

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650236

研究課題名(和文) 生命現象の多様性を科学する新しい研究基盤の開発：日本固有齧歯類の実験動物化の試み

研究課題名(英文) Construction of original research infrastructure to investigate life phenomenon of great diversity

研究代表者

越本 知大 (Chihiro, Koshimoto)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授

研究者番号：70295210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：マウスやラットなど既存のリソースを補完する新規研究資源の開発を目的に、アカネズミ(Apodemus)属齧歯類の繁殖コロニー作出と特性評価に着手した。主要な標的を二種(A. speciosusとA. sylvaticus)に絞り、野生由来の前者で世界初の繁殖コロニーの立ち上げ受精卵の人為操作の基礎技術を構築した。更にコロニーが構築できている後者では、マウスやラットと異なる脂質異常症病態の解析からヒトとの類似性を見出した。これらの結果よりApodemus属齧歯類の新規リソースとしての可能性が提示できた。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a new research resource which complements the existing lab-animals such as mice and rats, breeding stock construction and property evaluation in genus Apodemus which include Japanese endemic species have been started. The research performed in Japanese endemic species (A. speciosus) and the European species (A. sylvaticus) as main targets. In the former, the world's first breeding colony has been constructed under indoor condition and fundamental technique development relating to embryo handling in vitro has been started. In the latter which can maintain indoor, it has become clearer that their hyperlipemia characteristic is corresponding to that in human but in mouse or rat. These results indicate that Apodemus could have a high potential as a unique bio-resource.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：実験動物学 バイオリソース Apodemus speciosus Apodemus sylvaticus 脂質異常症(高コレステロール血症) 生殖工学 ゲノム科学

## 1. 研究開始当初の背景

実験動物、とりわけ実験医学領域でのマウスの価値は遺伝子操作技術の確立やゲノム解析の進展によって極めて高いものとなっており、国内外においてマウスバイオリソースが高度に開発、整備されている。しかし全塩基配列の解析をもって生命の設計図が明らかとなったわけではない。全ての生命現象は遺伝子から説明するには複雑性に富んでおり、表現型解析の重要性が改めて強く認識されている。さらに生物が長い進化の過程での多様な変異と選抜の総和として成立していることを勘案すると、ヒトのモデル動物としての役割をマウスのみに求める事にも限界があり、マウスではミミックできないヒトの生命現象が数多く存在することに疑念の余地はない。ましてや近交系マウスは個体差を克服した普遍的な研究素材の創成を目的として作出された特異な動物である。すなわちこの過程はマウス本来が備えていた生き物としての多様性を喪失させ、遺伝的均一性を獲得する過程であったと換言でき、多様性の剥奪は生命科学研究の素材としての短所となる可能性をも含んでいる事を忘れてはならない。

以上の理由から、マウスにおけるこの欠点を補完する新たな研究素材を野生由来齧歯類 *Apodemus* (アカネズミ) 属に求め、さらに実験医学領域を凌駕した広範な生物学分野において遺伝的多様性を維持したモデル動物としての役割をも担う新規実験動物を日本発で確立することには、大きな意義があると考えた。海外に目を向けても、野生齧歯類から構築されたバイオリソースは北米大陸に卓越する *Peromyscus* 属を対象としたサウスカロライナ大学の *Peromyscus* Genetic Stock Center が唯一で、独自のリソースとして米国で高い評価を受けている。しかしヨーロッパを含めそれ以外に同様の研究展開はなされておらず、日本固有種を含むユーラシア大陸の野生齧歯類バイオリソースの構築は、世界的に見ても大きな

意義があると判断し、研究を立案した。

## 2. 研究の目的

近年の生命科学研究は蓄積されたゲノム情報を表現型にリンクさせて総合的に評価する機能性研究へ移行しつつある。そのための研究素材として、生物個体を遺伝的情報と共に体系的に整備したバイオリソースプロジェクトが進行中で、実験動物においても着実な成果をあげている。しかし、既存の実験動物は近交系化の経緯を経て個体差を削ぎ落とした動物として確立されてきた歴史を持つため、遺伝的に均一な近交系動物は、一方で生命現象の多様性を考察する場合には適切なモデルとは成り得ない場合がある。我々は実験動物学的思考に逆行し、多様性が維持されている野生種をベースに遺伝的な統御を制限しつつ新たなバイオリソースを構築する事で、生物多様性に富んだ独自性の高い科学基盤を設立できると考えた。そこで、マウス・ラットとの近縁の野生齧歯類である *Apodemus* (アカネズミ) 属にその可能性を見出す事として、本研究計画を立案した。

