

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500505

研究課題名(和文) 糖尿病合併症研究に適した病態モデルブタの開発

研究課題名(英文) Development of disease model pigs suitable for diabetic complications research

研究代表者

長嶋 比呂志 (NAGASHIMA, Hiroshi)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：50318664

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)：本研究の目的は糖尿病およびその合併症研究に適した病態モデルブタを開発することである。我々は若年発症成人型糖尿病3型の原因遺伝子である変異型ヒトHNF-1 α P291fsinsC遺伝子を導入した遺伝子組換え(Tg)ブタを樹立した。このTgブタは恒常的な高血糖(>200 mg/dl)を維持し、経口糖負荷試験でも糖尿病の特徴を示した。病理組織学的には膵臓ランゲルハンス島の形成不全、ヒト糖尿病性腎症で確認される結節性病変、糖尿病性網膜症で確認される網膜出血と綿花状白斑が確認された。これらの結果から、このTgブタは有望な糖尿病およびその合併症モデルになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at identifying the characteristics of transgenic(tg) pigs as a research model for diabetes and its complications. Tg pigs carrying a mutant gene, human HNF-1 α (P291fsinsC), responsible for maturity-onset diabetes of the young type 3, were obtained by in vitro fertilization using the cryopreserved sperm from tg founder. The tg pigs maintained a high blood glucose level(>200mg/dl). The oral glucose tolerance test showed that the recovery of the blood sugar levels of the pigs was significantly delayed compared with non-tg pigs. The hypoplasia of the islets of Langerhans was confirmed by the histopathological image of the tg pigs' pancreas. The histopathological image of the tg pigs' kidney showed a nodular lesion typical of diabetic nephropathy in humans. Also, retinal hemorrhages and cotton-wool spots were confirmed in the tg pigs. These data demonstrate that the tg pigs is a promising model for research into diabetes and its complications.

研究分野：発生工学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：ブタ 遺伝子組換え動物 病態モデル動物 糖尿病 合併症 糖尿病腎症 糖尿病網膜症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病研究において優れた病態モデル動物は不可欠であり、げっ歯類の糖尿病モデル動物に比して、よりヒトへの外挿性の高い知見が得られる大型動物のモデルが望まれている。ブタは生理・解剖学的、病理学的にヒトとの類似性が高いという特徴を持つことから、近年、大型実験動物として医学研究に多用されている。従来、ブタの糖尿病モデルを作るために、膵臓全摘や化学物質による膵細胞破壊が行われてきた。しかし、膵臓全摘には外科手術の煩雑さに加えて、被処置個体が長期生存できないという致命的欠点があり、また膵細胞破壊には糖尿病症状の不安定性や長期維持が難しいという問題があった。

このような課題に対して、我々は世界で初めて、遺伝子改変による糖尿病発症ブタを作出することに成功した(Umeyama et al. 2009)。このブタは若年発症成人型糖尿病 3 型 (MODY3) の原因遺伝子である変異型ヒト Hepatocyte Nuclear Factor-1 (HNF-1 P291fsinsC) 遺伝子を導入したブタ胎仔線維芽細胞を用いて、体細胞核移植技術により作出した。しかし、この糖尿病発症ブタの病状が重篤である為に長期生存が難しい事、また体細胞核移植で作出されるクローン個体である事から実験動物として多個体を供給する事が難しかった。

2. 研究の目的

本研究では第一に、長期飼育可能な糖尿病発症ブタの系統樹立と、実験モデル動物としての多個体生産を実現する人工生殖システムの確立を目的とした。さらに、モデルブタ群における糖尿病の再現性とその病状評価、並びに糖尿病合併症の詳細な解明を目的とした。

3. 研究の方法

以前の研究では、HNF-1 のドミナントネガティブ変異体(HNF-1 P291fsinsC)の高発現により重篤な糖尿病症状が現れる事が確認された。そこで本研究では、導入遺伝子コピー数の少ない細胞株を核ドナー細胞に用い、体細胞核移植法により founder 個体を作出した。Founder 個体は、インスリン投与により血糖値をコントロールしながら性成熟期まで育成し、種豚とした。この種豚の精巢上体精子を採取し、Kikuchi et al.(1998)の方法にて凍結保存した。凍結保存精子を用いて、下記の実験を実施した。

(1)凍結精子による糖尿病 Tg ブタの安定作出

NCSU23 を基本とする培地を用いてブタ卵丘卵子複合体から体外成熟卵を調製し、Yoshioka et al.(2008)の方法を用いて体外受精を行った。体外受精胚を PZM-5 液で培養し、仮親の未経産メス豚の子宮に移植した。

