えば、機関内規程、動物実験等に関する点検及び評価、当該研究機関等以外の者による検証の結果、実験動物の飼養及び保管の状況等）について、毎年度、インターネットの利用、年報の配布その他適切な方法により公開するものとする。

6



外部検証のための体制作り

2006年当時、国内ではまだ「第三者による評価」の体制が整備されていなかった。先述のとおり、厚生労働省および農林水産省でも、文部科学省と同様の動物実験に関する基本指針が通知され、これら3省で「第三者による評価」の受け皿づくりが検討された。

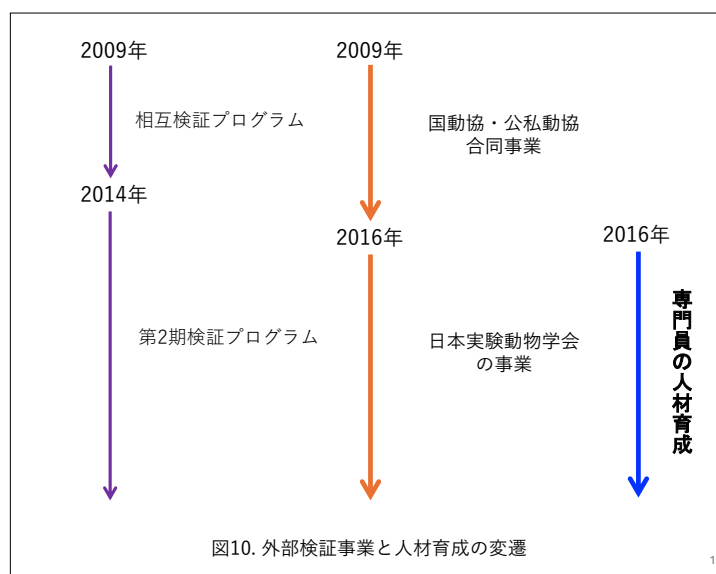
文部科学省関係では、国立大学法人動物実験施設協議会と公私立大学実験動物施設協議会が共同事業として、大学等における外部検証体制の検討を開始した(図8)。筆者はその立ち上げメンバーの一人であったが、前例のないゼロからのシステム構築は非常に困難であった。また、外部検証を実際に担う専門委員の育成も同時に必要であり、その方法も確立されておらず、試行錯誤の連続であった。

当時、国立大学法人動物実験施設協議会側の委員であった八神先生が中心となり、この体制の構築を主導された。各委員が異なる背景を持ち、意見が対立する場面も少なくなかったが、八神先生の手腕により意見はまとめられ、2009年には文部科学省関係の外部検証事業として「相互検証プログラム」が始動した(図9)。

図8. 国動協・公私動協 評価検証制度検討WG	
国立大学動物実験施設協議会および公私立大学実験動物施設協議会が、基本指針に基づく「第三者評価」の実施に向けて、合同事業を実施するために検討WGを立ち上げ、それぞれから委員をだし、「相互検証プログラム」を検討した	
国動協・公私動協 試行的相互評価制度準備委員会の委員	
国立大学法人動物実験施設協議会	公私立大学実験動物施設協議会
有川二郎(北海道大学)	片平清昭(福島県立医科大学)
浦野 徹(熊本大学)	喜多正和(京都府立医科大学)
笠井憲雪(東北大学)	佐加良英治(兵庫医科大学)*
八神健一(筑波大学)	下田耕治(慶応大学)
* : 2006年の科研費班での検討開始時は安藤隆一郎(東北薬科大学)が担当 2007年からの試行的相互評価制度準備委員会から佐加良が担当	

図9. 外部検証の実施のための体制作りの経過	
2007年 5月	試行的相互評価準備委員会の設置(国動協・公私動協)
2008年 3月	実施要領、マニュアル、評価項目など、規則や様式の作成 (まる二日間:熱海で缶詰になり議論)
2008年 7~8月	相互検証プログラム(案)の公表・意見収集・決定、準備委員会は検証委員会に(日本実験動物学会の旧事務所で真夏に8名で議論)
2008年 9~10月	相互検証プログラムの説明会(筑波、京都)を検証委員会で実施、事務局もなくほぼ手弁当の説明会
2008年10月~	各機関における自己点検・評価
2009年 1~3月	相互検証の申請受付(初年度目標:10機関程度) 専門委員の選考、研修(5月の日本実験動物学会大宮総会の後まで続く)、事務局の選考、議論白熱の会議(慶應大)、日本実験動物学会期間中に深夜まで専門委員の研修
2009年 4月	担当調査員(調査チーム)の決定、書面審査
2009年 6~9月	訪問調査(検証委員会の8名+佐藤先生)国+公私のチーム
2009年 11月	検証委員会による検証結果の決定(初年度6機関)
2009年 12月	検証結果報告書の通知
2010年 1~3月	相互検証の申請受付(次年度目標:20機関程度)

その後、この相互検証は 2014 年に外部評価（メタ評価）を受け、外部の意見を参考にして第 2 期検証プログラムが策定され、2015 年から実施された。2016 年には、国立大学法人動物実験施設協議会と公私立大学実験動物施設協議会による共同事業から、公益社団法人日本実験動物学会の事業へと移管された。移管に伴い、同学会では外部検証の専門員（※相互検証時代は「専門委員」と称していた）の育成を、人材育成委員会が開始した（図 10）。筆者は、2006 年から相互検証の立ち上げに参画し、2009 年からは専門委員として外部検証を実施していた。また、運営に携わる検証委員会にも所属し、専門委員の育成にも関わった。このような経歴から、人材育成委員会の立ち上げにも関与し、教材やプログラムの作成を担当し、これまでに 100 名を超える専門員の育成に関わっている。

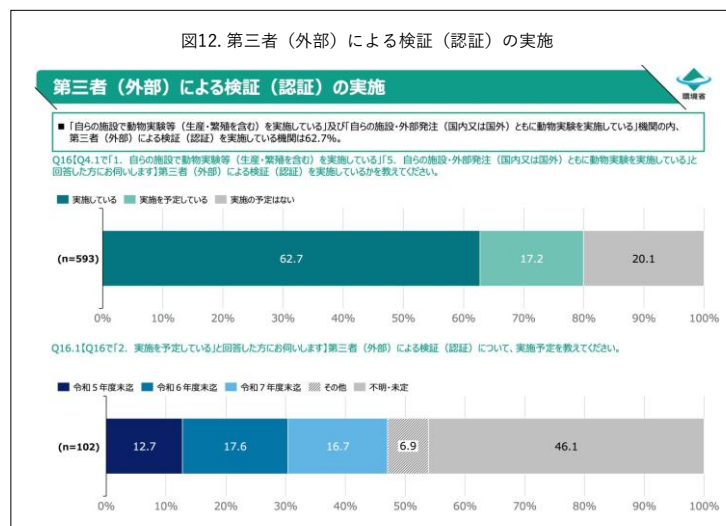


体制はできたけれど.....

現在では、「第三者による評価」は検証と認証に分類されており、国内 3 団体と海外 1 団体が主要な実施団体として第三者評価を行っている（図 11 参照）。受け入れ体制は十分に整っており、研究機関等が希望すれば第三者評価を受けることが可能な状況にある。では、全国の研究機関等のうち、どの程度が実際に「第三者による評価」を受けているのだろうか。

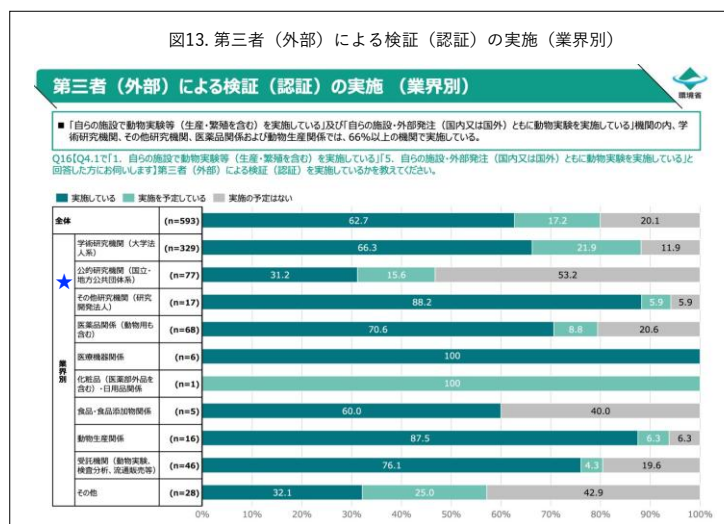
図11. 第三者評価を行う機関、評価の形式、対象等	
1 公益社団法人日本実験動物学会（国立大学法人動物実験施設協議会・公私立大学実験動物施設協議会の合同事業から移管）	検証(Assessment and Verification)
主として、文部科学省関連の大学・研究機関等、最近では厚生労働省、農林水産省、その他の機関の検証も実施	
2 一般財団法人日本医薬情報センター（公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団より承継）	検証・認証(Assessment and Accreditation)
「厚生労働省の基本指針」が適用される実施施設が対象	
3 公益財団法人日本実験動物協会：実験動物生産施設等福祉事業	認証事業
実験動物生産施設等（日本実験動物協会正会員、賛助会員、非会員が対象）	
4 AAALAC International(private, nonprofit organization)	accreditation and assessment
companies, universities, hospitals, government agencies and other research institutions (the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International)	

環境省は 2023 年度、2019 年改正の動物愛護管理法附則に基づき、実験動物の適正な取扱い推進に向けた検討を開始するため、全国の実験動物飼養施設における取扱状況の網羅的把握を目的とした統一的調査を実施した。その結果⁶⁾によると、第三者による検証（または認証）を既に実施している機関は 62.7%、実施を予定している機関は 17.2%であった。さらに、実施を予定している機関のうち、2025 年度までに実施予定と回答した機関は 47%にとどまり、過半数に達していなかった。一方、約 30%の機関は、2025 年度までに実施予定がないと回答している（図 12）。



業種別に見ると、公的研究機関（国立・地方公立団体系）の実施率は 31.2%と、著しく低かった（図 13）。佐藤⁷⁾によれば、公的研究機関は「業界として 2 番目に多い回答数であったが、3Rs に関する事項の実施や、飼養保管基準の遵守状況について、全体平均よりも低い傾向が見られた」とされており、適正な動物実験の実施という観点からは憂慮すべき結果である。

外部検証の訪問調査を通じて筆者が毎回感じるのは、外部検証の根拠である基本指針の制定経緯に対する理解が不十分な機関が少なくないということだ。これまで述べてきたように、これらの指針は、研究者自らが必要と判断し、策定を国に求めた経緯がある。自らが望んだ制度であれば、その遵守は当然であり、遵守することこそが自身の動物実験の環境を守り、将来的にも動物実験の継続を可能にする基盤を築くはずである。しかし、その理解が浸透していない現状は、非常に残念である。



早ければ、2025 年末には動物愛護管理法の改正が本格的に議論される見込みである。もし動物実験に関する条項が法改正に盛り込まれることになれば、基本指針や飼養保管基準も改正され、2006 年以来の大幅な制度変更が行われる可能性がある。指針やガイドラインによる規制は、研究者自身を守るためのものである。一方、法律による規制は、研究者のみならず広く国民全体を対象とする枠組みとなり得る。したがって、今後はより一層厳格で包括的な規制となる可能性が高い（図 14 参照）。

それゆえ、法改正される前に、まずは研究者自らが率先して適正な動物実験を実施し、自身の所属機関の体制を整えていくべきである。この考え方が広く理解・共有されることを、筆者は強く願っている。



さいごに

筆者は、適正な動物実験の実施に不可欠な外部検証事業および人材育成事業の立ち上げに関与し、現在も中心メンバーとして活動している。もともと積極的にこの分野に関わるつもりはなかったが、前任校にて適正な動物実験体制の構築に尽力していた結果、いつの間にかこの分野に深く関わるようになり、抜け出せない状態となってしまった。

関西実験動物研究会では評議員・幹事として運営に携わらせていただき、また関西で開催された日本実験動物学会総会の運営にも複数回関与してきた。特に、筆者が世話役を務める予定であった第 146 回関西実験動物研究会（2020 年 6 月 19 日開催予定）が、新型コロナウイルス感染症の影響により中止となったことは、今でも大きな心残りである。準備万端整っていたにもかかわらず、開催直前での中止は非常に堪えた。また、その直前には、大阪府立国際会議場で開催予定だった第 67 回日本実験動物学会総会（大会長：塩谷先生）も、同様にコロナ禍により誌上開催となった。筆者は、この学会の情報交換会において一生の思い出になるような企画を準備しており、その準備のために大丸百貨店の外商ともやり取りを重ね、大丸のゴールドカードまで作らされたが、結局一度も使用する機会がなかった。

兵庫医科大学を定年退職後、故郷・九州に戻り、静かな老後を過ごすつもりでいたが、現在も日本実験動物学会の外部検証委員会や人材育成委員会、日本実験動物環境研究会などの活動が続いており、楽隠居とはほど遠い日々が続いている。

今後も、これまでに蓄積してきた知見と経験を活かし、適正な動物実験の実施を支援していく所存である。こうした取り組みが、会員の皆さまのお役にたてれば、これに勝る喜びはない。

引用文献

- 1) 公益財団法人動物環境・福祉協会. “犬猫の殺処分ゼロをめざす動物愛護議員連盟第 20 回総会”. Instagram. 2025-6-12. <https://www.instagram.com/p/DKycxpsBMbX/>, (参照 2025-7-14).
- 2) 行政機関の通知・文部科学省・動物実験. “大学等における動物実験について（通知）”. 秋田大学バイオサイエンス教育・研究サポートセンター動物実験部門. <https://www.med.akita-u.ac.jp/~doubutu/sisin/daigaku.html>, (参照 2025-7-22)
- 3) 行政機関の通知・文部科学省・動物実験. “大学等における動物実験の実施に関する基本的な考え方について（報告）”. 秋田大学バイオサイエンス教育・研究サポートセンター動物実験部門. <https://www.med.akita-u.ac.jp/~doubutu/sisin/singikai.html>, (参照 2025-7-22).
- 4) 株式会社杏林社. “実験動物の飼養及び保管等に関する基準”. 日産婦誌 65 巻 1 号. <https://fa.kyorin.co.jp/jsog/readPDF.php?file=65/1/065010114.pdf>, (参照 2025-7-23).
- 5) 厚生労働省. “PDCA サイクルと OODA ループ”. 生活衛生関係営業の生産性向上を図るためのマニュアル（基礎編）. <https://www.mhlw.go.jp/content/001297217.pdf> (参照 2025-7-23).
- 6) 環境省動物愛護管理室. “実験動物取扱いの実態に関する調査（令和 5 年度実施）”. 統計資料. https://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/2_data/statistics/jikken_r05.html (参照 2025-7-23).
- 7) 佐藤暢彦. 動物愛護管理法と実験動物取扱いの実態に関する調査について. 実験動物ニュース. 2025. Vol.74(2), p.39-46.

