

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06044

研究課題名(和文) 胚盤胞補完法による臓器特異的疾患モデルマウスの開発

研究課題名(英文) Development of MODY5 model mouse using blastocyst complementation

研究代表者

橋本 晴夫 (Hashimoto, Haruo)

公益財団法人実験動物中央研究所・教育・研修室・研究員

研究者番号：30353478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は難病で、若年発症成人型糖尿病Maturity-onset diabetes mellitus of the young type5; MODY5)モデルマウスを胚盤胞補完法の利用により作製することを目的とした。そこで、今回はHNF-1 遺伝子に対するshRNAを発現するES細胞(shRNA-ES細胞)を、膵臓および腎臓欠損マウスの胚盤胞期卵へ注入しキメラを作製した。その結果、作製されたキメラマウスは糖尿病を示した。これらの結果から、疾患ES/iPS細胞(ドナー細胞)を用いた胚盤胞補完法は、膵臓ではドナー細胞の特性を反映することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患ES/iPS細胞(ドナー細胞)を用いた胚盤胞補完法は、膵臓ではドナー細胞の特性を反映することが示された。この結果は、ヒトの疾患iPS細胞を用いた場合でも、マウスで個人の膵臓疾患の特性を再現できるものと期待される。

今回、腎臓ではキメラが作製できなかったが、キメラ作製効率の向上により様々な臓器でのヒト化マウスを可能にすると思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to generate a model mouse of Maturity-onset diabetes mellitus of the young type5; MODY5), which is an intractable disease, by using the blastocyst complementation method. Therefore, this time, ES cells (shRNA-ES cells) expressing shRNA for the HNF-1 gene were injected into blastocyst stage eggs of pancreatic and kidney-deficient mice to prepare a chimera. As the results, the chimeric mice produced showed diabetes. From these results, it was shown that the blastocyst complementation method using diseased ES / iPS cells (donor cells) reflects the characteristics of donor cells in the pancreas.

研究分野：実験動物学

キーワード：胚盤胞補完法 マウス MODY2 MODY5 ES細胞

1. 研究開始当初の背景

マウスでヒトの臓器特異的疾患モデルを再現すると胎生致死になることが多い。例えば、MODY5は膵臓および腎臓での *HNF-1B* 遺伝子の発現不全により糖尿病と腎不全を併発する。しかし、本疾患を含め MODY のほとんどは原因遺伝子のヘテロ欠損により発症するドミナントネガティブ型疾患である。そのため、通常の遺伝子ノックアウト法(ジーンターゲティング)で作製される *HNF-1B* 遺伝子ヘテロ欠損マウスは胎生致死となり、変異マウス胎仔を得ることができない。この問題を克服する方法として、Coffinier らは特定の時期に臓器特異的に遺伝子を破壊するコンディショナルノックアウト(Cre/loxP システム)を用いた(Development, 2002)。しかし、この方法では loxP で挟まれた *HNF-1B* 遺伝子のヘテロノックアウトマウスの作製に加え、肝臓で Cre リコンビナーゼ遺伝子を発現する 2 系統のマウスを作製しなければならず、モデルの完成に最短でも 1 年半を要する。また、腎不全を併発させるためには腎臓で Cre リコンビナーゼ遺伝子を発現するマウスの作製も必要となり、これらの変異マウスを交配でモデルを完成させるためには、さらに 2 年以上の時間を要する。さらに Cre/loxP システムでは、loxP の不完全消化や標的部以外での切断も懸念される。このような点を考慮し、本研究では *HNF-1B* 遺伝子を片側欠損させた ES 細胞を、膵臓および腎臓欠損マウスの胚盤胞期卵へ注入することにより短期間で膵臓および腎臓特異的に *HNF-1B* 遺伝子の発現が欠落する MODY5 モデルの作製を試みた。

