

トランスジェニックラットの作成とその公共利用のための胚バンクの検討

所属 自治医科大学分子病態治療研究センター 臓器置換研究部

研究者 小林 英司

分担研究者

- (1) 自治医科大学 生理学講座 統合生理学部門 矢田俊彦
- (2) 自治医科大学 分子病態治療研究センター ゲノム機能研究部 間野博行
- (3) 自治医科大学 生化学講座 機能生化学部門 遠藤仁司
- (4) 自治医科大学 分子病態治療研究センター 発生工学研究部 袴田陽二
- (5) 京都大学大学院医学研究科 附属動物施設 芹川忠夫
- (6) 国立成育医療センター研究所 移植・外科研究部 梨井 康
- (7) エイチ・イー・ビー研究機構附属研究所 鈴木 聡
- (8) 大塚製薬株式会社 宮本剛八郎

要旨

創薬を含む高度先端医学・薬学の研究に有効なモデルラットの作製を目的に、ヒト等の遺伝子を持つトランスジェニック(Tg)ラットの作製を試みた。初年度(平成13年度)は臓器移植研究に有用なラットを中心に6種のTgラットを作製した。また作製したTgラットのうちGFP-Tgラットの特性を明らかにし、多くの研究者が公共利用できるバイオリソースの構築に関する情報収集を行った。次年度(平成14年度)は、前年度作製したTgラットの医学研究における有用性を明らかにするとともに、新たに再生医学研究に有用な3種類のTgラットを作製し、バンクシステムの実動化のために、作製したTgラットの受精卵/精子保存法を検討した。

1. 研究目的

新薬開発を含め高度先進医療を推進するためにこれまでもラット・マウス等の実験動物が広く利用されてきている。しかしヒトとこれらの動物間では薬物代謝酵素等の相違があることやヒトの疾患に類似していないなどの問題があり、これらのいわゆる正常動物を使った実験の成績をヒトへ外挿することが困難な場合が多く存在している。これまで我々は、マウスより体サイズが大きく、薬物動態学などの薬学研究や臓器移植、再生医療などの高度先端医科学研究に有用な遺伝子改変ラット(以下Tgラット)の作製を試みてきた。本研究はTgラットを作成するとともにいち早くその特性を明らかにし、より多くの研究者に供与できる創薬疾患等の研究に有用なラットのバイオリソース構築のための検討を目的とした。

2. 研究方法

実際の臨床医学・薬学に役立つ Tg ラットをよりスピーディーに産出するために、以下の3段階の開発計画とした。すなわち基礎医学および薬学の分担者が *in vitro* 等で目的となる遺伝子をスクリーニングする。目的遺伝子は随時分担研究者が研究協力者を募り、絞込みを効率よく行う。次に目的遺伝子を Tg 可能なコンストラクトの作成を行い Tg ラットの産出を試みる。Tg はバイチャンスで生まれるため種々の細胞、組織で発現することから有用なラインの絞込みは解析研究を平行させながら行うこととした。

研究初年度としては、ラットがマウスに比しその体サイズから臓器移植研究に有利であることから、移植に関連した遺伝子をターゲットとして6種類：1) GFP, 2) EBNA-1, 3) ヒト血液型 A および B 糖鎖転移酵素遺伝子, 4) Lac-Z, 5) HSV-tk の Tg ラットの作製を行った。また、GFP-Tg ラットについてはその動物のキャラクタリゼーションを行い紙上報告し、公共利用可能とするための基礎情報収集をおこなった。

初年度(平成13年)は以下の項目について検討した。

- ① Tg ラットの作製とライン化 (小林、袴田)
- ② 生理学的研究に有用な Tg ラット作製のための基礎的研究 (矢田)
- ③ 血液疾患研究に有用な Tg ラット作製のための基礎的研究 (間野)
- ④ 生化学研究に有用な Tg ラット作製のための基礎的研究 (遠藤)
- ⑤ ヒトとラットにおける薬物代謝能相違の検討 (佐藤、宮本)
- ⑥ ラット胚バンクシステムの運用に関する検討 (小林)

2年目は、医薬品開発の研究に有効な Tg ラットの作製をめざし、1) 特定臓器への遺伝子発現、2) 遺伝子発現の on/off (Cre/LoxP) 遺伝子システムについて検討した。更に初年度の研究から、ラットのバイオリソースの拡充とその有効利用には、ラット胚の取り扱いが重要と考えられたため、新たに以下の検討項目を追加した。

- ⑦ ラット受精卵/精子保存法の開発 (芹川)

3. 研究成果

(1) Tg ラットの作製効率とライン化に要する期間

それぞれの Tg ラットの作製効率とライン化に要する期間を下記の表に示した。Tg ラットの発現率は導入遺伝子に依存するが、平均するとマイクロインジェクション数に対し 2.4%、移植卵数に対し 2.7%、出産数に対し 15.7%であった。また、Tg ラットの作製効率は、outbred と inbred の strain による差は認められなかった。従って、1匹の Tg ラットを得るためには少なくとも 100 個以上の受精卵にマイクロインジェクションする必要があることが判明した。また、Tg ラットのライン化には平均で 2.6 ヶ月を要する。