遺伝子改変マウスが教えてくれたこと



第156回関西実験動物研究会
2024年12月26日

京都大学医学研究科
実験動物学分野
附属動物実験施設
浅野 雅秀

自己紹介



1959年 大阪府箕面市に生まれる
1978年 大阪府立北野高校卒業
1983年 京都大学理学部卒業
1988年 京都大学大学院理学研究科博士課程研究指導認定退学
1989年 理学博士の学位取得



※川出由己先生のもとインターフェロンの研究
1988年 (財)大阪バイオサイエンス研究所・特別研究員
長田重一先生のもとG-CSFの研究
1991年 ドイツマックスプランク生物物理化学研究所・ポスドク
Peter Gruss先生のもとPax5の研究



1993年 東京大学医科学研究所・助手
1999年 同・講師
岩倉洋一郎先生のもとIL-1と糖転移酵素の研究



2000年 金沢大学医学部・教授 (13年11ヶ月)
2003年 金沢大学学際科学実験センター・教授
同・センター長併任 (2009年～2014年)
2014年12月 京都大学大学院医学研究科・教授 (10年4ヶ月)
2025年3月 同・定年退職予定

附属動物実験施設の沿革

1972年 医学部附属動物実験施設設置
1974年 動物実験施設棟竣工
1998年 医学研究科附属動物実験施設に名称変更
2002年 ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) ラットの中核拠点
2003年 増改修動物実験施設棟竣工
2017年 医薬系総合研究棟 地下2階SPF飼育室・マウス行動解析室利用開始
2024年 がん免疫総合研究棟 地下1階SPF飼育室利用開始
2024年 A棟地下1階SPF飼育室利用終了

歴代施設長

藤原元典	教授 (微生物学)	1972年5月～1979年3月
高折修二	教授 (薬理学)	1979年4月～1987年3月
山田淳三	教授 (動物実験施設)	1987年4月～1993年3月
日合 弘	教授 (病理学)	1993年4月～1994年3月
芹川忠夫	教授 (動物実験施設)	1994年4月～2013年3月
篠原隆司	教授 (分子遺伝学)	2013年4月～2015年3月
浅野雅秀	教授 (動物実験施設)	2015年4月～2025年3月

動物実験施設の研究支援

学内の主な役割

発生工学支援（山根、杉原）
IVF受精卵移植によるSPF化
胚・精子凍結と個体復元
IVFによる実験群の大量作製

NBRPラット代表機関課題管理者
マウス行動解析室室長
全学動物実験委員会委員長
医学研究科動物実験委員会委員

ゲノム編集マウスの作製（松崎）

学外の活動

飼育管理

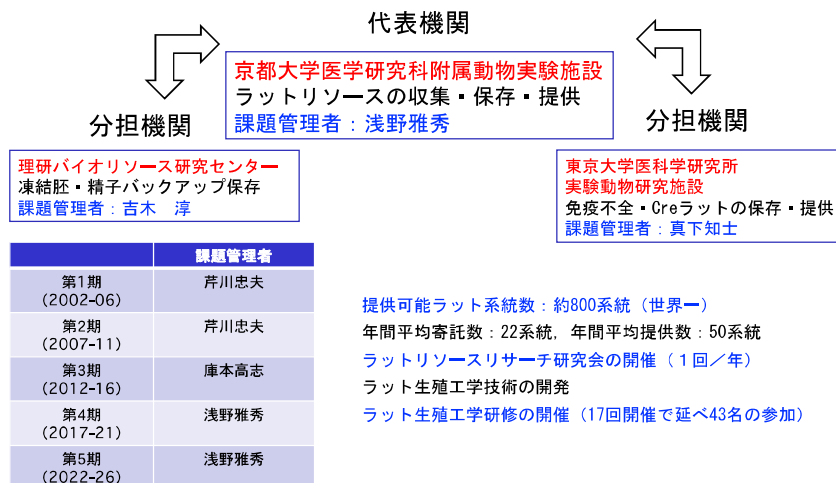
本館2階・3階（杉原）
本館地下（長尾）
P2感染・洗浄（藤井、田村）
医薬棟・がん免疫棟（中根）
微生物モニタリング（中根、長尾）
空調管理・安全衛生（中西）

国立大学法人動物実験施設協議会（国動協）
会長、副会長、総会主催（金沢大学）
高度技術研修主催（京都大学）
日本実験動物学会理事（6期12年）
安東・田嶋賞受賞（2019年）
第71回学術集会大会長（2024年）
関西実験動物研究会幹事
日本実験動物協会の認定実技試験総括
農水省拡散防止措置確認会議委員
神戸理研動物実験審査委員会外部委員

適正な動物実験の実施

（江南・動物実験委員会）

ナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）ラット



ラット生殖工学技術の開発

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（基盤技術整備：2019-2020年度）
代表機関：京大（浅野）、分担機関：理研BRC（小倉淳郎）

- 汎用的なラット系統における過排卵
- 効率的な体外受精（IVF）と産仔産生
- IVF卵を用いた簡潔なKO/KIラットの作製
- 精子凍結法の開発
- 凍結精子を用いたIVFによる産仔産生

SCIENTIFIC
REPORTS
nature research

Scientific Reports 9: 11571, 2019

Efficient derivation of knock-out
and knock-in rats using embryos
obtained by *in vitro* fertilization

Arata Honda^{1,2}, Ryoma Tachibana¹, Kazuya Hamada¹, Kohsuke Morita¹, Naoki Mizuno¹,
Kento Morita¹ & Masahide Asano¹

大学院生の教育

金沢大学時代（13年11ヶ月）

博士学位取得：6名

修士学位取得：8名

中途退学（博士）：2名（留学生1名）

京都大学時代（10年4ヶ月）

博士学位取得：2名+2名（予定）（留学生3名）

修士学位取得*：5名+1名（予定）

中途転出：2名

*生命科学研究科（松田道行教授，渡邊直樹教授）

人間健康科学研究科（岡昌吾教授）

留学後，新潟大学准教授

大阪大学准教授→東京大学教授

岩手大学准教授→大阪公立大学教授

東京農業大学教授

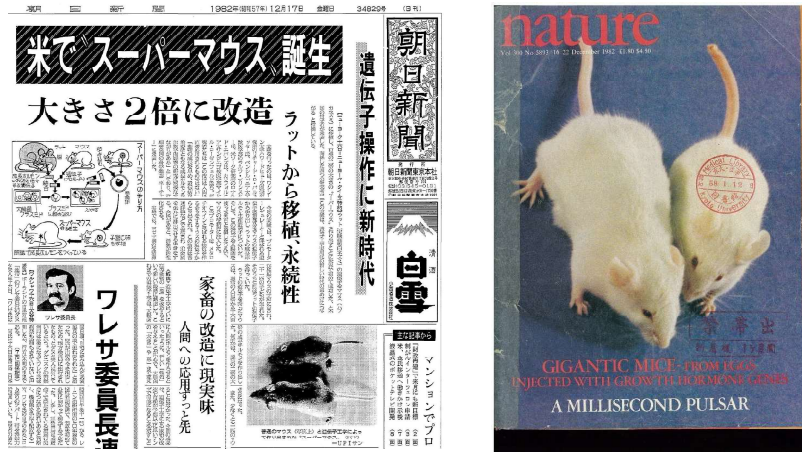
京都大学准教授

自治医科大学教授

理研BRC開発研究員

教員の輩出

スーパーマウスの登場（1982年）

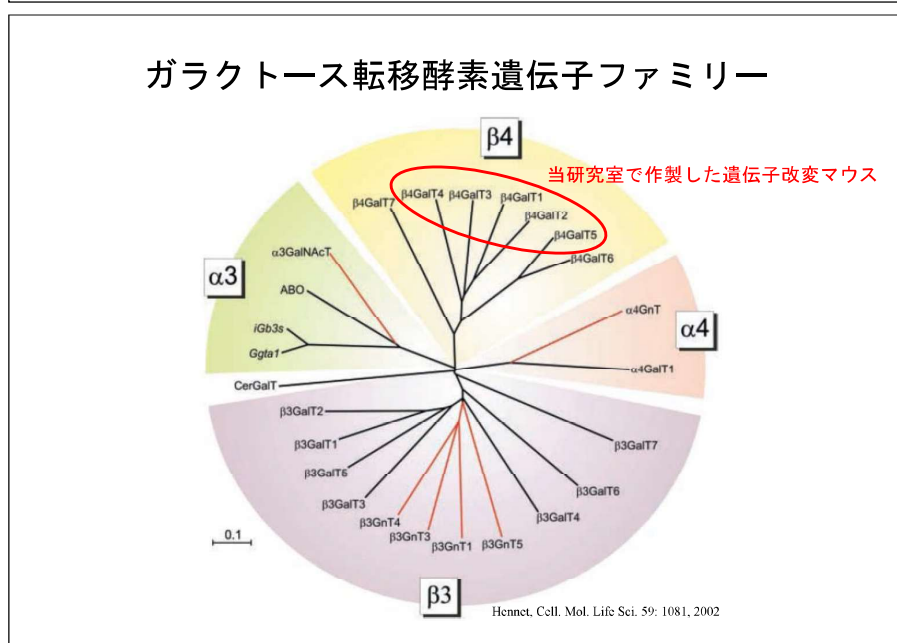
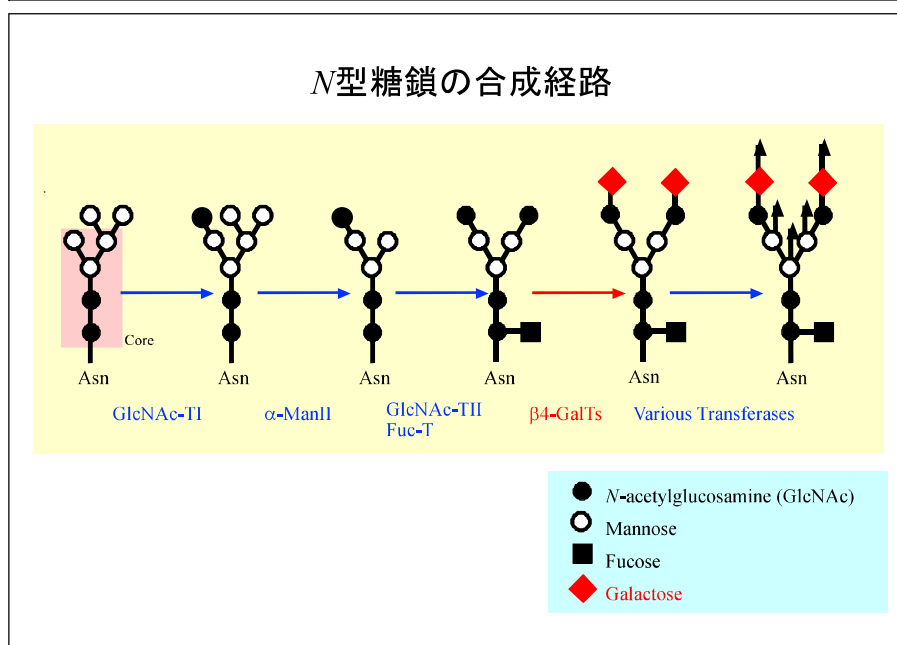
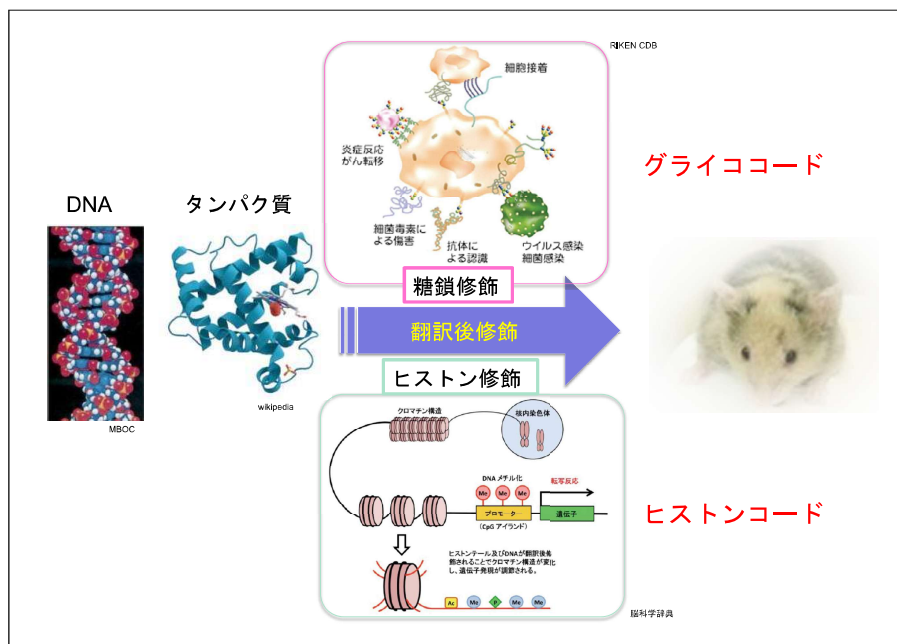


Palmiter RD, Brinster R, *et al*. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 300, 611-615 (1982).

糖鎖は様々な生命現象の鍵となっている

第125回関西実験動物研究会
平成27年3月6日

京都大学大学院医学研究科
附属動物実験施設
浅野 雅秀



発生過程における糖鎖の役割 ガングリオシドの役割 (β4GalT-5欠損マウス)

Nishie T, Hikimochi, Y *et al.* β4-galactosyltransferase-5 is a lactosylceramide synthase essential for mouse extra-embryonic development. *Glycobiology* 2010

13

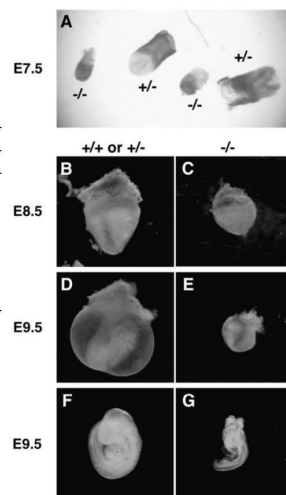
β4GalT-5欠損マウスは発生初期に致死

Table 1. Genotype of embryos from β4GalT-5 heterozygous matings

Age	No. of embryos	No. of each genotype		
		+/+	+/-	-/-
E6.5	47	16	23	8
E7.5	95	30	49	16*
E8.5	35	8	21	6*
E9.5	29	7	16	6*
E10.5	13	5	8	0
Postnatal	43	16	27	0

The genotype was determined by PCR as described in Supporting information.

*Abnormal



14

スフィンゴ糖脂質の生合成

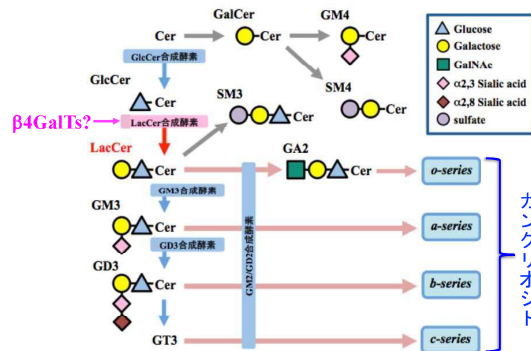
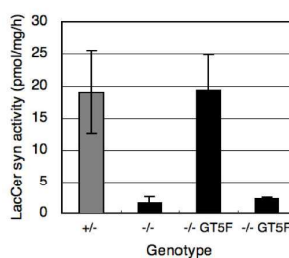


図1 スフィンゴ糖脂質の生合成経路

XEN細胞におけるLacCer合成活性



GT5F: β4GalT-5 cDNA (正方向)を導入
 GT5R: β4GalT-5 cDNA (逆方向)を導入

XEN: Extra-embryonic endoderm

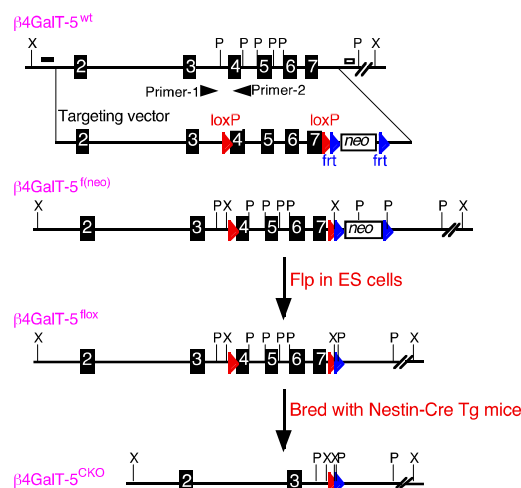
15

脳神経系における糖鎖の役割 ガングリオシドの役割 (β4GalT-5/6ダブル欠損マウス)

Yoshihara T, *et al.* Lactosylceramide synthases encoded by B4galt5 and 6 genes are pivotal for neuronal generation and myelin formation in mice. *PLOS Genetics* 2018