計画申請時点では折しも生物多様性条約第10回締約国会議(COP10)が名古屋で開催されていた時期であり、それを契機に「多様性」というキーワードで生物を俯瞰的に捉える事の重要性が一般にも再認識され始めていた、従って本研究を実施する事は社会的意義も深いと考えられた。

## 3. 研究の方法

研究は二本の柱を立ち上げ、将来的にそれらに関連させる事でリソースの有用性が高められるよう立案した。まずは日本固有種齧歯類の実験動物化をめざし、人工的な繁殖と経代が不可能とされてきたアカネズミ (*A. speciosus*) の実験室内においての繁殖条件の探索を中心に据え、同時に諸々の生理学的基礎データを集積した。我々は2011年度よ

り *A. speciosus* の性周期と温度・日長などの条件との関係について予備試験を開始していたため、予め研究の方向性は定まっております。まもなく室内で安定して世代を重ねることが可能となった。この時点で、実験動物のコロニーとして閉鎖系での経代繁殖を試み、リソース化の口火を切った。さらに表現型解析やゲノム解析に着手し、新規モデルとしての可能性探索を開行っている。一方でこれと並行して、既に実験室コロニーが確立し、LDL 蓄積型脂質異常症及び II 型糖尿病様の複合病態を示唆する変異が見出されている欧州種 *A. sylvaticus* において更なる病態特性の解析と原因遺伝子の探索を行い、病態モデルとしての付加情報を蓄積した。具体的にはヒト用脂質異常症治療薬であるスタチンの投与による血中脂質への影響評価、脂質異常症発症と自発活動量やエネルギー代謝との相関関係の精査、さらには *A. speciosus* 同様に肝臓における代謝関連遺伝子の発現解析に着手した。これらから得られた情報は、日本産 *Apodemus* の表現型解析に臨む際にも reference data として活用可能で、*Apodemus* リソースの付加価値の醸成に繋がると考える。

#### 4 . 研究成果

【アカネズミ (*A. speciosus*) の人工繁殖条件の検討と、関連知見の集積】

アカネズミ (*A. speciosus*) の飼育下での繁殖は困難とされ、これまでに報告例は殆どなかった。そのため実験動物化の第一歩として人工環境下での飼育繁殖条件の検索試験を行った。成熟アカネズミを自然光周期・自然環境温度条件の屋根付きの屋外で飼育した場合、偶発的例を除いて繁殖は誘導できなかった。しかし、飼育ケージに疑似巣穴環境を再現することで、秋から春にかけて屋外環境で複数回の繁殖が誘導できた。さらに実験室内では年間を通じて連続的な繁殖が認められた。これは本種の繁殖特性が高い環境応答性を

示すものの、疑似巣穴で人工飼育のストレスを軽減し、適切な環境温湿度を提供すれば効率的に通年繁殖が誘導できること示しており、実験動物コロニー設立に目処が立った。

この課程で、本種において初めて後分娩排卵と着床遅延についての検証的な知見を得た。すなわち人工繁殖において授乳期間と次の妊娠期間が重重複した連続的な分娩が見られたことから、マウスやラットと同様に後分娩排卵と 4~10 日間程度の着床遅延が生じ手いることが示唆された。これはラットなどと同様に、繁殖率の向上を図るための本種の生物学的な戦略で、本種の持つ高い繁殖能力が示された一方で、人工繁殖における管理上の注意点を抽出した結果となった。

飼育下での繁殖が可能となった時点で、その効率に個体差が見られる事がわかった。そこで個体差の克服するために、まず個体ごとの性周期とその季節性を正確に把握する事が求められた。そこで糞サンプルを用いた非観血的で連続的なステロイドホルモン測定系を、マウスを対照に開発する事とした。しかしスミアテストの結果と糞中ステロイドの蛍光 ELISA 測定値との周期は、プロジェステロンについて一部に弱い相関が見られたのみで、敏感な測定系の樹立には至らず、野生種の繁殖期の簡便な推定法としての利用にとどまる結果となった。今後の課題である。