トランスジェニックラットの作製とその効率

目的遺伝子	EBNA-1	h-A ts	h-B ts	LacZ	HSV- tk	DsRed	LRL-GFP	Cre	平均
Strain	Wistar	Wistar	Wistar	DA	DA	Wistar	Wistar	Wistar	
移植卵数/injection数 (%)	276/312 (88.5)	271/346 (78.3)	233/263 (88.6)	262/289 (90.7)	238/247 (96.4)	133/169 (78.7)	229/256 (89.5)	162/170 (95.3)	226/257 (87.9)
出産匹数	69	56	20	36	45	40	29	13	38.5
Tg個体数	11	10	2	3	6	8	5	3	6.0
Tg発現率(%)									
Tg/injection数	3.5	2.9	0.8	1.0	2.4	4.7	2.0	1.8	2.4
Tg/移植数	4.0	3.7	0.9	1.1	2.5	6.0	2.2	1.6	2.7
Tg/出産数	15.9	17.9	10.0	8.3	13.3	20.0	17.2	23.1	15.7
ライン化に要した期間(月)	2	2	2	2	4	2	2	3	2.6

(2)各 Tg ラットの特性

GFP ラット

移植臓器の生着と拒絶反応との関係において、移植時に目的臓器と同時にレシピエントに持込まれるリンパ球(donor cell migration)の役割が注目されている。これまで動物モデルを用いて Donor cell migration と免疫寛容に関する研究が数多く行われてきたが、ドナー細胞の同定にはドナー細胞に特異的な抗体や分子生物学的マーカーが用いられてきた。発光クラゲを由来とする GFP (Green Fluorescent Protein) は、特定の基質を必要とせず励起光下(489nm)で緑色に発色する蛍光色素で、細胞マーカーとして広く利用されている。作成した GFP ラットは chicken beta-actin (CAG) プロモーターの下流に EGFP (Enhanced GFP) を繋いだ遺伝子を持ち、その発現は発生の初期段階より認められた。蛍光実体顕微鏡での観察では、GFP の発現は筋肉系および脾臓で強く認められた。成熟 GFP ラットの末梢血液を用いたフローサイトメトリー (FACS) では、70%以上の白血球が GFP 陽性であった。まず臓器移植研究への有用性を確認する目的で、GFP ラットをドナーとして各種臓器を LEW ラットへ移植したところ、レシピエントの末血中に GFP 発現細胞をモノクローナル抗体などで染色するような操作を加えることなく、FACS で容易に検出できた。GFP ラットを臓器移植時のドナーに用いれば、レシピエント内におけるドナー細胞あるいは組織を GFP マーカーにして同定することが出来ることが判明した。GFP ラットはマイクロサージャリーに適した体サイズを有すると共に、細胞の lineage を探索することが容易である点で、臓器再生移植研究のツールとして有用であることを明らかにした。さらに胎生初期から発生過程の各種臓器における GFP の発現を仔細に検討した結果、その発現は、成熟期におけるプロファイルとは異なることが明かとなった。このことは発生学や再生医学研究にも極めて有用性が高いと考えられた。

ABO 血液型ラット

臨床では donor 不足のため ABO 不適合移植が行われているが、今だその予後は不良であり、新しい免疫制御法の開発が望まれている。血液型物質は動物の他、植物にもその発現が確認されているが、ヒトのように同じ種のなかに A 型、B 型、O 型が混在しているモデル動物は存在しない。我々は、ABO 不適合臓器移植のモデルの確立を目的に、ヒト由来の A および B 糖転移

酵素遺伝子を CAG プロモーターの下流に挿入したものを導入遺伝子として、ヒト血液型物質発現 Tg ラットの作製を行った。まず正常ラットでの血液型発現遺伝子を同定し、A 型発現遺伝子 3 個、B 型発現遺伝子は 1 個を有することをつきとめた。Tg ラットではヒト A/B 型転換酵素を遺伝子導入されることによりさらにそれぞれ 1 つずつ転移酵素が増える形で導入されることになる。このように常に用意されている遺伝子にさらに付加的に遺伝子を入れると致死になる可能性があったが、作製したラットは通常のラット遺伝子導入率と遜色なく Founder が取れた。ヒト A/B 型転移酵素遺伝子を導入したラットの主要臓器におけるヒト血液型 A/B 抗原の有無をヒト特異的 A/B 抗体を用いて確認したところ、A Tg ラットでは A 抗原が強く、しかもより多くの臓器で発現していた。A Tg ラットでは元来染まっていたものに加え、Tg したヒト酵素に反応した‘ヒト型’ A 抗原が過剰に染まっている可能性がある。B Tg ラットは通常の Wild ラットの表出する A 抗原も染まるが新たに B 抗原が染色されてきた。B Tg ラットも A Tg ラットと同様に元来ラットが持っていた A 抗原に加えヒト B 型転換酵素遺伝子の導入によって発現した B 型抗原が染まっている可能性と思われた。A/B 型抗原の過剰発現が顕著であった小腸を用いて、移植実験を行いラットの生体内での抗原性を検討した。コントロール群すなわち Wistar-Wistar 間の小腸移植ではグラフトが 30 日以上生着した。一方 A Tg-Wild Wistar または B Tg-Wild Wistar 間の移植では 2~3 週間で拒絶された。超急性拒絶が生じない理由は、通常 Wild ラットは俗に言う弱い AB 型であり抗 A 抗 B 抗体を持っていない状態であるためと思われる。また A 抗原をすでに持つ Wild と A Tg ラット間でも拒絶が起こるのは、元来ラットの持つ A 型抗原物質とヒト A 転移酵素によって発現した A 抗原物質の間に構造的な違いが生じた可能性を示している。B Tg-Wistar 間の移植では wild は B 抗原を強く発現していないためヒト転移酵素で過剰発現した B 抗原と反応している可能性がある。さらに B Tg-A Tg、A Tg-B Tg 間の移植モデルでは移植小腸は強く拒絶され、移植を受けたラットも激しい体重減少を生じた。これはそれぞれのラットが発現しているヒト A, B 型抗原にラットリンパ球が反応し、逆にグラフトが含有するリンパ球がレシピエントの抗原に反応した可能性がある。遺伝子導入したヒト転移酵素はラット転移酵素と相同性が高く酵素自身に強く反応することはほとんど起こりえないことを考えると、過剰発現 A/B 型物質が免疫反応を起こしていると考えられる。血液型発現は癌化と逆相関にあるといわれているが、そのような意味からも、ヒト A/B 型転移酵素遺伝子導入ラットは今後種々の方面での研究に有用と思われた。