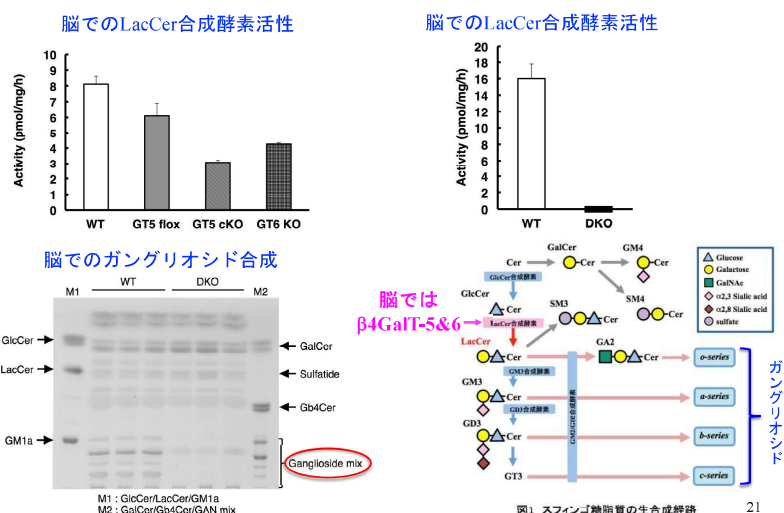
19

脳神経特異的β4GalT-5欠損マウスの作出



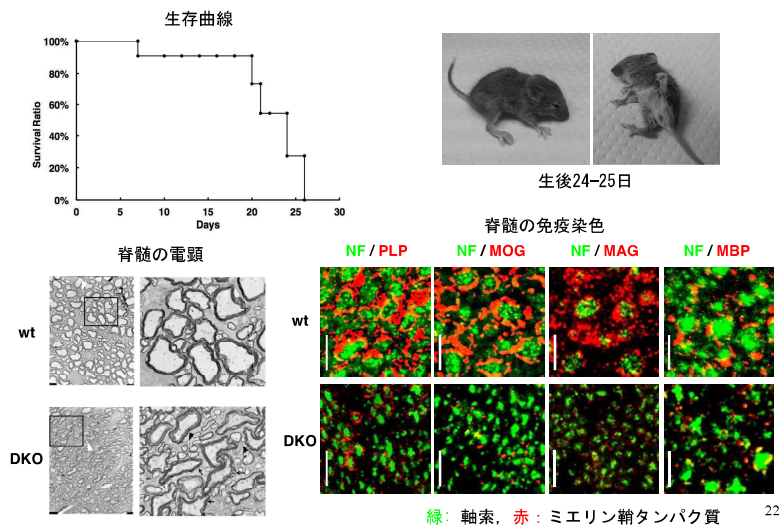
20

脳におけるLacCer合成酵素はβ4GalT-5と-6が担う

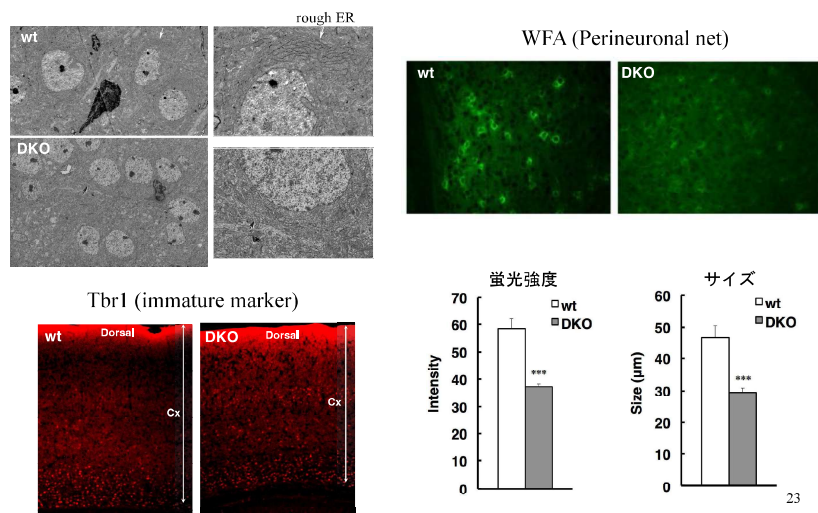


21

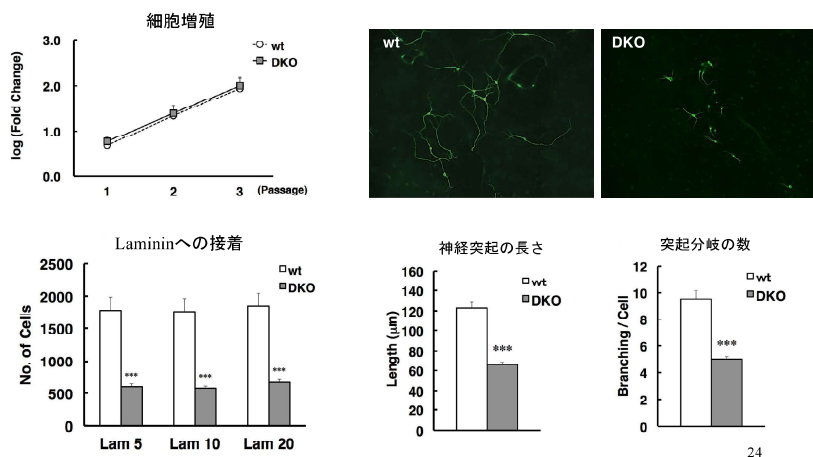
脳神経特異的 β 4GalT-5/6 DKOマウスは運動失調のため離乳前に死亡



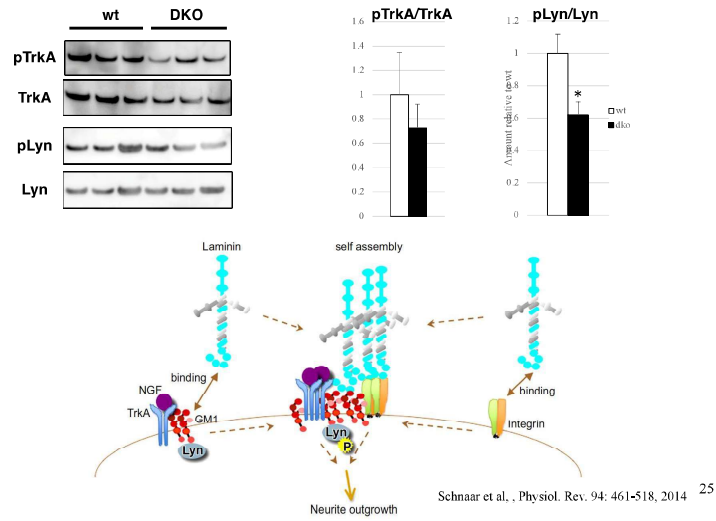
未熟な神経細胞とPerineuronal netの形成不全



DKOマウスのNeurosphereの解析



NGF/TrkAシグナル伝達の減弱

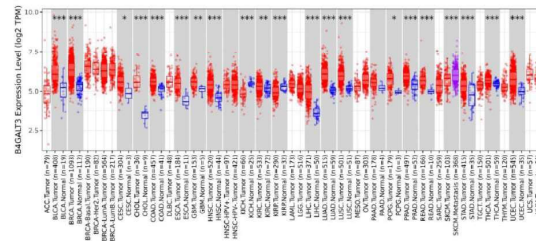


がんにおける糖鎖の役割 がん免疫（ β 4GalT-3欠損マウス）

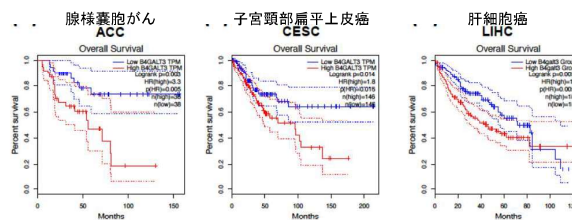
Wei H, et al. Beta-1,4-galactosyltransferase-3 deficiency suppresses the growth of immunogenic tumors in mice. *Front Immunol* 2023

26

ヒトのがんにおける β 4GalT-3発現の相関



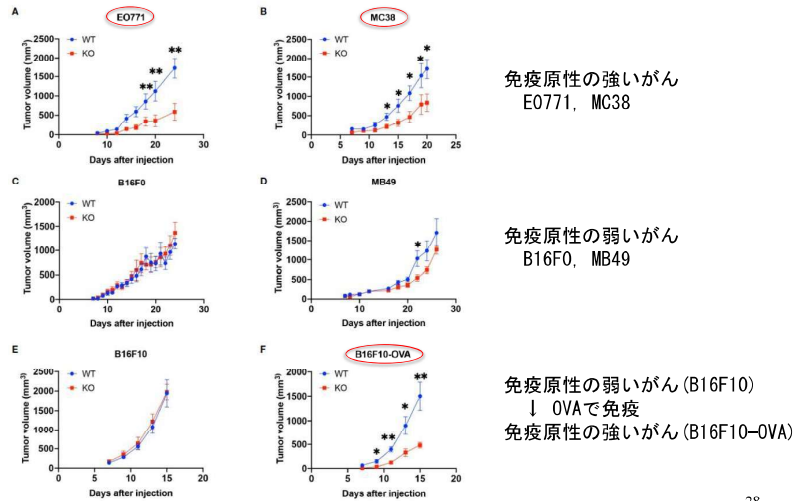
様々ながん組織（赤）において β 4GalT-3の発現がその周辺正常組織（青）より高い



β 4GalT-3の発現が高いと予後不良ながんがある

27

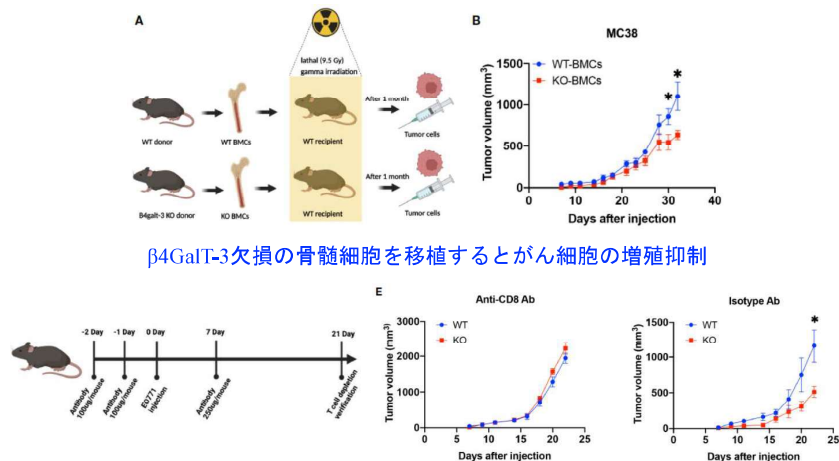
β4GalT-3欠損マウスにおける免疫原性の違いによるがん細胞の増殖



28

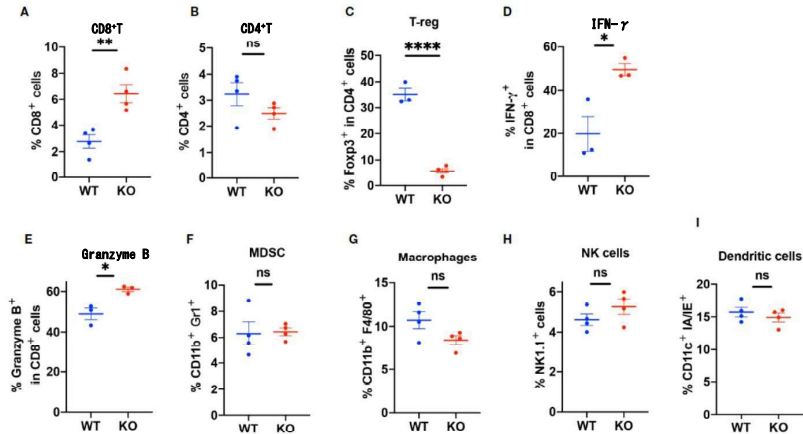
免疫原性の強いがん細胞はβ4GalT-3欠損マウスでの増殖が抑制

β4GalT-3欠損によるがん細胞増殖抑制はCD8陽性T細胞が重要



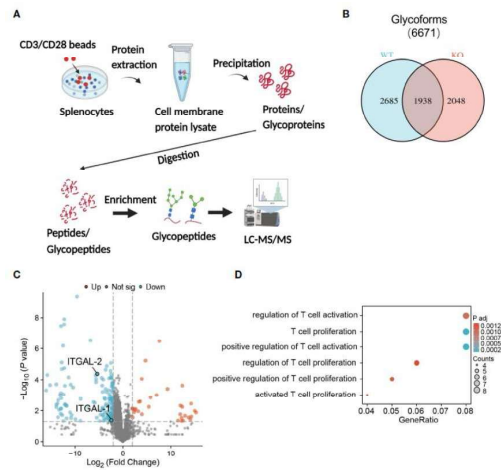
29

がん微小環境における免疫細胞の浸潤



30

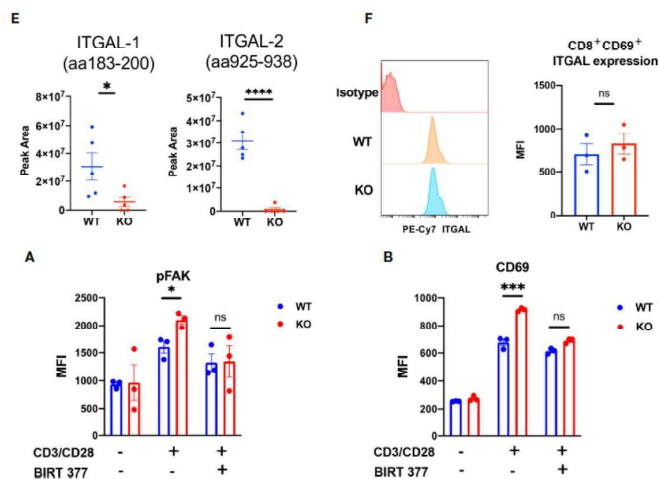
脾臓におけるグライコプロテオミクス解析



全部で6,671グライコフォーム（1,281タンパク質）を検出
CD8陽性T細胞の活性化に与するITGAL（インテグリン α L）に注目

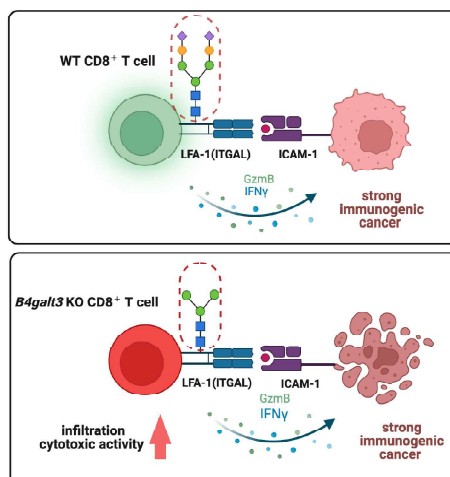
31

インテグリン α L (ITGAL) の糖鎖と下流のシグナル伝達



β 4GalT-3欠損マウスのITGALの糖鎖が減少し、下流のシグナル（pFAK）が活性化

β 4GalT-3欠損マウスにおけるがん細胞抑制メカニズムの仮説



33

造血幹細胞 (HSC) の骨髄へのホーミング (β 4GalT-1 欠損マウス)

Takagaki, S., Yamashita, R., *et al.* Galactosyl carbohydrate residues on hematopoietic stem/progenitor cells are essential for homing and engraftment to the bone marrow. *Scientific Reports* 2019

細胞接着を制御する糖鎖リガンド

確立した糖鎖リガンド

○リンパ球の末梢リンパ節へのホーミング

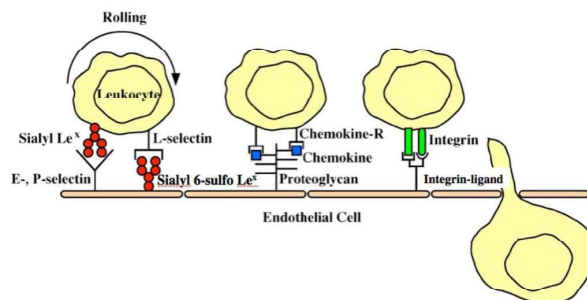
6-sulfo sialyl Le^x \Leftrightarrow L-selectin