2. 研究の目的

申請者は、上記のように MODY5 モデルのような胎生致死となる臓器特異的疾患モデルを短期間で開発するため胚盤胞補完法に着目した。胚盤胞補完法は、遺伝子操作で欠損させた臓器・組織を、胚盤胞期胚の卵割腔へ外来幹細胞を注入することにより再構築させる技術である。申請者は MODY5 モデルマウスを簡便、かつ短期間で確実に作製するために胚盤胞補完法と疾患発症型 ES 細胞を組み合わせた新たな疾患モデル作製技術を考案した。この技術を用いて、レシピエントとなる膵臓および腎臓欠損マウスの胚盤胞期卵へ、*HNF-1B* 遺伝子をドミナントネガティブ型に遺伝子改変した ES 細胞を注入することにより 3 週間で糖尿病および腎不全となる MODY5 モデルマウスを作製することを試みた。

3. 研究の方法

HNF-1B 遺伝子に対する shRNA 配列を導入した ES 細胞の樹立後、当研究所で樹立された *PDX-1* ノックアウトマウスでの胚盤胞補完法を実施し、膵臓特異的疾患モデルマウス作製を試みた。対照は、遺伝子改変していない *EGR-G101* で作製したキメラマウスとした。胚盤胞補完法によって得られた膵臓特異的疾患モデルマウスは、生後 6 週齢で糖負荷試験によるインスリン分泌不全の検証に使用した。糖負荷試験後、採血および各臓器のサンプリングを行い緑色蛍光蛋白の発現を指標に、*HNF-1B* 遺伝子を片側欠損させた ES 細胞による膵臓の再構築を確認する。糖負荷試験により耐糖能障害と判定した場合、インスリン分泌能について血漿を用いた ELISA で測定し、*HNF-1B* 遺伝子の発現不全によるインスリン分泌不全を検証した。また、各種アディポカインの測定も行う。膵臓からは RNA を抽出し、*HNF-1B* 遺伝子の発現低下を確認する。さらに他の主要臓器でも *HNF-1B* 遺伝子の発現解析を行うとともに、肝臓、骨格筋、白色脂肪でのインスリンシグナルに関わる分子の検索によって糖尿病の発症を確認した。

HNF-1B 遺伝子を片側欠損させた ES 細胞の樹立後、当研究所で樹立された *Sall1* ノックアウトマウスでの胚盤胞補完法を実施し、腎臓特異的疾患モデルマウス作製を試みた。胚盤胞補完法によって得られた腎臓特異的疾患モデルマウスは、生後 3~4 週齢以降で採血・採尿し、尿酸、クレアチニン、尿素窒素の測定および腎臓の病理学的検索により腎臓細胞およびネフロン形成不全の有無を確認した。また、*PDX-1* と *Sall1* のダブルノックアウトマウスを作製し、胚盤胞補完法の実施により腎不全を併発する糖尿病モデル、MODY5 を樹立した。

4. 研究成果

1) MODY5 および MODY2 の特性を模倣した ES 細胞の樹立

MODY5 および MODY2 の特性を模倣した ES 細胞を樹立した。MODY5 は *HNF-1B* に対する shRNA および導入マーカーとして CAG-GFP の遺伝子ユニットを導入し、樹立した (shRNA-GFP_ES 細胞; Fig.1A)。対照は CAG-GFP のみの ES 細胞とした。shRNA-GFP_ES 細胞からの *HNF-1B* の発現量は 70%であった。一方、MODY2 は、先ず公益財団法人実験動物中央研究所で開発したグリコキナーゼ欠損マウスと GFP 発現マウスを掛け合わせグリコキナーゼ欠損-GFP 発現(Gck KO-GFP)マウスを樹立した。そのマウスの胚盤胞期卵の内部細胞塊から ES 細胞を樹立した(Gck KO-GFP_ES 細胞; Fig.1B)。これらの遺伝子改変 ES 細胞を *IQ1/Jic* をバックグラウンドとし、膵臓を欠損する *PDX-1* ノックアウト(KO)および腎臓欠損である *Sall1*KO マウス、それぞれの胚盤胞期卵へブラストシストインジェクションした。*PDX-1*KO マウスではキメラを得ることができたが、*Sall1*KO マウスではキメラを得ることができなかった。従って、*PDX-1*KO キメラマウスのみを解析を行った。