LacZ ラット

最近様々な組織には自己の幹細胞がすることが明らかになってきた。幹細胞を移植することで、障害を受けた組織を再生させることができると期待されている。再生医学の研究において、幹細胞の lineage をトレースすることが重要である。我々は、細胞マーカーとして LacZ に着目して、近交系である DA ラット (RT1^a) を用いて、LacZ (β -galactosidase) cDNA を CAG プロモーターにつなげた導入遺伝子を用いて、トランスジェニックラットを作製した。LacZ の発現は GFP ラットと同様に、皮膚、筋肉系で強い発現が認められた。LacZ は発現の特異性が高く、極少数

の幹細胞でも組織学的に検出できる点で GFP に比べ優れていると考えられ、LacZ トランスジェニックラットも再生医学研究用のよいツールとなりうる。

EBNA 1 ラット

EB ウイルス (Epstein-Barr virus)により誘導される EVNA-1 (Epstein-Barr virus nuclear antigen-1)は臓器移植後におけるリンパ球増殖性疾患(Posttransplant lymphoproliferative disease: PTLD)やレシピエントの免疫寛容状態に関与することが知られている。EBNA-1 遺伝子を Wistar ラット受精卵にマイクロインジェクションし、生後1ヶ月目に各個体の尾および肝組織を用いて各々PCR、RT-PCR ならびに病理組織学検査を行い遺伝子導入個体を得た。生後1ヶ月目の肝臓の病理組織学的検査では異常を認めなかったが、各ラットを長期飼育したところ、一部で脾臓あるいは筋肉に腫瘍を形成した。従来、PTLD は EV ウイルス感染そのものによると考えられていたが、無ウイルス状態でも EVNA-1 タンパクが誘導されると PTLD 様の病態となることが判明した。

HSV-tk ラット

創薬等の研究用にもラット・マウス等の実験動物が広く利用されているが、ヒトと動物間で薬物代謝酵素 (P-450) 等に相違があり、動物実験の成績をヒトへ外挿することへの問題が指摘されている。そのためヒト創薬研究においては、ヒト肝細胞を用いた *in vitro* の実験が精力的に行われている。最近、ヒト肝細胞を持つキメラマウスが作製され、ヒト肝細胞はヒト特異的な薬物代謝酵素を発現していることが報告された。キメラマウスは、あらかじめ肝炎を発症させたマウスにヒト肝細胞を移植して作製される。ヒト肝細胞を持つマウスは、薬物の薬効や安全性を評価するよいモデル動物になると期待されているが、創薬等の研究には同一個体で薬物動態が測定可能なラットが体サイズの小さなマウスより有効である。我々は、キメララットの作製の一環として、細胞障害を起こすガンシクロピルの投与により肝障害を誘発させるモデルとして、アルブミンプロモーターをに HSV-tk (herpes simplex virus thymidine kinase) 遺伝子を繋いだ遺伝子を持つトランスジェニックラットを作製し、6 匹の遺伝子導入個体を得た。本 Tg ラットの肝臓をもとに *in vivo/in vitro* でガンシクロピルによる肝障害を誘起する事に成功した。

DsRed ラット

CAG プロモーターは Tg 動物の作製において導入遺伝子を全身性に強発現させる場合によく用いられるプロモーターであるが、少数の肝幹細胞を効率良く同定するためには、ラットの肝臓での発現はより強めたシステムを開発する必要がある。また創薬等研究モデル動物の作製のために肝臓をターゲットにした Tg ラットを作製する上で、肝臓に特異的でしかも強力なプロモーターの開発は必須である。Tg マウスで実績のあるマウスアルブミンプロモーターの下流に生体蛍光タンパク質である DsRed 遺伝子を繋いだコンストラクトを用いて、プロモーターの解析を行った。DsRed は励起光下で赤色に光り、遺伝子の発現を容易に確認できる。マウスアルブミンプロモ-

ターはラットの肝臓でも強力に遺伝子発現を誘起することが明らかになった。本プロモーターを用いて、薬物代謝酵素に関連した遺伝子をもつ Tg ラットの作製を行う予定である。

Cre/loxP ラット

ラットでは未だ世界的にも遺伝子ノックアウト技術がない。また致命的な遺伝子を導入した場合 Founder が得られない。このような弱点を補うため Cre/loxP 系遺伝子コンストラクトの動作をラットで確認した。まず CAG プロモーターの下流に loxP-DsRed-polyA-loxP の配列および GFP 遺伝子を連結した発現プラスミドベクターを作製し、培養細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入された細胞は、赤色蛍光タンパク (DsRed) のみが発現した。その細胞に Cre recombinase 遺伝子を共発現させると、loxP 配列に挟まれた DsRed 遺伝子が切り出され、その下流に存在する GFP タンパク質が発現した。本発現ベクターを導入遺伝子として Tg ラットの作製を行った。LoxP Tg ラットでは特に脾臓において DsRed の強発現が認められた。LoxP Tg ラットの筋肉に Cre recombinase 遺伝子を直接注入したところ、GFP の発現が確認された。本システムは、致命的遺伝子の Tg ラットの作製に有効であると考えられ、現在、Cre Tg ラットとの交配を進めている。