○好中球などの炎症部位への遊走

sialyl Le^x \Leftrightarrow E-, P-selectin

糖鎖の関与が不明

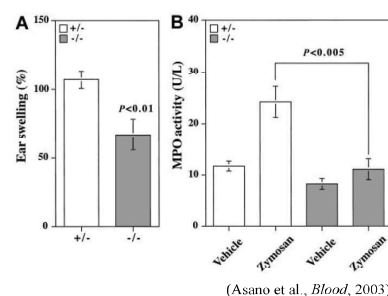
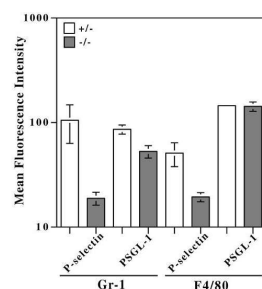
○造血幹細胞 (HSC) の骨髄へのホーミング



β -1,4-ガラクトース転移酵素-1 とセレクチンリガンド糖鎖



- β 4GalT-1 mtマウスの好中球, 単球はP-セレクチンとの結合活性が減少し, 炎症反応が減弱
- しかし, 末梢リンパ節へのリンパ球のホーミングは正常



β4GalT-1欠損骨髓細胞を移植したときの レシピエントマウスの生存率

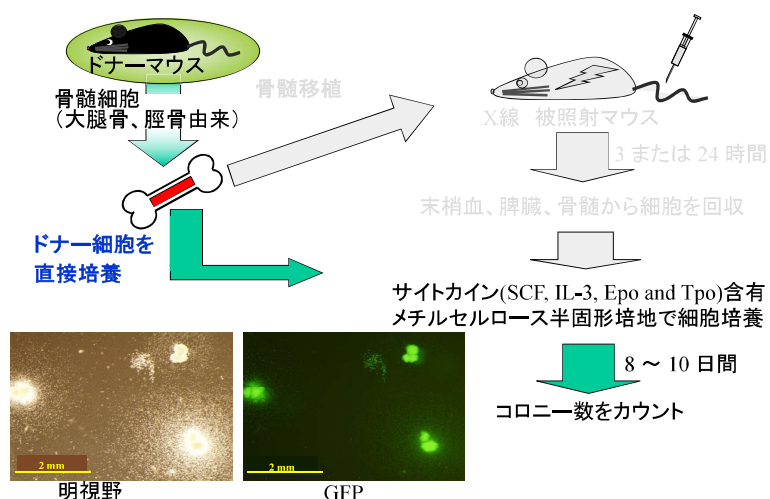
Table 1. Survival ratio of recipient mice after IV-BMT and IBM-BMT of β4GalT-1-deficient BMCs

BMT methods	Donar BMCs	Recipient mice	Survival ratio (No. of survival/No. of total)				
			0*	5*	10*	15*	60*
IV-BMT	β4GalT-1 -/-	C57BL/6 (wt)	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3
	β4GalT-1 +/-	C57BL/6 (wt)	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
	β4GalT-1 -/-	β4GalT-1 -/-	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2
	C57BL/6 (wt)	β4GalT-1 -/-	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
		C57BL/6 (wt)	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3
IBM-BMT	β4GalT-1 -/-	C57BL/6 (wt)	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4
	β4GalT-1 +/-	C57BL/6 (wt)	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
		C57BL/6 (wt)	4/4	3/4	0/4	0/4	0/4
IV-BMT	β4GalT-1 -/-	NOD/SCID	4/4	4/4	0/4	0/4	
	β4GalT-1 +/-	NOD/SCID	4/4	4/4	4/4	4/4	
		NOD/SCID	2/2	1/2	0/2	0/2	

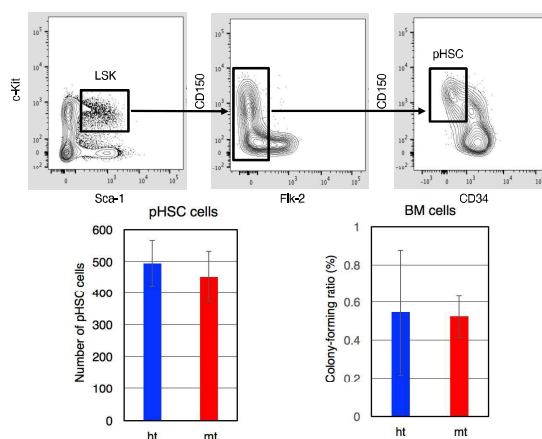
*, days after BMT

β4GalT-1欠損骨髓細胞は、骨髓移植後のレシピエントの生存を維持できない
尾静脈移植 (IV-BMT) だけでなく、骨髓内移植 (IBM-BMT) でも維持できない
免疫不全のNOD/SCIDマウスをレシピエントに用いても維持できない

ドナー骨髓細胞のコロニー形成能

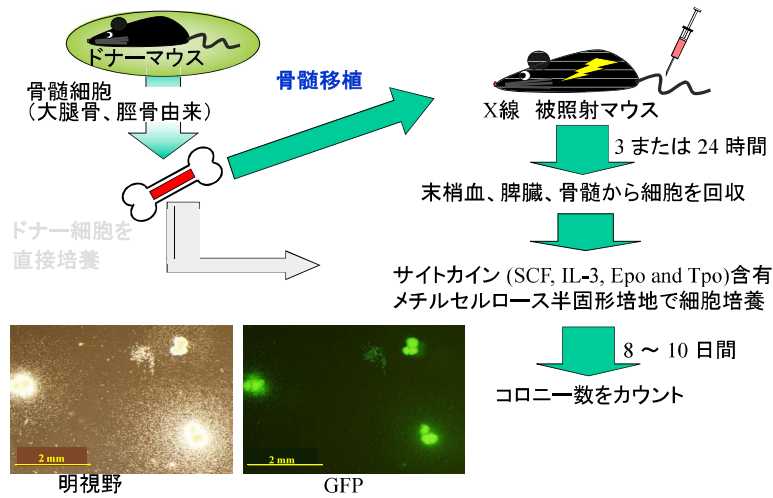


β4GalT-1欠損骨髓細胞由来のHSC

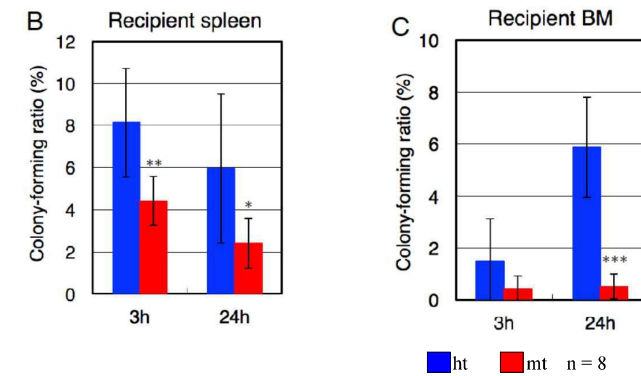


β4GalT-1欠損骨髓細胞からFACSで分離したHSCの数(左)
および骨髓細胞のコロニー形成能(右)は正常である

骨髄移植後に生着した細胞数(ホーミング活性)



生着細胞のコロニー形成率(レシピエントマウス:B6)

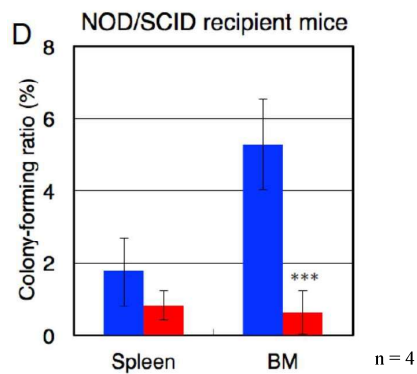


移植細胞のコロニー形成率

= レシピエント生着細胞のコロニー形成数 / ドナー骨髄細胞のコロニー形成数

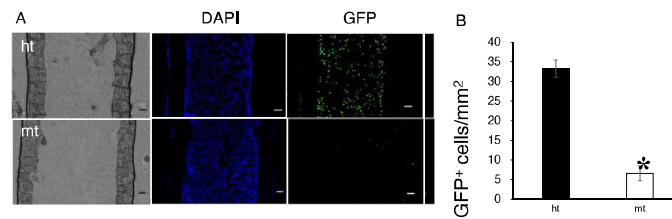
β4GalT-1欠損骨髄細胞は、レシピエント骨髄へのホーミング活性が著しく低い

生着細胞のコロニー形成率(レシピエント:NOD/SCID)



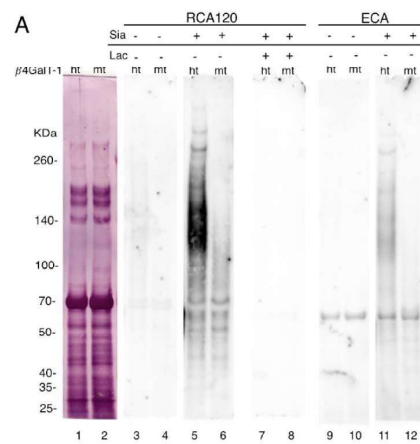
NOD/SCIDマウスをレシピエントに用いたときも
β4GalT-1欠損骨髄細胞のホーミング活性は著しく低い

GFP標識β4GalT-1欠損骨髓細胞の骨髓腔内へのホーミング



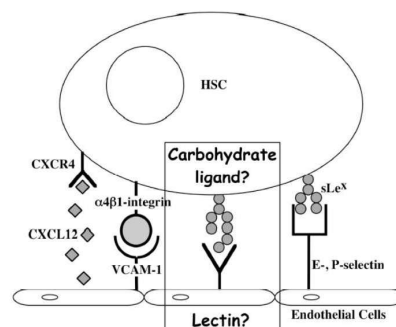
GFPで標識したβ4GalT-1欠損骨髓細胞の骨髓腔内へのホーミングをGFPで定量

Lineage陰性細胞におけるガラクトース糖鎖



β4GalT-1欠損Lin陰性細胞は、高分子糖タンパク質のガラクトース糖鎖が消失

造血幹細胞(HSC)のホーミングと糖鎖



•CXCR4
•α4β1-Integrin

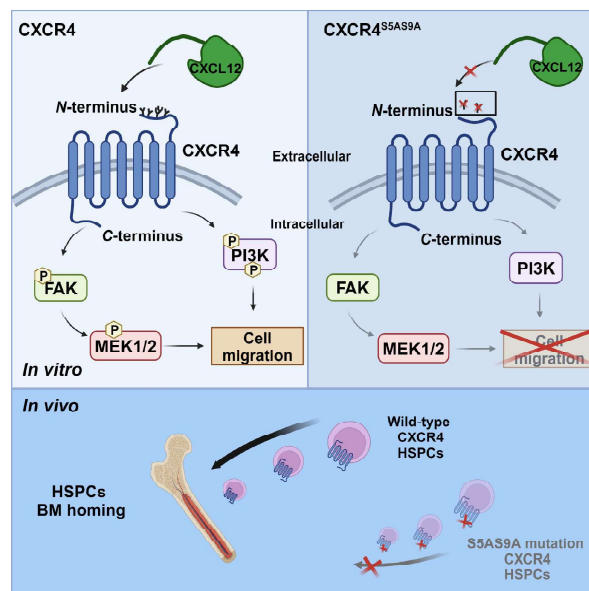
CXCR4やα4β1-Integrin欠損はホーミングに影響を与えるが、これらに付加する糖鎖がホーミングに関与している可能性

•E-,P-selectin
•FucT-IV, VII (Sialyl Lewis^x)

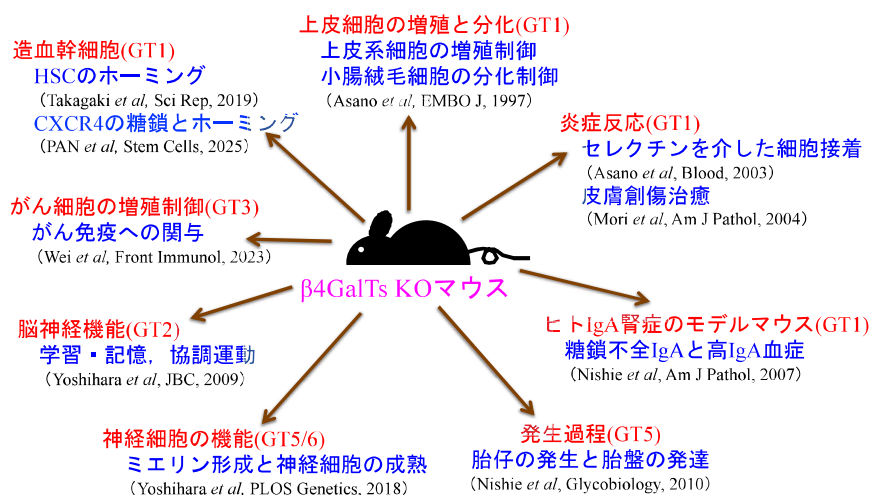
セレクトリンやそのリガンド糖鎖が欠損した場合、HSCのホーミング活性が減弱する

CXCR4のO型糖鎖がホーミングに重要 (CXCR4点変異マウス)

PAN, X., *et al.* Critical role of the potential *O*-linked glycosylation sites of CXCR4 in cell migration and bone marrow homing of hematopoietic stem progenitor cells. *Stem Cells* 2025



糖転移酵素遺伝子改変マウスから学んだ糖鎖の様々な生理機能

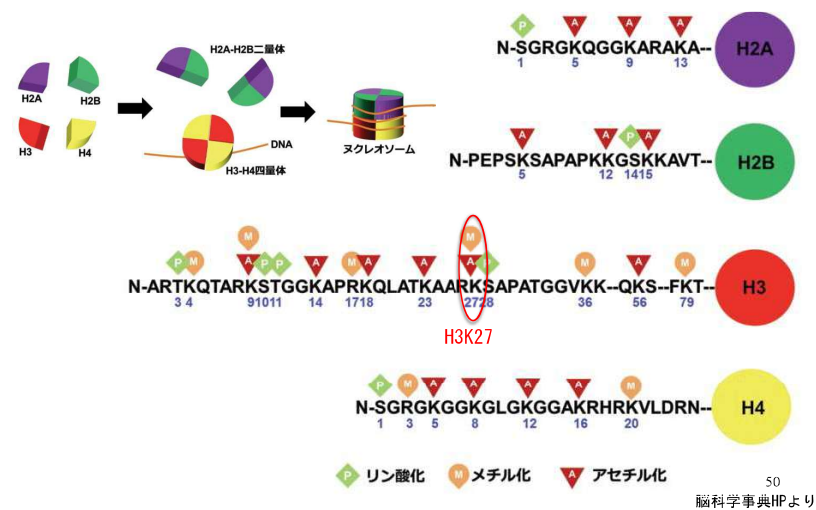


発生過程におけるヒストン修飾の役割 前後軸形成 (Jmjd3欠損マウス)

Naruse C, *et al.* New insights on the role of Jmjd3 and Utx in axial skeletal formation in mice.
FASEB Journal 2017