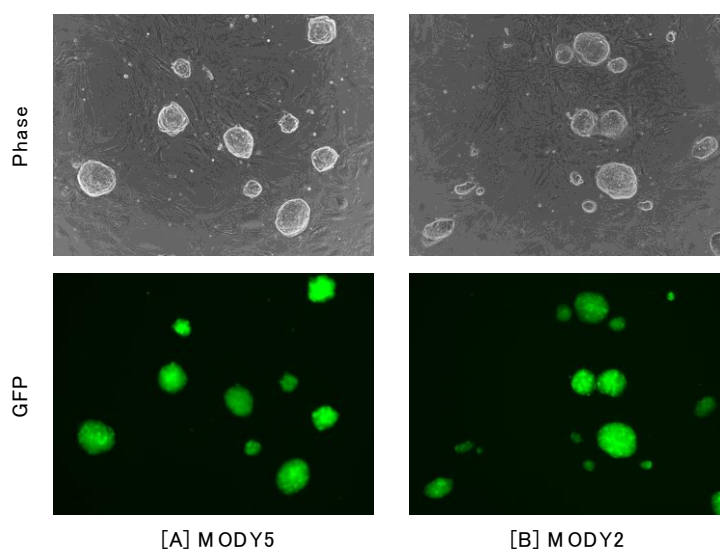


Fig. 1 Establishment of ES cells characteristic of MODY5 and MODY2

2) 膵臓特異的 MODY5 および MODY2 キメラマウスのインスリン分泌能の解析

先ず、shRNA-GFP_ES 細胞由来(MODY5)および Gck KO-GFP_ES 細胞由来(MODY2) キメラマウスのインスリン分泌能(耐糖能障害)について、グルコース負荷試験(Glucose Tolerance Test, GTT)を行って調べた。Fig. 2 に MODY5 キメラマウスおよび MODY2 キメラマウスの GTT を示した。

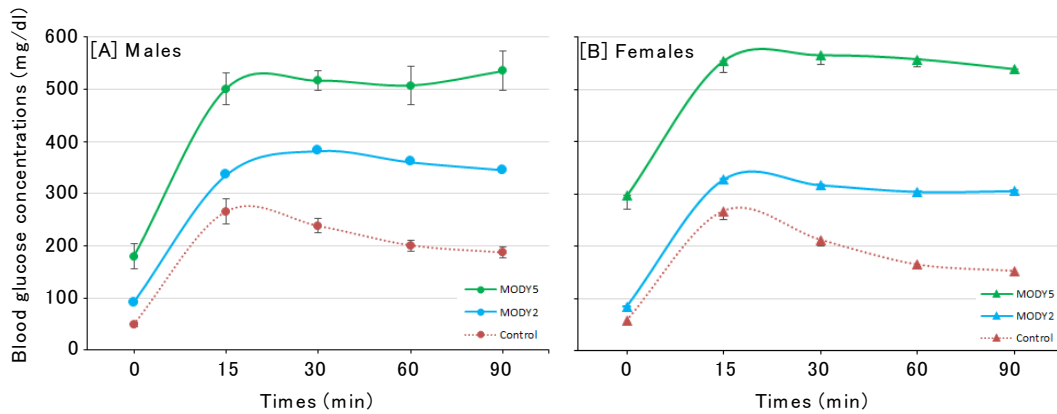


Fig. 2 GTT in MODY5 and MODY2 chimeric mice

その結果、MODY5 キメラマウスは雌雄ともにグルコースの経口投与直後に 500mg/dl 以上のグルコース濃度を示し、90 分間の試験の間に低下することはなかった。

MODY2 キメラマウスは MODY5 よりもマイルドであったが、グルコースの経口投与直後に 300-400mg/dl の血中グルコース濃度を示し、90 分間の試験の間に低下することはなかった。両キメラマウスとも対照マウスと比べ、インスリンの分泌低下が見られた。

3) 膵臓特異的 MODY5 および MODY2 キメラマウスの ES 細胞由来膵臓の確認

MODY5 および MODY2 キメラマウスの腹腔内を蛍光顕微鏡で観察した結果、いずれもキメラマウスも膵臓は緑色蛍光を示した (Fig. 3)。さらに、その膵臓の GFP 免疫染色を行ったところ、GFP に置き換わっていた (Fig. 4)。

