

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 30 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500500

研究課題名(和文)ヒト化肝臓マウスを用いた糖尿病の新規遺伝子治療法技術の確立

研究課題名(英文)Establish of novel gene therapy of diabetes using Humanized liver mice

研究代表者

橋本 晴夫(Haruo, Hashimoto)

公益財団法人実験動物中央研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：30353478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究目的は、生体内でヒト肝臓細胞からヒト膵ランゲルハンス島へ分化転換する方法を確立し、苦痛を伴うインシュリンの反復投与に代わる遺伝子治療法が、「ヒト」でも実現可能かヒト肝臓を持つヒト化肝臓マウスを用いて実証研究を試みた。

肝臓でインシュリンを産性するAAV2-Pdx1-GFPはヒト化肝臓マウスでの500mg/dlの血糖を300mg/dlまで抑制し、その血清中にヒトインシュリンを検出した。さらにFCM解析では、マウスのヒト肝臓領域に多く遺伝子導入されていた。従って、AAV2-Pdx1-GFPは糖尿病治療に効果的であることがマウスを用いた「ヒト」での実験で明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research was to establish a method of efficiently inducing the transdifferentiation of “human hepatocytes into human Langerhans islet or beta cells” using humanized liver mice in vivo.

First, an attempt was made to efficiently prepare adeno-associated virus (AAV) with Pdx1-GFP. During preparation of AAV, the ratio of the amount of transgene, helper vector, and capsid vector DNA μg to the amount of Lipofectamine μl was 2:6. This resulted in successful preparation of AAV2 and AAV-DJ/8 with transgene. That said, the production of AAV-DJ/8 was about 1/20th of that of AAV2. This means that AAV2 was produced efficiently. Results indicated that there was substantial transfection in areas of the “human” liver in a mouse with a humanized liver. Thus, a mouse with a humanized liver is a suitable way of assessing gene therapy using AAV, and AAV2- Pdx1-Ngn3-GFP and AAV2- Pdx1-GFP were rapidly effective as diabetes treatments, as “human” experiments in mice revealed.

研究分野：実験動物学

キーワード：アデノ随伴ウイルス ヒト化肝臓マウス Pdx1 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者は全世界で、加速度的に増加し続けており、我が国も例外ではない。第二次世界大戦後の自動車の普及、食生活の欧米化、仕事や日常生活での椅子に座る習慣の増加などがその大きな要因とされている。研究代表者は、公益財団法人実験動物中央研究所にて IRS-2 ノックアウトマウスを中心とした糖尿病モデルマウスの開発と β 細胞移植による糖尿病治療研究を推進してきた。前者に関する一連の研究結果 (Comp. Med.56:176-187,2006; Exp Anim.56:149-154, 2007; Clin. Exp. Med.8:93-99, 2008; Exp. Anim.57:407-411, 2008; Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.117:577-586,2009) は第 57 回実験動物学会総会にて評価され、研究奨励賞を受けた。後者については、メッシュ製のチャンバーへ MIN6 を培地と共に注入し作製した人工膵臓を、STZ により高血糖および中枢神経系異常の指標とされている性行動の減退を示した糖尿病ラットの腹腔へ移植した (Exp. Anim. 59:515-519, 2010)。その結果、ラットの血糖は正常値まで改善し、減退していた性行動の回復を認めた。人工膵臓による高血糖抑制効果は半年以上継続し、従来のインシュリン反復投与に伴う苦痛の軽減に繋がる成果を得た。しかしながら、人工膵臓の移植は外科的手技が伴うため、申請者はより外科的侵襲が少なく、効果がより長期的な方法を模索した。そうしたところ、アデノウイルスでは糖尿病マウスの肝臓からランゲルハンス島(ラ氏島)細胞への分化転換誘導が高血糖抑制に有効であるとの研究 (Nat. Med. 6: 568-572, 2000; Diabetes 54: 1009-1022, 2005) が幾つか報告されている。しかしながら、それらの結果はマウスの肝臓を用いた実験結果による推論であり、アデノウイルスベクターによる血糖値の抑制効果は報告によって差異が見られる。例えば Kaneto らの報告では、500mg/dl 以上の高血糖を抑制しても、その値は 300mg/dl 程度であり、その効果は極めて弱いと言える (Diabetes 54: 1009-1022, 2005)。さらにアデノウイルスベクターにはその安全性に問題があるとされている。例えば 1997 年 4 月に米国ペンシルバニア大学で行われたオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症の遺伝子治療臨床研究では、その欠損遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを肝動脈経路にて肝臓に投与したが、ウイルスベクターを投与した患者が劇症肝炎から播種性血管内凝固症候群を併発し死亡している (Genet. Metab. 80:148-158, 2003)。一方、アデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus; AAV)はアデノウイルスの培養に混入してくる小型ウイルスとして 1960 年に発見され、病原性を持たず(ウイルス 57:47-56, 2007)、アデノウイルスベクターと比較して、発現期間が長期であるという長所(ウイルス 53:163-170, 2003)も

