

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500496

研究課題名(和文)改良型TRECKマウスを用いた細胞移植系の確立

研究課題名(英文)The cell transplant system using improved TRECK mice

研究代表者

斉藤 美知子(Saito, Michiko)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：40379558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ジフテリア毒素受容体(DTR)を特定の細胞に発現させ、毒素投与によってその細胞を破壊するTRECK法は、疾患モデルマウス作製法としても再生移植研究のドナー細胞に利用するとしても非常に優れたツールである。しかし、このDTRが増殖因子であることが生体内で不具合をきたし、生体内でDTRを全身に発現させることは困難であった。本研究において、増殖因子活性を失った改良型DTRを用いて全身でDTRを発現させることに成功した。さらにこのマウスよりドナー細胞を分離し疾患モデルマウスに移植した後、生着したドナー細胞を毒素投与によって破壊してその効果を確認することが可能であることを証明した。

研究成果の概要(英文)：The TRECK method is very useful for generating model mice and obtaining useful donor cells. However, it has been difficult to make DTR expressed in whole bodies of mice because DTR is a growth factor and overexpression of it induces a slightly abnormal phenotype. In this study, to solve these problems, we generated improved TRECK mice using a modified DT receptor with reduced growth factor activity. The improved TRECK mice showed a normal phenotype and the DTR could be expressed in whole mice bodies. This improvement is expected to extend the applicable range of the TRECK method. Furthermore, we could demonstrate that transplanted and accepted donor cells from this mouse could be removed again from the recipient mouse by DT administration to examine the effect of the transplantation.

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：再生医療 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

ヒトやサルの Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) はジフテリア毒素 (diphtheria toxin; DT) の受容体として機能するが、マウスやラットの HB-EGF は毒素結合部位のアミノ酸配列の相違により、毒素受容体としては機能しない。したがって、DT 受容体 (DT receptor; DTR=ヒト HB-EGF) を標的細胞のみで発現するトランスジェニックマウスを作製し、このマウスに DT を投与することによって標的細胞のみが特異的に破壊されることになる。実際、アルブミンエンハンサープロモーター制御下で毒素受容体であるヒト HB-EGF を肝実質細胞に発現させたトランスジェニックマウスを作製し、任意の時期の毒素投与により肝炎を引き起こすことができることを証明した (Toxin Receptor-mediated Cell Knockout; TRECK 法の開発。M.Saito *et al.*, *Nature Biotechnology* 19, 746-750(2001))。

この TRECK 法を利用し、ヒトインスリンプロモーターを用いて、新たに糖尿病モデルマウスを作製したところ、DT 投与により細胞が減少あるいは消滅し、多尿、糖尿、高血糖などの糖尿病様症状を示したが、野生型マウスと比べて僅かながら TRECK マウスに耐糖能の悪化が認められた。また、免疫組織学的解析において TRECK マウスでは、膵島が齧歯類特有の細胞を細胞が取り囲むというマントルコア構造をとっていないことがわかった。以前作製した肝実質細胞特異的にヒト HB-EGF を過剰発現させた TRECK 肝炎モデルマウスは、通常の飼育条件下では異常は見られなかったが、肝切除を行うとその後の肝実質細胞の増殖の加速が見られた (Kiso. S, *et al.*, *Gastroenterology* 124, 701-707 (2003))。さらに、HB-EGF の過剰発現により膵臓の繊維化が見られたという報告もある (Means. A. L. *et al.* *Gastroenterology*. 124,(1020-1036))。TRECK マウスにこのような特有の現象が起きる原因の一つとしては、DTR が増殖因子であるということが考えられた。毒素受容体である HB-EGF は、ヘパリン結合ドメイン、EGF 様ドメイン、膜貫通ドメインと細胞