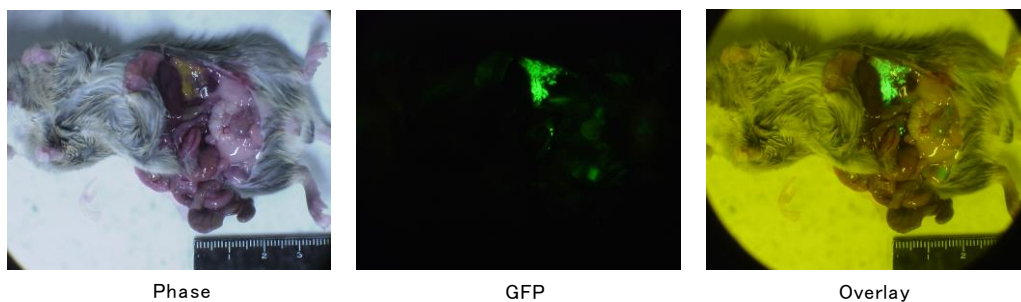


Fig. 3 Detection of GFP in pancreas reconstituted by blastocyst complementation

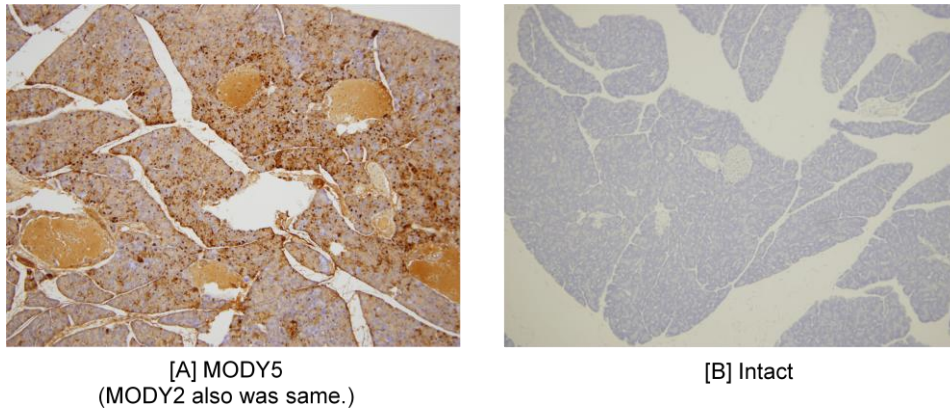


Fig. 4 GFP immunological staining to detect pancreas reconstituted by ES cells

4) 膵臓特異的 MODY5 および MODY2 キメラマウスのランゲルハンス島の観察

MODY5 および MODY2 キメラマウスのランゲルハンス等を観察した結果、両キメラともランゲルハンス島の委縮と β 細胞の減少を示した (Fig. 5)。

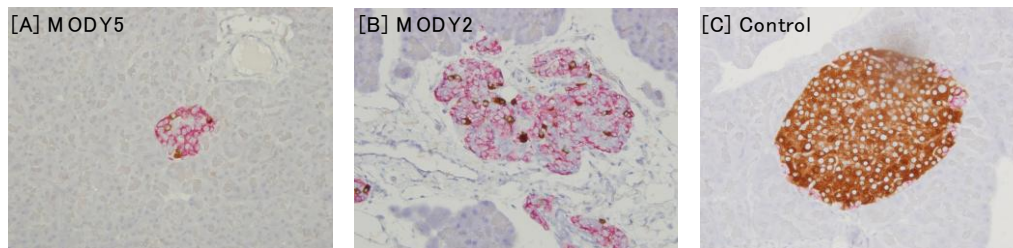


Fig. 5 Detections of insulin by immunostaining in MODY5 and MODY2 chimeric mice

これらの結果から、膵臓欠損マウスの胚盤補完法は糖尿病のキメラマウスを作製することが可能であり、改変した遺伝子により糖尿病のインスリン分泌能を変化させることが可能であった。従って、胚盤胞補完法は疾患ヒト iPS 細胞の使用によりその人に応じた疾患モデルマウスの再現とオーダーメイド医療研究への可能性を有する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 斎藤宗雄, 今井都泰, 富澤政史, 橋本晴夫, 日置恭司	4. 巻 54
2. 論文標題 ビニールアイソレータへの応用を目指した宇宙服用ファスナーの気密性に関する検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験動物技術	6. 最初と最後の頁 7-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Haruo HASHIMOTO, Tomoo ETO, Masafumi YAMAMOTO, Mika YAGOTO, Motohito GOTO, Takahiro KAGAWA, Keisuke KOJIMA, Kenji KAWAI, Toshio AKIMOTO, Ri-ichi TAKAHASHI	4. 巻 68
2. 論文標題 Development of blastocyst complementation technology without contributions to gametes and the brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 361-370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.18-0173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Haruo HASHIMOTO, Masafumi YAMAMOTO, Emika SUGIURA, Hayato ABE, Takahiro KAGAWA, Ri-ichi TAKAHASHI, Toshio AKIMOTO, Hiroshi SUEMIZU.	4. 巻 80 (4)
2. 論文標題 Adiponectin deficiency-induced diabetes increases TNF and FFA via downregulation of PPAR .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 662-666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.17-0641.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hitomi IGARASHI, Mami UEMURA, Ryuji HIRAMATSU, Ryuto HIRAMATSU, Saki SEGAMI, Montri PATTARAPANAWAN, Yoshikazu HIRATE, Yuki YOSHIMURA, Haruo HASHIMOTO, Hiroki HIGASHIYAMA, Hiroyuki SUMITOMO, Masamichi KUROHIMARU, Yukio SAIJOH, Hiroshi SUEMIZU, Masami KANAI-AZUMA, Yoshiakira KANAI.	4. 巻 99 (3)