(3) Out bred から Inbred GFP ヘスピードコンジュニク法の検討

先に作製した GFP ラットは outbred の Wistar を遺伝背景に持つため、移植実験モデルとして使用する場合、MHC の多型性が問題となる。近交系の遺伝背景を持つ GFPTg ラットを作製するために、GFPTg Wistar から戻し交配による近交系 GFPTg LEW (RT1^l) の作出を試みた。効率的な作出を図る目的で、LEW ラットの皮膚を戻し交配して得られた動物に移植し、生着日数の長い動物を次世代の種動物とすることとした。N7 世代までは、移植した皮膚はいまだ拒絶される。現在、さらに世代を重ねている。

(4) ヒト代謝能を持つラット作成のための基盤研究

新薬開発において、ラットやマウスは薬効や毒性の検討する最初の重要な実験動物である。しかしヒトとの代謝能がそれらの動物で異なるためヒトの代謝を模倣する際の障害となっている。まず P450 サブタイプ活性のヒトと動物での違いを明らかにするため、ラット、ヒト、マウス、サル、ブタのそれを測定した。ヒトでは 3A4 が半数以上を占めるのに対し、ラットには 3A4 サブタイプは殆んど存在しなかった。またラットのチトクローム P450 総量はヒトのそれに比し約 3 倍であった。従って、ラットでは多くの薬剤がヒトに比し相対的に薬物動態値が低くなることが考えられる。つまり体重値あたりの薬物投与量においてはヒトに比し毒性が出にくくなる可能性がある。さらにヒトにおいてサブタイプ分画の半数以上を占めるとされる 3A が、ラットではその他のサブタイプと比較して相対的に低いことから、3A を代謝酵素とする薬物の開発をラットで行う場合には薬物動態値を補正しながら検討することが必要である。ヒトに近い代謝を示すラットを開発するには、ヒト 3A4 遺伝子を発現するトランスジェニックラットが一つの候補と考えられた。

(5) ラット胚バンクシステムの検討

胚バンクシステムのあり方の検討を目的に、開発された動物の情報公開とそれらの動物の使用希望者の現状を解析し、調査結果を表2にまとめた。国内からの依頼が14件、海外から23件があった。研究目的としては再生医療のもの26件、臓器移植のもの11件であった。対象臓器(細胞)としてはきわめて多彩な臓器(組織)が求められていた。またいずれの研究者もラット胚の分与ではなく、動物個体での分与を希望していた。さらに必要な情報としてはマクロのGFP輝度だけでなく各種組織や細胞のGFP輝度など組織レベルにおける詳細な情報を希望していた。

表2 GFP Tgラット使用希望施設リスト

	施設	使用目的	対象臓器(細胞)	受け渡し法	追加希望情報	その他備考状況
国内	北海道大学	臓器移植	肝、小腸	動物	組織における発現	
	東北大学	組織再生	心臓			
	東北大学	組織再生	肺	動物		
	東北大学	核移植	受精卵	動物		
	筑波大学	臓器移植				
	三好大学	組織再生	筋肉	動物		
	大阪大学	組織再生	皮膚	動物		
	岡山大学	臓器移植	小腸	動物		
	広島大学	組織再生	皮膚	動物		
	山口大学	臓器移植	筋肉	動物	健康証明書	
	千葉大学	組織再生	皮膚	動物		
	東京医科歯科大学	組織再生	小腸	動物		
	東京医科歯科大学	組織再生	網膜	動物		
	鳥取大学	組織再生	肝臓	動物		
	海外	アメリカ	United States Air Force Academy	組織再生	骨髄	動物
University of Miami School of Medicine			臓器移植	小腸	動物	
UCLA			組織再生	腎臓	動物	GFP-ES細胞の有無
Mayo Clinic Rochester MN USA			臓器移植	四肢	動物	骨髄における発現
University of Pennsylvania				精巣、卵巢		精巣、卵巢における発現
UMDNJ-Robert Wood Johnson Medical Sch			組織再生	脳	動物	
University of Louisville			組織再生	骨髄	動物	
Massachusetts General Hospital			組織再生	腎臓	動物	
VA Medical Center			組織再生	腎臓	動物/胚	
Tufts University School of Medicine			組織再生	乳腺	動物	
Henry Ford Health Sciences Center			組織再生	神経	動物	
University of California			組織再生	神経	動物	
University of Southern California			組織再生	神経	動物	
University of Pennsylvania			組織再生	神経	動物	
カナダ			University of Health Network (Toronto)	組織再生	心臓	動物
イギリス		Imperial College School of Medicine	組織再生	心臓	動物	
		Heart Science Centre, Harefield Hospital	組織再生	心臓	動物	
ドイツ		Universitat Sklinikum Hamburg-Eppendorf	組織再生	骨髄	動物	胚はだめ
フィンランド	Biomedicum Helsinki	臓器移植	血管	動物	健康証明書 胚はだめ	
イスラエル	Hadassah University Hospital	組織再生	骨髄	動物	胚はだめ	
オーストラリア	University of Tasmania	組織再生	骨髄	胚	動物の輸入が難しい	
チェコ共和国	Institute of Experimental Medicine ASCR					
ギリシア	AHEPA University Hospital				T cell分化と発光輝度の関係、ホモ動物の生	