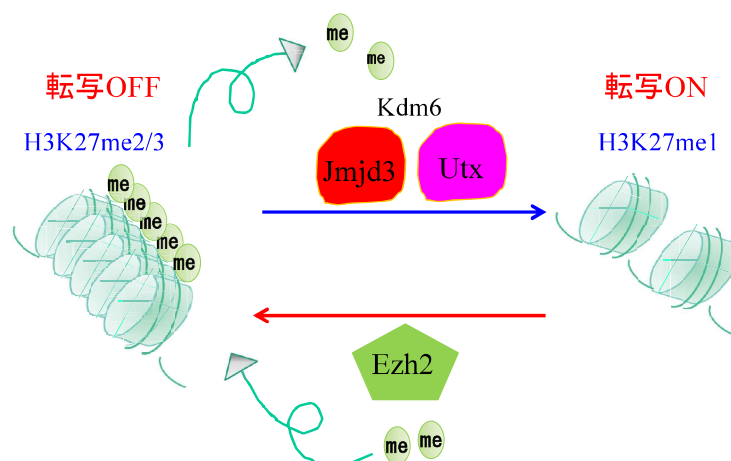
49

ヒストン修飾とヒストンコード



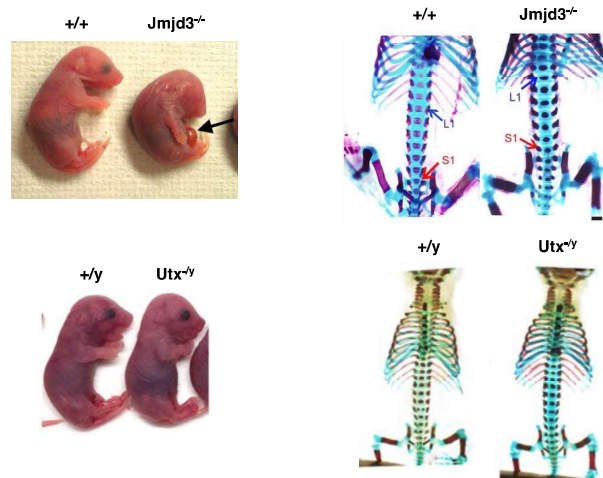
50
脳科学事典HPより

H3K27のメチル化／脱メチル化反応



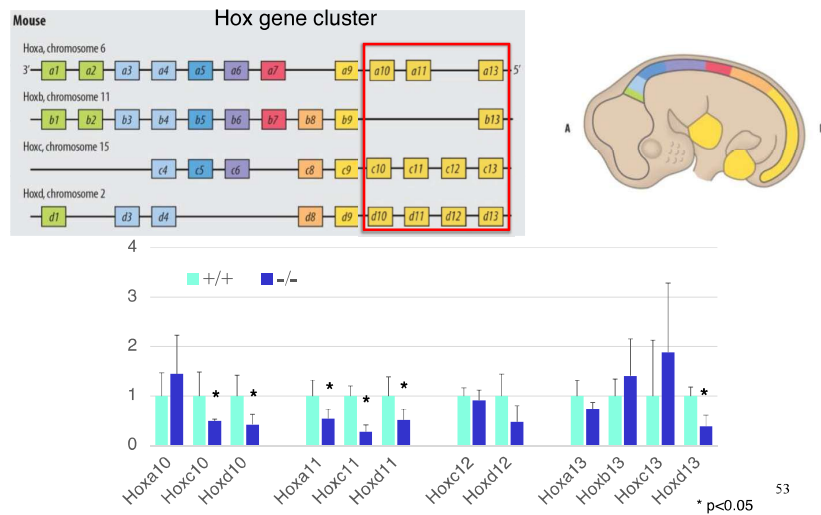
51

Jmjd3欠損胎仔：脊柱後弯症と前方ホメオティック変異
 Utx欠損胎仔：骨格形成は正常



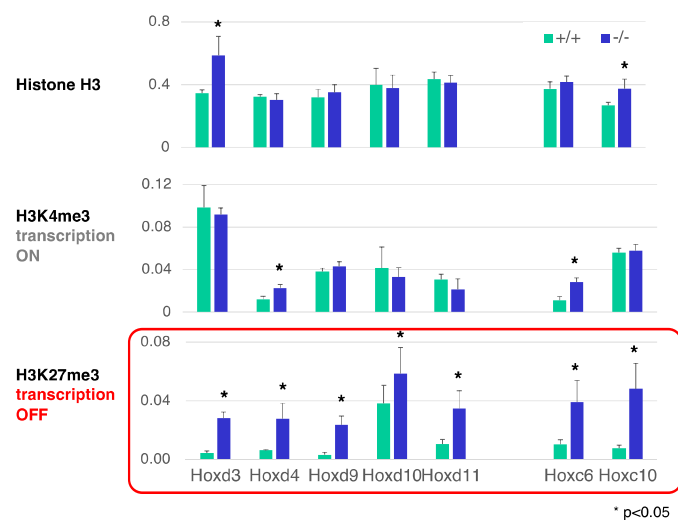
52

Jmjd3欠損胎仔における5'-Hox遺伝子群の発現低下



53

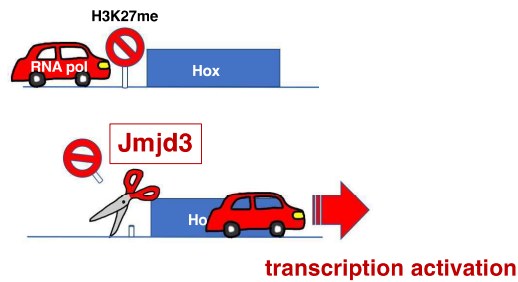
Hox遺伝子領域におけるヒストン修飾（胎生9.5日の胎仔）



54

Jmjd3研究のまとめ

- ◆Jmjd3はH3K27me3の脱メチル化活性により、Hox遺伝子群の時期特異的な発現を制御している



- ◆Utxは骨格形成やHox遺伝子群の発現制御には関与していない

55

歴代研究室メンバー

大学院生（修士学位：14+6名）：

柿内太，引持陽子，高垣聡一郎，鈴木紘史，
牧野志織，川口隆之，田畑佳祐，佐武寛之，
堀家康太，小野雅，山下莉映子，越智真由子，
池田月，馬場智子

大学院生（博士学位：8名+2名予定）：

西江敏和，福住好恭，杉原一司，安陪道代，
阿部可奈恵，伊藤光俊，西谷あい，魏恒，
PAN Xuchi，李双

スタッフ（教員）：

橋本憲佳，成瀬智恵，吉原亨，神村栄吉，
庫本高志，靱島旭

ポスドクなど：

林田直樹，柴田進和，杉原一司，横山晴香

NBRPラット：

金子武人，竹鶴裕亮，田中美有，B. Voigt
本多新，守田昂太郎，梶島克哉，井橋俊哉

共同研究者（当研究室の糖鎖研究）

東京大学・医科学研究所：

中根進，南部あや，岩倉洋一郎
小谷典弘，高崎誠一，白藤尚毅

東京都老人研：城戸正開，古川清

ヤクルト中央研究所：松本敏，梅崎良則

大阪大学・医学系研究科：

川島博人，広瀬まゆみ，宮坂昌之

金沢大学・医学系研究科：

森亮一，近藤稔和，大島徹

遠山直志，古市賢吾，和田隆志

金沢医科大学：横山仁，八田稔久

愛知医科大学：宮石理

大阪医科大学：東治人

産業総合研究所：亀山明彦，成松久

国立七尾病院：浅賀知也

京都大学・医学研究科人間健康科学：

木塚康彦，岡昌吾

九州大学・生物資源環境科学府：

沖野望，座間宏太，伊東信

名古屋大学・医学系研究科／中央大学：

徳田典代，古川圭子，古川鎮一

島根大学：大谷浩

理研BDR：宮西正憲

横浜市立大学：川崎ナナ，高倉大輔

奈良先端科学技術大学院大学：磯谷綾子



これまでお世話になった皆様と
研究の犠牲となった動物たちへ感謝

【第 157 回研究会 令和 6 年 3 月 14 日（金曜日）於：京都教育文化センター302 会議室】

＜特別講演＞

1. 「実験動物から脳の進化と生成 AI を考える」

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）

2. 「遺伝子改変マウスの解析から紐解く病原体センサーを介したサイトカイン産生誘導機構」


佐々木 泉（和歌山県立医科大学 先端医学研究所）

3. 「三毛猫遺伝子探索プロジェクト～60 年間の謎に挑む～」

佐々木 裕之（九州大学 高等研究院）

2025.03.14

害り添うところ、支える技術。

 **大阪河崎リハビリテーション大学**

●理学療法専攻 ●作業療法専攻 ●言語聴覚専攻

55

窓から火星の広野が見える書斎 の絵がすぐできる時代

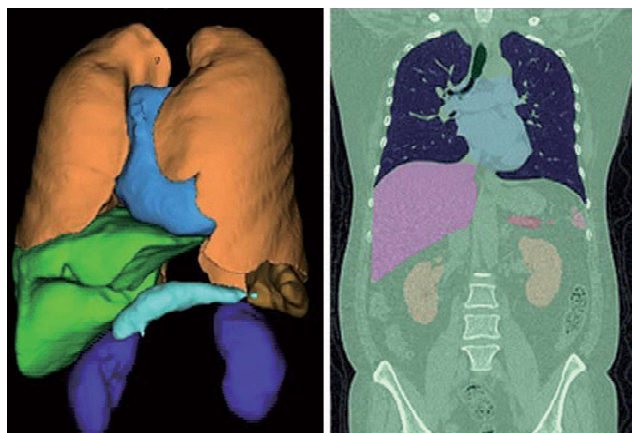


図 2-6 各臓器の切り分け (画像提供：富士フイルムメディカル)
CT画像から自動で臓器が分離されて認識されている。

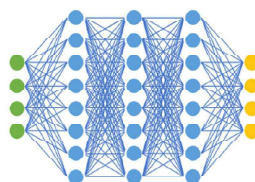
日内会誌 109：974～986, 2020 木村 通男

全てをプログラム、判断と条件分岐と結果出力、は諦めかけている

Deep Learning、深層学習 (2012)

AIに画像を分類させた

YouTubeに投稿された
ビデオの中から無作
為に一千万枚の画像



猫が分類されていた

輪郭や構成要素、全体の特徴

教師データなしで完成！

2024年のノーベル物理学賞

人工ニューラルネットワークの概念を確立して深層学習の発展に貢献
ジョン・ホップフィールドとジェフリー・ヒントン

Transformer (2017)



2010年にDeepMindを創業したデニス・ハサビス。GEORDIE WOOD

<https://wired.jp/special/2016/alphago-vs-sedol/>

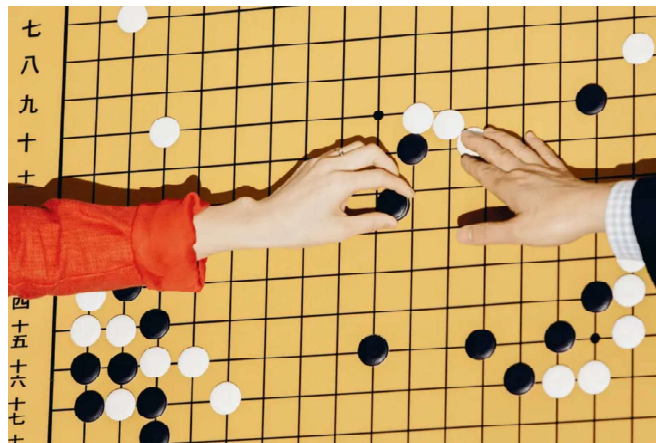
囲碁は局面分岐が多すぎて全てを計算できない→プログラム不可能

AlphaGO 自分同士で対局し勝利する様に学習

欧州チャンピオン3度のファン・ファイとの数百局の対戦でも強化したのち

2016 囲碁棋士イ・セドル九段と全5局対戦 4勝1敗

黒37手と白78手: AlphaGoとイ・セドルが再定義した「未来」



PHOTOGRAPHS BY GEORDIE WOOD

<https://wired.jp/special/2016/alphago-vs-sedol/>

Transformer (2017)

Attention Is All You Need

Ashish Vaswani*
Google Brain
avaswani@google.com

Noam Shazeer*
Google Brain
noam@google.com

Niki Parmar*
Google Research
nikip@google.com

Jacob Uszkoreit*
Google Research
usz@google.com

Llion Jones*
Google Research
llion@google.com

Aidan N. Gomez*[†]
University of Toronto
aidan@cs.toronto.edu

Lukasz Kaiser*
Google Brain
lukasz.kaiser@google.com

Illia Polosukhin*[‡]
illia.polosukhin@gmail.com

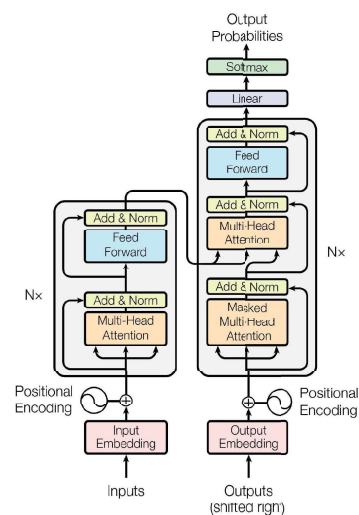


Figure 1: The Transformer - model architecture.

Transformer (2017)

周辺の文脈を加味したベクトル化、重み付け
トークン

Jordan バスケットボール

Michael

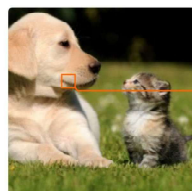
Jackson ダンス、ミュージックビデオ

単語部品の集まり→文法例に似た出力
トークン
あげまして→おめでとう

まいど→おおきに
→あり

それらしい文章にできる

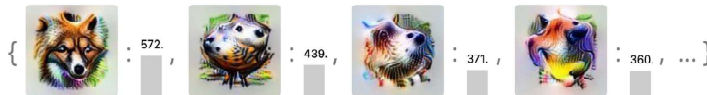
マルチモーダル！



Making sense of these activations is hard because we usually work with them as abstract vectors:

$a_{c,4} = [0, 0, 0, 92.3, 275.3, 0, 92.2, 0, 0, 0, 0, \dots]$

With feature visualization, however, we can transform this abstract vector into a more meaningful "semantic dictionary".



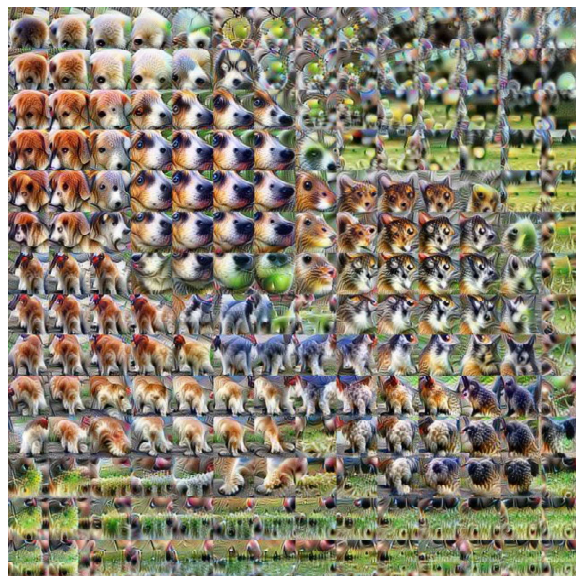
There seem to be detectors for floppy ears, dog snouts, cat heads, furry legs, and grass.

REPRODUCE IN A NOTEBOOK

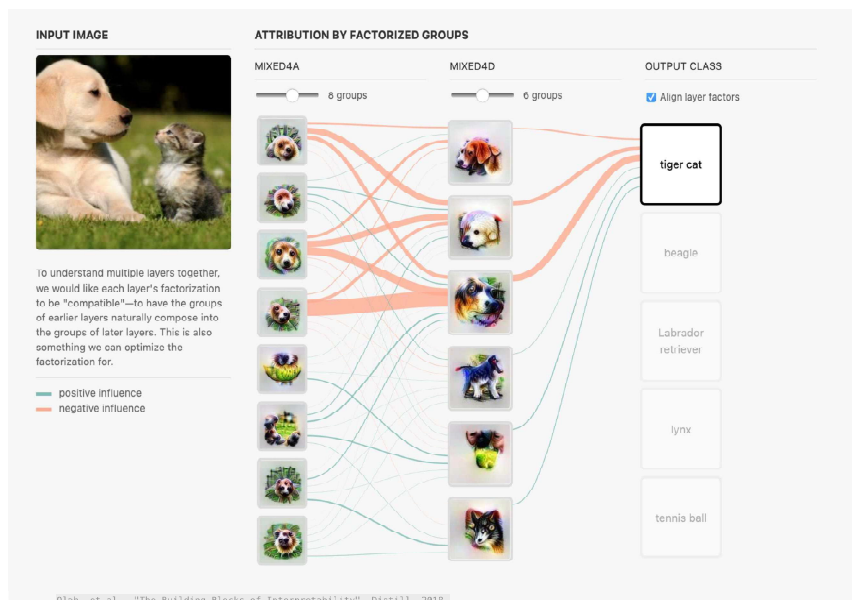
Olah, et al., "The Building Blocks of Interpretability", Distill, 2018.