(2)糖尿病 Tg ブタの生理機能解析

誕生した糖尿病 Tg ブタは、血糖値コントロールせずに市販の飼料を用いて飼育した。経時的に体重測定、随時血糖値測定、血液生化学測定、病理組織解析を実施した。

(3)糖尿病 Tg ブタの糖尿病腎症の解析

血糖値コントロールせずに糖尿病 Tg ブタを 10 か月齢迄育成し、経時的に腎生検を実施して、腎組織の病変を解析した。

(4)糖尿病 Tg ブタの糖尿病網膜症の解析

2 頭の糖尿病 Tg ブタの血糖値を約 400mg/dl にコントロールしながら 1 年間飼育し、経時的に眼底検査を実施し、眼底の病変を解析した。

4 . 研究の成果

(1)凍結精子による糖尿病 Tg ブタの安定作出

糖尿病ブタ由来の凍結精子を用いて作出した体外受精胚を8頭の仮親に移植した。この結果、7頭の仮親が妊娠し、54頭の後代産仔(Non-Tg産仔:34頭(内死産仔6頭)、Tg産仔:20頭(内死産仔4頭))が誕生した。生存Tg産仔16頭の内、9頭は離乳時迄生存し、恒常的な高血糖状態の病態を示した。

(2)糖尿病 Tg ブタの生理・病理学的特徴

誕生したTgブタの随時血糖値は、Non-Tgブタに対して2週齢から有意に高値であり(Tgブタ群 vs Non-Tgブタ群: 512 ± 50.9 vs 101 ± 4.3 mg/dl)、その後400~600mg/dlの間で推移した。Tgブタの1,5-AG濃度もNon-Tgブタに対して有意に低い事から、恒常的な高血糖状態である事が判明した。経口糖負荷試験においても、Non-Tgブタは糖負荷後3時間後には血糖値124mg/dlとなるのに対し、Tgブタの血糖値は483mg/dlと有意に高かった。以上の結果から、後代Tg産仔もfounder個体と同様に典型的な糖尿病の病態を示す事が明らかとなった。

病理組織解析の結果、膵臓のランゲルハンス島の形成不全、ヒト糖尿病性腎症に特有の腎臓系球体結節性病変、および眼球の白内障が確認された。

(3)糖尿病 Tg ブタが発症する糖尿病腎症の解析

糖尿病性腎症に特徴的な結節性病変は4週齢から確認され、月齢と共に病変数は増加した。この病変は表層皮質部分よりも深層皮質部分に分布する傾向であった。免疫染色像の解析の結果、この結節性病変は各種コラーゲン(type I, III, IV, V, VI)、AGEs、CML、

TGF- α に対して陽性であった。また、この病変は傍髄質腎小体で成長する特徴を持ち、その形成にはこのブタに特徴的な持続的高血糖と血行力学的因子が関与していると考えられた。しかし、ヒト糖尿病患者に確認されるメサンギウム融解、滲出性病変、尿細管間質病変、細動脈の硝子様変性は確認されなかった。

(4) 糖尿病 Tg ブタが発症する糖尿病網膜症の解析

試験に供した2頭ともに2ヶ月齢時から糖尿病白内障を示した。続いて、4ヶ月齢時から眼底網膜において出血と綿花状白斑が確認された。さらに、1頭については硝子体出血が確認された。

以上の成果から、本研究では人工生殖による糖尿病発症ブタの安定的な作出システムが確立された。この糖尿病発症ブタは、生後1年以内に糖尿病腎症、白内障、糖尿病網膜症などの様々な糖尿病合併症の病変を現すことから、糖尿病モデル動物として、今後の研究に有用であると考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Satoshi Hara, Kazuhiro

Umeyama, Takashi Yokoo, Hiroshi

Nagashima, Michio Nagata.

Diffuse glomerular nodular lesions in diabetic pigs carrying a

dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha, an inheritant diabetic gene in humans., PLoS One、査読有、Vol. 9、2014、e92219.

DOI : 10.1371/journal.pone.0092219.

eCollection 2014.

Kazuhiro Umeyama, Kasumi Honda, Hitomi Matsunari, Kazuaki Nakano, Tatsuro Hidaka, Keito Sekiguchi, Hironori Mochizuki, Yasuhiro Takeuchi, Tsukasa Fujiwara, Masahito Watanabe, Masaki Nagaya, Hiroshi Nagashima.

Production of diabetic offspring using cryopreserved epididymal sperm by in vitro fertilization and intrafallopian insemination techniques in transgenic pigs., J Reprod Dev.、査読有、Vol. 59、2013、599-603
DOI : 10.1262/jrd.2013-069

[学会発表] (計 12 件)

Satoshi Hara, Kazuhiro Umeyama, Takashi Yokoo, Hiroshi Nagashima, Michio Nagata.

DIFFUSE GLOMERULAR NODULAR LESIONS IN DIABETIC PIGS CARRYING A DOMINANT-NEGATIVE MUTANT HEPATOCYTE NUCLEAR FACTOR ONE-ALPHA, AN INHERITANT DIABETIC GENE IN HUMANS., The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology 2014、2014 年 5 月 14 日 ~ 5 月 17 日、Shinagawa Prince Hotel (Minato-ku, Tokyo, Japan)
Masami Nakajima, Akiko Ishimori, Kazuhiro Umeyama, Hiroshi Nagashima.
Diabetic retinopathy in transgenic pigs with induced diabetes mellitus., The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2014 Annual Meeting、2014 年 5 月 4 日 ~ 5 月 8 日、Orange County Convention Center (Orlando, Florida, USA)

Satoshi Hara, Kazuhiro Umeyama, Takashi Yokoo, Hiroshi Nagashima, Michio Nagata
Evolution of Glomerular Nodular Lesions

in Diabetic Pigs Carrying a Dominant-Negative Mutant Hepatocyte Nuclear Factor 1-Alpha., The Kidney Week 2013、2013 年 11 月 5 日 ~ 11 月 10 日、Georgia World Convention Center (Atlanta, Georgia, USA)

Satoshi Hara, Takashi Yokoo, Kazuhiro Umeyama, Hiroshi Nagashima, Michio Nagata.

