

機関番号：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700450

研究課題名（和文） 人工毒素受容体を用いた糖尿病モデルマウスの作製

研究課題名（英文） Generation of Diabetic model mouse using improved toxin receptor

研究代表者

齊藤 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

研究成果の概要（和文）：我々が独自に開発したTRECK法という手法を用いて、これまでに糖尿病モデルマウスを作製している。このモデルマウスはジフテリア毒素を投与することにより、出生後任意の時期に糖尿病を発症させることができ、症状の程度もコントロールすることができる。しかし、これらのマウスにおいて、毒素投与前でも耐糖能異常、膵島の構造異常が確認された。本研究ではこのモデルマウスで発見された、いくつかの欠点を補うべく、改良型人工毒素受容体を用いて新たなTRECK糖尿病モデルマウスを作製した。このマウスは毒素投与前には正しい膵島の構造をとっており、毒素投与によって糖尿病を発症することがわかった。

研究成果の概要（英文）：Previously we generated the diabetic model mouse by using TRECK method. This model mouse can be determined when to develop diabetes by the administration of Diphtheria toxin (DT). We can also control the level of the symptom. However, the transgenic mouse displayed abnormality in glucose tolerance and islet structure even without DT treatment. In this study, to solve these problems found in the model mouse, we generated improved TRECK diabetic model mice using a modified DT receptor. The new diabetic model mice showed normal architecture of pancreatic islets before DT treatment and they developed hyperglycemia after DT administration.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学
キーワード：疾患モデル、糖尿病、毒素受容体

1. 研究開始当初の背景

以前我々は標的細胞を任意の時期に特異的に破壊する方法として、TRECK (Toxin Receptor-mediated Cell Knockout)法を開発した。ヒトやサルの Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)はジフテリア毒素(DT)の受容体として機能するが、マウスやラットの HB-EGF はDT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。DT は受容体と結合して細胞内に取り込まれることによって、EF-2 をADPリボシル化シタンパク質合成を阻害して細胞を死に至らしめる。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すれば、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。実際に、我々はすでにこのTRECK法を利用して、アルブミンプロモーターを用いた肝炎モデルマウス、インスリンプロモーターを用いた糖尿病モデルマウスを作製している。これらのモデルマウスは、毒素投与によりそれぞれの症状を発症させることが可能である。

2. 研究の目的

糖尿病モデルマウスには自然発症モデルマウスや薬剤投与により糖尿病を誘発するマウスが存在するが、いずれも共通してその症状や発症時期をコントロールすることができない。我々が開発したTRECK法による糖尿病モデルマウスは、DT投与によりβ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。また投与するDT濃度依存的にβ細胞が破壊されていることが確認できた。さらに野生型マウスより膵島を精製し、腎皮膜下に移植することによって、その糖尿病様症状を回復させることが可能であった。

しかし、野生型マウスとこのTRECK糖尿病

マウスの耐糖能を調べたところ、僅かながらTRECKマウスに耐糖能悪化が認められた。また、免疫組織学的解析において TRECK糖尿病マウスでは、膵島が齧歯類特有のβ細胞をα細胞が取り囲むというマントルコア構造をとらないこと、小型の膵島の占める割合が有意に高く ductに隣接した像が多く観察されること、およびduct様細胞への化生を伴う大型の膵島がある割合で存在する、という特徴が認められた。TRECK 糖尿病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。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。

そこで、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。

3. 研究の方法

以前作製したTRECK糖尿病モデルマウスに用いたプロモーターはヒトインスリンプロ

モーターであるが、このプロモーターを用いた別のトランスジェニックマウスにおいて、目的遺伝子の発現パターンに様々なタイプが観察された。そのためこのヒトインスリンプロモーターの他に、膵β細胞特異的に発現するプロモーターとして一般的によく使われているラットインスリンプロモーター (RIP) を用いたトランスジーンも作製した。人工毒素受容体としては、*in vitro* の解析によりDTRとしての機能が野生型 DTR と同程度維持されており、増殖因子活性が大幅に減少していることが確認されている I117V/L148V (TR6) を用いた。さらに、DTRが発現している細胞を簡便に識別できるように人工毒素受容体TR6 にはGFP遺伝子を融合させた。DTRにGFP遺伝子が融合されていても、発現や機能には異常がないことは確認済みである。

作製したトランスジェニックマウスのラインは、まず DT を腹腔内に投与することによって選定した。β細胞特異的にDTRが発現していれば、DT 投与によりβ細胞が特異的に破壊されるはずであり、DT投与後3日以内に血糖値の上昇が見られなかった場合にはβ細胞の破壊が起こっていない指標となるため、そのラインは使用不可とした。毒素投与により血糖上昇の見られたラインにおいて、免疫組織学的解析を行い、その膵島の構造に異常がないかを調べた。