質ドメインを含む膜結合型のタンパク質として合成される。毒素受容体としても機能する膜結合型 HB-EGF は、細胞表面でプロテアーゼにより細胞外領域が切断され分泌型となる。そして分泌された HB-EGF は、様々な細胞に対して増殖活性を持ち、EGF や他の EGF ファミリーのタンパク質と同様に EGF 受容体に結合しリン酸化の刺激となる。そこで我々は、DTR 機能を保持しつつ増殖因子活性を失い、プロテアーゼによる切断が起こらない変異型ヒト HB-EGF (人工毒素受容体: I117V/L148V=TR6) を作製した。

2. 研究の目的

本研究では DTR 機能を保持しつつ増殖因子活性を失い、プロテアーゼによる切断が起こらない変異型ヒト HB-EGF (人工毒素受容体) を用いることで、TRECK マウスに異常を生じる可能性を取り除き、DT 投与前では野生型により近い形態をもち、DT 投与によって初めて症状を呈するという特徴をもつ TRECK 糖尿病モデルマウスの作製を計画した。

一方、ヒト HB-EGF (毒素受容体) を全身で発現させるとマウスは生まれてくることができず、胎児期の HB-EGF の過剰発現は致死となる可能性が報告されている (Cha *et al.*, *Mol.Microbiology*, 49(1), 235-240(2003)) ため、全身で遺伝子を発現させるプロモーターを用いて TR6 を全身に発現させた場合は生まれてくるのかどうかを確認する。このことによって、マウス個体で人工毒素受容体を用いたときの有用性を検証する。トランスジェニックマウスの場合は、外来遺伝子が導入された位置によって発現形態が異なるため、多くのラインを作製し解析を行うこととし、トランスジェンが導入されたマウスについて各組織での発現を確認する。全身発現型の TRECK マウスが生まれれば、ドナー細胞を採取するマウスとして有用に利用できるはずである。

さらに実際に、ドナー細胞用マウスとして使用可能かどうか、ランゲルハンス島や

肝実質細胞などを採取し、移植実験を行い検討する。

3. 研究の方法

(1) 改良型 TRECK 糖尿病モデルマウスの解析

これまでに作製した 10 ライン以上のトランスジェニックマウスのうち、毒素投与によって糖尿病を発症するマウスを数ライン選び、ライン化している。これらの TRECK 糖尿病モデルマウスにおいて、各臓器の発現解析を行い、膵内分泌細胞関連遺伝子の発現に変化がないか確認する。また、耐糖能、インスリン分泌に変化が無いか確認する。

(2) 人工毒素受容体全身発現型トランスジェニックマウスの作製、Luc トランスジェニックマウスの作製

前述の膵細胞でのみ TR6 を発現させたマウスでは、細胞での異常を克服できるかどうかは判断できるが、TR6 がどの細胞に発現させても異常を来さないかどうかはわからない。そのため全身で遺伝子を発現させるプロモーターであるチキン アクチンプロモーターを用い、TR6 を全身で発現するトランスジェニックマウスを作製する (CAG-TR6)。このとき、トランスジーン の発現確認を容易にするために、TR6 と GFP 遺伝子を融合させる。これまでに、GFP 融合ヒト HB-EGF 遺伝子を導入したマウス細胞の DT 感受性は、野生型ヒト HB-EGF を導入したマウス細胞と変わらないことを確認している。比較検討のため、野生型ヒト HB-EGF と TR6 両方を用いてトランスジーンを作製し、マイクロインジェクションを行う。野生型ヒト HB-EGF では全身発現させると生まれにくいという報告があるため、それぞれ 100 匹程度ずつのマウスが誕生するまで、C57BL/6J × C57BL/6J の受精卵へトランスジーン のインジェクションを行い、誕生したマウスの中にトランスジーンが導入されたマウスが何%いるか確認する。TR6 がどの細胞でも異常を来すことがなければ、野生型ヒト HB-EGF を導

入したマウスに比べて、高い確率で導入遺伝子が確認されるはずである。

さらに、ルシフェラーゼ cDNA をチキン アクチンプロモーターの下流に接続し、トランスジェニックマウスを作製する (CAG-Luc)。ルシフェラーゼ遺伝子をもったマウスからドナー細胞を採取し、このドナー細胞が移植後レシピエントマウスの体内でルシフェラーゼを産生すれば、IVIS System (Xenogen 社) という化学発光を捉える機器で非侵襲的にモニターすることができる。CAG-TR6 が生まれれば、CAG-Luc と掛け合わせるにより、その子どもたちはすべての細胞で TR6 とルシフェラーゼ遺伝子を持つことになり、ドナー細胞として利用するのに非常に有用である。