並列処理



Olah, et al., "The Building Blocks of Interpretability", Distill, 2018.



大規模言語モデル

PC上へ

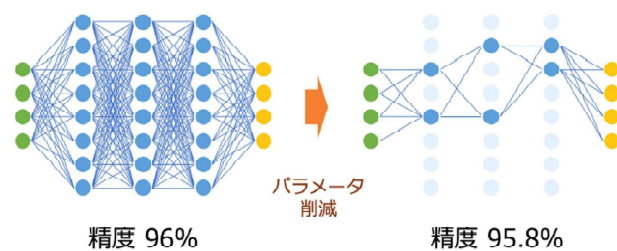


図3：高い精度を発揮するニューラルネットワーク（左）と、そのパラメータの大半を削減したニューラルネットワーク（右）。適切にパラメータを削減すれば、その精度はあまり変動しない。

<https://rad-it21.com/category/ai/>
今泉 允聡 深層学習はなぜ賢いのか？

今のAIの限界

ハルシネーション
フレーム問題

今のAIの効用

用途に応じたファインチューニング
チャット対応
既存データで対応できる範囲の問題

美味しいハンバーガーには木工用ボンド！



<https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://ii-fake.com/?pid=174450419&ved=2ahUKewiBg6f-8ZmLAXAUPUHHY8DJqQQh-wKegQIFRAD&usg=AOvVaw1BQ-dS3g-nl7vMp1omiCXT>
https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://rtrp.jp/articles/104178/&ved=2ahUKewiBg6f-8ZmLAXAUPUHHY8DJqQQh-wKegQIFhAD&usg=AOvVaw3ZM5YP5of7oYp0_-1hwxcg

今のAIの限界

ハルシネーション
フレーム問題

今のAIの効用

用途に応じたファインチューニング
チャット対応
既存データで対応できる範囲の問題

神経系

Neuron 神経

150億個

グリア細胞も含めて

1000億個くらい

遠距離で速い情報伝達

うまく生きている 大脳

たくましく 辺縁系
生きている

まずは生きている 脳幹

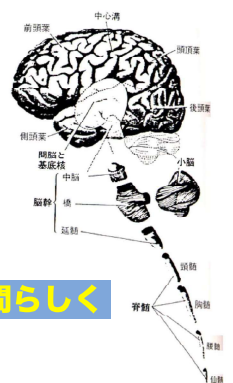
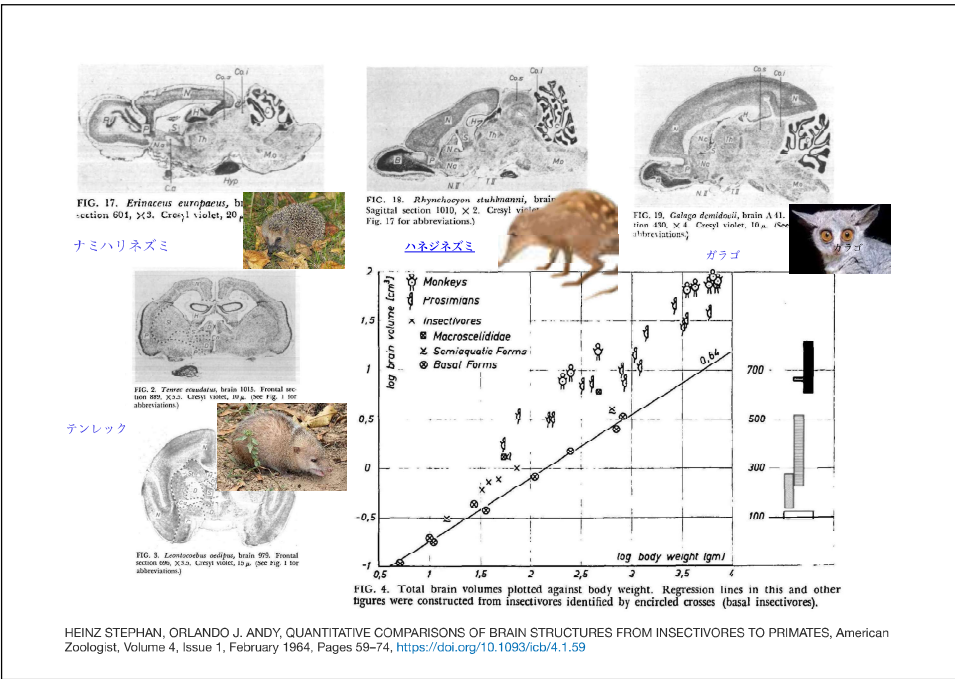
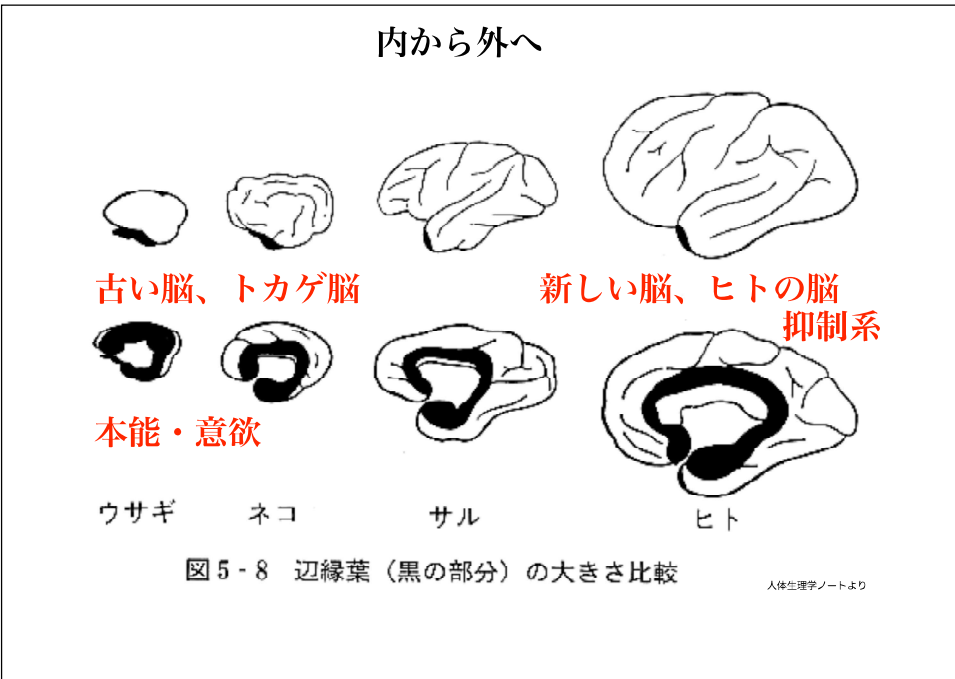
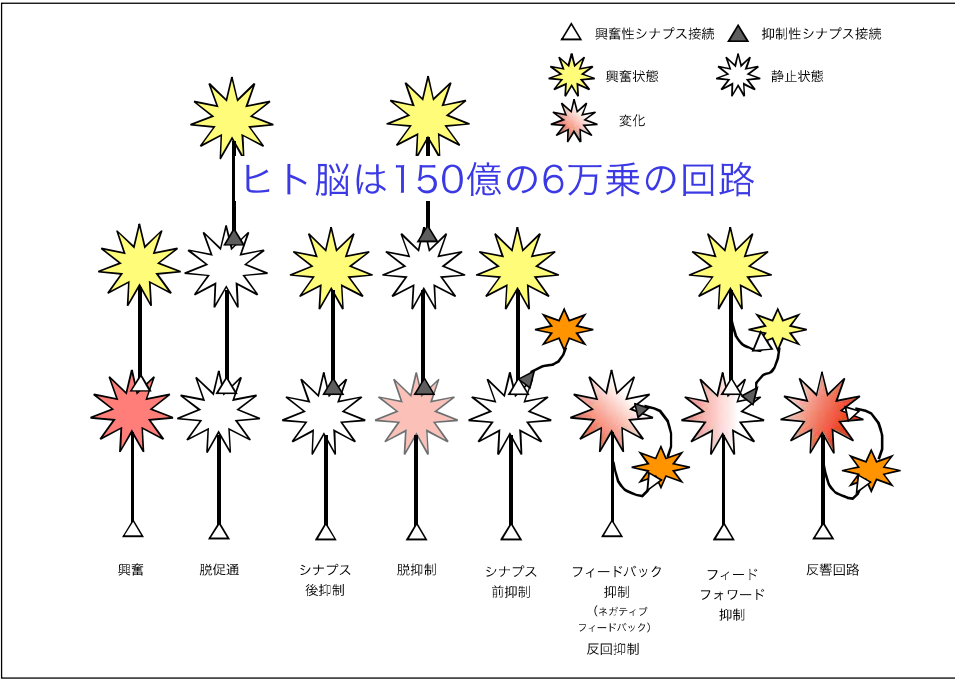


図 3-1 神経系の構成
(Kandel, E.R., et al.: Principles of neural science
p.6, 1981 より)

資料提供: 大森 実 (大阪河崎リハビリテーション大学)
大阪河崎リハビリテーション大学
理学療法学科 理学療法専攻 理学療法学科 理学療法専攻



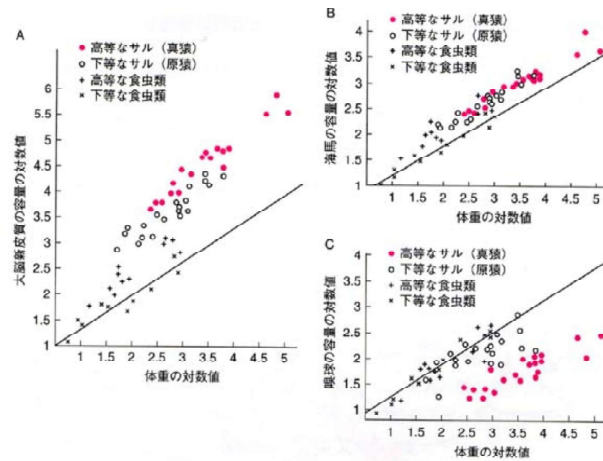


図1 哺乳類における大脳新皮質 (A)、海馬 (B)、嗅球 (C) の系統比較。高等なサル (真猿) をピンクで表示してある。真猿の大脳新皮質は下等なサル (原猿) に比較して体重比でより大きい。古い皮質である海馬は真猿と原猿で殆ど差がない。嗅球は真猿で体重比が最も小さい。縦軸、横軸ともに対数軸。(Stephans, 1969を改変)

http://web2.chubu-gu.ac.jp/web_labo/mikami/brain/08-2/

脳って何

braegen パピルス (紀元前17世紀)

-> brain

穿孔術 脳が生命に直結、悪い水、頭痛

ヒポクラテス (紀元前460-379)

脳は知性の座

アリストテレス (紀元前384-322)

心臓に精神が宿る、脳はラジエーター

ガレヌス (ローマ 130-200)

大脳は感覚受容、小脳は運動統御

脳室 脳脊髄液 脳は腺, 体液(humor)

ブローカ (1861) わかるがしゃべれない

脳 動かない器官 → 機能不明

それよりも心臓 → 心 (精神活動)

ガルの骨相学 前額の発達と言語

脳はひとかたまり ⇔ 機能局在

ブローカ 1861

右片麻痺、失語 → 左前頭葉に脳梗塞

8例とも左半球に病変 1863 8 : 0 ?

10例+他の15例 1865

すべて左半球 脳梗塞、外傷あるいは腫瘍

「われわれは左半球でしゃべっている」

1900年代 ゲシュタルト心理学勃興

脳は全体で一つ

全対論 ⇔ 機能局在 マイナーに

1965 ゲシュウインド Norman Geschwind

Broca, Wernicke, Dejerine (角回) らの

再評価

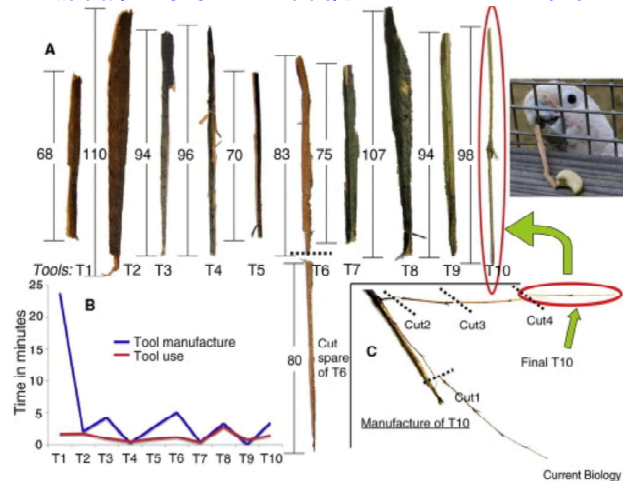
1970 C T scan 広まる

1990 MRI 広まる

特定脳領域の障害と症状

の関係がより明確に

大脳新皮質が6層構造なくても賢い！



Auersperg, A.M.I., B. Szabo, A.M.P. von Bayern, et al., Spontaneous innovation in tool manufacture and use in a Goffin's cockatoo. Current Biology, 2012, 22(21): p. R903-R904.

ヒトはこの世界にどう対応しているか

神経系

Neuron 神経

150億個

グリア細胞も含めて

1000億個くらい

遠距離で速い情報伝達

うまく生きている 配線だけ 大脳

たくましく 辺縁系
生きている

まずは生きている 脳幹

遺伝子で完成

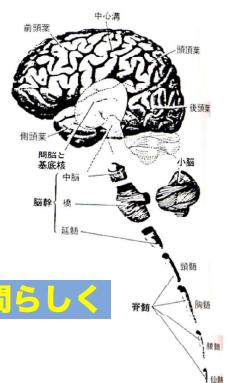
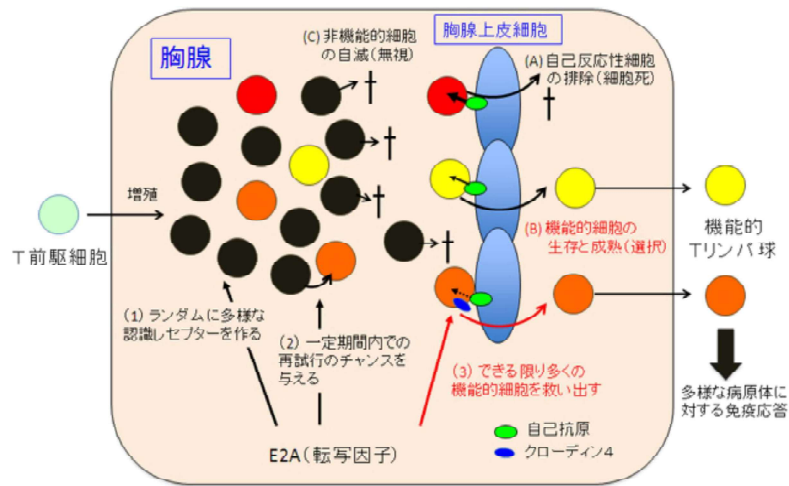


図3-1 神経系の構成
(Kandel, E.R., et al.: Principles of neural science
p.6, 1981 より)

資料提供先: 大阪河崎リハビリテーション大学
大阪河崎リハビリテーション大学
大阪河崎リハビリテーション大学



10^{10} 10^8
 免疫、腎機能など 準備して学習選択
https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/archive/prev/news_data/h/h より改変