あるため、申請者は AAV ベクターによるラ氏島細胞の形成はインシュリン反復投与の激減に繋がると考えた。また AAV には様々な血清型が発見され、特に 8 型は肝臓に親和性の高い AAV として開発されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.99: 11854-11859, 2002)。さらに近年、Yagi ら(2011)は自己相補型 AAV ゲノムを使用することによりウイルスベクターの生産効率も良く遺伝子発現が速い AAV8 型ベクターの改良に成功した (J. Gene Med. 13:114-122, 2011)。本研究は in vivo での分化誘導を検討する。そのために必要な動物はヒト肝臓に置換したヒト肝臓保有マウスである。このマウスは当研究所の末水ら(2008)によって作製され、その置換率は 80% に及ぶ (Biochem. Biophys. Res. Commun. 377: 284-252, 2008)。この動物を用いることによって、マウスにおけるヒト肝臓からラ氏島細胞への分化転換誘導を検証することが可能となる。

2. 研究の目的

本研究目的は、生体内で"ヒト肝臓細胞からヒト膵ランゲルハンス島(ラ氏島)細胞"を効率よく分化転換誘導する方法を確立することである。インシュリン産生機能を失ったラ氏島細胞は、肝細胞のような強い自己再生力を持たないため、自然回復することなく糖尿病へと進展する。最近、膵臓と共通の起源より発生する肝臓にラ氏島形成に重要な役割を果たす遺伝子を発現させ、"ラ氏島細胞"に分化転換誘導する報告が齧歯類を使った実験で示され、糖尿病治療の新たな可能性が示された。応募者らは苦痛を伴う現在の治療法(インシュリンの反復投与)に代わる遺伝子治療法が、「ヒト」でも実現可能か"ヒト肝臓"を保有する"ヒト化肝臓マウス"を用いて実証研究を試みた。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝臓からラ氏島細胞に分化転換誘導するための AAV 用ベクターの作製

CMV プロモーターまたはヒト EF1 α プロモーターの下流に PDX-1-Ngn3-GFP の配列を繋ぎ、PDX-1、Ngn3 および GFP が同時に発現する AAV 用発現ベクターを構築した (Fig. 1)。対照は GFP のみを発現するベクターとした。

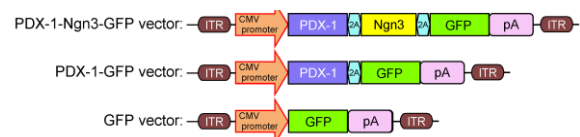


Fig. 1 Expression vectors used in this study. PDX1-Ngn3-GFP, PDX1-GFP, and GFP vectors were used for transfection and AAV production.

これらのベクターを構築後、細胞株として樹立されたマウス肝上皮細胞 (Cancer Res. 49: 403-409, 1989) およびヒト由来肝細胞へ発現ベクターを導入し、PDX-1、Ngn3 および GFP の遺伝子発現、タンパク発現およびグルコース応答性インシュリン分泌の確認を行った。その後、PDX-1-Ngn3-GFP、PDX-1-GFP および GFP のみのプラスミドから Yagi ら (2011) の方法 (J. Gene Med. 13:114-122, 2011) に準じ、AAV2 ベクターによるウイルスベクター作製に移った。

(2) ヒト肝臓からラ氏島細胞への分化転換の過程についての解明

次に作製した PDX-1-Ngn3-GFP、PDX-1-GFP および GFP のみのプラスミド、および PDX-1-GFP AAV2 型アデノ随伴ウイルスベクター (AAV2-PDX-1-GFP) をマウスおよびヒト由来の肝細胞に導入し機能の確認を行った。