【欧州種 *A. sylvaticus* の病態特性解析と胚の体外操作技術開発】

欧州種であるヨーロッパモリネズミ (*A. sylvaticus*) には脂質異常症を自然発症する個体群が存在し、新規脂質異常症モデル動物としての可能性が期待されてきたが、そこでその発症要因を絞り込むために、強制運動負荷による体重と血中脂質プロファイルの変化を観察した。しかし運動負荷によって体重や血中脂質値は改善されず、後天的な栄養要因より遺伝的要因が影響していることが示唆された。しかし運動負荷による自発活動の

減少が見られたため、詳細なエネルギー収支について再検討する必要性が浮上した。

一方で、ヒト用脂質異常症治療薬であるメバロチンの二週間連続投与試験を行ったところ、マウスと異なり一週間目に一過性にコレステロールの有意な低下が観察され、更にヒトへの効果の高いアトルバスタチンを投与すると、コレステロールの低下は顕著に現れた。

逆に本種に外因性にコレステロールを負荷して血中リポ蛋白の詳細な変動解析を行った場合、通常試料給与下の主要リポ蛋白はマウス同様に HDL であったが、マウス血中で殆ど見られない VLDL と LDL も高い割合で検出された。ここにコレステロールを負荷すると VLDL は 5~10 倍に、LDL も 1.4~2.6 倍に増加した。このことは通常試料給与時においても本種のリポ蛋白組成がマウスとは異なるうえ、コレステロール負荷に対する応答性も個体差があるものの、マウスと異なりヒトと類似した特性を有する可能性が強く示唆された。そこでヒトの血中脂質代謝の鍵となる CETP の発現検索を目的に、次世代シーケンサーを用いて肝臓の mRNA の網羅的発現解析を試みた。しかし CETP 遺伝子の発現は見出すことができなかった。一方で健常個体と脂質異常個体間において、脂質代謝に関連した幾つかの遺伝子発現の様式が異なる可能性が見出され、これらの情報をもとに発現量解析を行えば、本種で見られる脂質異常の原因に迫れると考えている。

*Apodemus* 属齧歯類の効率的な繁殖と系統維持、将来的な遺伝子操作個体の作出までを見据えた場合、受精卵の体外操作技術を確立することは、研究素材としての本種の付加価値を高めることは明白である。そこで本種の排卵誘起、体外培養、体外受精、胚凍結技術について検討した。

このうち排卵誘起に関しては、アメリカで実験動物化されている *Peromyscus* で有効な

PMSG 二回投与方法ではなく、マウスと同様の一回投与方法が有効で、投与間隔を 54 時間に延長することで、より効率的に排卵が誘起できることがわかった。そこで排卵卵子を用いた体外受精を行ったが、受精率低く、授精しても 2-4 細胞期で発生を停止した。そこで胚の体外培養条件を再検討した。哺乳類の胚は発生初期においてマグネシウムなどの二価カチオンやグルコースが発生を阻害する。また動物種によって適正な浸透圧が 220-300mOsm 程度の幅でばらつくことも知られている。そこで 1) 二価カチオンのキレートである EDTA を添加した培地、2) グルコース濃度を通常の 10% に低減した培地、3) 浸透圧を 250mOsm まで低減した培地を用いて 2 細胞期受精卵の培養試験をおこなったところ、いずれも、発生が若干改善された。今後 1)~3) の条件を組み合わせることで、条件が改善されるかもしれない。好適な体外培養系が確立できなかったため、胚凍結試験を実施しても融解後の検定が困難である。そこで直接的な凍結融解試験を実施する前に、発生諸段階の胚の物理指標、すなわち水と耐凍剤の膜透過性を測定することで、その凍結特性を類推する事とした。その結果、桑実期以前の *Apodemus* 属の胚では、水および透過性が極端に低かったグリセロールを除く諸々の耐凍剤は膜を単純拡散で透過することが示された、一方で桑実期から初期胚盤胞期にかけて、水と耐凍剤の透過性は若干上昇することから、水チャンネルの発現が始まっていると予測できた。しかしマウス胚に較べて透過性の変化は緩慢であった。これらの知見は本種胚のガラス化凍結には高濃度の耐凍剤ないしは長時間の平衡時間が必要で、マウスに較べて困難であろうと予測された。さらに今後本種胚の凍結を成功に導くための予備的知見を集積留守目的で、ラット、ウシ、ブタ胚の水チャンネル発現に関連する基礎研究を並行して実施した。