(平成15年1月現在)

(6) ラット受精卵/精子保存法

研究初年度のラット胚バンクシステムの検討から、ラット胚バンクの有効利用には、胚操作の技術の開発が必要であることが明らかとなった。そこでラット系統の受精卵および精子による凍結保存法を確立することを目的に、近交系ラット、突然変異系ラットを用いて、自然排卵と過排卵処置による排卵数の比較および精巣上体精子の凍結保存法について検討した。まず、31系統の

ラットにおける自然排卵と過排卵処置による排卵数の系統差を比較した。排卵数は、系統により大きな差が認められた。マウスの緩慢法に準じてラット各系統の 2 細胞期胚凍結保存を行い、その一部を融解・移植して凍結保存胚の生存を検討した。生体まで発生した系統は 5 割で、移植胚数に対する出生率は約 10%となった。凍結精子の融解テストの結果、すべて運動性が認められた。

4. 考察

これまでトランスジェニックラットの作製は受精卵膜がマウスに比し脆弱のため作製効率が悪いとされていきたが、高度なマイクロインジェクション技術の開発により、高率に遺伝子導入個体を得ることが出来るようになった。今回の Tg ラットの発現率 (Tg 動物数/総出産数) は平均 13.1%となり、マウスと同等の成績が得られた。体サイズの大きな動物でトランスジェニック個体を作製し、ライン化をはかる場合、効率的なラインの選抜が肝要である。我々は、可能な限り早期の遺伝子発現個体の選抜を行った。通常導入した遺伝子の解析は F1 固体を用いて行うが、高度な外科手術を駆使することで、貴重な founder (F0) から安全に目的組織を得ることを可能にした。

本年度は、GFPTg ラットをモデルにしてラット胚バンクシステムの円滑な運営をはかるためのシミュレーションを行った。まず公的動物リソース機構としては、これまでに作製された種々のラット胚を維持管理する初期の目的もあるが、利用者は動物種を希望している。Tg ラットは自然発症動物モデルと異なり人為的に作製されるため近年の研究動向にあわせたものがタイムリーに作製された動物胚がバンクされる必要がある。また多くの研究者が利用するには、作製された動物の特徴をそえた情報が必要である。研究初年度は、ユーザーとして可能性のある研究者に作製動物に関する希望を調査した。調査期間は 7 ヶ月と短期間であったにもかかわらず、きわめて多くの Tg ラット譲与希望者があった。既に我が国では、マウスにおいてはリソース機構が整備されているが、実際の譲与希望の増加は少ないとされている (Personal communication)。今後有効に公的リソース機構が機能するためには、先端医療等の研究に適するラット等の動物を計画性を持って人為的に作り出す部門の重要性が伺われた。

今回の GFPTg ラットの使用希望者に対する調査で以下に指摘するシステム上の問題点が明らかとなった。まず現在の HSRRB のシステムでは、ラットの寄託は、ラット胚のみで動物個体での寄託はできない。今回の調査研究から、分譲を希望する側 (ユーザー) は、その大多数が凍結胚による分与を希望しないことが明らかとなった。その理由としてマウスと比し、ラット胚の凍結融解法やそれを基にした動物種作製法には未だ確立されていないことが考えられた。一方、寄託者側 (バンクへ動物胚を寄託する者) の問題点として、寄託するための凍結胚を準備することが難しいことである。現在の状況では多くの寄託者希望者となりえる者が胚の取り扱いに精通していることは限らない。仮に技術的に対応が可能であっても、凍結胚を準備する経済的負担が問題となる。今回の GFP ラットは既に国内外から 20 件を越える分与希望があり、胚で分与をする場合、最低でも施設あたり 1 本の凍結チューブが必要となり、その経済的負担が大である。今

後その負担等も含めた経費を明らかにする必要がある。

5. まとめ

今後、円滑なラット胚バンクの利用には以下の要件が必須であると考える。

- 1) 国内におけるこれまでの創薬等医学研究に有用なラット胚のバンキング
- 2) ラット胚の特徴を明記した論文などの情報収集とそれに関わるホームページの開設
さらに今後 HSRRB として対応を希望することは下記である。
- 3) ラットモデルの寄託者に対して動物個体による寄託の受け入れ
- 4) ユーザーへの動物個体による分与
- 5) 他の胚バンクとの連携による国際化（データベースの共有）
- 6) 国内の動物実験センターや動物業者に対するラット胚の取り扱い技術にたいする普及啓蒙事業
- 7) 先端医科学や創薬等の研究に有用な新しいラット種作製に対する支援事業