(3) CAG-TR6 由来細胞を用いた細胞移植

作製した CAG-Luc と CAG-TR6 を掛け合わせるによって作製したマウスよりから、ランゲルハンス島、神経芽細胞、肝実質細胞などの細胞を分離精製し、既存のモデルマウスを用い、細胞移植を試みる。

どの細胞移植においても、CAG-TR6 マウス由来の細胞のみが毒素投与により除去されたことは、IVIS を用いた観察でルシフェラーゼの発光が消えることによって確認することができる。

4. 研究成果

改良型毒素受容体 Toxin Receptor5, 6 (TR5, TR6) を作製し、それらがマウス個体内で本来の毒素受容体で起こっていた障害が改善されているのかどうかを検討するため、野生型ヒト HB-EGF (TR1) および作製した TR5, TR6 が全身で発現するトランスジェニックマウスを作製した (CAG-TR1, CAG-TR5, CAG-TR6)。これらのトランスジェニックマウスはそれぞれが 100 匹の産子を得るまでインジェクションを行い、産子の中にどれくらいの割合で遺伝子が導入されているか、また遺伝子が導入されたラインではどれくらいの割合で遺伝子が発現しているかを調べた。その結果、遺伝子が導入された割合は、TR1 で

8.7%、TR5で20%、TR6で18%であった。また遺伝子が導入されたマウスの中で、実際に毒素受容体である HB-EGF が発現している割合は、TR1、TR5、TR6 の順に 22.2%、73.6%、85%であった。このことから、TR1(野生型 HB-EGF:毒素受容体)に比べ、TR5 と TR6 は生体内における毒性(過剰発現により生体に異常をきたす性質)を軽減した改良型毒素受容体であるといえる。

移植のドナー細胞に用いるモニター系の確立として、全身でルシフェラーゼ遺伝子を発現するマウス(CAG-Luc)とインスリン発現細胞になると蛍光を発する Ins-Venus の作製をし、目的にあったラインを選定、ホモマウスの作製を行った。CAG-Luc マウスを、CAG-TR6 マウスと交配し、そこから細胞を精製して移植することにより、生着したドナー細胞を非侵襲的に観察することができ、毒素投与によってその効果を確認することも可能であることを証明した。

一方、再生移植のドナー細胞候補探索も試みている。前述の Ins-Venus というトランスジェニックマウスから細胞を採取し、遺伝子導入によりインスリン陽性細胞へと分化転換が起これば蛍光を発するようになるため、評価がしやすい。現在、膵細胞以外の非侵襲性に得ることが可能である自己細胞を Ins-Venus マウスから取り出し、体外で遺伝子導入を行って、脱分化を経ずにインスリン細胞様の細胞へ転換させるダイレクトリプログラミングに取り組んでいる。

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)

Identification of the redox partners of ERdj5 /JPDI, a PDI family member, from an animal tissue

Kadokura H, Saito M, Tsuru A, Hosoda A, Iwawaki T, Inaba K, Kohno K.

Biochemical and biophysical research communications 440(2):245-50, 2013 査読有り

Generation of mouse models for type 1 diabetes by selective depletion of pancreatic beta cells using toxin receptor-mediated cell knockout.

Matsuoka K, Saito M, Shibata K, Sekine M, Shitara H, Taya C, Xiaohong Zhang, Takahashi A. T., Kohno K, Kikkawa Y, Yonekawa H.

Biochemical and biophysical research communications 436(400-405) 2013 査読有り

Negative feedback by IRE1 β optimizes mucin production in goblet cells.

Tsuru A, Fujimoto N, Takahashi S, Saito M, Nakamura D, Iwano M, Iwawaki T, Kadokura H, Ron D, Kohno K.