また我々は将来を見据えて、コロニー化した

*Apodemus* 属を多様な目的の研究素材として発展させるため、本種を野生希少齧歯類の人工繁殖技術の開発モデルや小型哺乳類の消化管内微生物叢の分子生態学的比較解析モデル、野生齧歯類の eavesdropping(盗み聞き)行動の比較モデルとして用いた発展研究を実施した(「5. 主な発表論文等」参照)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### 〔雑誌論文〕(計 6 件 全て査読有り)

Y. Yamaji, S. Seki, K. Matsukawa, C. Koshimoto, M. Kasai, and K. Edashige: Developmental Ability of Vitrified Mouse Oocytes Expressing Water Channels. *J. Reprod. Dev.* 57(3) 403-408. 2011

B. Jin, Y. Kawai, T. Hara, S. Takeda, S. Seki, Y. Nakata, K. Matsukawa, C. Koshimoto, M. Kasai, and K. Edashige: Pathway for the Movement of Water and Cryoprotectants in Bovine Oocytes and Embryos. *Biol.Reprod.* 85(4): 834-47. 2011

S.H. Sakamoto, S.N. Suzuki, Y. Degawa, C. Koshimoto, and R. O. Suzuki: Seasonal habitat partitioning between sympatric terrestrial and semi-arboreal Japanese wood mice, *Apodemus speciosus* and *A. argenteus* in spatially heterogeneous environment. *Mammal Study.* 37(4):261-272. 2012

B. Jin, K. Mochida, A. Ogura, C. Koshimoto, K. Matsukawa, M. Kasai, and K. Edashige. Equilibrium Vitrification of Mouse Embryos at Various Developmental Stages. *Mol. Reprod. Dev.* 79 (11) 785-794. 2012.

酒井悠輔・坂本信介・岩本直治郎・尾崎良介・江藤 毅・篠原明男・森田哲夫・越本知大：アカネズミ(*Apodemus speciosus*)の実験動物化に向けた飼育繁殖実験 哺乳類科学 53(1): 57-65. 2013

名倉彩香・篠原明男・坂本信介・越本知大：高コレステロール血症を自然発症するヨーロッパモリネズミに対するプラバスタチンの影響、九州実験動物雑誌 29: 23-28. 2013

### 〔学会発表〕(計 23 件)

K. Edashige, Y. Yamaji, S. Seki, K. Matsukawa, C. Koshimoto, M. Kasai. Developmental ability of vitrified mouse

oocytes expressing water channels. 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Cryobiology "CRYO 11" 24-27 July 2011, Corvallis, OR, USA

酒井悠輔・坂本信介・岩元直治郎・高橋俊浩・森田哲夫・篠原明男・越本知大、アカネズミの繁殖生理特性：異性からの刺激に対する雌雄の非対称的生理応答、日本哺乳類学会 2011 年度大会 宮崎市 (2011.9)

大久保慶信・越本知大・高橋俊浩・森田哲夫、予測不能な寒冷暴露がヒメネズミの日内休眠に及ぼす影響、日本哺乳類学会 2011 年度大会 宮崎市 (2011.9)

花田千聖・八木千尋・井出麻佑子・坂本信介・篠原明男・高橋俊浩・森田哲夫・越本知大、*Apodemus* 属齧歯類の過排卵誘起条件の検討、第 29 回九州実験動物研究会 鹿児島市 (2011.11)

酒井悠輔・坂本信介・岩元直治郎・高橋俊浩・森田哲夫・篠原明男・村上 昇・中原桂子・越本知大、小型齧歯類に適用可能な非侵襲的性ホルモン値測定法の確立、第 29 回九州実験動物研究会 鹿児島市 (2011.11)

坂本信介・酒井悠輔・岩元直治郎・篠原明男・越本知大、実験用および野生由来齧歯類の eavesdropping (盗み聞き) 行動の比較、日本実験動物科学・技術 九州 2012 大分県別府市 (2012.5)

酒井悠輔・坂本信介・岩元直治郎・高橋俊浩・森田哲夫・篠原明男・越本知大、小型齧歯類の微量血漿中及び糞中の性ホルモンの測定、日本実験動物科学・技術九州 2012 大分県別府市 (2012.5)

名倉彩香・酒井悠輔・坂本信介・篠原明男・越本知大、ヨーロッパモリネズミにみられる高脂血症に対する投薬と強制運動の影響、日本実験動物科学・技術九州 2012 大分県別府市 (2012.5)