2. 論文標題 Sox17 is essential for proper formation of the marginal zone of extraembryonic endoderm adjacent to a developing mouse placental disk..	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 578-589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioy079.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 斎藤宗雄, 今井都奈, 富澤政史, 橋本晴夫, 日置恭司.	4. 巻 53 (2)
2. 論文標題 炭酸ガスを用いた減衰法による飼育ケージの換気回数の測定.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験動物技術	6. 最初と最後の頁 67-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 斎藤宗雄, 今井都奈, 富澤政史, 橋本晴夫, 日置恭司.	4. 巻 53 (2)
2. 論文標題 集塵性能に優れた新しいピニールアイソレータ用エアフィルター材の開発及び従前フィルターとの比較.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験動物技術	6. 最初と最後の頁 75-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 富澤政史, 橋本晴夫, 町田一彦, 伊藤豊志雄, 日置恭司, 横山峯介
2. 発表標題 「動物実験技術者養成講座」15年間の総括
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会 (福岡国際会議場 / 福岡県)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本晴夫, 富澤政史, 日置恭司, 伊藤豊志雄, 横山峯介
2. 発表標題 「動物実験」から「In vivo実験医学」へ - 実中研が新たに展開する教育研修プログラムの紹介 -
3. 学会等名 第53回日本実験動物技術者協会総会 (松山市総合コミュニティセンター / 愛媛県).
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋司、佐藤人美、江藤智生、橋本晴夫、梅山一大、長嶋比呂志、佐々木 えりか
2. 発表標題 発光レポーターを用いた移殖胚選抜によるトランスジェニックマーマーモセット作製の効率化
3. 学会等名 第8回 日本マーマーモセット研究会大会(シーサイドホテル舞子ピラ神戸)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本晴夫、山本真史、杉浦恵美香、阿倍隼人、香川貴洋、後藤元人、高橋利一、秋元敏雄、末水洋志
2. 発表標題 アディポネクチン欠損によるPPAR の発現低下を介したTNF の増加
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会(富山県民会館)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

第67回日本実験動物学会総会 最優秀論文賞 https://jalas67.org/program.html 実験動物中央研究所ホームページ https://www.ciea.or.jp/introduction/animal_resources/development.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	外丸 祐介 (Sotomaru Yusuke) (90309352)	広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------