4. 研究成果

ヒトインスリンプロモーターを用いたラインに関しては、ゲノム上にトランスジーンが確認されたトランスジェニックマウスが13匹確認でき、そのうち8匹が繁殖に成功した。これらの2世代目もしくは3世代目を利用し、まずDT投与により糖尿病を発症するかどうかをマウスのLD50 (500 μg /体重kg) の1/10 量である 50 μg/体重kg腹腔内投与して確認した。投与後毎朝朝食時血糖を1週間測定したところ、血糖値上昇が見られたのは hIns-TR6-2M3 という1ラインのみであった。血糖値が上がらないラインがあったのは、ト

ランスジーンが導入されたものの、発現していなかった、もしくは非常に発現が弱く血糖上昇には至らなかったと考えられた。次に、このマウスに関して膵β細胞の分布、膵島形態異常がTR6 (DTR) を用いることによって改善されたかどうか調べるために、抗インスリン抗体、抗グルカゴン抗体を用いて免疫組織学的解析を行ったところ、形態異常や膵島内のα細胞やβ細胞の分布における異常は認められなかった。しかし、DTRの発現をDTRと融合したGFPを抗GFP抗体により確認したところ、一部のβ細胞にしか発現が認められず、さらにインスリンプロモーターは動かないはずであるα細胞での発現も認められた。

一方、ラットインスリンプロモーターを用いた方は、10匹にトランスジーンが確認でき、そのうち3ラインのみが繁殖できた。これらの2世代目もしくは3世代目以降にDT投与を行ったところ、1ライン (RIP-TR6-2F12) のみで血糖値上昇が観察された。抗インスリン抗体、抗グルカゴン抗体を用いて免疫組織学的解析を行ったところ、このラインでは、正常な膵島の形態、細胞の分布をとっていることが確認できた。しかし、DTRの発現が少なくまばらであった。

以上より、人工毒素受容体を用いて糖尿病モデルマウスを作製したところ、野生型毒素受容体を利用した場合に起こっていた異常の一部が改善できた。しかし発現している細胞が少なく、毒素の効きが悪いことが想定される。今後、ホモ個体を作製してまだ確認できていない耐糖能異常の有無を含め、さらなる解析を行うことを予定している。

今回の人工毒素受容体を用いた新たな糖尿病モデルマウスは、形態的な異常は改善されていたが、すべてのβ細胞で発現しておらずα細胞での発現が認められたラインも存在した。これは、プロモーターに依存した問題もあると考えられるため、計画書にも記載したCre-loxP 組み換えシステムを利用したターゲティングマウスの作製も計画している。これは ROSA26 サイトに STOP^{fllox}TR6 を組み込んだターゲティングマウスを作製し、

このマウスに組織特異的 Cre 発現マウスを交配させることにより、その組織特異的に TR6 を発現するようになるシステムである。このマウスは Cre マウスさえ準備できれば、様々な組織特異的に TR6 を発現させることが出来、DT 投与によって容易にモデルマウスの作製や細胞の機能解析に用いることも可能であり、TR6 の発現に関してはプロモーターに依存せず、作製することが可能である。

このような任意の時期に症状を誘発することが出来、投与量を調節するだけで症状の程度をコントロールできる疾患モデルマウスは、様々な研究材料として有用であり、引き続き改良型モデルマウスの作製を行う予定である。

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 4 件)

① Abematsu M, Tsujimura K, Yamano M, Saito M, Kohno K, Kohyama J, Namihira M, Komiya S, Nakashima K., Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury. *The Journal of Clinical Investigation* 120, 3255-3266, 2010

査読有り

② 斉藤美知子、河野憲二、TRECK糖尿病モデルマウスを用いた再生移植研究、*Surgery Frontier*, 16(1)、74-78、2009

査読無し

③ 斉藤美知子、河野憲二、ジフテリア毒素受容体を利用した疾患モデルマウスの作製、蛋白質、核酸、酵素、54(5)、2009

査読無し

④ 木村泰子、斉藤美知子、古川智久、古川賀絵、河野憲二、TRECK法を用いた疾患モデル

マウス作製、分子細胞治療、8(6)、62-66、2009

査読無し

[学会発表] (計 4 件)

① 上村良, 石井隆道, 佐々木直也, 梶原正俊, 斉藤美知子, 河野憲二, 猪飼伊和夫, 安近健太郎, 上本伸二、急性肝障害に対する幹細胞移植における、移植細胞の分化段階による治療効果および接着浸潤能の比較検討、第 10 回日本再生医療学会、2011. 3. 1、京王プラザホテル

② 土屋雄一、藤岡洋美、斉藤美知子、河野憲二、Role of the unfolded protein response pathway in pancreatic beta cells、第 33 回日本分子生物学会、2010. 12. 8、神戸国際会議場

③ 藤岡洋美, 土屋雄一, 斉藤美知子, 岩脇隆夫, 森和俊、河野憲二、膵β細胞でのインスリン産生におけるIRE1 とATF6 の役割、第 33 回日本分子生物学会、2010. 12. 10、神戸国際会議場

④ 斉藤美知子、河野憲二 他、Improved PRECK 第 32 回日本分子生物学会、2009. 12. 12 パシフィコ横浜

[図書] (計 0 件)

[その他]

<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：