6. 研究発表

1. 井上成一郎、田原和典、金子道夫、小林英司：ラット小腸移植技術—術中循環動態からみたモデル評価。 *Organ Biology* 9(4):365-376, 2002
2. 井上成一郎、堀 哲夫、金子道夫、田原和典、袴田陽二、高橋将文、小林英司：時間薬理に基づいたタクロリムス・ミゾリピン併用用法。 *今日の移植* 14(6):809-810, 2002
3. 清水尚、高橋将文、藤秀人、内藤昭貴、佐久間康成、武田真一、田原和典、井上成一郎、吉野浩之、袴田陽二、金子隆志、佐藤友紀、竹吉泉、森下靖雄、小林英司：ラット異系間大動脈移植による慢性拒絶モデル—サイクロスポリン・ミゾリピン変更プロトコールによる移植後血管内膜肥厚に対する抑制効果の検討—。 *今日の移植* 15(6):646-649, 2002
4. Endo, M., Enosawa, S., Suzuki, S., Amemiya, H., Kobayashi, E., Miyashita, T., Aoki, T., and Koyanagi, Y.: Porcine liver transplantation as an estimation system for bridge-use of bioartificial liver. *Transplant Proc.* 34:2714-2717, 2002
5. Iwamoto, S., Kumada, M., Kanasaki, T., Okuda, H., Kajii, E., Inagaki, T., Saikawa, D., Takeuchi, K., Ohgawara, S., Takahashi, R., Ueda, S., Inoue, S., Tahara, K., Hakamata, Y. and Kobayashi, E.: Rat encodes paralogous gene equivalent of human histo-blood group ABO gene: association with antigen expression by overexpression of Human ABO transferase. *J Biol Chem.* Nov 29:277(48):46463-46469, 2002
6. Nakao, A., Tahara, K., Inoue, S., Tanaka, N. and Kobayashi, E.: Experimental models of small intestinal transplantation in rats: orthotopic versus heterotopic model. *Acta Medica Okayama* 56(2):69-74, 2002
7. Nakao, A., Tahara, K., Inoue, S., Mizuta, K., Takeichi, T., Uchida, H., Tanaka, N. and Kobayashi, E.: Combined cuff and suture technique for orthotopic whole intestinal transplantation in rats. *Microsurgery* 22:85-90, 2002
8. Ohya, T., Usui, K., Teramoto, K., Arai, S., Iwai, T., Tahara, K., Hashizume, K., and Kobayashi, E.: "Virtual Histology": A novel Modality for Monitoring Graft Rejection Post-Small Bowel Transplantation. *Transplant Proc* 34: 993, 2002
9. Ogata, Y., Takahashi, M., Takeuchi, K., Ueno, S., Mano, H., Ogawara, S., Kobayashi, E., Ikeda, U. and Shimada, K.: Fluvastatin induces apoptosis in rat

- neonatal cardiac myocytes: A possible mechanism of statin-attenuated cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 40:907-915, 2002
10. Okazaki, H., Hirata, D., Kamimura, T., Sato, H., Iwamoto, M., Yoshio, T., Masuyama, J., Fujimura, A., Kobayashi, E., Kano, S. and Minota, S.: Effects of FTY720 in MRL-lpr/lpr mice: Therapeutic Potential in Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol.* 29(4):707-716, 2002
 11. Sakuma, Y., Xiu, D.R., Uchida, H., Hakamata, Y., Takahashi, M., Murakami, T., Nagai, H. and Kobayashi, E.: Short-course methotrexate and long-term acceptance of fully allogeneic rat cardiac grafts: A possible mechanism of tolerance. *Transpl Immunol* 10(1): 49-54, 2002
 12. Takahashi, M., Nishihira, J., Katsuki, T., Kobayashi, E., Ikeda, U., Shimada, K.: Elevation of plasma levels of macrophage migration inhibitory factor in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 89(2):248-9, 2002
 13. Takahashi, M., Ogata, Y., Okazaki, H., Takeuchi, K., Kobayashi, E., Ikeda, U., Shimada, K.: Fluvastatin enhances apoptosis in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 39(2): 310-7, 2002
 14. Takahashi, M., Takahashi, S., Shimpo, M., Naito, A., Ogata, Y., Kobayashi, E., Ikeda, U., Shimada, K.: β -very low density lipoprotein enhances inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 162(2): 307-313, 2002
 15. Wang, J., Tahara, K., Hakamata, Y., Mutoh, H., Murakami, T., Takahashi, M., Kusama, M. and Kobayashi, E.: Auxiliary partial liver grafting in rats: Effect of host hepatectomy on graft regeneration and review of literature on surgical technique. *Microsurgery* 21:1-7, 2002
 16. Nakao, A., Mitsuoka, N., Tahara, K., Tanaka, N., Kobayashi, E.: Experimental models of rat small intestinal transplantation: cuff method and suture method. *Transplant Proc* 35:571-572, 2003
 17. Takahashi, M., Hakamata, Y., Takeuchi, K., and Kobayashi, E.: Effects of Different Fixatives on β -Galactosidase Activity. *J Histochem Cytochem* 51:1-2, 2003
 18. Ajiki, T., Takahashi, M., Hakamata, Y., Murakami, T., Kariya, Y., Hoshino, Y., and Kobayashi, E.: Difficulty of getting a long-term graft survival of MHC disparate composite graft using CTLA4-Ig. *Transplantation* (in press)
 19. Ajiki, T., Takahashi, M., Inoue, S., Sakuma, Y., Oyama, S., Kaneko, T., Hakamata, Y., Murakami, T., Kume, A., Kariya, Y., Hoshino, Y., and Kobayashi, E.: Generation of donor hemato-lymphoid cells after rat limb composite grafting. *Transplantation* (in press)
 20. Ajiki, T., Murakami, T., Kobayashi, Y., Hakamata, Y., Wang, J., Inoue, S., Nakagawa, H., Kariya, Y., Hoshino, Y., and Kobayashi, E.: Long-lasting gene expression by particle-mediated intramuscular transfection modified with bupivacain: Efficient combination therapy with IL-12 and IL-18 cDNA on the rat with carcinoma. *Cancer Gene Ther* (in press)
 21. Hishikawa, S., Sugimoto, K., Kobayashi, E. and Fujimura A.: Dosing-time-dependent variation in the biliary excretion of flomoxef in rats. (in press)
 22. Inoue, S., Tahara, K., Sakuma, Y., Hori, T., Uchida, H., Hakamata, Y., Murakami, T., Takahashi, M., Kawarasaki, H., Hashizume, K., Kaneko, M., Kobayashi, E.: Impact of graft length on surgical damage after intestinal transplantation in rats. *Transplant Immunol* (in press)
 23. Kita, J., Kobayashi, E., Hishinuma, A., Kaneda, Y. and Kubota, K.: Genetic modification of cold-preserved renal grafts using HSP70 or bcl-2 HVJ-Liposome

