



|              |                                                                                                                                                       |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | A high-quality severe combined immunodeficiency (SCID) rat bioresource                                                                                |
| Author(s)    | 宮坂, 佳樹                                                                                                                                                |
| Citation     | 大阪大学, 2023, 博士論文                                                                                                                                      |
| Version Type |                                                                                                                                                       |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/91817">https://hdl.handle.net/11094/91817</a>                                                                   |
| rights       |                                                                                                                                                       |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 論文内容の要旨

## Synopsis of Thesis

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名<br>Name                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 宮坂 佳樹                                                                                              |
| 論文題名<br>Title                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | A high-quality severe combined immunodeficiency (SCID) rat bioresource<br>(高品質な重症複合免疫不全ラットバイオリソース) |
| <p>論文内容の要旨</p> <p>〔目 的(Purpose)〕</p> <p>免疫不全モデル動物は移植レシピエントとして理想的であり、これまで腫瘍学、再生医学や整形外科学その他の広範な分野で活用されてきた。特に先行したジーンターゲティング技術を背景に、免疫不全マウスは多くの系統が作出され利用されてきた。ラットはマウスと比較して、その体容積の大きさ、それによる採材の容易さ、手術のしやすさが特徴である。数多く報告され利用されてきた免疫不全マウスと同様に免疫不全ラットは広い用途に活用されるものの、従来遺伝子改変は困難と考えられていた。</p> <p>近年様々なゲノム編集法が登場し、とりわけCRISPR Cas9システムは標的配列の選択自由度と切断効率の高さから著しく普及した。幅広い生物種で適用可能なこの方法を使えば、従来困難であった遺伝子改変ラットの作製も可能となる。当研究室ではゲノム編集の黎明期から、特にエレクトロポレーションを使用した簡便で手技依存度の低い、遺伝子改変ラットの作製に注力してきた。</p> <p>本研究では、CRISPR Cas9を用いて近交系ラットを背景とした重度免疫不全モデルの作出を目指した。エレクトロポレーションでノックアウトラットを作製し、それを維持し、ナショナルバイオリソースプロジェクト・ラットに寄託することで、安定的に供給可能なバイオリソースとしての免疫不全ラットを提供することが目的である。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>使用したラット系統は近交系のF344/Jc1である。ラット <i>I12rg</i> 遺伝子および <i>Rag2</i> 遺伝子を標的にガイドRNAを設計し、前核期受精卵にエレクトロポレーションにてCas9 mRNAとともに導入した。得られたF0産仔をジェノタイピングし選抜後、野生型F344/Jc1 (WT) と交配、さらに得られたF1を交配することで <i>I12rg</i> KO (sKO)、<i>I12rg/Rag2</i> double KO (dKO) の2系統を樹立した。また各系統につき成長遅滞の有無や繁殖性を確認した。これは以前に同様の目的で作製した <i>Prkdc</i> KOラットで成長遅滞が見られたためである。</p> <p>各系統での <i>I12rg</i> および <i>Rag2</i> の発現消失はRT-PCRで確認した。解剖学的指標として成体を開胸し胸腺の有無を確認した。血球計測機ならびに血液の生化学的検査を行ったほか、特異抗体を用いてT細胞、B細胞、NK細胞の減少をフローサイトメーターで評価した。またELISA法により血清IgG、IgM、IgAの比較解析をした。</p> <p>免疫不全により易感染性の懸念があったため、感染リスクの低い維持飼育について方法を策定し、SPFを維持するための微生物検査を定期的に行った。</p> <p>F0産仔29匹のうち2匹で <i>I12rg</i>、<i>Rag2</i> 両遺伝子座にフレームシフト変異を有していた。このうち一方を系統化し、以下の実験に臨んだ。RT-PCRでは <i>I12rg</i>、<i>Rag2</i> 遺伝子それぞれの発現消失を確認できた。また胸腺の著しい萎縮が確認できた。末梢血の血球計測ではsKOおよびdKOで白血球が減少していた。リンパ球は減少していた一方で、単球および顆粒球はsKO、dKO、WTで有意差は認めなかった。フローサイトメリーの結果、dKOではCD3+ T細胞が著減していた。sKOではCD3+ CD8+ T細胞が著減した一方CD3+ CD4+ T細胞が些少残存した。sKO、dKOともCD45+ B細胞、CD161+ NK細胞は著減した。ELISA解析の結果、dKOでは血清IgG、IgM、IgAの濃度が低下していた一方、sKOではIgMレベルに有意な変化を認めなかった。易感染性に対しては個別飼育を維持し定期的な微生物検査を続けることで品質を維持できている。特に近年問題視されていたラットポリオーマウイルス2を検査項目に加えることで樹立からおおよそ5年間、一度も感染事故を起こさず維持している。</p> <p>〔総 括(Conclusion)〕</p> <p>従来免疫不全マウスは多系統樹立され活用されてきているところ、体容積や反復処置への耐性など有用性が指摘されながら研究者が利用できる免疫不全ラットは存在しなかった。本研究では <i>I12rg</i> と <i>Rag2</i> のノックアウトラットを作製しその免疫能低下を評価した。本研究では移植実験ができなかった点など課題はあるが、長所も多い。</p> <p>これまで発表された免疫不全ラット系統は成長遅滞、リンパ球の不完全な減少、感染事故などが報告されている。また多くがアウトブリード系統で作製されており、移植後に行う処置の影響を観察する場合や、さらにゲノム編集を施し遺伝子機能を調べる用途では近交系が優れている。またこの免疫不全ラット2系統をNBRPに寄託し、希望する研究者が自由に使えるバイオリソースとして整備した。現時点で系統樹立から5年ほど経過しているが一度も感染事故を起こしたことはなく、また利用を希望する研究者は国内外で増加している。今後、日本発のラットバイオリソースのひとつとして本系統が世界でさらに活用されることを願っている。</p> |                                                                                                    |

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| (申請者氏名) 宮坂 佳樹 |     |        |       |    |
|---------------|-----|--------|-------|----|
| 論文審査担当者       | (職) |        | 氏 名   |    |
|               | 主 査 | 大阪大学教授 | 河原 行郎 | 署名 |
|               | 副 査 | 大阪大学教授 | 中尾 和貴 | 署名 |
|               | 副 査 | 大阪大学教授 | 伊藤 弘人 | 署名 |

## 論文審査の結果の要旨

免疫不全動物はヒト化動物モデルの作製をはじめ、再生医療や腫瘍学など多くの分野で広く用いられている。実験用ラットはマウスに比べ体容積が大きく処置が容易であるなど利点がある一方、良質な免疫不全ラットは存在しなかった。本論文ではバイオリソースとして重症複合免疫不全（SCID）ラットを確立することを目指した。近交系ラットの *Il2rg* 遺伝子を単独に、または *Rag2* 遺伝子と共にノックアウトした結果、重度胸腺低形成、リンパ球減少に起因する白血球減少、特にT細胞、B細胞、NK細胞の著減を認めた。本系統はNBRPラットプロジェクトにより管理、頒布されており利用者が増加している。

本研究は、生命医科学分野における免疫不全ラットの有用性に着眼、系統樹立し、その解析を行い広く研究者の使用に耐えるバイオリソースとして公表した。その応用可能性は大きく医学研究への貢献が期待されるものであり、学位授与に値すると認める。