脳の限界

毎世代0から教育

ハルシネーション（陰謀論）
 フレーム問題（理解の壁）
 正解の出せない問題への対処

脳の全容はまだ理解されていない

汎用人工知能AGIは未だ？ 今のAIの限界

ハルシネーション
 フレーム問題
 正解がない問題？

身体モデルからアフォーダンス、
 入力パラメータを増やすと何か起こるかも

今のAIの効用

用途に応じたファインチューニング deepseek
 チャット対応 ロボット三原則
 既存データで対応できる範囲の問題

遺伝子改変マウスの解析から紐解く病原体センサーを介した サイトカイン産生誘導機構

佐々木 泉

和歌山県立医科大学 先端医学研究所 生体調節機構研究部

はじめに

樹状細胞やマクロファージは自然免疫担当細胞であり、病原体センサーを介して外来微生物の構成成分を認識し、インターフェロン（interferon: IFN）や炎症性サイトカインの産生を誘導する。この応答は、T細胞やB細胞の活性化すなわち獲得免疫応答の誘導に必要であり、感染微生物の排除や癌に対する防御免疫応答の誘導に必須の役割を果たす。一方で、病原体センサーは自己由来の成分にも応答し、過剰に産生されたサイトカインは、全身性エリテマトーデスに代表される自己免疫疾患や、糖尿病などの慢性炎症性疾患の病態に密接に関与する。さらに近年、病原体センサー自身の遺伝子変異（バリエーション）により、リガンドが無くても自発的にサイトカインが産生され炎症病態を呈する、いわゆる自己炎症性疾患が生じることもわかってきた。このように病原体センサーを介したサイトカイン産生誘導は功の側面と罪の側面があり、その誘導機構に関与する分子細胞基盤を明らかにすることは非常に重要であるが、依然として不明な部分が多い。我々はこれまで、種々の遺伝子改変マウスを用いて、樹状細胞やマクロファージにおける病原体センサーを介したサイトカイン産生誘導機構を明らかにしてきた。本稿では、その研究内容について紹介する。

核酸センサーを介した形質細胞様樹状細胞からの I 型 IFN 産生誘導機構

形質細胞様樹状細胞（plasmacytoid dendritic cells: pDC）は、ヒトとマウスに共通して存在する樹状細胞サブセットであり、核酸センサーTLR7/9 を介して大量の I 型 IFN を産生するという機能特性がある。この機能特性は、ウイルス由来の核酸を認識した場合はウイルス感染防御に、宿主由来の核酸を認識した場合は自己免疫疾患の病態形成に関与する。我々は、pDCにおいてETSファミリー転写因子SPIBが高発現していることに着目し、SPIBがIRFファミリー転写因子IRF7と相互作用し協調してI型IFNの

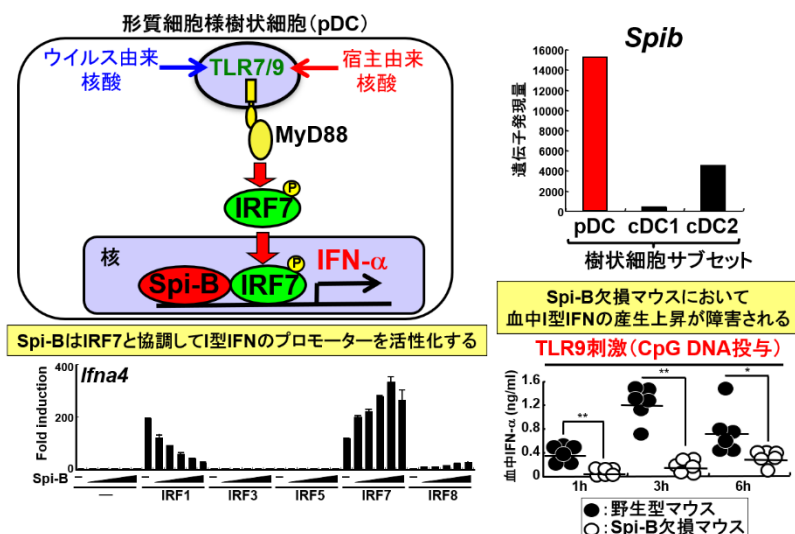


図1. 形質細胞様樹状細胞からのI型IFN産生誘導における転写因子Spi-Bの役割

プロモーターを活性化すること、SPIB 欠損マウスにおいて TLR7/9 リガンドによる pDC からの I 型 IFN 産生誘導や血中 I 型 IFN レベル上昇が著しく障害されていることを見出した (図 1)。すなわち、SPIB は pDC からの I 型 IFN 産生誘導に必須の役割を果たしていることが明らかとなった¹⁾。

細胞内病原体センサーを介した組織常在マクロファージからの炎症性サイトカインインターロイキン-1 β 産生誘導機構

マクロファージは病原体を貪食すると共に、様々な炎症性サイトカインを産生し炎症反応を引き起こす。インターロイキン-1 β (interleukin-1 β : IL-1 β) は、マクロファージが産生する代表的な炎症性サイトカインであり、まず、病原体センサーである Toll 様受容体などの刺激により IL-1 β 前駆体遺伝子の発現が亢進し、IL-1 β 前駆体タンパクとして産生される。しかし、この IL-1 β 前駆体タンパクは炎症誘導活性を持っていない不活性型であり、インフラマソームにより切断されてはじめて活性型の IL-1 β として炎症誘導活性を発揮できるようになる。インフラマソームは、病原体センサー、タンパク質切断酵素 (Pro-caspase-1)、およびその両者を連結させるアダプター分子 ASC から構成され、病原体センサーの名を冠して NLRP3 インフラマソームや Pyrin インフラマソームなどと呼称され、そのセンサーが認識する刺激に応答し機能する。インフラマソームは、病原体由来の構成成分や毒素ばかりでなく、生体内の代謝産物である尿酸、コレステロール、膵島由来ペプチドにも応答することにより、微生物感染への防御反応や、痛風・動脈硬化・糖尿病などの炎症性疾患の病態形成にも関与する。また、インフラマソームの構成因子の遺伝子変異 (バリエーション) により、クリオピリン関連周期熱症候群や家族性地中海熱などの自己炎症性疾患が生じることもわかってきている。さらに、コレステロール経路の代謝酵素 (メバロン酸キナーゼ) や細胞内タンパク質輸送を制御する機能分子 (Cdc42) などインフラマソーム以外の機能分子の遺伝子バリエーションによっても、インフラマソームが活性化され、自己炎症性疾患を来すことがわかってきており、新規のインフラマソーム制御機構が明らかになりつつある。このように、インフラマソームの活性化は様々な病態に密接に関与しているが、その分子細胞基盤に関しては不明な部分が多い。

我々はこれまで、コレラ菌由来の毒素、コレラ毒素 (Cholera toxin: CT) の免疫増強 (免疫アジュバント) 機能に着目し、その作用機構にインフラマソームが関与することを明らかにしてきた^{2), 3)}。コレラ毒素は、腸管上皮細胞に作用し下痢を引き起こす A サブユニット (CTA) と、細胞膜上の糖脂質ガングリオシド GM1 (以下、GM1) に結合し CT を細胞内に導入させる B サブユニット (CTB) から構成されている。CT は、マウスの腹腔に常在するマクロファージ (以下、腹腔常在マクロファージ) に作用し、リポ多糖 (lipopolysaccharides: LPS) と協調して IL-1 β の産生を誘導する。この IL-1 β の産生誘導に、NLRP3、Pyrin を病原体センサーとして含む 2 つのインフラマソームが関与することを明らかにした。しかし、CT がどのようにインフラマソームを活性化するのかは不明なままであった。

今回、この点を明らかにするため、LPS で刺激した腹腔常在マクロファージにおいて、CT により誘導される遺伝子群の網羅的解析 (RNA シークエンス) を行った。その結果、

CT の刺激で 2 倍以上発現が上昇する遺伝子が 853 個得られ、その中には小胞体ストレス応答により誘導される遺伝子が数多く含まれていた。この結果から、CT は腹腔常在マクロファージに作用し、小胞体ストレス応答を誘導することが明らかになった。タンパク質は合成された後、小胞体で正しく折りたたまれ、機能する。正しく折りたたまれず異常な構造を取ったタンパク質や、細胞に取り込まれた毒素が小胞体内で蓄積すると、Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) や inositol-requiring enzyme 1-alpha (IRE1α) などの小胞体ストレスセンサーが活性化され、タンパク質の分解処理や合成停止に関与する機能分子群の遺伝子発現が亢進するなど、小胞体ストレス応答と呼ばれる経路が活性化される。そこで、CT による小胞体ストレス応答の誘導に、糖脂質 GM1 を介した小胞体内への侵入が必要かどうか、GM1 欠損マウスを用いて解析した。その結果、野生型腹腔常在マクロファージでは、CT が小胞体内へ侵入し、小胞体ストレス応答遺伝子群の発現が顕著に誘導されたが、GM1 欠損腹腔常在マクロファージでは、CT は小胞体内には検出されず、小胞体ストレス応答遺伝子群の発現も全く認められなかった。以上の結果から、CT は糖脂質 GM1 を介して小胞体内へ侵入、蓄積し、小胞体ストレス応答を誘導していることが明らかとなった。

次に、小胞体ストレスセンサー PERK と IRE1α のどちらが CT による IL-1β 産生誘導に関与するかを明らかにするため、それぞれのセンサーの阻害剤を用いて検討した。その結果、PERK 阻害剤ではなく IRE1α 阻害剤の添加により、CT による IL-1β 産生誘導が顕著に阻害された。このことから PERK ではなく IRE1α が CT による IL-1β 産生誘導に関与することが示唆された。さらに、生体内での IRE1α の役割を明らかにするために、マクロファージ特異的に IRE1α を欠損するマウスを作製し、腹腔常在マクロファージを解析したところ、CT による IL-1β 産生誘導が有意に障害されていた。以上の結果から、CT で刺激された腹腔常在マクロファージにおける小胞体ストレス応答の誘導には IRE1α が必須であること、この IRE1α の活性化が CT による IL-1β 産生誘導に必要であることが明らかとなった。

CT は、NLRP3、Pyrin 両方のインフラマソームを活性化する。そこで最後に、IRE1α がどちらのインフラマソーム活性に関与しているのかを明らかにするために、IRE1α 欠損腹腔常在マクロファージを用いて、NLRP3 インフラマソームの活性化因子アデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate: ATP)、Pyrin インフラマソームの活性化因子クロストリジウム毒素 (*Clostridium difficile* toxin B: TcdB) それぞれの IL-1β 産生誘導能を解析した。その結果、ATP、TcdB いずれの IL-

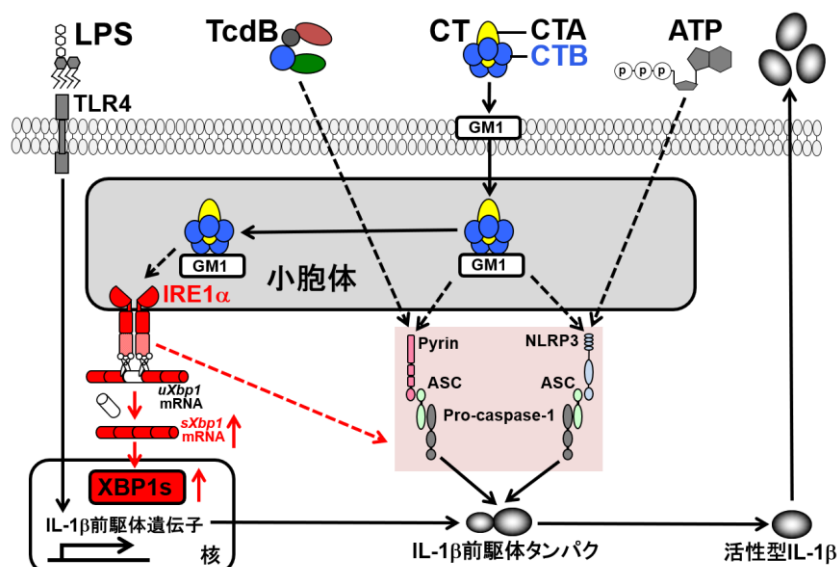


図2. 腹腔常在マクロファージにおける細胞内病原体センサーを介したIL-1β産生誘導機構

1 β 産生誘導能も有意に障害されることが明らかになった。これらの結果から、小胞体ストレスセンサーIRE1 α は、NLRP3、Pyrin 両方のインフラマソームの活性化に必要であることがわかった (図 2) ⁴⁾。

小胞体ストレス応答は、生体にとって有害な構造異常タンパク質を探知し排除することによりタンパク質の品質を管理する機構であり、IRE1 α はこの応答に必須の膜貫通分子である。本研究により、生体内マクロファージにおいてタンパク質品質管理機構と IL-1 β 産生誘導機構がクロストークしている可能性が示唆された。本研究で着目したマウス腹腔常在マクロファージは、生物種を超えて保存されており、ヒトの腹腔にも対応するマクロファージが常在している ⁵⁾。今回、このマクロファージにおいて、炎症性サイトカインの産生における小胞体ストレスセンサーの役割が明らかになったことから、今後、ヒトの種々の慢性炎症性疾患や自己炎症性疾患の病態解明が進み、新規炎症制御薬の開発に繋がることが期待される。

おわりに

遺伝子改変マウスを用いた解析により、病原体センサーを介したサイトカイン産生誘導機構に関与する機能分子が次々と明らかになっていった。近年では CRISPR/Cas9 システムにより遺伝子変異 (バリエーション) 導入マウスの作製も可能となり、種々の自己炎症性疾患モデルマウスが作製・解析されるようになり、病原体センサーの病理的意義も明らかになりつつある。iPS 細胞やオルガノイド技術も進展し、様々なヒト由来の自然免疫担当細胞が作製されている。しかし、これらの技術で腹腔常在マクロファージのような組織常在マクロファージを作製することは依然として難しい。この現状を鑑みると、生体内のマクロファージや樹状細胞の生理的意義にアプローチすることができる遺伝子改変マウスの研究は依然として重要であり、様々な難治性疾患の新規治療薬を開発する上で大変有用であると思われる。我々も引き続き、病原体センサーを介したサイトカイン産生誘導機構に関与する分子細胞基盤を明らかにし、ヒト疾患の治療に貢献していきたいと考えている。

本稿を終えるにあたり、このような発表の機会を頂きました磯野協一先生、横井伯英先生および関西実験動物研究会の諸先生方に心より感謝申し上げます。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。

文献

1. Sasaki, I., Hoshino, K. *et al.* Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood* 120, 4733-43 (2012).
2. Orimo, T., Sasaki, I. *et al.* Cholera toxin B induces interleukin-1 β production from resident peritoneal macrophages through the pyrin inflammasome as well as the NLRP3 inflammasome. *International immunology* 31, 657-668 (2019).
3. Sasaki, I. & Kaisho, T. Preparation and Inflammasome Activation of Murine Bone Marrow-Derived and Resident Peritoneal Macrophages. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2427, 95-104 (2022).

4. Sasaki, I., Fukuda-Ohta, Y. *et al.* A stress sensor, IRE1 α , is required for bacterial-exotoxin-induced interleukin-1 β production in tissue-resident macrophages. *Cell reports* 43, 113981 (2024).
5. Han, J., Gallerand, A. *et al.* Human serous cavity macrophages and dendritic cells possess counterparts in the mouse with a distinct distribution between species. *Nature Immunology* 25, 155-165 (2024).

