



報道機関各位

東京工業大学
熊本大学

自然発症型糖尿病モデルマウスの作製に成功

—膵臓再生医療の新しい移植モデル動物として期待—

【要点】

- インスリン2タンパク質の104番目のアミノ酸残基を欠失
- 重度免疫不全モデルマウス BRJ マウスに遺伝子変異導入
- インスリン治療により正常な血糖値に回復

【概要】

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系の糸昭苑教授、坂野大介助教、井上愛里大学院生（博士後期課程1年）らの研究グループは、熊本大学 生命資源研究・支援センターの荒木喜美教授、同大 ヒトレトロウイルス学共同研究センターの岡田誠治教授、順天堂大学大学院医学系研究科の小池正人教授らとの共同研究により、マウスのインスリン2タンパク質への **Q104del 変異導入**（用語1）による自然発症型の糖尿病モデルマウスを作製した（図1）。作製した糖尿病モデルマウスは遺伝的な変異により発症するため、従来の薬剤投与による糖尿病モデルよりも安定に糖尿病を発症することができる。そして、**重度免疫不全モデルマウス**（用語2）の系統に遺伝子変異を導入したため、ヒト iPS 細胞や ES 細胞から作成された膵臓（すいぞう）細胞の糖尿病治療効果を評価するための細胞移植実験への活用が期待される。

この成果は7月22日付で英国の科学誌「*Scientific Reports*（サイエンティフィック・リポーツ）」にオンライン掲載された。

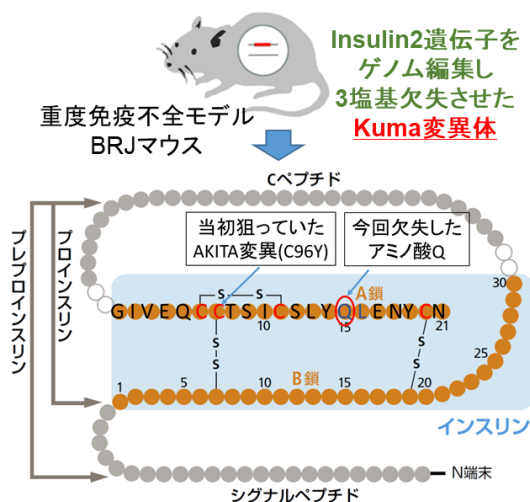


図1 CRISPR/Cas9システムを用いた Kuma 変異をもつマウスの樹立

CRISPR/Cas9 システムを用いて重篤な免疫不全 BRJ マウスに、変異の導入を試みた。当初狙った相同組み換え体は得られなかったが、その代わりに、遺伝子修復時に起こった3塩基 DNA の欠失を有するマウス系統を得た。このゲノム配列の欠失によりインスリン2タンパク質の104番目アミノ酸であるグルタミンが失われていた。

●研究の背景

膵臓β細胞（用語3）は血糖の恒常性維持のためにインスリンという内分泌ホルモンを産生分泌する。血糖値を感知し、インスリンを分泌する機能に関与するタンパク質群の遺伝子に変異があった場合に糖尿病を発症する。従来、インスリン遺伝子において、生後すぐに糖尿病を引き起こすことで知られている変異がいくつか報告されていたが、今回は、新生児糖尿病変異の原因となる新規なインスリン遺伝子変異として **Q104del** 変異を同定した。

一方で、糖尿病の治療には膵臓移植または膵臓内の**ランゲルハンス島**（用語4）の移植が有効な治療手段だが、ドナー不足がその妨げになっている。そこでヒトiPS細胞やES細胞を膵臓細胞へ分化させ移植源とすることが期待されている。試験管内で作製された膵臓細胞の糖尿病治療効果を評価するには糖尿病モデル動物への細胞移植を行い、血糖値の改善効果によって評価することが有効な手法である。

糖尿病モデルマウスを作製する方法としては、薬剤を使ってβ細胞を破壊する方法がよく使用されているが、遺伝子変異糖尿病モデルの方が安定した高血糖状態を作り出せると考えた。従来からよく使われている自然発症糖尿病モデルマウスは重篤な免疫不全の系統ではないため、ヒトの細胞の移植後の生着率を上げる必要があった。そこで従来のモデルマウスと比べてさらに重篤な免疫不全モデルである**BRJマウス**（用語5）のインスリン遺伝子に変異を導入した重度免疫不全糖尿病モデルを作製することにした。