(3) ヒト肝臓を持つマウスの作製

ウイルスベクター作製中の一方で、肝傷害を自然発症した TK-NOG マウスの肝臓にヒト肝細胞を移植し、ヒト肝臓を持つマウスを作製した。血中ヒトアルブミン濃度の測定によりヒト肝臓への置換率を推定し、置換率の高いものを選抜した。

(4) 糖尿病ヒト肝臓マウスへの AAV2-PDX-1-GFP ベクター投与の効果に関する検討

次にヒト肝臓キメラマウスへの streptozotocin (STZ) を投与による糖尿病の誘発と PDX-1-Ngn3-GFP の AAV ベクターの投与による糖尿病治療技術の検討を行った。ヒト肝臓を持つ uPA-NOG マウスへの STZ の効果は、当研究所での予備実験により 200mg/kg body wt の投与量で投与後 3 日目に 400mg/dl の血糖値を示すことがわかっている。ヒト肝臓キメラマウスへの STZ 投与後 3 日目に血糖値が 400mg/dl 以上に上昇していることを確認後、STZ 投与後 4 日目に AAV ベクターを尾静脈、または麻酔下での脾臓門脈ルートより投与した。すなわち、PDX-1-Ngn3-GFP AAV8 型ベクターの尾静脈または脾臓門脈投与、その対照として GFP AAV ベクターの尾静脈または脾臓門脈投与を行った。ヒトでは皮膚からの静脈投与が一般的であると考えられるため、本実験では静脈投与群を追加した。実験群は対象を含めて 4 群であり、各群 6-10 匹のヒト肝臓キメラマウスを用いた。体重測定および採血は眼窩静脈叢から行った。STZ 投与直前の採血を 0 日とし、STZ 投与後 1、3、5、7、10、14、17、21 日目に、その後は 3~4 日間隔で行った。AAV ベクター投与後、PDX-1-Ngn3-GFP AAV2 型ベクターを投与されたマウスの高血糖値は 3~4 週間で徐々に正常に戻っていくと予想された。さらに STZ 投与後 7 および 21 日目でグルコース負荷試験を行い、ヒト肝臓で誘導したラ氏島細胞のグ

ルコース応答性の有無について検討した。PDX-1-Ngn3-GFP AAV ベクターを投与されたマウスの血糖値と投与前の基礎値との有意差が無くなった時点で実験終了とし、後大静脈からの採血および各臓器のサンプリングを行う。採取した血液はヒトおよびマウスインシュリンを ELISA にて測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト肝臓からラ氏島細胞への分化転換の過程についての解明

作製したプラスミドの機能を確認するためマウス肝細胞に PDX-1-Ngn3-GFP、PDX-1-GFP および GFP を導入し、導入後 2 日目、7 日目、および 21 日目の培地内に分泌されたインシュリンを測定した。その結果、PDX-1-Ngn3-GFP および PDX-1-GFP を導入したマウス肝細胞は導入 2 日目でインシュリンを分泌していた (Fig. 2)。

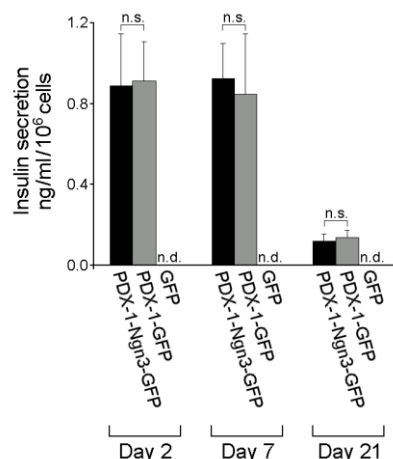


Fig.2 Characteristics of MLECs introduced with PDX1-Ngn3-GFP, PDX1-GFP, or GFP alone. The concentrations of insulin secreted from mouse hepatocytes 2, 7, and 21 days after introduction of PDX1-Ngn3-GFP, PDX1-GFP, or GFP using FuGENE HD. The insulin concentrations in the medium are expressed as means \pm SD (ng/ml/10⁶ cells). The threshold for statistical significance was $p < 0.05$. n.d., not detectable; n.s., not significant.

さらに、グルコース濃度を 11.1mmol/l、22.2mmol/l および 33.3mmol/l にした培地で培養した PDX-1-GFP 導入マウス肝細胞のインシュリン濃度を測定した結果、培地内のグルコース濃度に応じたインシュリン濃度を示した (Fig. 3)。

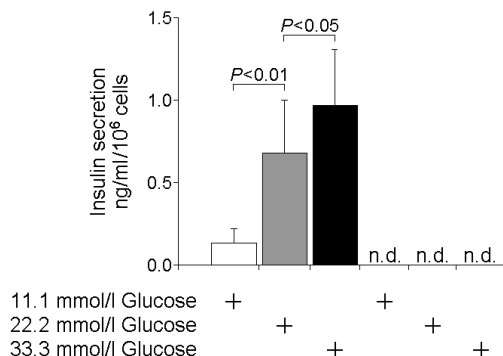


Fig.3 Evaluation of glucose-responsive insulin secretion from MLECs and MEFs introduced with PDX1-GFP or GFP using FuGENE HD.

この時のマウス肝細胞の RNA (Fig. 4-A) およびタンパク (Fig. 4-B) 解析をしたところ、PDX-1-Ngn3-GFP を導入したマウス肝細胞は、プラスミドに搭載されているヒト PDX-1、ヒト Ngn3 の他にマウス Ngn3 およびマウス MAFA を発現していた。そして、PDX-1-GFP を導入したマウス肝細胞は、プラスミドに搭載されているヒト PDX-1 の他にマウス Ngn3 およびマウス MAFA を発現していた。

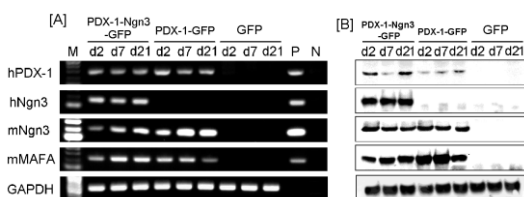


Fig.4 RNA [A] and Protein [B] expressions of mouse hepatocytes introduced with PDX1-Ngn3-GFP, PDX1-GFP, or GFP alone.

しかし、PDX-1-Ngn3-GFP および PDX-1-GFP を導入したマウス肝細胞の外見には、従来報告されている肝細胞からランゲルハンス島または β 細胞への転換は認められなかった (Fig. 5-A)。そこで、PDX-1-Ngn3-GFP および PDX-1-GFP を導入 2 日目と PDX-1-GFP を導入 21 日目でインシュリンとアルブミンの 2 重染色を行った。その結果、プラスミドの違いおよび導入後の機能に関係なくインシュリン

を分泌しているマウス肝細胞はアルブミンも分泌していた (Fig. 5-B)。対照である GFP のみ発現するプラスミドではアルブミンの分泌のみが認められた。

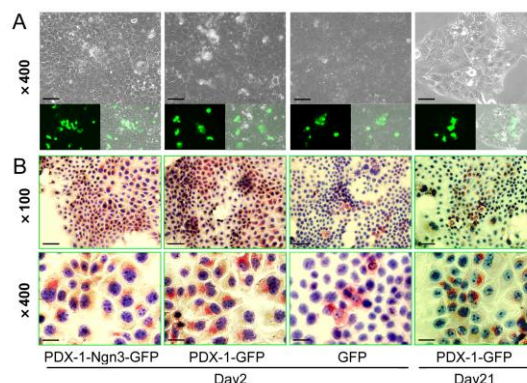


Fig.5 Albumin- and insulin-positive mouse hepatocytes introduced with PDX1-Ngn3-fluorescent protein or PDX1-fluorescent protein.

A: Fluorescence photomicrographs and immunohistochemical double-staining of MLECs 2 and 21 days after the introduction of PDX1-Ngn3-GFP, PDX1-GFP, or GFP using FuGENE HD. B: Albumin and insulin are depicted in red and brown, respectively. The upper photomicrographs were taken at a magnification of $\times 100$. The lower photomicrographs were taken at a magnification of $\times 400$. The calibration bars in the $\times 100$ images represent 200 μm , and those in the $\times 400$ images represent 50 μm .

さらに、蛍光染色にて PDX-1-GFP プラスミドの GFP 発現とアルブミンの分泌は同一の細胞であること (Fig. 6)。

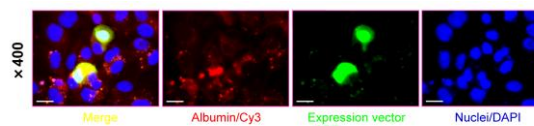


Fig.6 Immunofluorescent observations of albumin (Cy3) and GFP in MLECs 2 days after introduction of the PDX1-GFP-expression vector using FuGENE HD. The red fluorescence signal represents albumin. The green fluorescence signal represents GFP from the expression vector. The yellow fluorescence represents the overlaying signals from albumin and GFP. The calibration bars in the $\times 400$ images represent 50 μm .

そして PDX-1-GFP プラスミドの GFP 発現とインシュリン分泌は同一の細胞であることを確認した (Fig. 7)。

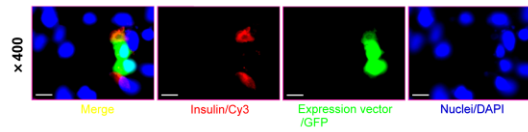


Fig. 7 Immunofluorescent observations of insulin (Cy3) and GFP present in mouse hepatocytes 2 days after introduction of the PDX1-GFP-expression vector using FuGENE HD.

The red fluorescence represents insulin. The green fluorescence represents GFP from the expression vector. The yellow fluorescence represents the overlaying signals from insulin and GFP. The calibration bars in the $\times 400$ images represent 50 μm .

次にヒト肝細胞である HepaRG に AAV2-PDX-1-GFP および AAV2-GFP を感染による遺伝子導入を行い、解析を行った。その結果、PDX-1-GFP 遺伝子導入 2 日目でインシュリン分泌を認め、グルコース応答性インシュリン分泌能を獲得していた (Fig. 8)。

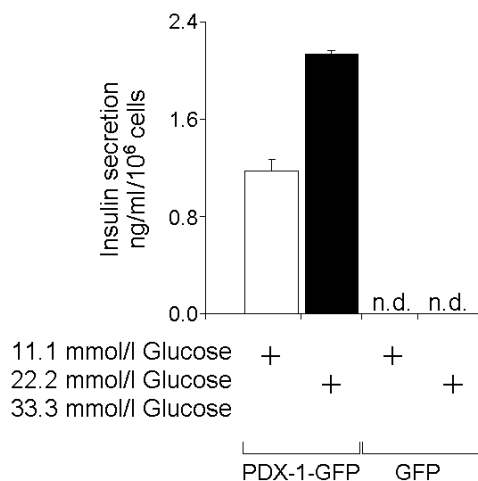


Fig.8 Evaluation of glucose-responsive insulin secretion from HepaRG cells infected with AAV2 carrying PDX1-GFP or GFP.

この時の HepaRG でのタンパク発現はプラスミドに搭載されているヒト PDX-1 の他にヒト Ngn3 およびヒト MAFA を発現していた

(Fig. 9)。GFP のみ発現する AAV2 ではインシュリンの分泌とヒト PDX-1、ヒト Ngn3 およびヒト MAFA の発現はなかった。

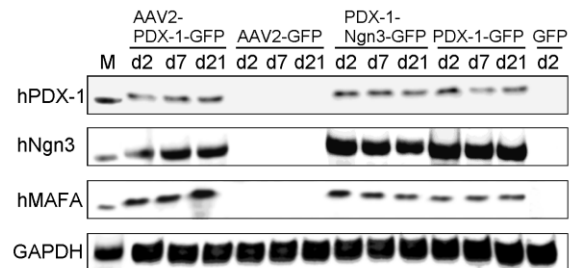


Fig.9 Protein expression in HepaRG cells 2, 7, and 21 days after infection with AAV2 carrying PDX1-GFP or GFP.

この時、AAV2-PDX-1-GFP の GFP 発現とヒトアルブミンの蛍光 2 重染色を行った。その結果、AAV2-PDX-1-GFP を感染させた HepaRG は、アルブミンを発現し、肝細胞の特性を維持し続けていた (Fig. 10)。

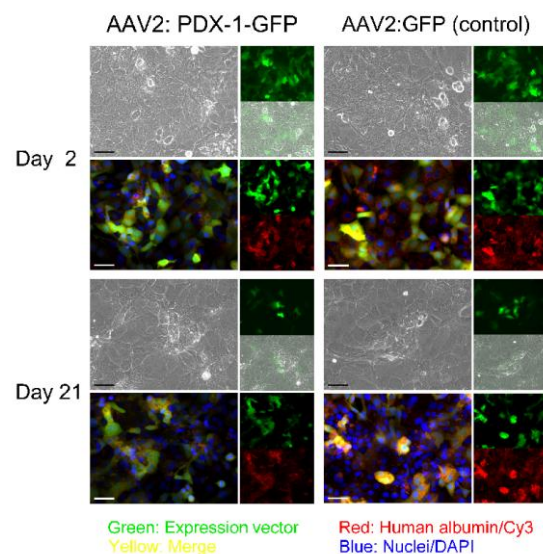


Fig.10 Immunofluorescence photomicrographs of HepaRG cells.

Calibration bars in all images represent 50 μm .

以上の結果から、PDX-1 遺伝子を導入した肝細胞は、ランゲルハンス島あるいは β 細胞に分化転換せず、肝細胞の特性を維持したままグルコース応答性インシュリン分泌能を獲得するものと思われた。

(2) 糖尿病ヒト肝臓マウスへの AAV2-PDX-1-GFP ベクター投与の効果に関する検討

次に、ヒト化肝臓マウスを用いた STZ に

よる糖尿病の抑制効果を検討した。その結果、 7×10^7 GC の力価を持つ AAV2 AAV2-Pdx1-GFP はヒト化肝臓マウスでの 500mg/dl の高血糖を 300mg/dl まで抑制し、その血清中にヒトインシュリンを検出した。AAV2 投与後 6 週間目でサクリファイし、IVIS を用いた imaging 解析を行った結果、投与された AAV2-PDX-1-GFP は、肝臓に集積していた。その時のマーカである GFP を発現している肝臓を観察した結果、肉眼的にランゲルハンス島または β 細胞に変化した細胞は認められなかった。さらに、FCM 解析を行った結果、ヒト化肝臓マウスのヒト肝臓領域に多く遺伝子を導入されていた。

従って、ヒト化肝臓マウスは、AAV を用いた遺伝子治療の評価に適しており、AAV2- Pdx1-Ngn3-GFP および AAV2- Pdx1-GFP は AAV2- Pdx1-Ngn3-GFP および AAV2- Pdx1-GFP は、糖尿病治療に急性的に効果を示すことがマウスを用いた「ヒト」での実験で明らかになった。

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を引いた)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Kromkhun, P., Katou, M., Hashimoto, H., Terada, M., Moon, C., Saito, T.R.: Quantitative and qualitative analysis of rat pup ultrasonic vocalization sounds induced by a hypothermic stimulus. *Lab. Anim. Res.*, 29, 77-83, 2013.
2. Hashimoto, H., Eto, T., Suemizu, H., Ito, M.: Application of a new convenience gender sorting method for mouse spermatozoa to mouse reproductive engineering technology. *J. Vet. Med. Sci.*, 75, 231-235, 2013.
3. Suemizu, H., Kawai, K., Higuchi, Y., Hashimoto, H., Ogura, T., Itoh, T., Sasaki, E., Nakamura, M.: A versatile technique for the in vivo imaging of

human tumor xenografts using near-infrared fluorochrome-conjugated macromolecule probes. *PLoS One*, 8, e82708, 2013.

4. 橋本晴夫, 新井敏郎, 川井健司, 窪田直人, 植木浩二郎, 日置恭司, 斎藤宗雄, 大西保行, 上山義人, 門脇孝, 伊藤守.: 2 型糖尿病モデル IRS-2 ノックアウトマウスにおける遺伝的背景、129^{Ter}/Sv および C57BL/6JJcl 系統の比較. 実験動物技術 49, 3-12, 2014.
5. Hashimoto, H., Higuchi, Y., Kawai, K.: Forced expression of PDX-1 gene makes hepatoma cells to acquire glucose-responsive insulin secretion while maintaining hepatic characteristic. *Cell. Mol. Biol.*, 61(1), 21-29, 2015.
6. 江袋 進, 橋本晴夫, 冨澤政史, 何 裕遥, 小倉智幸, 樋口裕一郎, 桑畑 玲, 寺田 節, 日置恭司, 高橋利一, 斎藤宗雄. スンクスの嘔吐を強化する遺伝的要因は雄に存在する可能性. 実験動物技術 50(1), 2015. in press.

[学会発表] (計 1 件)

1. 再生医学研究用ツールのための全身性クサビラオレンジ発現マウス開発の試み
橋本晴夫¹, 上迫努¹, 山本真史¹, 香川貴洋¹, 川井健司¹, 中村雅登², 末水洋志¹ (実中研¹, 東海大²)
第 60 回日本実験動物学会総会(つくば)、平成 25 年(2013)5 月 15 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本晴夫 (Hashimoto Haruo)

研究者番号 : 30353478

(2) 研究分担者

樋口裕一郎 (Higuchi Yuichiro)

研究者番号 : 00596281