酒井悠輔・坂本信介・加藤悟郎・岩元直治郎・高橋俊浩・森田哲夫・篠原明男・越本知大、アカネズミにおける後分娩発情と着床遅延、日本哺乳類学会 2012 年度大会 神奈川県相模原市 (2012.9)

酒井悠輔・坂本信介・森田哲夫・篠原明男・越本知大、実験動物化に向けたアカネズミの繁殖、第 30 回九州実験動物研究会 長崎市 (2012.11)

井上比加里・井手麻佑子・坂本信介・

森田哲夫・越本知大・篠原明男、アカネズミ (*Apodemus speciosus*) の盲腸内微生物叢の解析、第 30 回九州実験動物研究会 長崎市 (2012.11)

猪口瑞穂・名倉彩香・坂本信介・森田哲夫・篠原明男・越本知大、ヨーロッパモリネズミにおける運動による血中脂質と自発活動量への影響、第 30 回九州実験動物研究会 長崎市 (2012.11)

八木千尋・北山みずほ・花田千聖・坂本信介・篠原明男・枝重圭祐・越本知大、ヨーロッパモリネズミ卵母細胞の水および耐凍剤に対する透過性、第 30 回九州実験動物研究会 長崎市 (2012.11)

山下諒・七条宏樹・坂本信介・篠原明男・越本知大、高コレステロール飼料を給与したヨーロッパモリネズミにおけるリポ蛋白の変動、第 60 回日本実験動物学会総会 茨城県つくば市 (2013.5)

酒井悠輔・坂本信介・森田哲夫・篠原明男・中原桂子・村上昇・越本知大、卵巣摘出マウスの微量血漿中及び糞中の性ホルモン測定、第 60 回日本実験動物学会総会 茨城県つくば市 (2013.5)

名倉彩香・七條宏樹・泉陽介・坂本信介・篠原明男・越本知大、ヨーロッパモリネズミにおけるアトルバスタチンのコレステロール低下作用、第 60 回日本実験動物学会総会 茨城県つくば市 (2013.5)

佐々木智世・平川猛・北山みずほ・越本知大・松川和嗣・葛西孫三郎・枝重圭祐、平衡ガラス化法によるラット胚の凍結保存、第 60 回日本実験動物学会総会 茨城県つくば市 (2013.5)

K.Edashige, S. Seki, H. Arimura, M. Kitayama, S. Niimi, C. Koshimoto, K. Matsukawa, M. Kasai. Aquaporin 9 plays a significant role in the channel-dependent movement of Me<sub>2</sub>SO and acetamide in mouse morulae. 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Cryobiology "CRYO 13" July 2013, Bethesda, MD, USA

井上比加里・酒井悠輔・坂本信介・森田哲夫・越本知大・篠原明男、食性の異なる小型哺乳類の消化管内微生物叢の分子生態学的比較解析、日本哺乳類学会 2013 年度大会 岡山市 (2013.9)

八木千尋・北山みずほ・花田千聖・坂本信介・篠原明男・枝重圭祐・越本知大、新規実験動物候補ヨーロッパモリネズ

ミの卵子と 2 細胞期胚における水および耐凍剤透過性、第 106 回日本繁殖生物学会 東京都府中市 (2013.9)

②① 泉陽介・加藤悟郎・櫻村敦・坂本信介・森田哲夫・篠原明男・越本知大、ヨーロッパモリネズミのエネルギー代謝に関する予備的研究、第 31 回九州実験動物研究会 熊本県山鹿市 (2013.11)

②② 豊島梨沙・八木千尋・坂本信介・森田哲夫・篠原明男・越本知大、ヨーロッパモリネズミ排卵誘起条件の再検討、第 31 回九州実験動物研究会 熊本県山鹿市 (2013.11)

②③ 江藤 毅・坂本信介・大久保慶信・越本知大・櫻村 敦・森田哲夫、ハドリングと日内休眠の複合利用による小型齧歯類のエネルギー節約、日本動物行動学会 第 32 回大会 広島県東広島市 (2013.11)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

越本 知大 (Koshimoto Chihiro)  
宮崎大学・70年代科学実験総合センター・教授  
研究者番号：70295210

(2) 研究分担者

枝重 圭祐 (Edashige Keisuke)  
高知大学・教育研究部・教授  
研究者番号：30175228

森田 哲夫 (Morita Tetsuo)  
宮崎大学・農学部・教授  
研究者番号：90301382

(3) 連携研究者

なし