●研究成果

糸教授と荒木教授らは当初、ゲノム編集技術の一つである**CRISPR/Cas9**システム（用語6）を使用して重度免疫不全マウスであるBRJマウスの**Insulin2**遺伝子（用語7）を編集し、得られたマウスのなかにインスリン2タンパク質の104番目のアミノ酸であるグルタミンが欠失したマウスを得た。このマウスは糖尿病の症状を示したことから、この変異型を**Kuma**変異と名付けた。Kuma変異をもつマウス（**Kumaマウス**）は、生後4週以降に血糖値が上昇した（図2）。

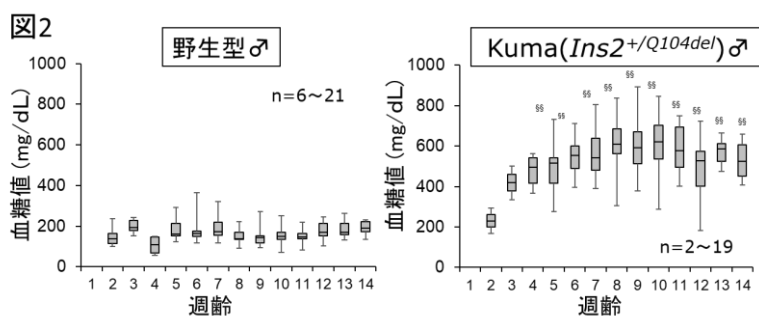


図2 Kumaマウスは糖尿病を自然発症する

野生型マウスとKumaヘテロ接合体の各週齢におけるオスの随時血糖。野生型マウスの血糖値は、100~200 mg/dL程度であるが、Kumaマウスでは、3週齢ごろより血糖上昇が確認された。

§ p < 0.05, § § p < 0.01

得られた Kuma マウスの解析により、変異インスリタンパク質の安定性が低く、生後 3 週以降に Kuma マウスの膵臓 β 細胞におけるインスリタンパク質の産生量が減少していたことが分かった。そして、小池教授らの電子顕微鏡観察結果により、生後 3 週以降では、Kuma マウスの膵臓 β 細胞内のインスリン顆粒の数が減少していることが分かった (図 3)。

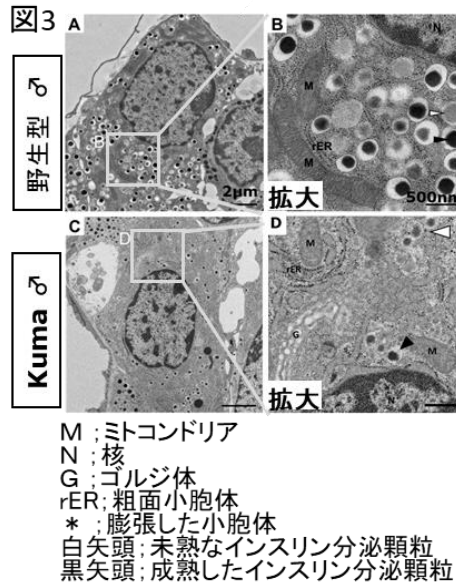


図 3 Kuma マウスの膵臓 β 細胞ではインスリン分泌顆粒が減少していた

5 週齢オスマウスの膵臓の電子顕微鏡観察像。Kuma マウスにおいて、成熟したインスリン顆粒 (黒矢頭) の数が少なくなっていた。

さらに成長とともに膵臓内の β 細胞が減少していく様子も観察された。これらの表現型の変化に伴って、インスリンの分泌する能力は失われていくが、インスリンを徐々に放出するチップをマウス体内に入れ、インスリンを投与することで高血糖を是正できることを確認した (図 4)。

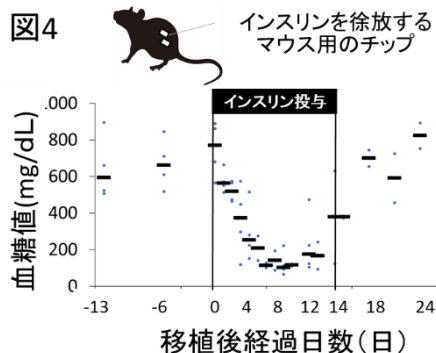


図 4 インスリン治療による血糖値の改善効果がみられた

メスの Kuma ヘテロ接合体マウスにインスリン徐放チップを投与した。インスリン投与前後の血糖値を測定した。インスリン投与は 8 週齢から 12 週齢にかけて、4 週間行った。インスリン投与により、通常血糖 (200mg/dL 以下) まで高血糖は低下し、インスリン投与を停止する (チッ

