

No.	25-1158	
Project Title	多重標識モデルラットRatbowの樹立とドライバーラインの拡充	
Principal Investigator	Takuma Kumamoto (Tokyo metropolitan institute of medical science・主席研究員)	
Project Member(s)	IMSUT Host Researcher	Tomoji Mashimo (The Institute of Medical Science, The University of Tokyo・Professor)
	Project Member (s)	石田 紗恵子 (先進動物ゲノム研究分野・助教)
	Project Member (s)	服部 晃佑 (先進動物ゲノム研究分野・学術専門職員)

東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業
共同研究報告書（年次終了・研究完了）【国内】

共同研究報告（年次終了）

2025 年度新規採択 1 年目においては、2024 年度までに樹立した、神経細胞特異的に発現する Thy1 プロモーターを用いた Ratbow 系統 (Rosa26Thy1-Ratbow) およびコビキタスな発現を目的とした EF1 α プロモーターを用いた Ratbow 系統 (Rosa26EF1 α -Ratbow) について、Thy1-Cre および EF1 α -Cre 系統との交配による発現評価を進めた。その結果、蛍光タンパク質の発現量が当初の想定よりも低いことが明らかとなったため、新たに、全身性かつ強力な発現が期待される CAG プロモーターを用いた Ratbow 系統 (Rosa26CAG-Ratbow) の作製を進めた。

2025 年度終了時点では、Rosa26Thy1-Ratbow、Rosa26EF1 α -Ratbow、および Rosa26CAG-Ratbow の各系統について、Ratbow システムの脳内における発現分布および発現強度の比較評価を、東京大学医科学研究所顕微鏡コアラボが所有する共焦点顕微鏡を用いて進めている。CAG-Ratbow 系統については、組換え前に標準的に発現する EBFP シグナルを先行して確認し、正常な EBFP 発現を観察した。現在、上記 Cre ラットとの交配後サンプルを取得し、Cre 依存的な蛍光タンパク質発現およびモザイク標識能の評価を進める準備段階にある。

また、モザイク解析機能を検証するための予備実験も並行して進めた。第一に、Rat1 細胞を用いて Ratbow stable cell line を作製し、そこに Cre および各種インテグレースを導入することで、in vitro において Ratbow システムの組換え効率およびモザイク標識能を評価する実験系を構築している。現在、stable cell line の作製を進めている。第二に、in vivo における評価試験として、Ratbow ラットの胎仔脳に Cre 発現プラスミド等を in utero electroporation により導入し、局所的な組換え誘導およびモザイク標識を評価する実験系の検討を開始した。すでに機器のセットアップを完了し、実験条件の最適化を進めている。このように、CAG-Ratbow 系統の作製と並行して、Ratbow システムのモザイク解析機能を多角的に評価する基盤を整備している。

さらに、アストロサイト特異的に Cre を発現する Cre ドライバーラットとして、Aldh1l1-CreERT2 系統の作製にも成功した。本系統は、ラットにおいて全タイプのアストロサイトを標識し得る新規 Cre ドライバー系統として期待される。これまでに、RT-PCR により Cre 発現を確認している。次に、Aldh1l1-CreERT2 ラットを Reporter rat と交配し、4-hydroxytamoxifen またはタモキシフェン投与により Cre 依存的な組換えを誘導する実験を行った。本実験系では、通常 EGFP を発現して緑色を呈するアストロサイトが、Cre 依存的な組換えにより mCherry を発現し、赤色に変化することを指標として組換え効率を評価する。これまでに、胎生期における母体経由の投与、および生後個体への腹腔内投与による誘導実験を行ったが、現時点では十分な組換え誘導は得られていない。そのため、今後は 4-hydroxytamoxifen またはタモキシフェンの投与量、投与時期、投与経路の詳細な最適化が必要であると考えられる。この点については、ラットの取り扱いに精通している東北医科薬科大学の廣瀬准教授に協力を依頼し、タモキシフェン誘導条件の検討実験について協力を得る予定である。現在、個体搬入に向けた手続きを進めている。