Proc Natl Acad Sci U S A. Feb 19;110(8):2864-9, 2013 査読有り

Fetal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin transactivates aryl hydrocarbon receptor-responsive element III in the tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons of the mouse midbrain.

Tanida T, Tasaka K, Akahoshi E, Ishihara-Sugano M, Saito M, Kawata S, Danjo M, Tokumoto J, Mantani Y, Nagahara D, Tabuchi Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Kawata M, Hoshi N.

J Appl Toxicol. Jan 8. 2013 査読有り

A novel mammalian ER-located J-protein, DNAJB14, can accelerate ERAD of misfolded membrane proteins.

Kadokura H, Yamamoto Y, Takeuchi M, Saito M, Tsuru A, Kohno K.

Cell Structure and Function 37(2):177-87, 2012 査読有り

Comparative study of transplantation of

hepatocytes at various differentiation stages into mice with lethal liver damage

Kamimura R, Ishii T, Sasaki N, Kajiwara M, Machimoto T, Saito M, Kohno K, Suemori H, Nakatsuji N, Ikai I, Yasuchika K, and Uemoto S.

Cell Transplantation 21(11):2351-2362, 2012
査読有り

〔学会発表〕(計 8 件)

Yuichi Tuchiya, Michiko Saito, Takao Iwawaki
Jun-ichi Miyazaki, Kenji Kohno

IRE1 α is indispensable for the efficient production of insulin in pancreatic β cell

Keystone Symposia “Diabetes-New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6)” (2013.1.30) Keystone Resort (U.S.A)

Akio Tsuru, Michiko Saito, Megumi Iwano, Takao Iwawaki, David Ron, Kenji Kohno

Negative feedback by IRE1 β optimizes mucin production in goblet cells

Cold spring harbor meeting (2012.5.4) Cold spring harbor, U.S.A

Yuichi Tsuchiya, Michiko Saito, Jun-ichi Miyazaki, Takao Iwawaki, Kenji Kohno

Roles of the unfolded protein response pathways in pancreatic β cells

Cold Spring Harbor Conferences Asia, Protein Homeostasis in Health and Disease 2011

(2011.9.27) Suzhou Industrial Park 215123 China

森田この美、斉藤美知子、河野憲二

細胞系譜の異なる細胞から膵 β 細胞へのダイレクトリプログラミング

第 13 回日本再生医療学会 (2014.3.4-6) (京都国際会館)

Yuichi Tuchiya, Michiko Saito, Takao Iwawaki
Jun-ichi Miyazaki, Kenji Kohno

小胞体ストレスセンサーIRE1 α の効率的なインスリンの成熟への役割

第 65 回日本細胞生物学会大会

(2013.6.19-21) (名古屋)

斉藤美知子、土屋雄一、岩脇隆夫、森和俊、河野憲二

Mechanism of diabetes development due to dysfunction of unfolded protein response

第 35 回日本分子生物学会年会 (2012.12.11-14) (福岡)

Akio Tsuru, Naoko Fujimoto, Satsuki Takahashi, Daisuke Nakamura, Michiko Saito,

Rina Nagai, Megumi Iwano, Takao Iwawaki, David Ron, Kenji Kohno

Negative feedback by IRE1 β optimizes mucin production in goblet cells

第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会(2012.5.30) 神戸

Yuichi Tsuchiya, Michiko Saito, Takao Iwawaki, Jun-ichi Miyazaki, Kazutoshi Mori, Kenji Kohno

The Role of the Unfolded Protein Response in Pancreatic β cells

日本農芸化学会 2012 年度京都大会 (2012.3.22-26) (京都女子大学、聖護院、ウエスティン都ホテル京都)

斉藤美知子、土屋雄一、岩脇隆夫、森和俊、河野憲二

Role of the unfolded protein response pathway in pancreatic β cells

第 34 回日本分子生物学会(2011.12.13-16)

(パシフィコ横浜)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/kouno/kouno.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

斉藤 美知子 (Saito Michiko)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエ
ンス研究科・助教

研究者番号：40379558

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：