プの除去) と再び高血糖となった。

これらの結果から、インスリンを分泌する iPS 細胞由来の膵臓細胞を移植し、糖尿病の治療効果を評価する動物モデルとしてこの Kuma マウスが有用であることが明らかになった。

●今後の展開

ヒト iPS 細胞から血糖値に応じてインスリンを分泌できる膵臓細胞 (iPS- β 細胞) を高効率に作り出すことが、世界的に可能になりつつある。今後、これらの iPS- β 細胞を再生医療に利用し、長期間の治療効果を発揮できるかどうかを判断するため Kuma マウスへの細胞移植実験を進めることにしている。

【用語説明】

- (1) **Q104del 変異導入** : 104 番目のアミノ酸のグルタミンを欠失した変異を導入すること。
- (2) **重度免疫不全モデルマウス** : 自然変異マウスと遺伝子改変マウスを交配することで、免疫能力をほぼなくしたマウス。異種の細胞に対する拒絶反応をほとんど起こさないため、人間の造血細胞や免疫細胞を直接導入するヒト化マウスの作出に利用される。
- (3) **膵臓 β 細胞** : 膵臓の内分泌機能を担うランゲルハンス島に存在するインスリン分泌細胞のこと。細胞表面にはグルコーストランスポーターを発現し、血糖レベルに応じてグルコースを取り込み、それがシグナルとなってインスリン分泌応答が起きる。
- (4) **ランゲルハンス島** : 膵臓は、消化酵素を分泌する外分泌細胞と血糖値をコントロールするホルモンを分泌する内分泌細胞からなるランゲルハンス島から構成される。ランゲルハンス島は、血糖値を低下させるインスリンを産生分泌する β 細胞、血糖値を上昇させるグルカゴン産生分泌する α 細胞、そして δ 細胞、 ϵ 細胞、PP 細胞などの内分泌細胞とランゲルハンス島内に栄養を運ぶ血管により構成される。
- (5) **BRJ マウス** : BALB/c マウスの Rag2 遺伝子及び Jak3 遺伝子の両方を欠損させたマウスであり、T 細胞、B 細胞、NK 細胞が完全欠損し、NKT 細胞が減少している、重度免疫不全マウス。2011 年に掲載論文の著者の一人である熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センターの岡田誠治教授らによって樹立された。
- (6) **CRISPR / Cas9 システム** : ウイルスやトランスポゾンが細胞内に侵入した場合、細菌や古細菌で用いられる免疫適応の仕組みを利用したゲノム編集技術の一つ。ゼブラフィッシュ、マウス、ラット、線虫、植物や細菌でゲノム編集が可能。標的となるゲノム上の塩基配列と相補的な配列をもつ guide RNA (crRNA : tracrRNA) に従い DNA を切断する酵素で

ある Cas9 タンパク質がゲノム上の任意の配列を切断する。ゲノムの切断後、DNA 修復が起こるが、この時に一定確率で塩基置換や欠損が起こる。今回の Kuma 変異はこれに由来する。また、切断された部位に相同な配列をもつドナーベクターを同時に細胞内に取り込ませることで、狙った領域の配列をドナーベクター上の配列と組み替えることができる。

(7) **Insulin2 遺伝子**：膵臓内分泌β細胞で、インスリンタンパク質を産生する2つの遺伝子 (Insulin1 と Insulin2) のうちの一つ。

【論文情報】

掲載誌：*Scientific Reports*

論文タイトル：Insulin2 Q104del (Kuma) Mutant Mice Develop Diabetes with Dominant Inheritance

著者：Daisuke Sakano, Airi Inoue, Takayuki Enomoto, Mai Imasaka, Seiji Okada, Mutsumi Yokota, Masato Koike, Kimi Araki, Shoen Kume

DOI：10.1038/s41598-020-68987-z

【問い合わせ先】

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系

教授 糸昭苑 (くめ しょうえん)

TEL: 045-924-5812 FAX: 045-924-5813

Email: skume@bio.titech.ac.jp

熊本大学 生命資源研究・支援センター 疾患モデル分野

教授 荒木喜美 (あらか きみ)

TEL: 096-373-6597 FAX: 096-373-6599

Email: arakimi@gpo.kumamoto-u.ac.jp

【取材申込み先】

東京工業大学 総務部 広報・社会連携課

TEL: 03-5734-2975 FAX: 03-5734-3661

Email: media@jim.titech.ac.jp

熊本大学 総務部総務課広報戦略室

TEL: 096-342-3271 FAX: 096-342-3110

Email: sos-koho@jim.kumamoto-u.ac.jp