PATHOLOGICAL ANALYSIS OF GLOMERULAR NODULAR LESION IN DIABETIC PIGS CARRYING A DOMINANT-NEGATIVE MUTANT HEPATOCYTE NUCLEAR FACTOR 1-ALPHA., International Society of Nephrology, World Congress of Nephrology 2013、2013 年 5 月 31 日 ~ 6 月 4 日、The Hong Kong Convention and Exhibition Centre (Hong Kong, China)

松村幸奈, 前原美樹, 本田香澄, 林田豪太, 倉本桃子, 中野和明, 松成ひとみ, 小林美里奈, 内倉鮎子, 浅野吉則, 渡邊將人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志

ガラス化保存された体外成熟 / 体外受精卵を用いた糖尿病モデル遺伝子改変ブタの作出、第 106 回日本繁殖生物学会大会、2013 年 9 月 12 日 ~ 9 月 14 日、東京農工大学 (東京都府中市)

原怜史、横尾隆、梅山一大、長嶋比呂志、長田道夫

Dominant-negative 変異型 hepatocyte nuclear factor 1 (HNF1) 導入糖尿病ブタにおける糸球体結節性病変の解析、第 56 回日本腎臓学会学術総会、2013 年 5 月 10 日 ~ 5 月 12 日、東京国際フォーラム (東京都中央区)

梅山一大、渡邊將人、本田香澄、竹内靖浩、中野和明、松成ひとみ、横尾隆、長嶋比呂志

糖尿病発症遺伝子改変ブタによる
Nonalcoholic fatty liver
disease(NAFLD)病変の作出、第 59 回日本
実験動物学会総会、2012 年 5 月 24 日～5
月 26 日、別府国際コンベンションセンタ
ー（大分県別府市）

長嶋比呂志、松成ひとみ、渡邊将人、梅山
一大、長屋昌樹

遺伝子改変ブタ・クローンブタのトランス
レーショナルリサーチへの応用、JALAM(日
本実験動物医学会)シンポジウム、2012
年 5 月 23 日、別府国際コンベンションセ
ンター（大分県別府市）

梅山一大、渡邊将人、松成ひとみ、中野和
明、竹内靖浩、本田香澄、長田道夫、横尾
隆、長嶋比呂志

糖尿病発症遺伝子改変ブタによる結節性
病変を有した腎病変の作出、第 23 回日本
糖尿病性腎症研究会、2011 年 12 月 3 日～
12 月 4 日、ベルサール神田（東京千代田
区）

梅山一大、渡邊将人、松成ひとみ、中野和
明、藤原主、日高龍路、竹内靖浩、本田香
澄、望月寛徳、関口溪人、長嶋比呂志

糖尿病モデル・変異型ヒト HNF-1 遺伝子
を導入したトランスジェニックブタの病
態解析、第 25 回日本糖尿病・肥満動物学
会、2011 年 11 月 5 日、東京大学（東京都
文京区）

Kazuhiro Umeyama, Masahito Watanabe,
Hitomi Matsunari, Kazuaki Nakano,
Yasuhiro Takeuchi, Kasumi Honda,
Takashi Yokoo, Hiroshi Nagashima
Development of genetically modified
pigs suitable for diabetes and its
complications research., Swine in
Biomedical Research 2011、2011 年 7 月
17 日～7 月 19 日、Holiday Inn Chicago

Mart Plaza (Chicago, IL, USA)

梅山一大、渡邊将人、松成ひとみ、中野和
明、竹内靖浩、本田香澄、横尾隆、長嶋比
呂志、

糖尿病合併症に適した遺伝子改変ブタの
開発、第 58 回日本実験動物学会、2011 年
5 月 25 日～5 月 27 日、タワーホール船堀
（東京江戸川区）

[図書]（計 1 件）

Hiroshi Nagashima, Hitomi Matsunari,
Kazuhiro Umeyama, CRC Press, The Minipig
in Biomedical Research. Chapter 28,
Creation and Conservation of
Genetically Modified Pigs:
Applications to Genetic Disease Model
and Xenotransplantation. 2011、415-430

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）
取得状況（計 0 件）

[その他]

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

長嶋 比呂志 (NAGASHIMA, Hiroshi)
明治大学・農学部 生命科学科・教授
研究者番号：5 0 3 1 8 6 6 4

(2) 研究分担者

梅山 一大 (UMEYAMA, Kazuhiro)
明治大学・研究 知財戦略機構・准教授
研究者番号：7 0 3 4 2 6 9 9