三毛猫遺伝子探索プロジェクト ～60年間の謎に挑む～

佐々木裕之

九州大学・名誉教授

九州大学高等研究院・特別主幹教授

理化学研究所・客員主幹研究員

1. はじめに

三毛猫とサビ猫はほぼ全て雌である。これはイエネコの黒/オレンジの毛色を決める「オレンジ遺伝子」がX染色体上に存在することに起因する（文献1-3）。すなわち、雄はX染色体を一本しか持たないため黒又はオレンジの一方の対立遺伝子しか持ちえないが、ヘテロ接合体の雌は両方の毛色を発現することができる。1961年、Mary Lyonは、雌の細胞では発生の初期に一方のX染色体がランダムに選ばれて不活性化されるとする「ランダムX不活性化説」を提唱し、この原理に基づけばサビ猫における黒/オレンジの斑状の毛色パターンが説明できるとした（文献4）。しかし、オレンジ遺伝子の発見から約120年、ランダムX不活性化の提唱から60年を経ても、オレンジ遺伝子（及びコードするタンパク質）の分子的な実体は明らかでなかった。そこで我々はイエネコのオレンジ遺伝子を特定するためのプロジェクトを開始した。なお、本項の内容は最近発表した原著論文に詳しいので、詳細についてはそちらを参照していただければ幸いである（文献5）。

2. 結果

イエネコX染色体上のオレンジ遺伝子は、何らかのメカニズムで被毛中のユウメラニン（黒色の色素）とフェオメラニン（オレンジの色素）の比率を変える働きをすると考えられる。過去の研究により、オレンジ遺伝子はX染色体上の1.5 Mbほどの領域内にあることが示されているが（文献6,7）、その領域に色素の合成や代謝に関連する既知の遺伝子は存在していなかった。我々は福岡市内の動物病院の協力を得て、様々な毛色のネコ18個体のゲノムをシーケンシングした。その結果、オレンジ毛をもつ猫（三毛猫8個体、サビ猫1個体、オレンジ1個体）において特異的に、X染色体上の*ARHGAP36*遺伝子のイントロン内のDNA配列が5.1 kbに渡り欠失していることを見つけた。興味深いことに、Lyonが予測した通り三毛猫とサビ猫は全てこの欠失に関するヘテロ接合体であった。データベース上の海外の猫のデータでも同一の欠失が見られた。さらに、40個体以上を対象にしたPCR法による追加解析においても、この欠失の有無がオレンジ/黒の毛色と例外なく一致することが示された。興味深いことに、稀な雄の三毛猫の1例では、野生型の配列とこの欠失を両方とも持っており（ヘテロ接合体）、X染色体の異数性が裏付けられた。欠失領域には動物種を超えて高度に保存された配列（ultra-conserved elementとして知られる）が含まれており、この配列が遺伝子の転写制御領域として機能することが示唆された。

次に亡くなった三毛猫の皮膚組織の提供を受けることができたので、異なる毛色の領域をそれぞれ複数箇所用いてRNAシーケンシング解析を行った。その結果、黒毛の領域において

ARHGAP36 遺伝子は発生段階或いは毛周期に応じた発現変化を呈するのに対し、オレンジ毛の領域ではより恒常的な発現を示すことが分かった。さらにこれらの皮膚組織において、*ARHGAP36* の発現と逆相関してメラニン合成遺伝子群が抑制されていた。この結果から、*ARHGAP36* と色素合成との関連が初めて明らかになった。すなわちオレンジ毛の皮膚領域では、制御配列の欠失によって *ARHGAP36* の異常な発現が生じ、これがユウメラニン合成関連遺伝子群の発現低下を招き、合成される色素がフェオメラニンへとシフトするというシナリオが推測された。*ARHGAP36* タンパク質はプロテインキナーゼ A を抑制する作用を持つと報告されているが（文献 8）、プロテインキナーゼ A はメラニン合成細胞刺激ホルモン受容体の下流のシグナル伝達因子であることから、*ARHGAP36* タンパク質の恒常的な存在がユウメラニン合成関連遺伝子群の抑制に繋がる可能性が推測された。なお、ヒトの赤毛（フェオメラニン優位）の家系においてはメラニン合成細胞刺激ホルモン受容体の配列多型が報告されており、色素タイプの決定におけるこのシグナル伝達経路の重要性は疑いのないところである。

最後に、X 染色体上にあるイエネコ *ARHGAP36* 遺伝子が雌に特異的な不活性化を受けるのか解析を試みた。まず、イエネコより分子レベルの研究が進んでいるヒト及びマウスでもこの遺伝子は X 染色体上にあるため、すでに公開されているヒト及びマウスの RNA シーケンシングデータを再解析することにより、これらの種でこの遺伝子の片方が雌に特異的な不活性化を受けることを確認した。この解析には、雌の一对の *ARHGAP36* 遺伝子の間に存在する一塩基多型を利用した。しかし、残念なことに、我々のイエネコのサンプルにはメッセンジャー RNA の由来を区別できる一塩基多型は存在しなかった。

そこで、全ゲノムレベルで DNA メチル化を解析するバイサルファイトシーケンシング解析を行った。CpG アイランドの DNA メチル化は、不活性化された X 染色体上の遺伝子を検出できるよいマーカーである。解析の結果、*ARHGAP36* 遺伝子の CpG アイランドが、X 染色体の不活性化に伴って高度にメチル化を受けることが明らかになった。すなわち、この遺伝子のメチル化は雄には見られず、雌だけに生じること、また雌においてのメチル化率は最大 50% 程度であること（片方の X 染色体のメチル化と合致）、さらに不活性化を免れることが知られている X 染色体上の遺伝子は同じ雌のサンプルでメチル化を受けないこと、などから *ARHGAP36* 遺伝子は X 染色体の不活性化に依存的なメチル化を受けることが示された。

以上により、長年の謎であったオレンジ遺伝子の正体は *ARHGAP36* 遺伝子であると結論づけた。なお、米国 Stanford 大学の Barsh 教授らの研究チームが、我々とは独立にオレンジ遺伝子が *ARHGAP36* 遺伝子であること、5.1 kb の欠失がオレンジ毛の原因であることを特定し、我々と同じ号の *Current Biology* 誌に発表した（文献 9）。

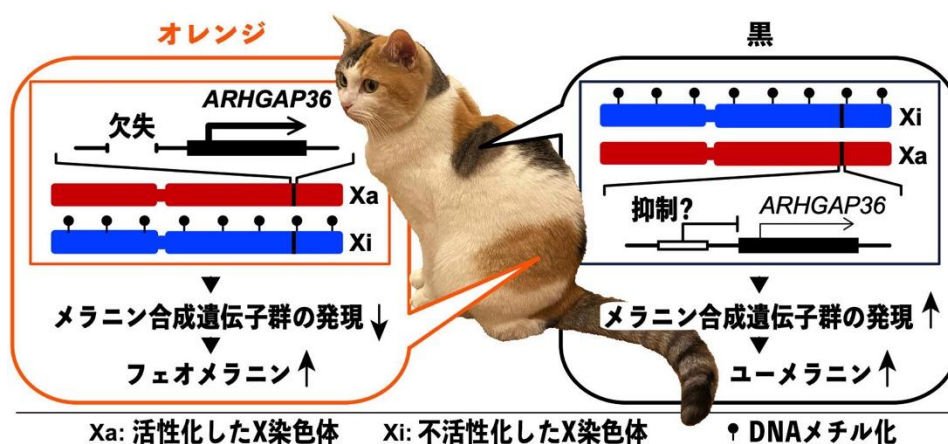
3. 考察

本研究の結果から、長年にわたり謎であったイエネコのオレンジ遺伝子の正体が *ARHGAP36* 遺伝子であること、またオレンジ毛の原因となる変異は 5.1 kb の欠失であることが分かった。また、X 染色体不活性化に伴う *ARHGAP36* 遺伝子の DNA メチル化のパターンは、60 年前に Lyon により提唱されたランダム X 不活性化説から想定されるパターンと一致していた。すなわち、同定された欠失のヘテロ接合体である雌において、発生の初期に一方の X 染色体上の *ARHGAP36* 遺伝子がランダムに選ばれて不活性化され、それらの細胞が不活性化パターンを維持したまま増

殖して一定範囲を占めることで、三毛猫やサビ猫の斑状の黒/オレンジのパターンを説明できる(図)。

一方、同定された欠失がユーメラニン合成をフェオメラニンの合成へと切り替える機構の全貌は明らかでない。最近高品質な猫の iPS 細胞が報告されたが(文献 10)、そのような培養細胞を用いる研究が、この謎を解き明かす手がかりを与える可能性がある。また、日米をはじめとして世界中のオレンジ毛を持つ猫の多くが同じ欠失を持つことから、この変異の歴史的な起源も興味深い問題である。古代の猫の絵画や動物のミイラなどを調べると、この欠失がいつどこで生じたのかを特定する手がかりを掴めるかも知れない。

最後に、*ARHGAP36* 遺伝子はヒトにも存在するが、ヒトでは肌の色や毛色に関わるという報告はなく、先天性の減毛症、母斑、皮膚の基底細胞癌、異所性骨化症などの病気と関わることを報告されている(文献 11,12)。つまり、この遺伝子の研究がヒト疾患の解明に役立つ可能性があることを述べて筆をおく。



図：今回の結果をもとに推測されたオレンジ/黒の斑形成の模式図

謝辞

本研究にご協力いただいた獣医師、動物病院のスタッフ、及び飼い主の皆様、そして共同研究者の方々に深く感謝いたします。また、多くの研究者の方から有益な助言や示唆をいただきました。ここに深謝いたします。最後に、本研究を実施するにあたり、研究費の一部をクラウドファンディングにより募りました。合計 619 名の寄附者の皆様に心より感謝申し上げます。

文献

1. Doncaster, L. (1904). On the inheritance of tortoiseshell and related colors in cats. *Proc. Camb. Philol. Soc.* 13, 35–38.
2. Little, C.C. (1919). Colour inheritance in cats, with special reference to colours, black, yellow and tortoiseshell. *J. Genet.* 8, 279–290.
3. Bamber, R.C., and Herdman, E.C. (1927). The inheritance of black, yellow and tortoiseshell coat colour in cats. *J. Genet.* 18, 87–97.

4. Lyon, M.F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372–373.
5. Toh, H., Au Yeung, W.K., Unoki, M., et al. (2025) A deletion at the X-linked *ARHGAP36* gene locus is associated with the orange coloration of tortoiseshell and calico cats. *Curr. Biol.* 35, 2816-2825.
6. Schmidt-Küntzel, A., Nelson, G., David, V.A., et al. (2009). A domestic cat X chromosome linkage map and the sex-linked orange locus: mapping of orange, multiple origins and epistasis over nonagouti. *Genetics* 181, 1415–1425
7. Gandolfi, B., Alhaddad, H., Abdi, M., et al. (2018). Applications and efficiencies of the first cat 63K DNA array. *Sci. Rep.* 8, 7024.
8. Eccles, R.L., Czajkowski, M.T., Barth, C., et al. (2016) Bimodal antagonism of PKA signalling by *ARHGAP36*. *Nat. Commun.* 7: 12693.
9. Kaelin, C.B., McGowan, K.A., Koroma, D.C., et al. (2025). Molecular and genetic characterization of sex-linked orange coat color in the domestic cat. *Curr. Biol.* 35, 2826-2836.
10. Kimura, K., Tsukamoto, M., Sugisaki, H., et al. (2024). Generation of footprint-free, high-quality feline induced pluripotent stem cells using Sendai virus vector. *Regen. Ther.* 26, 708–716.
11. Liu, Y., Banka, S., Huang, Y. et al. (2022) Germline intergeneic duplications at Xq26.1 underlie Bazex-Dupre-Christol basal cell carcinoma susceptibility syndrome. *British J. Dermatol.* 187, 948-961.
12. Melo, U.S., Jatzlau, J., Prada-Medina, C.A., et al. (2023) Enhancer hijacking at the *ARHGAP36* locus is associated with connective tissue to bone transformation. *Nat. Commun.* 14: 2034.

関西実験動物研究会 幹事・評議員・維持会員名簿

関西実験動物研究会 幹事・評議員・維持会員名簿（五十音順）

2025 年 11 月末現在

幹 事

役 職	氏 名	所 属
会 長	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
幹事長	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
編集・庶務	桑村 充	大阪公立大学大学院獣医学研究科 獣医病理学教室
	中井 伸子	
集 会	浅野 雅秀	京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
	磯谷 綾子	奈良先端科学技術大学院
	磯野 協一	和歌山県立医科大学 附属動物実験施設
	内尾 こずえ	（国研）医薬基盤・健康・栄養研究所
	卯野 善弘	大阪大学医学部 附属動物実験施設
	依馬 正次	滋賀医科大学 動物生命科学研究センター
	太田 毅	京都大学大学院農学研究科 生体機構学分野
	喜多 正和	京都府立医科大学大学院医学研究科
	清成 寛	（国研）理化学研究所生命機能科学研究センター
	葛谷 和也	科研製薬株式会社
	古賀 真昭	日本新薬株式会社
	近藤 玄	京都大学医生物学研究所 統合生体プロセス分野
	塩谷 恭子	（国研）国立循環器病研究センター研究所 動物実験管理室
	田中 美有	大阪公立大学大学院獣医学研究科 獣医病理学教室
	成瀬 智恵	京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
	宮坂 佳樹	大阪大学医学部 附属動物実験施設
	森岡 裕香	神戸大学大学院医学系研究科 附属動物実験施設
	山添 裕之	ハムリー株式会社
監 事	清水 何一	清水実験材料株式会社
	佐々木 昌志	株式会社エーテック

評 議 員

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
磯谷 綾子	奈良先端科学技術大学院大学
磯野 協一	和歌山県立医科大学 附属動物実験施設
今井 良悦	ラビックス株式会社
内尾こずえ	(国研) 医薬基盤・健康・栄養研究所
宇野 絹子	京都大学大学院農学研究科 生体機構学分野
卯野 善弘	大阪大学医学部 附属動物実験施設
依馬 正次	滋賀医科大学 動物生命科学研究センター
太田 毅	京都大学大学院農学研究科 生体機構学分野
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	大阪公立大学大学院獣医学研究科
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	大阪公立大学大学院獣医学研究科
喜多 正和	京都府立医科大学大学院医学研究科
清成 寛	(国研) 理化学研究所生命機能科学研究センター
葛谷 和也	科研製薬株式会社
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
桑村 充	大阪公立大学大学院獣医学研究科 獣医病理学教室
古賀 真昭	日本新薬株式会社
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	京都大学医生物学研究所 統合生体プロセス分野
近藤 友宏	大阪公立大学大学院獣医学研究科
近藤 靖	田辺三菱製薬株式会社
斉藤 美知子	京都薬科大学 バイオサイエンス研究センター
坂本 雄二	株式会社ケー・エー・シー
佐々木 昌志	株式会社エーテック
笹瀬 智彦	日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所
塩谷 恭子	(国研) 国立循環器病研究センター研究所 動物実験管理室
清水 何一	清水実験材料株式会社

氏 名	所 属
高木 貞明	
竹田 潤二	(前) 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
田中 美有	大阪公立大学大学院獣医学研究科 獣医病理学教室
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 生理学
徳弘 圭造	関西医科大学 ゲノム編集部門
中井 伸子	
中村 紳一朗	麻布大学獣医学部実験動物学
成瀬 智恵	京都大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
橋本 正晴	(前職) 株式会社ケー・エー・シー
平川 公昭	株式会社新日本科学 大阪病理センター
藤原 祥高	国立循環器病研究センター 先端医療技術開発部
松田 潤一郎	(国研) 医薬基盤・健康・栄養研究所 開発振興部／創薬デザイン研究センター
宮坂 佳樹	大阪大学医学部 附属動物実験施設
宮田 治彦	大阪大学微生物研究所
森岡 裕香	神戸大学大学院医学研究科 附属動物実験施設
森島 英喜	ラビックス株式会社
山添 裕之	ハムリー株式会社
山田 宜永	新潟大学農学部農業生産科学科 動物遺伝学
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
横山 俊史	神戸大学大学院農学研究科

維持会員

EP トレーディング株式会社
株式会社イブバイオサイエンス
株式会社エーテック
エフ・シー・アール・アンドバイオ株式会社
オリエンタル酵母工業株式会社
株式会社オリエンタルバイオサービス
北山ラベス株式会社
株式会社ケー・エー・シー
三協ラボサービス株式会社
清水実験材料株式会社
ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社
白井松器械株式会社
株式会社新日本科学
株式会社精研
セオービット株式会社
テクニブラスト・ジャパン株式会社

株式会社夏目製作所
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
バイオゲート株式会社
ハマグチラボプラス株式会社
ハムリー株式会社
株式会社ビオスタ
株式会社ビッグバン
株式会社 HERO
丸石製薬株式会社株式会社
三浦工業株式会社
株式会社美濃ラボ
株式会社レナテック

令和 7 年 12 月 19 日印刷

令和 7 年 12 月 19 日発行

編集兼発行者 横井 伯英

発 行 所 関西実験動物研究会

〒606 - 8502 京都市左京区北白川追分町

京都大学大学院農学研究科 動物遺伝種学分野内

印 刷 所 石川特殊特急製本株式会社