- method. *Transplant Immunol* (in press)
24. Ogata, Y., Takahashi, M., Ueno, S., Takeuchi, K., Okada, T., Mano, H., Ookawara, S., Ozawa, K., Berk, B.C. Ikeda, U., Shimada, K., Kobayashi, E.: c-Src/Bcl-l1 Pathway Involvement in Anti-Apoptotic Effect of Endothelin-1 in H9c2 Cardiomyocytes. *Hypertension* (in press)
 25. Sakuma, Y., Nagai, H., Sugimoto, K., Fujimura, A., Murakami, T., Uchida, H., Hakamata, Y., Takahashi, M. and Kobayashi, E.: Comparison of efficacy and toxicity between sandimmune® and neoral® in the cyclosporine-resistant rat allo-pancreas transplantation. *Res Commun Pharmacol Toxicol* (in press)
 26. To, H., Xiu, DR, Hishikawa, S., Uchida, H., Sudou, T., Sunada, K., Sugimoto, K., Higuchi, S., Fujimura, A. and Kobayashi, E.: Dosing time-dependent pharmacological effects of anti-metabolites for rat cardiac graft. *Res Commun Mol Pathol and Pharmacol* (in press)
 27. Usui, R., Naito, Y., Kobayashi, E., Takahashi, M., Nishizawa, T., Okamoto, H.: Pet cats as a potential reservoir for hepatitis E virus infection in humans. *J Clin Microbiol* (in press)
 28. Wang, J., Itoh, H., Jinbu, Y., Kusama, M., Tanaka, T., Tobita, K., Hakamata, Y., Takahashi, M., Murakami, T. and Kobayashi, E.: Direct bombardment of the oral cavity using a particle-mediated gene gun in hamsters, rabbits, and dogs. *Archives of Oral Biology* (in press)
 29. Wang, J., Murakami, T., Yoshida, S., Matsuoka, H., Ishii, A., Tanaka, T., Tobita, K., Ohtsuki, M., Nakagawa, H., Kusama, M. and Kobayashi, E.: Predominant cell-mediated immunity in the oral mucosa: gene gun-based vaccination against infectious diseases. *J Dermatol Sci* (in press)
 30. Xiu, D.R., Sakuma, Y., Nagai, H., To, H., Sugimoto, K., Fujimura, A., Uchida, H. and Kobayashi, E.: Chronotherapy of sublethal dose of methotrexate on rats with allo-geneic heart grafts. *Res Commun Pharmacol Toxicol* (in press)
 31. Yanagida K., Yaekura K., Arima T., Yada T.: Glucose-insensitivity induced by Ca²⁺ toxicity in islet β -cells and its prevention by PACAP. *Peptides* 23:135-142, 2002.
 32. Date Y., Nakazato M., Hashiguchi S., Dezaki K., Mondal M.-S., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K., Arima T., Matsuo H., Yada T. and Matsukura S. : Ghrelin is present in pancreatic β -cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51:124-129, 2002.
 33. Yamada S., Komatsu M., Aizawa T., Sato Y., Yajima H., Yada T., Hashiguchi S., Yamauchi K., Hashizume K.: Time-dependent potentiation of the β cell is a Ca²⁺-independent phenomenon. *J Endocrinol.* 172:345-354, 2002
 34. Nakazaki M., Kakei M., Ishihara H., Koriyama N., Hashiguchi H., Aso K., Fukudome M., Oka Y., Yada T., Tei C.: Association of upregulated activity of K(ATP) channels with impaired insulin secretion in UCP1-expressing insulinoma cells. *J Physiol.* 540:781-789, 2002
 35. Zhu L., Onaka T., Yada T.: Activation of orexin neurons after noxious but not conditioned fear stimuli in rats. *Neuroreport* 19:1351-1353, 2002
 36. Zhou C-J., Shioda S., Yada T., Inagaki N., Pleasure S.J. and Kikuyama S.: PACAP and its receptors exert pleiotropic effects in the nervous system by activating multiple signaling pathways. *Current Protein and Peptide Sci.* 3:423-439, 2002
 37. Kakei M., Yada T., Nakagawa A., Nakabayashi H.: Glucagon-like peptide-1 evokes action potentials and increases cytosolic Ca²⁺ in rat nodose ganglion neurons. *Auton Neurosci* 102:39-44, 2002
 38. Kohno D., Gao H-G., Muroya S., Kikuyama S., Yada T.: Ghrelin Directly Interacts with NPY-containing Neurons in the Rat Arcuate Nucleus: Ca²⁺ Signaling via

Protein Kinase A \cdot and N-type channel-dependent Mechanisms and Cross-talk with Leptin and Orexin. *Diabetes* (in press)

