

論文内容の要旨

申請者 斉藤 美知子

遺伝子の個体内での機能解析をする手法として、外科的除去という物理的方法や特定の細胞群に毒素遺伝子を発現させたトランスジェニック(Tg)マウスを作製するという生殖工学的手法が用いられてきた。しかし、外科的除去では散在する細胞をすべて除去することは不可能であり、また毒素を特定の細胞で発現させた Tg マウスを用いた解析では、目的とする細胞もしくは遺伝子が発生過程に必須なものであった場合、胎児期に死亡してしまい、その後の解析が困難である。これらのことから細胞を任意の時期に破壊する方法の確立が望まれていた。そこで本研究では、まず任意の時期に標的細胞に定量的に障害を与える新しい方法の開発を行い、さらにこの新手法により作製した疾患モデルマウスを用いて細胞移植、再生への応用を試みた。

ヒトやサルは HB-EGF(Heparin-binding EGF-like growth factor)は、ジフテリア毒素(DT)の受容体として機能することが知られている。一方、マウスやラットの HB-EGF は毒素結合部位にアミノ酸置換があり毒素受容体としては機能せず、これらの動物は個体としても DT に非感受性を示す。そこで私は、毒素受容体を標的細胞のみで発現する Tg マウスを作製するという「毒素受容体を介した標的細胞ノックアウト法 (Toxin receptor-mediated cell knockout(TRECK))」を考案した。この Tg マウスを作製すれば、任意の時期に DT を投与することにより標的細胞のみを特異的に破壊することが可能と考えられる。実際に毒素受容体を肝細胞特異的に発現する Tg マウスを作製し、このマウスに DT 投与を行ったところ、肝障害の指標となる血清中の GOT, GPT 活性が上昇し、組織染色により肝細胞が特異的に破壊されていることが観察された。このことから、TRECK 法はマウス個体内の標的細胞破壊法として大変有用であることが判明した。さらにこの肝障害モデルマウスに、GFP マウスより単離精製した肝細胞を移植し DT を定期的に投与したところ、ほぼすべての肝細胞をドナー由来の肝細胞に置き換えることが可能であった。従ってこの Tg マウスは幹細胞の探索や移植再生研究にも大変有用であることがわかった。

次にこの TRECK 法を用いた新たなモデルマウスとして、ヒトインシュリンプロモーターを利用した糖尿病モデルマウスの作製を試みた。この Tg マウスは DT 投与により、高血糖、高糖尿、多尿などの糖尿病様症状を示した。血清中インシュリン濃度は DT 投与後に激減し、インシュリン投与により血糖値は正常値に回復した。このマウスは DT 投与量に依存した β 細胞の破壊が観察され、症状のコントロールが可能であった。また野生型マウスより分離したランゲルハンス島の移植により、高血糖値の回復、生存率の上昇が確認できたことから、移植再生実験にも応用可能と考えられた。さらに低濃度の DT 投与により血糖値は上昇するが、後に正常値に戻ることが観察されたことから、この Tg マウスは β 細胞の再生についての研究にも有用と考えている。

今後これらのモデルマウスが新薬開発や移植再生実験などに利用されることが期待できる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 齊藤美知子

本論文は、哺乳動物個体の細胞の生理機能や細胞系譜を解析するための新しいかつ独自性に富んだ方法 TRECK を開発し、その方法を用いて作製した疾患モデルマウスの検証とそのマウスを移植再生研究に応用したものである。申請者は以下の3点を明らかにした。

(1) マウスがジフテリア毒素 (DT) に非感受性の動物であることに着目し、肝細胞特異的なプロモーター下に毒素受容体遺伝子 (hHB-EGF) をつなぎ肝実質細胞特異的に毒素受容体を発現しているトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。このマウスは正常に発育するが、DT を投与するとその投与量に依存して標的細胞、この場合には肝細胞が破壊され、予想通り肝障害が引き起こされることが明らかとなった。この方法 (TRECK) は従来の毒素遺伝子そのものを発現させる方法に比べ、標的細胞の破壊を任意の時期に行えること、毒素遺伝子発現のリークにより Tg マウス自体が得られないという危険性のないこと、投与量依存的に障害を与えることができること、障害からの回復をみることもできること、などの点で格段に優れていると考えられる。

(2) 次にこの肝障害モデルマウスが、肝細胞の移植再生研究に有効な系であることを示した。すなわち、毒素により Tg マウスに部分的な肝障害を与え、野生型のマウス由来の肝細胞を移植し、定期的な毒素投与により Tg マウス由来の肝細胞を段階的に破壊すると、3週間後にはほぼすべての肝細胞がドナー (野生型マウス) 由来の肝細胞に置き換えることができた。この方法の優れた点は、野生型マウス由来のドナー細胞は毒素耐性を示し、レシピエント (Tg マウス) の毒素感受性細胞と明確に区別をつけることができる点である。

(3) さらに TRECK 法を用いた新たなモデルマウスとして糖尿病モデルマウスの作製を試みた。インスリンプロモーター下に毒素受容体を発現する Tg マウスを作製したところ、毒素投与により膵臓 β 細胞が特異的に破壊され、典型的なインスリン依存型の糖尿病を発症することが明らかとなった。さらに毒素投与量によりその症状を制御できること、膵臓 β 細胞の移植により治療が可能であることを示し、 β 細胞の移植再生研究にも有用であることを明らかにした。

以上のように、本論文は新しい標的細胞ノックアウト法を樹立しただけでなく、有用な疾患モデルマウスを作製し移植再生研究への応用を示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。