39. 中田正範, 寒川浩道, 矢田俊彦: 膝島内前駆 B 細胞培養の試み. *日本再生医療学会雑誌* 1(1):p74,2002.
40. Miyazato, A., Ueno, S., Ohmine, K., Ueda, M., Yoshida, K., Yamashita, Y., Kaneko, T., Mori, M., Kirito, K., Toshima, M., Nakamura, Y., Saito, K., Kano, Y., Furusawa, S., Ozawa, K. & Mano, H. Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* 98, 422-427, 2001
41. Bony, C., Roche, S., Ueno, S., Sasaki, T., Crackower, M.A., Penninger, J., Mano, H. & Puceat, M. A specific role of phosphatidylinositol 3-kinase β : a regulation of autonomic Ca²⁺ oscillation in cardiac cells. *J. Cell. Biol.* 152, 717-727, 2001
42. Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Mano, H., Sato, Y., Honma, Y. & Furukawa, Y. In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with antileukemic agents. *Blood* 97, 1999-2007, 2001
43. Yamashita, Y., Kajigaya, S., Yoshida, K., Ueno, S., Ota, J., Ohmine, K., Ueda, M., Miyazato, A., Ohya, K., Kitamura, T., Ozawa, K. & Mano, H. Sak serine/threonine kinase acts as an effector of Tec tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 39012-39020, 2001
44. Yokohari, K., Yamashita, Y., Okada, S., Ohya Ki, K., Oda, S., Hatano, M., Mano, H., Hirasawa, H. & Tokuhisa, T. Isoform-Dependent Interaction of BRDG1 with Tec Kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 414-420, 2001
45. Ohmine, K., Ota, J., Ueda, M., Ueno, S., Yoshida, K., Yamashita, Y., Kirito, K., Imagawa, S., Nakamura, Y., Saito, K., Akutsu, M., Mitani, K., Kano, Y., Komatsu, N., Ozawa, K. & Mano, H. Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene* 20, 8249-8257, 2001
46. Takahashi, M., Nishihira, J., Shimpo, M., Mizue, Y., Ueno, S., Mano, H., Kobayashi, E., Ikeda, U. & Shimada, K. Macrophage migration inhibitory factor as a redox-sensitive cytokine in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 52, 438-445, 2001
47. Tago, K., Funakoshi, M., Mano, H., Yanagisawa, K., Hayakawa, M., Kuroiwa, K., Iwahana, H., Kasahara, T. & Tominaga, S. Presence of a genistein-responsive inhibitory mechanism on interleukin-1 alpha-induced NF-kappaB activation. *Eur. J. Biochem.* 268, 6526-6533, 2001
48. Mano, H.: TEC KINASES. *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine* pp3107-3110, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2002
49. Ohki, R., Yamamoto, K., Mano, H., Lee, R.T., Ikeda, U. & Shimada, K. Identification of mechanically induced genes in human monocytic cells by DNA microarrays. *J. Hypertens.* 20, 685-691, 2002
50. Makishima, H., Ishida, F., Ito, T., Kitano, K., Ueno, S., Ohmine, K., Yamashita, Y., Ota, J., Ota, M., Yamauchi, K. & Mano, H. DNA microarray analysis of T cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Br. J. Haematol.* 118, 462-469, 2002
51. Suzuki, N., Nakamura, S., Mano, H. & Kozasa, T. G β 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (in press)
52. Yoshida, K., Ueno, S., Iwao, T., Yamasaki, S., Tsuchida, A., Ohmine, K., Ueda, M., Yamashita, Y., Ota, J., Chayama, K., Sato, K. & Mano, H. Identification of pancreatic ductal carcinoma-specific genes by DNA microarray with ductal cells of normal- and cancer-origin. *Cancer Sci.*, (in press)

53. Jin, Y., Suzuki, H., Maegawa, S., Endo, H., Sugano, S., Hashimoto, K., Yasuda, K., and Inoue, K. A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG. *EMBO J.* 22, in press, 2003
54. Satoh, M., Hamamoto, T., Seo, N., Kagawa, Y., and Endo, H. Differential sublocalization of Dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 482-493, 2003.
55. Tamada, H., Sakashita, E., Shimazaki, K., Ueno, E., Hamamoto, T., Kagawa, Y., and Endo, H. cDNA cloning and characterization of Drb1, a new member of RRM-type neural RNA-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 96-104, 2002.
56. Hayakawa, M., Sakashita, E., Ueno, E., Tominaga, S., Hamamoto, T., Kagawa, Y., and Endo, H. Muscle-specific exonic splicing silencer for exon exclusion in human ATP synthase gamma-subunit pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* 277, 6974-6984, 2002.
57. 遠藤仁司, 水本清久: 第4章-6 スプライシング, In 分子生物学イラストレイテッド改訂第2版 (田村隆明, 山本 雅, 編集) pp 142-152, 羊土社, 2003.
58. Ito M, Yokouchi K, Naito K, Endo H, Hakamata Y, Miyazaki JI, Tojo H. In vitro Cre/loxP system in cells from developing gonads: Investigation of the Sry promoter. *Dev Growth Differ* 2002;44(6):549-557
59. Hozumi Y, Hakamata Y, Sasanuma H, Ogura S, Nagai H. Effects of anastrozole on lipid metabolism compared with tamoxifen in rats. *Breast Cancer Res Treat* 2002;76(2):131-6
60. Mutoh H, Hakamata Y, Sato K, Eda A, Yanaka I, Honda S, Osawa H, Kaneko Y, Sugano K. Conversion of gastric mucosa to intestinal metaplasia in Cdx2-expressing transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;294(2):470-9.
61. 袴田陽二, 井上成一朗, 田原和典, 安食孝士, 佐久間康成, 清水尚, 吉野浩之, 武田真一, 佐藤友紀, 金子隆志, 高橋将文, 小林英司. 臓器移植研究におけるトランスジェニックラットの利用. *アニテック*. 2002;14(4):193-202.

7. 的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 なし
- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし