

# 毒素受容体を利用した細胞ノックアウト法 TRECK の開発と応用

斉藤 美知子

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物細胞工学

(河野 憲二 教授)

平成 17 年 5 月 2 日提出

## 目次

### 第 1 章：毒素受容体を利用した細胞ノックアウト法の開発とその応用

#### 序論

1. 背景	6
2. ジフテリア毒素の作用機序	7
3. 毒素レセプター	8
4. 研究目的	8

#### 材料と方法

マウス、細胞およびジフテリア毒素	13
細胞への導入プラスミドの構築と調整	13
培養細胞への遺伝子導入	13
ジフテリア毒素に対する感受性	13
トランスジーンの調整	14
トランスジェニックマウスの作製	14
トランスジェニックマウスの判定	14
Northern 解析	15
In situ ハイブリダイゼーション	15
毒素投与	16
血清中 GOT、GPT 活性の測定	16
近郊系での肝炎モデルマウス作製	16
ゲノム抽出	16
PCR 解析	17
Immunohistochemistry	17
肝実質細胞の分離・精製	17
フローサイトメーターでの解析	18
細胞の脾臓から肝臓への経門脈移植	18

#### 結果

##### I. TRECK 法による肝炎モデルマウスの作製

培養細胞	20
トランスジェニックマウス	20
毒素投与	25

血中毒素濃度	28
毒素投与方法による肝臓への影響の違い	28
II. 肝炎モデルマウスを用いた肝細胞移植	
近郊系での肝炎モデルマウス作製	28
ジフテリア毒素単回投与	30
肝細胞移植	30
毒素連続投与による未発現細胞の増加	35
考察	39
第2章：TRECK法を用いた新たな糖尿病モデルマウスの作製	
序論	46
材料と方法	
ジフテリア毒素とマウス	48
トランスジェニックマウスの作製	48
Immunohistochemistry	48
血(清)中グルコース濃度、インシュリン濃度の測定	49
インシュリン負荷試験	49
ランゲルハンス島の分離精製	49
腎臓皮膜下へのランゲルハンス島の移植	49
腎臓摘出	50
結果	
トランスジェニックマウスの作製	51
毒素投与による糖尿病誘発	51
毒素濃度依存性	56
インシュリン依存性の確認	59
考察	68
謝辞	71





## 第 1 章

### 毒素受容体を利用した細胞ノックアウト法の開発とその応用

## 序論

### 1. 背景

ある組織や細胞の本来の機能を理解する方法として、目的の組織や細胞を欠失させてその機能解析を行うことがある。この手段としては細胞の外科的除去、細胞特異的に毒素を発現させる方法(Palmiter et al., 1987, Breitman et al., 1987, Lowell et al., 1993, Ross et al., 1993)、もしくは機能を調べたいものが遺伝子である場合はその遺伝子のノックアウトを作製するなどの方法が考えられる。ジフテリア毒素のフラグメント A 遺伝子を組織特異的なプロモーター下流に接続して受精卵に導入しトランスジェニックマウスを作製すれば、ある一群の特異的な細胞のみを殺すことができ、生体内でその細胞の役割をみることができる。また発生分化過程における、その細胞系譜についても知ることができる。この発想に基づいた最初の実験は、Palmiter らのグループにより試みられた(Palmiter et al., 1987)。彼らはラット由来の膵臓外分泌腺で特異的に発現するエラスターゼ遺伝子のプロモーター・エンハンサーの下流にフラグメント A 遺伝子を接続し、トランスジェニックマウスを作製した。生まれてきたマウスは膵臓を完全に欠失したものや、膵臓の一部が痕跡程度にしか残っていないものが得られた。胎仔は 14 日目以降の形成が阻害され、とくにエラスターゼを分泌する外分泌腺細胞の形成が阻害されていた。おそらくこのことが内分泌部の形成にも影響を与え、ランゲルハンス島なども不完全にしか形成されないと考えられた。Bernstein らのグループは、上記と同様の発想で、毒素フラグメント A 遺伝子を  $\alpha$ -クリスタリン遺伝子のプロモーター・エンハンサー部の下流につなぎトランスジェニックマウスを作製した(Breitman et al., 1987)。このうちの 3 匹に小眼球症状の表現型が現れた。この性質はすべて F1 マウスに遺伝し、毒素遺伝子がレンズを形成する線維細胞で発現しその形成が阻害されていることが明らかとなった。ラット成長ホルモンのプロモーターに毒素のフラグメント A 遺伝子をつないだ場合には、脳下垂体での成長ホルモンの産生が抑えられ、結果として通常の半分のサイズしかないマウスが生育してきた(Behringer et al., 1988)。さらにこのマウスでは黄体刺激ホルモンであるプロラクチンの産生も抑えられていること、さらに免疫組織化学的な解析結果を合わせて解釈すると、プロラクチン産生細胞は成長ホルモン産生細胞から分化してくることが明らかとなった。

このようにジフテリア毒素フラグメント A を標的遺伝子のプロモーターの下流に直接接続し、その細胞を破壊して機能を解析する試みは以前からなされており、標的細胞によっては非常に有効な方法である。しかしこの方法の欠点は、最初から毒素遺伝子が染色体に組み込まれているため、使用しているプロモーターの遺

伝子発現が始まると同時に細胞は死に、その細胞がマウスの発生の過程に必須のものであれば目的のマウスが得られず、その後の解析が困難になることである。

外科的除去（レーザーによる除去も含む）では散在する細胞を効率よく除去することは不可能であるし、ノックアウトマウスを用いた機能解析もその遺伝子が発生過程に必須であった場合は胎児期に死亡してしまいその後の解析が困難になることも少なくない。外科的に除去不可能である組織やある特定の細胞のみを任意の時期に破壊することは、まだ原因や治療法が解明されていない疾患の研究や、組織あるいは細胞の時期特異的ノックアウトによる治療法の開発としても役立っていくと考えられる。

## 2. ジフテリア毒素の作用機序

ジフテリア毒素は分子量約 58,000 の蛋白毒素であり、フラグメント A(DT-A)とフラグメント B(DT-B)の 2 つのドメインからなる。C 末端側の DT-B は細胞表面に存在する毒素受容体と結合し、受容体を介したエンドサイトーシスによりエンドソームとして細胞内に取り込まれる(Tsuneoka et al., 1993)。エンドソームがリソソームと融合して酸性条件下になると(pH5 以下)、毒素の立体構造が変化して DT-A がサイトゾルへと膜透過する(Draper et al., 1980, Sandvig et al., 1980)。DT-A が膜透過するためにはこの酸性条件が必須であり、リソソームの pH をあげるアミン類や酸性化に関与するプロトン ATPase を阻害するバフィロマイシンなどは毒素の膜透過を阻害する(Draper et al., 1980, Umata et al., 1990)。また細胞表層に結合した毒素は酸性条件下にすると直接サイトゾルへ入ることが報告されている。DT-A は細胞内でペプチド鎖伸長因子 elongation factor2 を ADP リボシル化することにより不活性化し、タンパク質合成を阻害して細胞を死に至らしめる(Honjo et al., 1968, Pappenheimer, 1977, Kohno et al., 1986, Mekada et al., 1988, Moskaug et al., 1991、図 1-1 参照)。DT-A は真核生物由来のすべての EF-2 を ADP リボシル化し、かつ 1 分子が細胞内に入るだけで細胞を死に至らしめる活性を持つことが知られている(Yamaizumi et al., 1978)。それにもかかわらず、動物個体に関する毒素感受性には大きな差がある。動物の組織由来の細胞は基本的にはその動物の毒素感受性を反映している。毒素感受性のサル由来の Vero 細胞と非感受性のマウス由来の L 細胞との間には、10 万倍という非常に大きな感受性の差が認められる(Mekada et al., 1982)。毒素の細胞に対する結合活性を調べると、感受性のヒト由来細胞には特異的毒素結合活性が観察されるが、マウスやラット由来の細胞には毒素の特異的結合は観察されない。このことから、毒素感受性の差は細胞表面にある毒素に対するレセプターの差と考えられる。

### 3. 毒素レセプター

この毒素レセプターの同定は、マウスの細胞に毒素高感受性の Vero 細胞由来の cDNA を発現させるというレセプター発現クローニング法により行われた (Naglich et al., 1992)。この結果、ジフテリア毒素レセプターはヘパリン結合 EGF 様増殖因子(HB-EGF)という EGF ファミリーに属する増殖因子であることが明らかとなった。HB-EGF は、マクロファージが産生分泌する血管平滑筋細胞の増殖因子として同定されたもので、全長 208 アミノ酸からなるプレプロ型の膜糖蛋白質として合成される。この膜結合型が毒素レセプターとして機能し、毒素が結合するとエンドサイトーシスによってエンドソームに取り込まれていく。この膜結合型 HB-EGF は、EGF ドメインの N 末端側と C 末端側の両端をプロテアーゼにより切断されると分泌型の成熟 HB-EGF となり、EGF レセプターを介したパラクライン増殖因子として機能する (Higashiyama et al., 1991)。毒素の結合部位はこの EGF 様ドメインにあり、ヒトやサルのように毒素感受性動物由来の HB-EGF はジフテリア毒素と結合し毒素受容体として機能するが、マウスやラットのようなげっ歯類の HB-EGF はこの EGF 様ドメインにいくつかのアミノ酸置換があり毒素と結合することができず、毒素受容体としては機能しない (Mitamura et al., 1995, 図 1-2 参照)。すなわち、マウスやラットはヒトに比べ毒素に対して 1,000 倍以上も耐性を示す。培養細胞レベルでは、ジフテリア毒素に対し非感受性であるマウス fibroblast 由来 L cell にヒト HB-EGF 遺伝子を導入し発現させると、その細胞は毒素に対して感受性となることが報告されている (Naglich et al., 1992)。ヒトやサルの HB-EGF cDNA をマウス細胞や昆虫由来の毒素非感受性細胞に発現させても毒素感受性を示すことから、エンドサイトーシス以降での過程はほとんど感受性の差には関与しておらず、毒素感受性の差は HB-EGF の構造や発現量の差に依存していると考えられる (Naglich et al., 1992, Valdizan et al., 1995)。またほかの EGF ファミリーに属する膜結合型 EGF 様増殖因子がジフテリア毒素レセプターとして機能することはなく、この機能は HB-EGF 特有のものであることがわかっている。

### 4. 研究目的

これらのことにより、細胞特異的に発現する遺伝子のプロモーターを用いて、ヒト HB-EGF をマウスの特定の細胞に発現させたトランスジェニックマウスを製作し、このマウスに任意の時期にジフテリア毒素を投与すればヒト HB-EGF を発現した細胞のみを破壊することが可能であると考えた。そのようなトランスジェニックマウスが得られれば、機能を知りたい任意の時期にジフテリア毒素を投与することにより、その細胞のみを破壊することが可能となる (図 1-3 参照)。毒素

は任意の時期に投与することができ、一度標的細胞にダメージを与えたところで、経過観察をしてその後の回復を見ることも可能である。分化した細胞のみにヒト HB-EGF を発現させ毒素投与を行えば、分化終了後の細胞のみが破壊され、幹細胞はダメージを受けずにその再分化の過程を観察することも可能であると思われる。この方法が実際にマウス個体内で再現可能であるかどうか確認するために、肝実質細胞特異的に発現するアルブミンエンハンサー・プロモーターを用い、毒素投与により発症時期や障害の程度を自由にコントロールできる肝炎モデルマウスの作製を試みた。

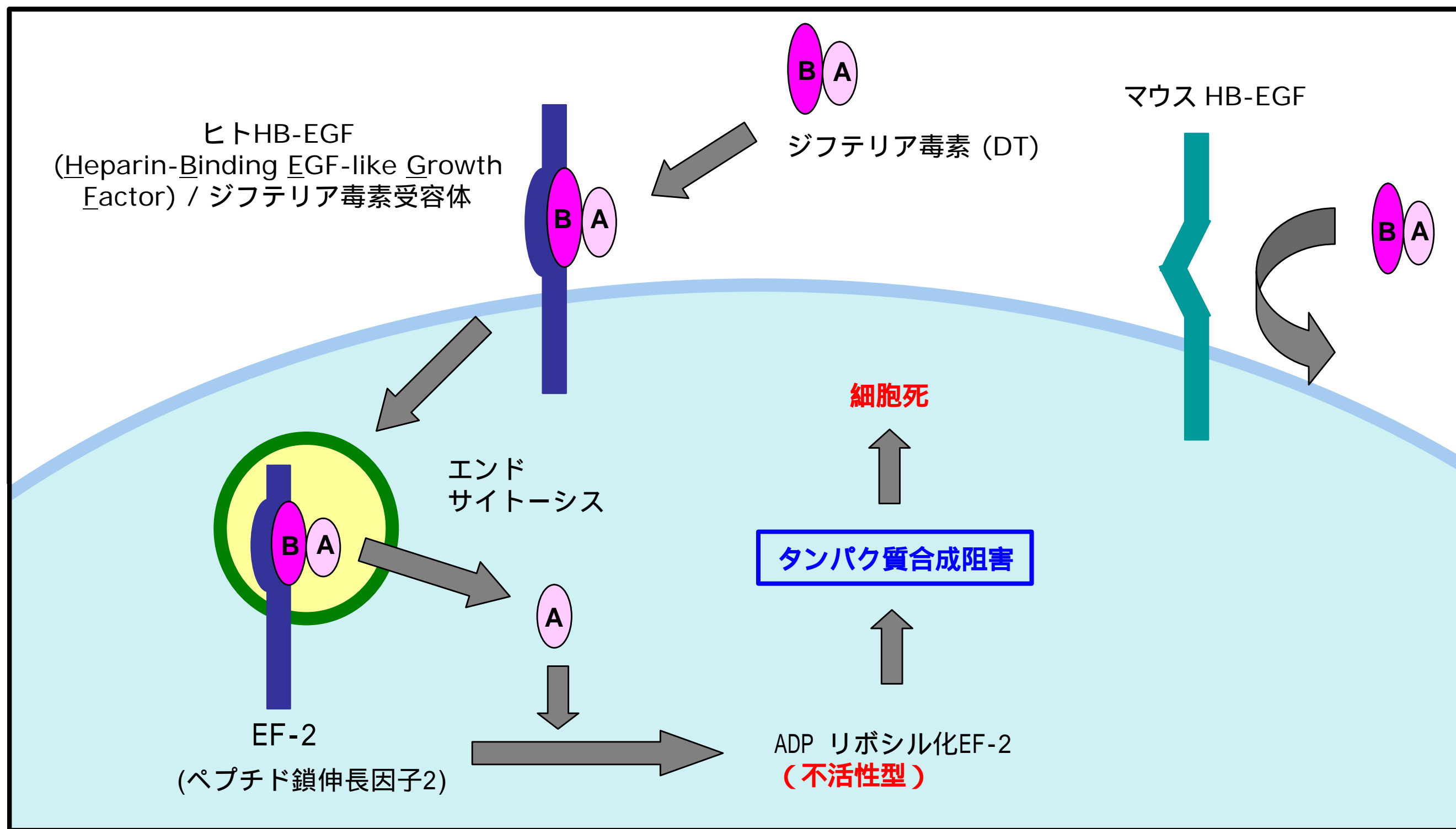


図 1 - 1 ジフテリア毒素の作用機序

ジフテリア毒素はA,B二つのドメインからなる蛋白質である。ヒトHB-EGFはジフテリア毒素受容体として機能し、ジフテリア毒素のフラグメントBと結合してエンドサイトーシスにより毒素を細胞内に取り入れる。細胞質中に遊離されたフラグメントAはEF-2をADP-リボシル化して不活性化し、タンパク質合成を阻害して細胞を死に至らしめる。一方マウスHB-EGFは構造上の違いによりジフテリア毒素と結合しない。

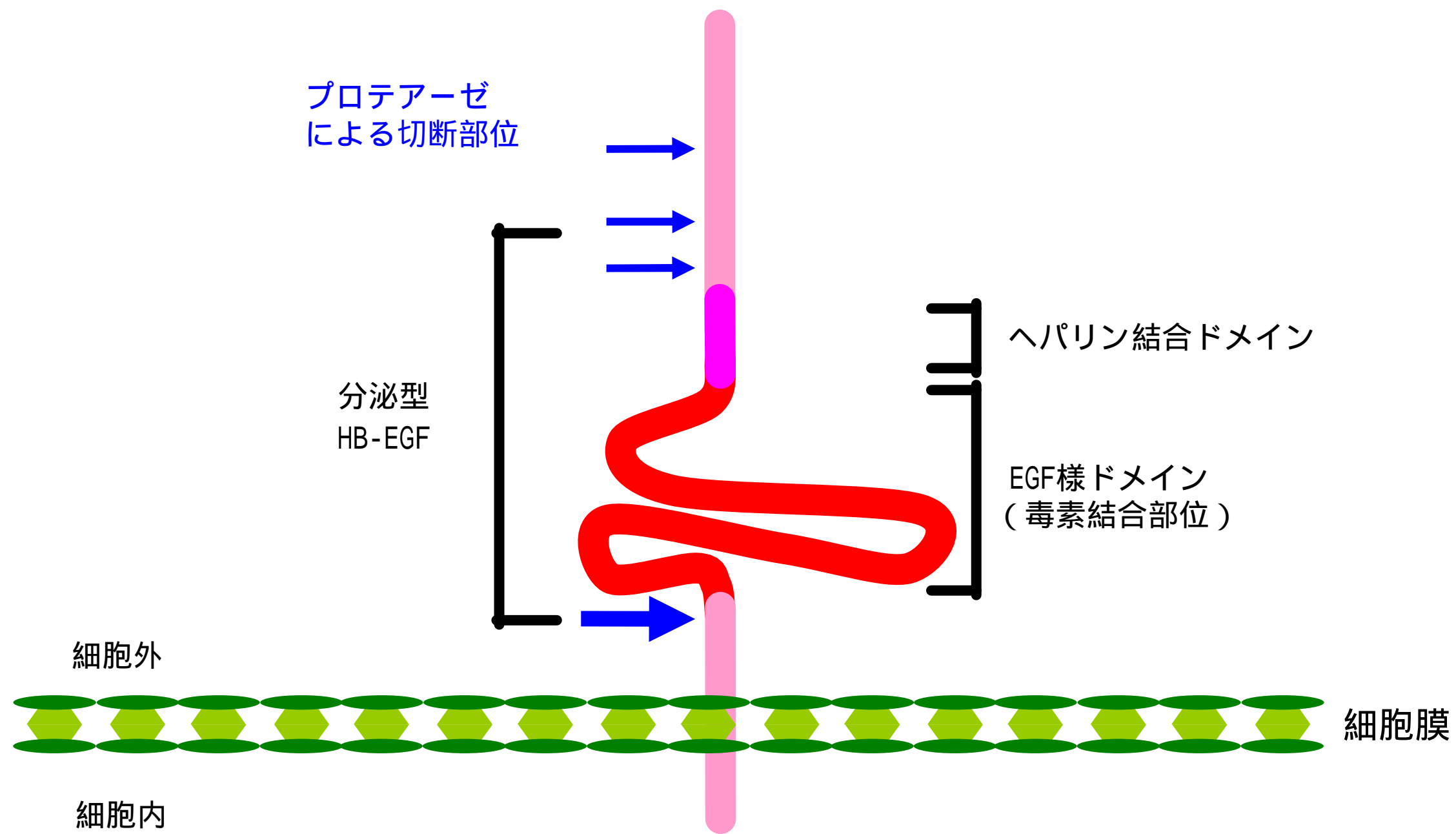


図 1 - 2 HB-EGFの構造

HB-EGFの構造の模式図を示す。HB-EGFは膜貫通部位を持つ膜蛋白質で、プロテアーゼにより矢印で示す部分で切断され分泌型（成熟型）となり増殖因子として機能する。赤で示したEGF様ドメインに毒素が結合する。

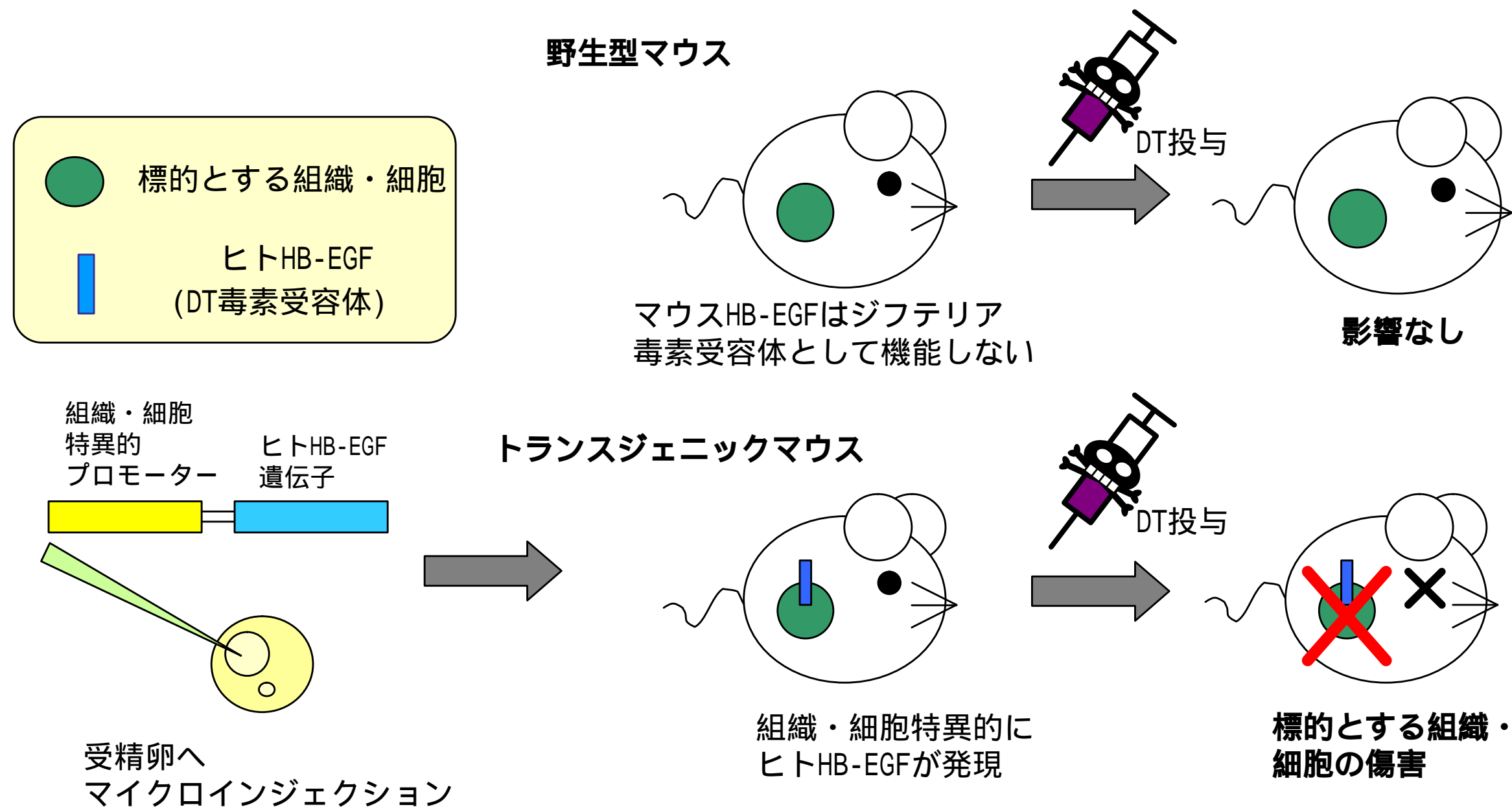


図 1 - 3 毒素受容体を利用した細胞ノックアウト法の概略図

野生型マウスはジフテリア毒素に対し、非感受性である。このことを利用し、マウスのある特定の細胞に毒素受容体(ヒトHB-EGF)を発現させ、その細胞のみを毒素感受性とする。このマウスにジフテリア毒素を投与することにより、毒素受容体を発現した標的細胞のみを破壊することができる。



## 材料と方法

### マウス、細胞およびジフテリア毒素

マウス肝細胞由来 BNL CL.2 は ATCC 社より購入して用いた(ATCC#TIB73)。ジフテリア毒素はジフテリア菌 (PW8 株) の培養上清より精製したものをを用いた (Ishii-Kanei et al., 1979, Saito et al., 2001, 当研究室岩脇隆夫修士論文参照)。マウスはすべて日本クレアから購入したものをを用い、本学動物実験施設の指針に従い飼育した。

### 細胞への導入プラスミドの構築と調製

pRcHBEGF (大阪大学微生物研究所 目加田英輔博士より供与、Iwamoto et al., 1994) は pRc/CMV(Invitrogen)の *Bst* XI site にヒト HB-EGF 遺伝子が挿入されており、neo 耐性遺伝子を持つ。マウス albumin enhancer promoter を p2335A-1 (大阪大学医学系研究科 金田安史博士より供与) から *Hin* dIII で切り出し、pRcHBEGF の CMV promoter 部分と組み換え pMS1(図 1-4A)とした。

終夜培養した菌体 (DH-5 $\alpha$ ) を 0.2N NaOH, 0.1% SDS で溶解後、中和し、上清にイソプロパノールを加えてプラスミド DNA を沈殿させた。TE(10mM Tris, 1mM EDTA)に溶解し 5M LiCl を等量加えて高分子 RNA を除去した。上清にイソプロパノールを加えプラスミド DNA を沈殿させて脱塩、乾燥後 TE に溶解し RNase A 処理を行った。Polyethylene glycol(13% PEG/1.6M NaCl)によりプラスミド DNA を沈殿させ、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿後、塩化セシウムを用いた密度勾配遠心法(NVT65.2, BECKMAN, 60,000rpm, 16hours, 20 )によって精製した。

### 培養細胞への遺伝子導入

calcium phosphate 法(Chen et al., 1988)によってヒト HB-EGF 遺伝子(pMS1)をマウス肝細胞由来の BNL CL.2 に導入し、恒常的に発現させた。5 $\times 10^5$  個の細胞を 10cm プレートに播き、翌日 20 $\mu$ g の DNA を含むリン酸カルシウム溶液を滴下、14 時間後に洗浄、2 日目から G418(15 $\mu$ g/ml, Geneticin Disulfate, 和光純薬)により、遺伝子導入細胞の選択を行った。

### ジフテリア毒素に対する感受性

24 穴のプレート(CORNING,#25020)に 1-2  $\times 10^5$  個/well となるように細胞を播き、種々の濃度( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ , 1, 10 $\mu$ g/ml)のジフテリア毒素を加えて 37 で 6 時間培養し、200 $\mu$ l/well のメチオニン不含培地(No.21099-015,GIBCO)に交換後、

$^{35}\text{S}$  ラベル化したメチオニン、システイン( $5\mu\text{Ci/ml}$ , NEG-072, NEN)を加えて 1 時間取り込ませた後 PBS で洗浄、細胞を  $0.1\text{N}$  NaOH で溶解し 10%トリクロロ酢酸を加えた。生成した沈殿物を吸引式 glass filter folder を用いて glass filter に吸着させ、その放射活性を液体シンチレーションカウンター(BECKMAN)で測定した(Kohn et al., 1985, Umata et al., 1990)。

### トランスジーンの調整

pRcHBEGF よりヒト HB-EGF cDNA を *Bam* HI-*Not* I で切り出し、Klenow Fragment (DNA polymerase I, Toyobo #PLA-103)にて平滑末端とし、*Eco* RI linker (Takara, Phosphorylated linker #4640P) を付け、pBluescript(SK-)に挿入した。これより *Eco* RI でヒト HBEGF cDNA 断片を切り出し、pBstN(福島県立医大 小林和人博士より供与)の *Eco* RI site に挿入、pMS6(図 1-4B)を作製した。P2335A-1 より *Not* I-*Bam* HI で albumin enhancer promoter を切り出し、pMS6 の  $\beta$ -globin intron の 5'側に挿入、pMS7 とした。pMS7 より *Not* I -*Xho* I で処理してできた 4.8kb の断片を切り出し(Vector の除去) QIAquick gel extraction kit (Qiagen) を用いて精製し、トランスジーンとして用いた。

### トランスジェニックマウスの作製

4 - 6 週齢の ICR メスマウスに採卵予定の 56 時間前に牝馬血清生殖腺刺激ホルモン(pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG, セロトロピン、帝国臓器)を 5IU/匹腹腔内投与し、その 48 時間後にヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン(human chorionic gonadotrophin, hCG, プベローゲン、三井ゾーキ)を 5IU/匹腹腔内投与して ICR オスマウスと同ケージにて飼育交配させた。翌朝膣腺チェックにより交配を確認し、メスマウスの卵管を摘出、M2 medium(Sigma)中で採卵を行った。ヒアルロニダーゼ(Sigma)を加えて卵丘細胞を除去し、M2 medium で数回洗浄した後、M16 medium(Sigma)中に入れ、 $37^\circ\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$  中でインジェクションまで培養した。

トランスジーン( $1\text{ng}/\mu\text{l}$  に  $10\text{mM}$  Tris-Cl,  $0.1\text{mM}$  EDTA, pH7.4 を用いて希釈したもの)を受精卵に導入し、レシピエントマウス(ICR) の卵管に移植 ( $25 \sim 30$  個/匹)した。移植後 20 日目までに自然分娩しないマウスは帝王切開により産子を取り出し、里親に付けて育てさせた。

### トランスジェニックマウスの判定

PCR buffer( $50\text{mM}$  KCl,  $10\text{mM}$  Tris-HCl pH8.0,  $1.5\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ , 0.1%(W/V)ゼラチン, 0.45% NP-40, 0.45% Tween20,  $500\mu\text{g}/\text{ml}$  Proteinase K)  $100\mu\text{l}$  中に 3 週齢マウスの耳片を少量入れ、 $55^\circ\text{C}$  で 1 時間インキュベートした後、 $95^\circ\text{C}$ 、5 分で Proteinase K を失

活させ、この lysate 5 $\mu$ l を用いて PCR(94 1 分、58 1 分、72 1 分、35cycles)を行った。Primer にはヒト HB-EGF cDNA に特異的な primer(M1;5'-gct ctt tct ggc tgc agt tc-3', M2 ;5'-gcg att ttc cac tgg gag gc-3')を用いた。

### Northern 解析

6-8 週齢のマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、肝臓、腎臓、脾臓、骨格筋、心臓、および肺を摘出し、直ちに液体窒素で凍らせた。AGPC 法(Han et al., 1987)により RNA を抽出した。Total RNA 15 $\mu$ g を 1%アガロース、2%ホルマリンゲルで電気泳動後、ナイロンメンブレン(Hybond-N, Amersham #PRN 303N)に 20xSSC を用いてブロットし、RNA の膜への固定は 80℃、2 時間 baking することにより行った。42℃ で 2 時間プレハイブリダイゼーション(5xSSPE, 50%ホルムアミド, 5xDenhardt's, 0.5% SDS, 20 $\mu$ g/ml 牛胸腺 DNA)を行った後、[ $\alpha$ -32P]dCTP で標識(random primer DNA labeling kit ver.2, Takara#6045)したヒト HB-EGF cDNA(783bp)断片をプローブとして 42℃ で一晩ハイブリダイゼーションした。6xSSC、0.1%SDS、室温 10 分で 2 回、2xSSC、0.1%SDS、室温 10 分で 2 回、さらにも 0.1xSSC、0.1%SDS、55℃、5 分で 1 回洗浄し、X-ray フィルム(Kodak)に 16 時間感光させてシグナルを検出した。

### In situ ハイブリダイゼーション

In situ 用プローブ作製のため、pRcHBEGF よりヒト HB-EGF cDNA を *Bal* II-*Sal* I で切り出し、pBluescript(SK-)の *Bam* HI-*Sal* I site に挿入、pMS10(図 1-4D)を作製した。pMS10 を antisense 鎖作製のために *Xba* I で、sense 鎖作製のために *Xho* I でそれぞれ制限酵素消化し、得られた template DNA を Dig DNA labeling mixture (Boehringer) を用いてラベリングを行った。antisense 鎖作製には T7 polymerase(Promega)、sense 鎖作製には T3 polymerase(Promega)を用いた。

8 週齢マウス個体より肝臓を摘出し、直ちにドライアイスで凍結、クライオスタットを用いて 7 $\mu$ m の切片を作製した。切片を 4% formaldehyde, 0.1M Phosphate buffer(20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH7.4)で室温 20 分固定し、0.1M Phosphate buffer で 2 回洗浄した後、0.2M HCl、0.1M Phosphate buffer、室温 20 分で内因性のアルカリフォスファターゼを失活させ、再び 0.1M Phosphate buffer で 2 回洗浄した。10 $\mu$ g/ml proteinase K, 50mM Tris-Cl, 5mM EDTA(pH8.0)で室温 5 分間処理し、0.1M Phosphate buffer で 2 回洗浄、4% formaldehyde, 0.1M Phosphate buffer(pH7.4)で後固定した後、0.25%無水酢酸、0.1M triethanolamine 溶液で 10 分間アセチル化した。0.1M Phosphate buffer で洗浄した後、アルコール系列、クロロホルムにて脱水脱脂後、風乾した。

Hybridization buffer(10% dextran sulfate Na, 20mM Tris-Cl(pH8.0), 0.3M NaCl, 0.2% sarcosyl, 0.2mg/ml denatured salmon sperm DNA, 500ng/ml yeast tRNA, 1xDenhardt's solution, 50% formamide)だけで 37℃、60 分間湿箱中でプレハイブリダイゼーションを行い、続いて DIG ラベルしたプローブを含んだ hybridization buffer をスライドあたり 100μl のせて湿箱中にて 55℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。4xSSC で 60℃、20 分、High stringency 溶液(50% formamide, 2xSSC)で 60℃、30 分間洗浄した。RNase buffer(10mM Tris-Cl (pH7.4), 1mM EDTA(pH8.0), 0.5M NaCl)で 37℃、10 分間、3 回洗浄後 2μg/ml RNase A(Sigma)を含んだ RNase buffer で 37℃、30 分間処理し、再び RNase buffer で 37℃、10 分間、洗浄した。さらに High stringency 溶液で 60℃、30 分洗浄した後、DIG nucleic acid detection kit(Boehringer)にしたがって発色を行った。

### 毒素投与

ジフテリア毒素 (stock; 6mg/ml) を PBS もしくは生理食塩水にて必要な濃度(個体に 200μl 前後の投与となるよう)に希釈した。本文中の筋肉注射は、マウスに麻酔をかけ、背部を筋層も含めて摘み上げ、筋肉中に毒素を注射した。そのほか、腹腔内注射、尾部より静脈注射を行った。

### 血清中 GOT, GPT 活性の測定

毒素投与 12 時間前、投与後 12 - 120 時間(12 時間おき)にマウス尻尾より採血を行い、5,000rpm, 5 分間遠心して血清を得た。GOT(glutamic oxaloacetic transaminase), GPT(glutamic pyruvic transaminase)活性測定キット(トランスアミナーゼ C テストワコー、和光純薬)を用いて、GOT, GPT 活性の測定を行った。

### 近郊系マウスでのトランスジェニックマウスの作製

先に述べた pMS7(図 1-4C)より *Not I* -*Xho I* で処理してできた 4.8kb の断片を切り出し、QIAquick gel extraction kit (Qiagen) を用いて精製し、トランスジーンとして用いた。C57BL/6J x C57BL/6J から得られた受精卵にこのトランスジーン(1ng/μl に 10mM Tris-Cl, 0.1mM EDTA, pH7.4 を用いて希釈したもの)を導入し、レシピエントマウス (ICR) の卵管に移植し (25 ~ 30 個/匹) トランスジェニックマウスを得た。

### ゲノム抽出

Lysis buffer(50mM Tris-Cl (pH8.0), 20mM EDTA, 0.2% SDS, 100μg/ml Proteinase K) 中にマウスの尻尾少量を切って入れ、55℃で 3 時間以上インキュベートして溶解

した後、フェノール/クロロホルム抽出を2回繰り返し、エタノールを加えゲノムを析出させた。これをチップですくい、70%エタノールで洗浄後風乾させ、TEに溶解した。

### PCR 解析

得られたゲノムをテンプレートとし、アルブミンプロモーターとヒト HB-EGF をはさむ primer (mAlb-310F ; 5'-aga gcg agt ctt tct gca ca-3', HBEGF200R ; 5'-gat ctg cct ctt gca agt ca-3') を用いた PCR 解析にてトランスジェニックマウスの同定を行った。

### Immunohistochemistry

マウスをペントバルビタールにて麻酔し、4% Paraformaldehyde を用いて灌流固定した。組織を取り出し、同じ固定液を用いて一晩後固定した後、30% sucrose に置換した。O.C.T.コンパウンド中で凍結後、クライオスタットにて 8 $\mu$ m の切片を作製した。PBS でコンパウンドを洗い流した後、PBST / NGS (0.2% Tween 20, 5% Normal goat serum in PBS) にて 30 分 blocking を行い、一次抗体 (Rabbit anti-GFP (MBL, 500 倍希釈)) を用いて室温で 2 時間反応を行った。PBST / NGS で 3 回洗い、二次抗体 (anti-rabbit IgG, 200 倍希釈, Jackson) で室温 1 時間反応させた。PBS で洗浄した後、VECTASheild with DAPI (Vector) を用いて封入、Zeiss 蛍光顕微鏡 (Axiophoto) にて観察を行った。

### 肝実質細胞の分離・精製

GFP マウス(京都大学から供与)をペントバルビタールにて麻酔し、腹部を切開して下大静脈を露出させ、下大静脈に 24G サーフロー留置針をカニューレーションし糸で固定した。横隔膜を切開し横隔膜上で下大静脈を結紮、あらかじめ 37 に温めておいた Hanks(HANKS' BALANCED SALTS (Sigma H-4891) 100mg, 10mM Hepes, 4mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.5mM GEDTA(Dojin 346-01312)) を用いて灌流を開始、直ちに門脈を切断し脱血を行った。肝臓の脱血が完全に行われた後、コラゲナーゼ溶液(0.05% Collagenase Type2 (GIBCO 17101-015), 0.8% NaCl, 5.4mM KCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.42mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10mM Hepes, 6 $\mu$ g/ml Phenol Red, 4.2mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.005% Trypsin inhibitor) で灌流を行った。約 10 分間 8~10ml/min.の速度で灌流し、肝皮膜下で肝実質が崩れていくことを確認して、肝臓を摘出した。DMEM(Sigma D6546)を加え、肝臓をはさみで mince した後、ガーゼでこして 100 $\mu$ m の篩を用いて filtration した(図 1-12 参照)。460rpm、4 で 5 分間遠心し、上清を取り除いた。この操作を 2 回繰り返し、さらに細胞懸濁液を 60% percoll の上に

重層して 65g, 4 で 15 分遠心し、沈殿物を DMEM で懸濁、細胞数をカウントした。

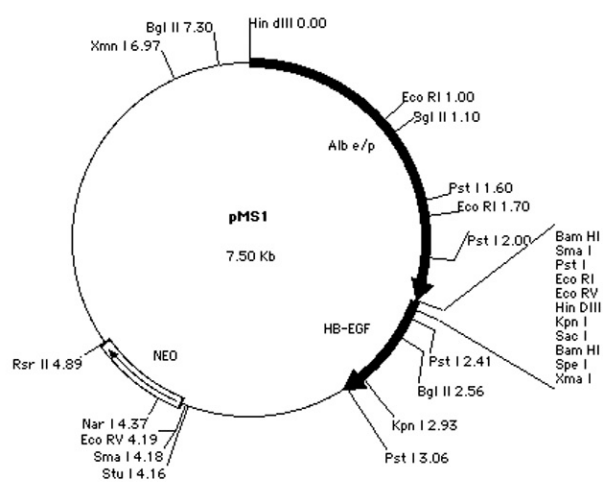
#### フローサイトメーターでの解析

精製前と精製後の細胞を PBS(-)に懸濁し、20,000 個の細胞を FACScan(BD)を用いて測定した。

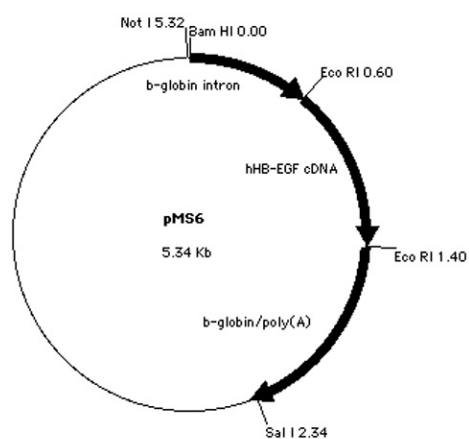
#### 細胞の脾臓への経門脈移植

精製した細胞を  $1 \times 10^7$  個/ml の濃度に DMEM(Sigma D6546)(+10%FCS)で懸濁した。マウスをペントバルビタールにて麻酔して左腹を 5mm 程切開し、脾臓を一部露出させた。脾臓先端から 30G の針を用いて細胞を  $200 \mu\text{l}$  ( $2 \times 10^6$  個/匹) 注入、針を刺して出血した部分を糸でしばって止血した後、脾臓を戻し、縫合した(図 1-13 参照)。

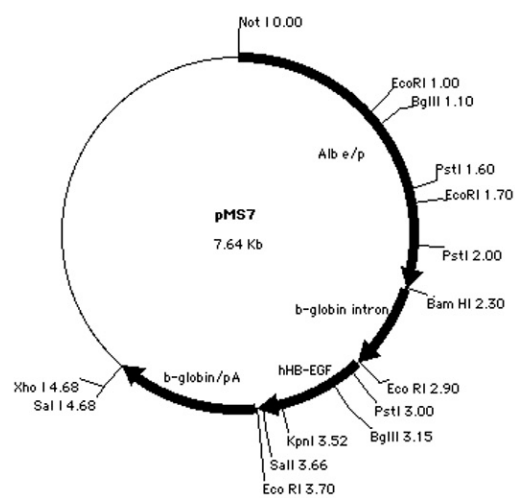
A



B



C



D

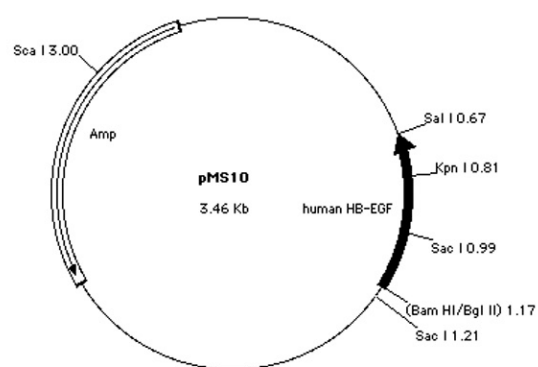


図 1-4 プラスミドマップ

使用したプラスミド。詳細は材料と方法の項を参照。

## 結果

### I. TRECK 法による肝炎モデルマウスの作製

#### 培養細胞

マウス肝細胞由来 BNL CL.2 に pMS1(図 1-4A)を導入して 6 つの stable line を得た。これら 6 つのクローンの培地中に、final 0,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ , 1, 10 $\mu$ g/ml となるようにジフテリア毒素を加え、蛋白質合成の抑制効果を検討した。図 1-5 で示すように、野生型細胞にジフテリア毒素を 10 $\mu$ g/ml 加えてもタンパク質合成率が 70% までしか減少しなかったことに比べ、ヒト HB-EGF 遺伝子を発現しているクローンではその 1/100 から 1/10000 以下の低濃度のジフテリア毒素で同等のタンパク質合成阻害効果が見られた。これら 6 クローンのタンパク質合成阻害の程度の差は、Northern 解析の結果、発現量の差であると考えられた(斉藤美知子修士論文参照)。

#### トランスジェニックマウス

肝細胞特異的に発現するアルブミンエンハンサー/プロモーターの下流にヒト HB-EGF(ジフテリア毒素受容体)遺伝子を接続したトランスジーンを作製し(図 1-6)、ICR x ICR マウスより得られた受精卵に導入した。生まれてきた 78 匹のマウスに対し PCR 解析を行ったところ、6 匹のファウンダーマウスが得られた(Tg16, Tg18, Tg24, Tg51, Tg62, Tg67)。これらのマウスに野生型 ICR を交配させ、F1 マウスを得て実験に使用した。

得られたトランスジェニックマウスが肝臓特異的にヒト HB-EGF を発現しているかどうか確認するため、Tg16 と 24 の肝臓、腎臓、脾臓、筋、心臓および肺の Northern 解析を行った。その結果ヒト HB-EGF は肝臓特異的に発現しており、他の組織での発現は見られなかった(図 1-7A, Tg24 については data not shown)。さらにヒト HB-EGF の発現が肝細胞特異的であるかどうか確認するため、Tg16 の肝臓の切片を作製し、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、ヒト HB-EGF は肝実質細胞のみで発現が認められ、他の非実質細胞での発現は見られなかった(図 1-8)。

次にそれぞれの系統間での発現量を Northern 解析により調べた。各ラインで発現量は異なり、本実験で毒素投与を行った Tg16, 24, 67 のラインについては Tg16>Tg24>Tg67 の順に発現量が高かった(図 1-7B)。



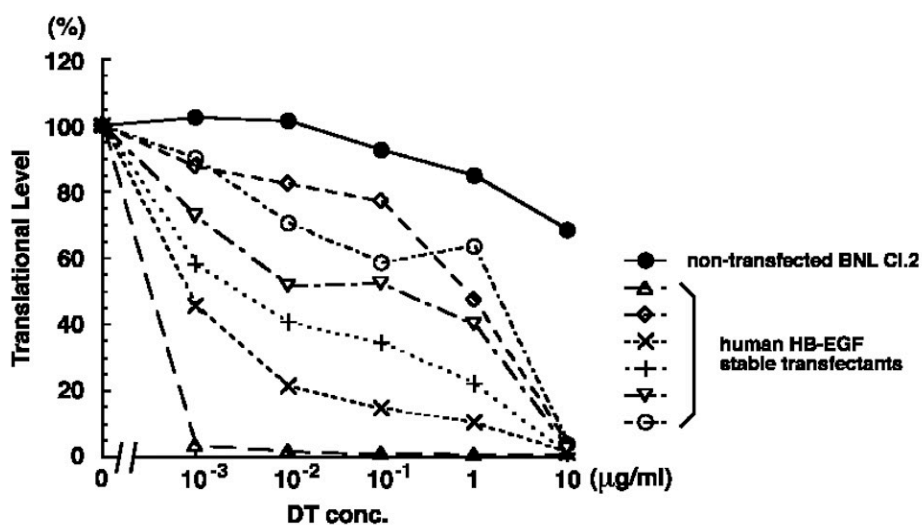


図 1-5 培養細胞での毒素感受性

マウス肝細胞由来 BNL CL.2 にヒト HB-EGF cDNA を導入、発現させ、得られた 6 クローンのジフテリア毒素に対する感受性を調べた。<sup>[35S]</sup>ラベル化メチオニンを 1 時間取り込ませ、放射活性を測定した。横軸はジフテリア毒素を培地中に加えたときの終濃度を示した(μg/ml)。縦軸はジフテリア毒素無添加時の蛋白合成量を 100% として、蛋白合成の程度を示した。

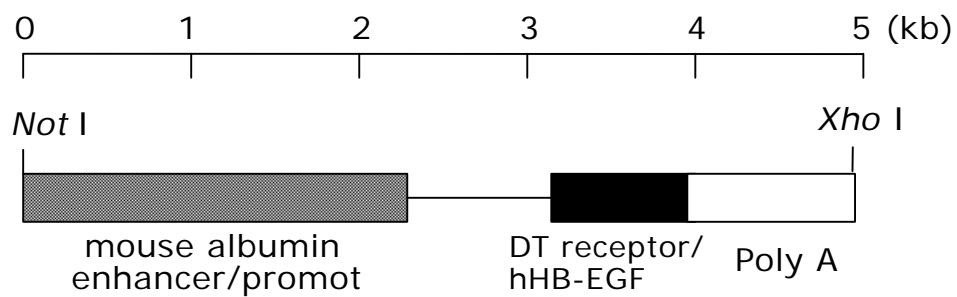


図 1-6 トランスジーン

マウスアルブミンエンハンサー・プロモーターの下流に毒素レセプター/ヒト HB-EGF cDNA(hHB-EGF)を接続した。プロモーターと cDNA の間にはβ-globin のイントロンを挿入した。さらに HB-EGF cDNA の下流にはβ-globin の polyA 部分を接続した。ベクターより、*Not* I / *Xho* I 消化によって切り出し、トランスジーンとして用いた。

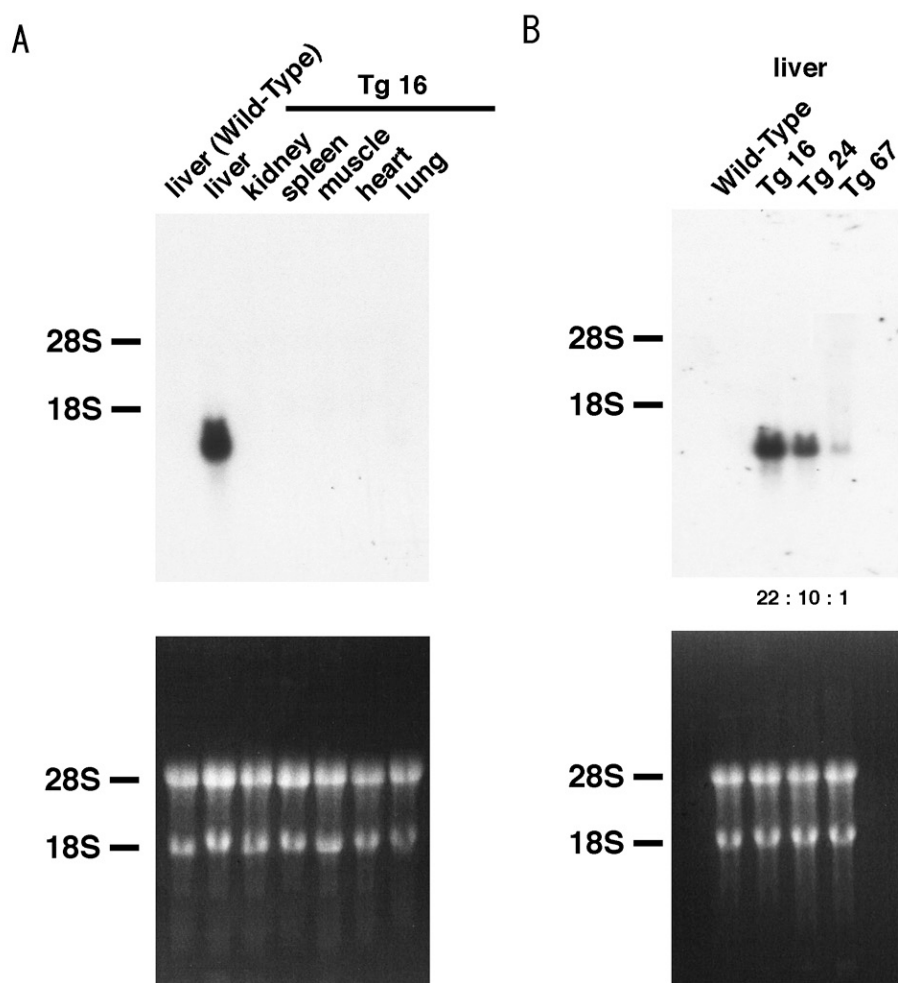


図 1-7 Northern 解析

A. トランスジェニックマウス (Tg16) の肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、心臓、および肺の Northern 解析。下段には各レーンに total RNA を等量 (15 g) 泳動したことを示すためのエチジウムブロマイドでの染色像。肝臓特異的にヒト HB-EGF を発現していた。プローブはヒト HB-EGF cDNA (783b) を用いた。

B. トランスジェニックマウス (Tg16, 24, 67) 各ラインでの肝臓の Northern 解析。各ラインでヒト HB-EGF の発現量が異なっていた。発現量の比は 22 : 10 : 1 であった。

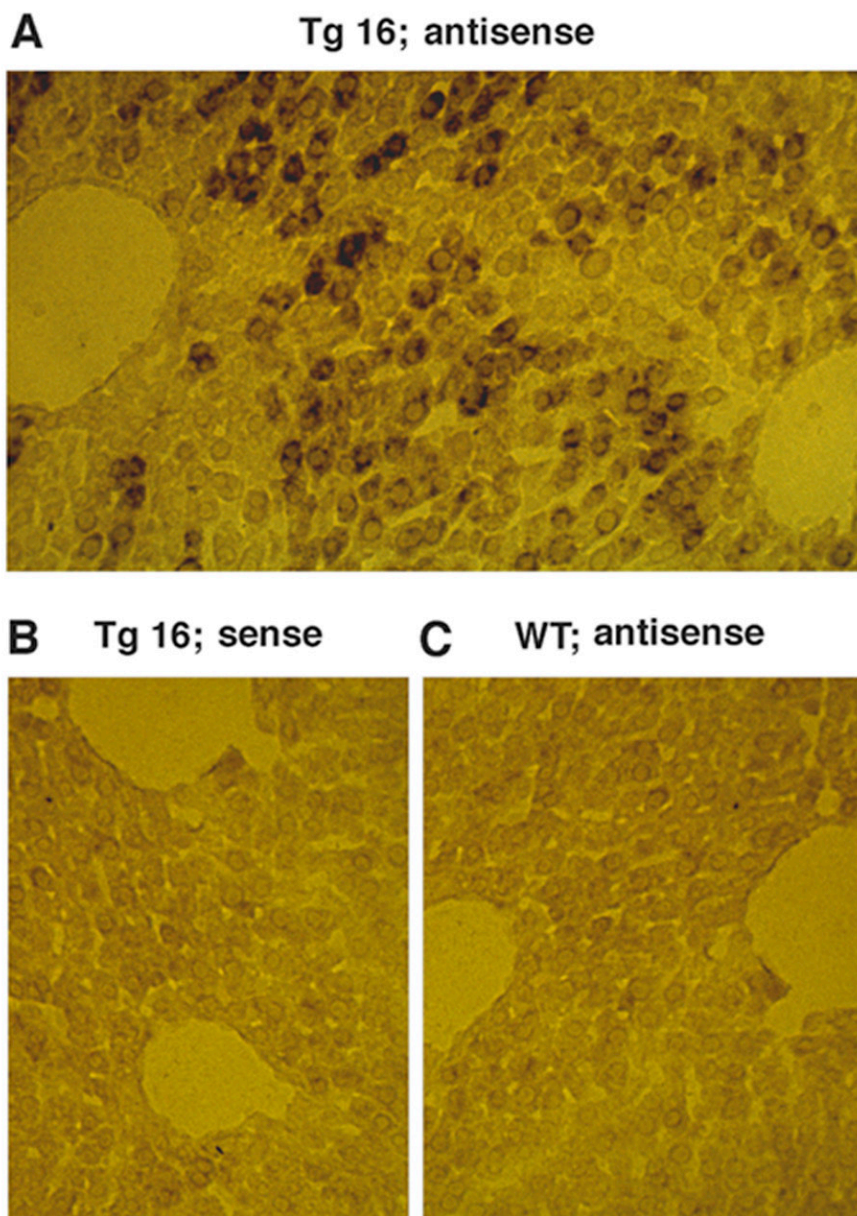


図 1-8 in situ ハイブリダイゼーションによる解析  
 トランスジェニックマウス (Tg16) (A, C) および野生型マウス (B) の  
 肝臓の切片 (7 $\mu$ m)。切片は固定してから、DIG ラベルしたヒト HB-EGF  
 antisense probe (A, C)、sense probe (B) を用いてハイブリダイゼ  
 ーションを行った。A でのみ肝実質細胞特異的に発現が認められた。

## 毒素投与

実際にこれらのトランスジェニックマウスに毒素を投与し、肝細胞への影響を血清中の GOT, GPT 濃度を測定することによって調べた。野生型マウスに体重 kg あたり 500 $\mu$ g(以下 500 $\mu$ g/kg DT と表記)の毒素を投与すると、非特異的な毒素の取り込みによりマウスは死亡するが、その 1/10 の濃度では影響がない(Pappenheimer et al., 1982)。この野生型に影響のない毒素濃度、50 $\mu$ g/kg を最大濃度とし、5 $\mu$ g/kg DT, 500ng/kg DT, 50ng/kg DT, 5ng/kg DT の毒素を筋肉内投与し、12 時間ごとに採血、血清中の GOT, GPT 値を測定した(図 1-9)。各濃度の毒素投与は 3 匹ずつ行い、その平均値をグラフに示した。野生型マウスへ 50 $\mu$ g/kg DT 投与した場合では、血清中 GOT, GPT 値は正常であった。Tg16 のラインでは 500ng/kg DT 投与により、約 12 時間後に血清中 GOT, GPT 値が上昇し始め、約 60 時間後に死亡した。50ng/kg DT 投与では約 50 時間後に血清中 GOT, GPT 値が上昇し始め、72 時間でピークに達し、その後 120 時間前後で正常値に回復した。そのピークは GOT 値で正常値の 4 倍、GPT 値で正常値の 10 倍であった。5ng/kg DT 投与では正常値のままであった(図 1-9A, B)。Tg24 のラインにおいても、500ng/kg DT 投与により約 12 時間後に血清中 GOT, GPT 濃度が上昇し始め、約 55 時間で死亡した。50ng/kg DT 投与では約 50 時間後に血清中 GOT, GPT 値が上昇し始め、84 時間でピークに達し、120 時間前後で正常値に回復した。また、そのピークは GOT 値で正常値の 3 倍、GPT 値で正常値の 5 倍であった。5ng/kg DT 投与では正常値を示していた(図 1-9C, D)。Tg67 のラインにおいては、500ng/kg DT 投与により約 24 時間後に血清中 GOT, GPT 濃度が上昇し始めるが、60 時間でピークに達した後、120 時間後には正常値に回復した。そのピークは GOT 値で正常値の 7 倍、GPT 値で正常値の 20 倍であった。50ng/kg, 5ng/kg DT 投与では正常値のままであった(図 1-9E, F)。さらに 50, 5 $\mu$ g/kg DT 投与ではここで調べた 3 系統とも約 12 時間後に血清中 GOT, GPT 濃度が上昇し始め、約 30 - 50 時間で死亡した(data not shown)。

毒素投与による肝臓とそれ以外の組織への影響を調べるため、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色により肝臓、腎臓、脾臓、心臓および肺の組織学的観察を行った。検体には、500ng/kg DT 投与後 35 時間で死亡した Tg16 と 50 $\mu$ g/kg DT 投与後 35 時間の野生型マウスを用いた。野生型マウスの肝組織は正常な組織像を示していたが、Tg16 では広範囲での肝細胞の破壊が観察され、肝臓を構成している他の細胞には異常が認められなかった(図 1-10)。また、この Tg16 と野生型マウスの腎臓、脾臓、心臓および肺は正常な組織像を示していた(data not shown)。

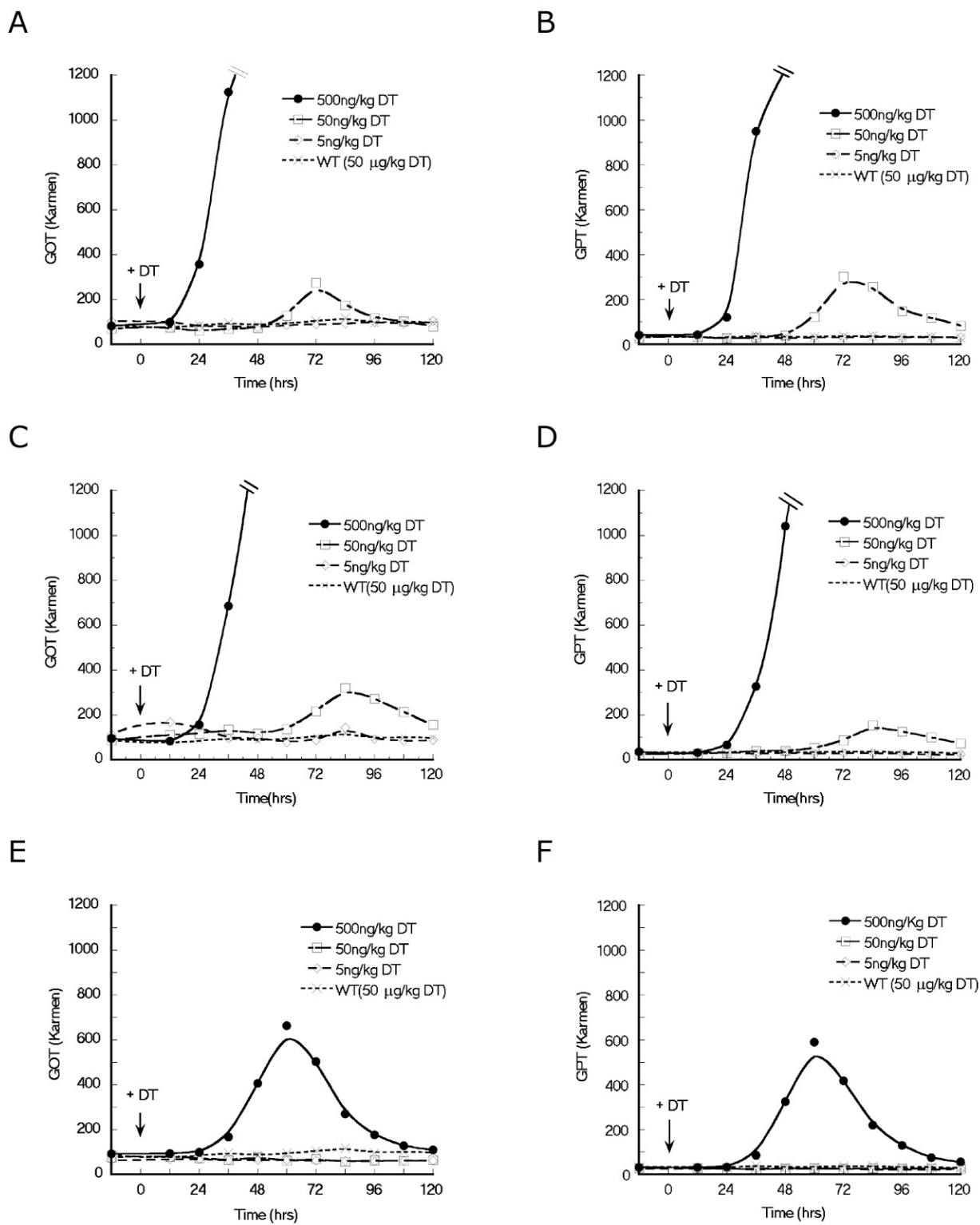
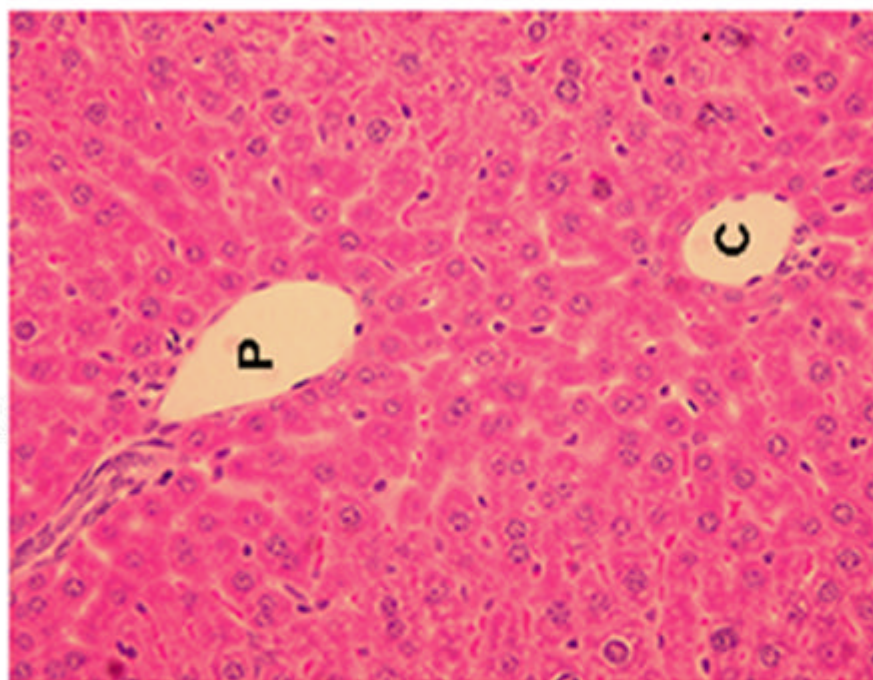


図 1-9 血清中 GOT/GPT 測定

毒素投与を 0 時間として、12 時間ごとの血清中 GOT、GPT の値の変化。Tg16(A, B)、Tg24(C, D)、Tg67(D, F)。それぞれのライン 3 匹ずつ測定し、その平均値で示した。



**A** Wild-Type; 50  $\mu$ g/kg DT



**B** Tg 16; 500ng/kg DT

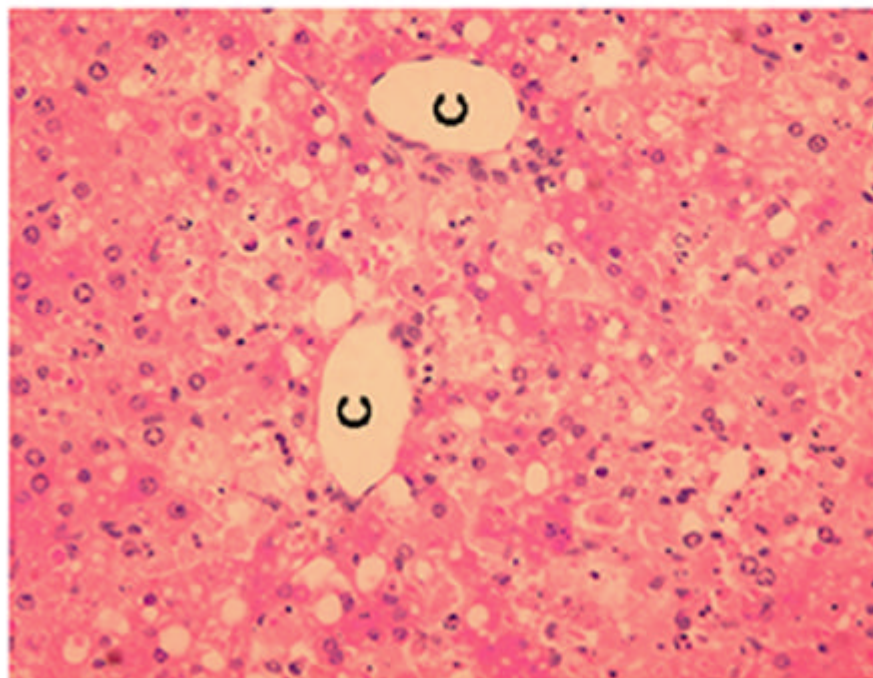


図 1-10 HE 染色

50 g/kg DT 投与を行った野生型マウス (A) と 500ng/kg DT 投与を行った Tg16 (B) の肝組織の HE 染色。野生型マウスは正常な組織像を示していたが、Tg16 では広範囲での肝細胞の壊死、脂肪の蓄積が認められた。  
C は中心静脈、P は周辺静脈を示す。

## 血中毒素濃度

毒素投与後の血中毒素濃度がどの程度残存活性を示すのかどうか、血清によるタンパク質合成阻害によって測定した。野生型マウスに 50 $\mu$ g/kg DT を筋肉内投与し、投与後 1,2,4,7,24 時間後に採血を行い、血清を回収した。これをジフテリア毒素に対し高い感受性を示す vero 細胞の培地中に 1/100 量加え、既知の濃度の毒素を投与したときのタンパク質合成(<sup>35</sup>S-システイン、<sup>35</sup>S-メチオニンの取り込み)阻害の ED<sub>50</sub> を比較した。血清中のジフテリア毒素濃度は毒素投与後 2-4 時間でピーク(1 $\mu$ g/ml)に達し、24 時間後には 100ng/ml であった(data not shown, 当研究室岩脇隆夫修士論文参照)。

## 毒素投与方法による肝臓への影響の違い

ここまでで述べた毒素投与は麻酔した上で背筋に注射したが、この投与方法を麻酔なしで行える腹腔内注射や尾部からの静脈注射に変更した場合、肝細胞への影響がどのように変化するのか、各投与方法での血清中 GOT 濃度の変化を測定した。トランスジェニックマウス 2 匹に PBS を、トランスジェニックマウス 3 匹、野生型マウス(ICR)2 匹に 200ng/kg DT 投与を、筋肉注射、腹腔内注射、尾静脈注射により行い、投与前と投与後 5 日間 24 時間おきに採血し、血清中 GOT 濃度の測定を行った。筋肉注射の場合は、4 日目にピークが現れたが、図 1-5 で示したほどに値は上昇せず 50ng/kg DT 投与と同程度の 100(Karmen)にとどまった(図 1-11C)。腹腔内投与では 2,3 日目にピークが現れ、5 日目には野生型と同様の値まで戻った(図 1-11B)。尾静脈投与でも 2,3 日目に血清中の GOT 濃度はピークとなり、5 日目には正常値まで回復した(図 1-11A)。腹腔内投与と尾静脈投与で見られた GOT 値のピークは筋肉内投与では見られなかった高い値であった。トランスジェニックマウスに PBS を投与した場合や同腹子のノントランスジェニックマウスに毒素を投与した場合には、ほとんど GOT 値の上昇は見られなかった。

## II. 肝炎モデルマウスを用いた肝細胞移植

### 近郊系での肝炎モデルマウス作製

ここで作った肝炎モデルマウスを利用し、肝臓に障害を与えるモデルマウスとしての利用価値を考え、肝臓への細胞移植が可能であるかどうか確認することにした。前述した肝炎モデルマウスはクローズドコロニーである ICR を用いて作製したため、移植に用いることができるように近郊系である C57BL/6J の系統でマウスを作製しなおした。トランスジーンは前述と同じものを用いた。8 匹のファ



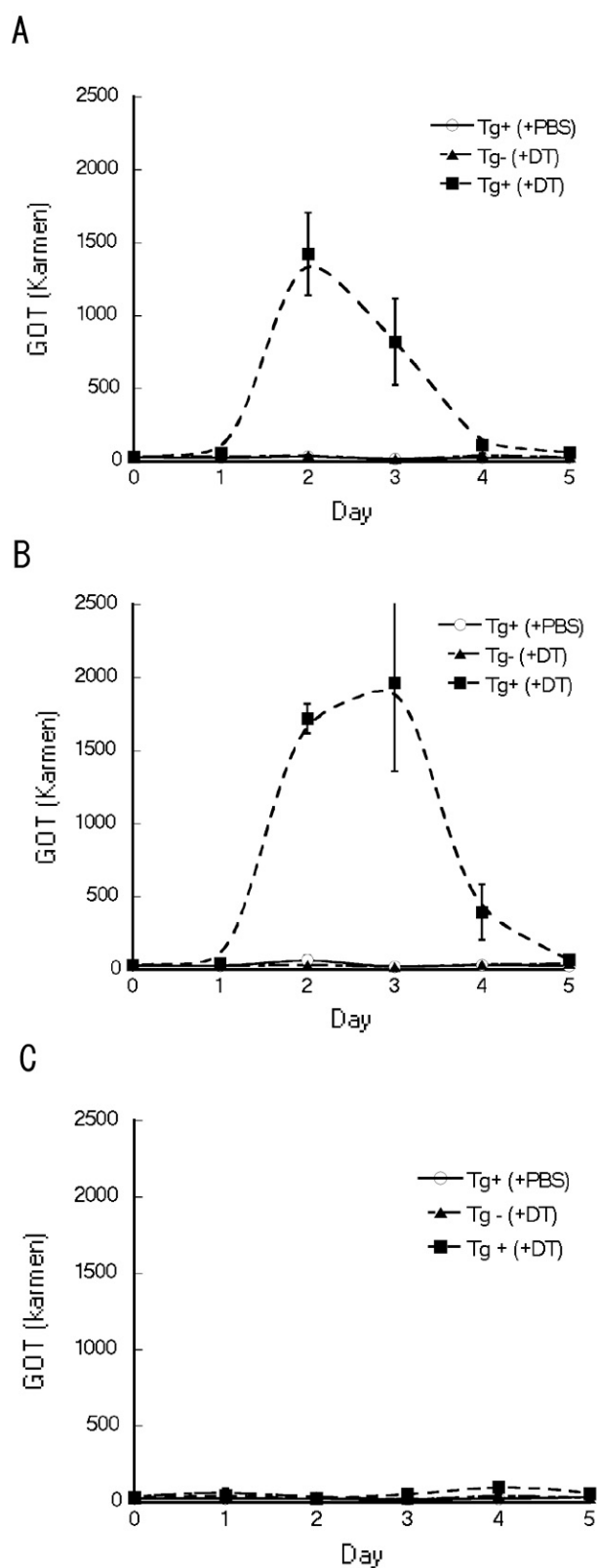


図 1-11 投与法の差による GOT 濃度の違い

トランスジェニックマウス Tg16 に 200ng/kg DT 投与を、尾静脈注射 (A)、腹腔内注射 (B)、筋肉注射 (C) によって行った。24 時間おきに採血を行い血清中の GOT 濃度を測定した。

ウンダーマウスを得、このうち 2 ラインを解析に用いた(6M2, 7M4)。Northern 解析の結果、両ラインとも肝臓でのみ特異的にヒト HB-EGF を発現していることが確認でき、その発現量の比は 1.25 : 1 であった(data not shown)。

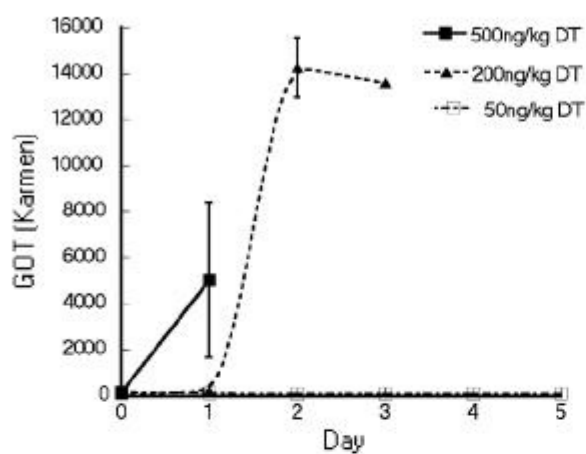
### ジフテリア毒素単回投与

次にこの 2 ラインのマウスに毒素投与を行った。前述したように、腹腔内投与が簡便で効果が高いことがわかったので、投与はすべて腹腔内投与で行い、それぞれの毒素濃度につきトランスジェニックマウス 3 匹ずつ調べた。野生型に関しては 50 $\mu$ g/kg DT 投与を行い同様に GOT, GPT 値を調べたが、測定した 5 日の間変化はなかった(data not shown)。6M2 のラインでは 500ng/kg DT 投与では、24 時間目で急激に GOT, GPT 値が上昇し、3 匹とも 48 時間以内に死亡した。200ng/kg DT 投与では 2 日目にピークが現れ、4 日目までには 3 匹とも死亡した。50ng/kg DT 投与では GOT, GPT 値とも上がらなかった(図 1-12 A, B)。7M4 のラインでは 500ng/kg DT 投与により、24 時間目から GOT, GPT 濃度が上昇し始め、2 日目でピークに達し、1 匹は死亡、他の 2 匹については 3 日目には値は下がってきたが 4 日目までには全匹死亡した。200ng/kg DT 投与では 2 日目から値が上がり始め、500ng/kg DT 投与のときよりも 1 日遅く 3 日目にピークとなり、5 日目までには正常値まで戻った(図 1-12 C, D)。

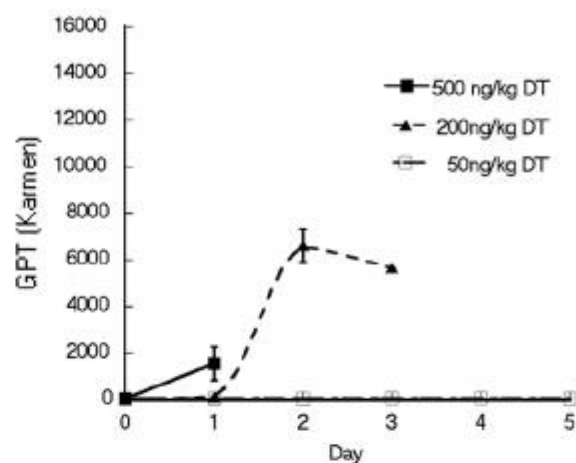
### 肝細胞移植

GFP マウス(京都大学より供与)より、肝実質細胞をコラゲナーゼ灌流法により単離、精製した。トランスジェニックマウスより採血した後麻酔をかけ、精製した肝実質細胞を  $2 \times 10^6$  個/匹(200 $\mu$ l)、脾臓より移植した(図 1-13, 14 参照)。毒素単回投与の結果を考慮して、移植後、6M2 のラインには 50ng/kg DT を、7M4 のラインには 200ng/kg DT を投与した。コントロール手術用のマウス(sham operation)は、同様に採血、麻酔をした後、脾臓より肝実質細胞の代わりに等量(200 $\mu$ l)の培地(DMEM)を注入し、毒素を投与した。このマウスより 3 日ごとに体重測定、採血を行い、体重の激減や毛並みの悪さなどが目立たない場合には採血の翌日に再度毒素を投与することとした。体重が毒素投与後 2~3 日の間で 10%程度以上減った場合には毒素投与は行わず、体重が回復してから再び毒素投与を開始した。毒素投与しても体調に変化が現れなかった場合には、毒素の濃度を(6M2 ラインの場合に 50ng/kg, 100ng/kg, 200ng/kg)順に上げていくこととした。6M2 ラインに肝細胞を移植後、5 日目に 50ng/kg DT 投与(2 回目)、9 日目に 100ng/kg DT 投与、13 日目に 200ng/kg DT 投与、17 日目に 400ng/kg DT を投与し、20 日目に麻酔をかけて開腹した。移植した細胞は GFP 陽性細胞であるため、細胞が置き換わってい

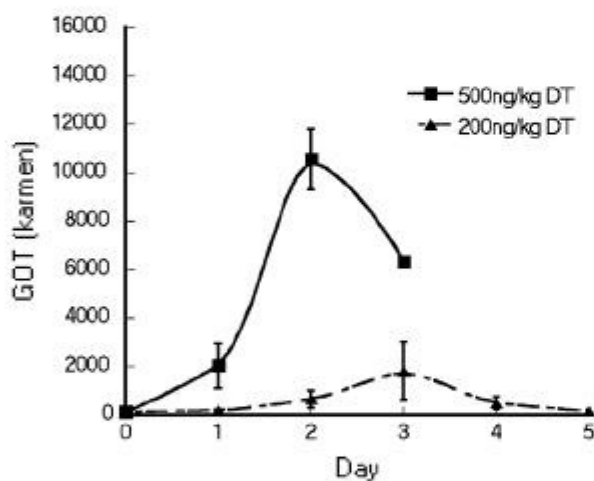
A



B



C



D

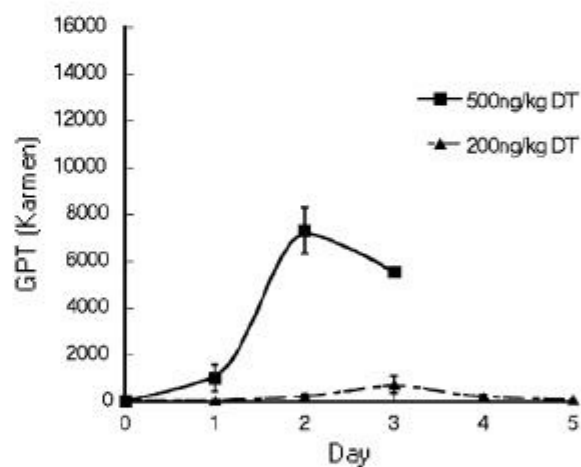


図 1-12 毒素単回投与による GOT, GPT 値の変化

トランスジェニックマウス 6M2 と 7M4 のラインに 200ng/kg DT の投与を行い、12 時間ごとに採血を行い、血清中の GOT, GPT 測定を行った。

A, B ; 6M2 の GOT, GPT 濃度。C, D ; 7M4 の GOT, GPT 濃度。



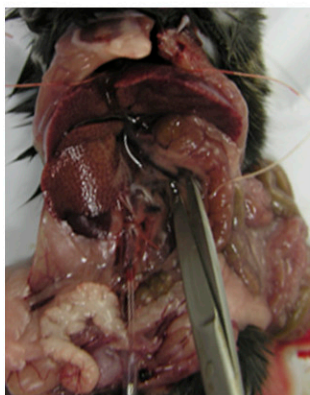
1. 下大静脈の下に糸を通す



2. 留置針を下大静脈に刺し  
糸で固定する



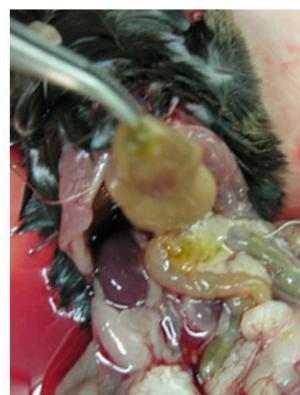
3. 横隔膜を開き横隔膜上  
で下大静脈を結紮する



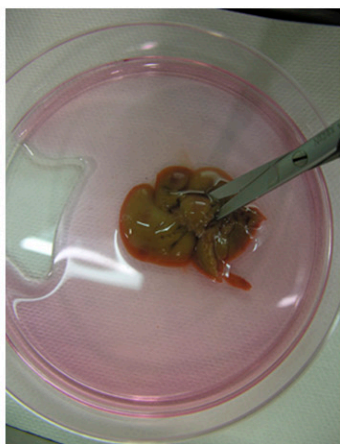
4. 灌流を開始し、直ちに  
膨張した門脈を切る



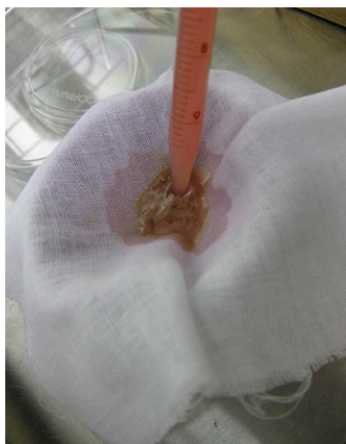
5. 脱血され肝臓の色が  
変わる



6. コラゲナーゼで灌流後  
肝臓を取り出す



7. dish 内ではさみで mince  
する



8. ガーゼで濾す



9. さらに 100μm の目の篩で  
濾す

図 1-13 肝臓のコラゲナーゼによる灌流法  
詳細は方法の項を参照。

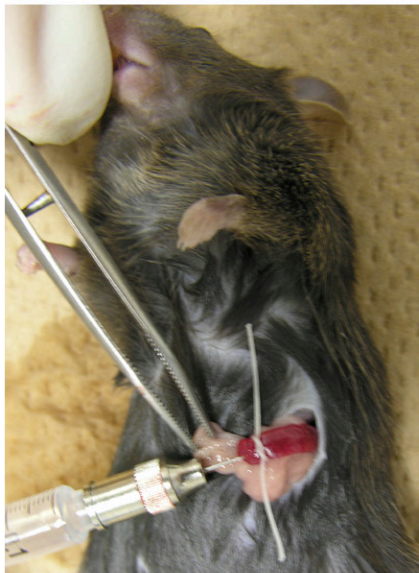




1. マウスを麻酔し、腹部右側を少量切開する



2. 脾臓を取り出し、先端を糸で軽く結ぶ



3. 脾臓先端から、皮膜を破らないように針を刺し、抜きながら細胞を注入する



4. 針の穴を糸で縛って止血し、腹腔内に脾臓を戻して縫合する

図 1-14 脾臓からの経門脈移植

細胞の移植方法。詳細は方法の項を参照。

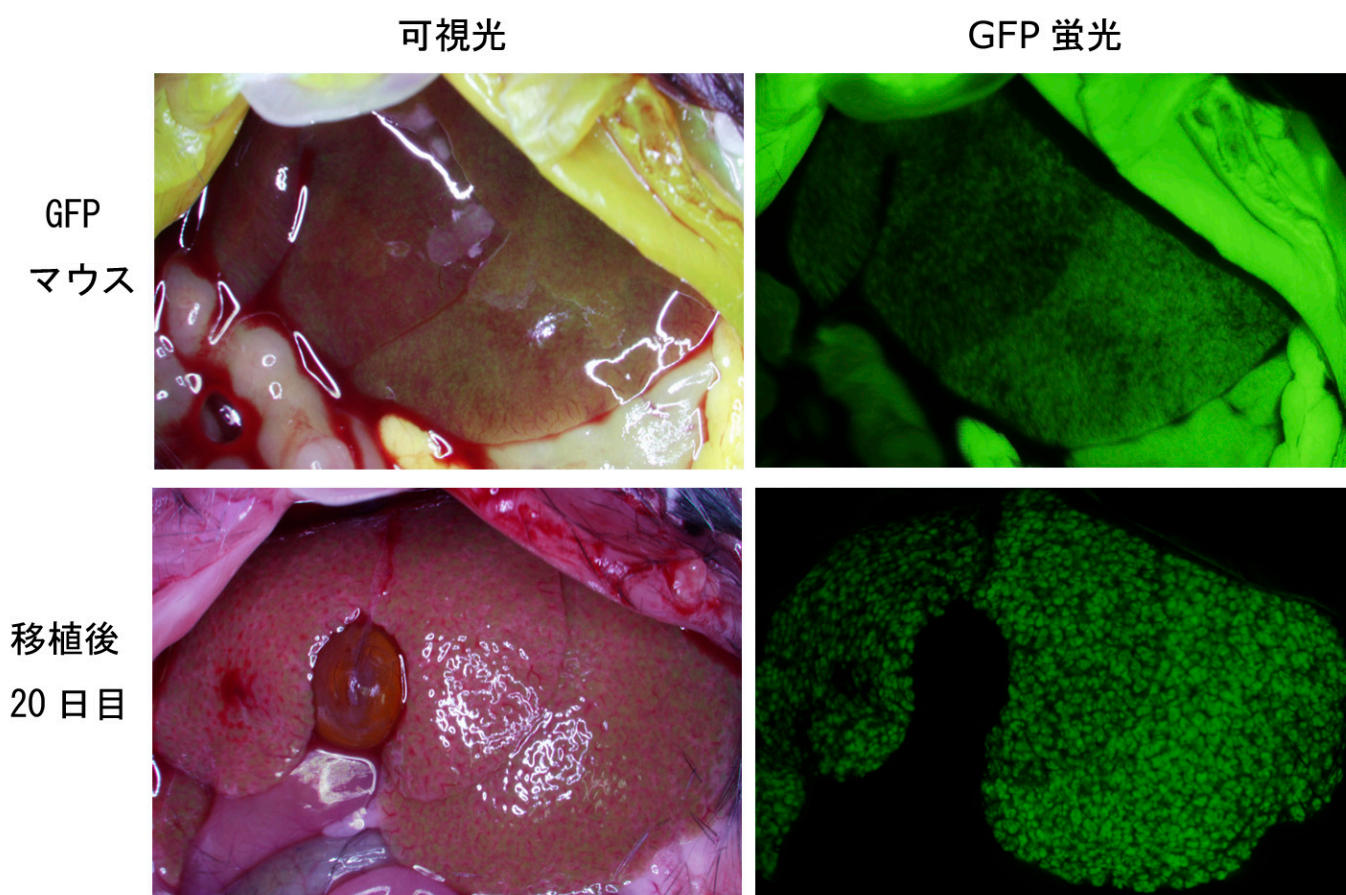


図 1-15 肝細胞移植後 20 日目の蛍光観察像

ドナーに用いた GFP マウス肝臓の GFP 蛍光（上段）と GFP マウスより分離精製した肝細胞を移植し、移植後 20 日目のトランスジェニックマウス（6M2）の肝臓の GFP 蛍光（下段）。

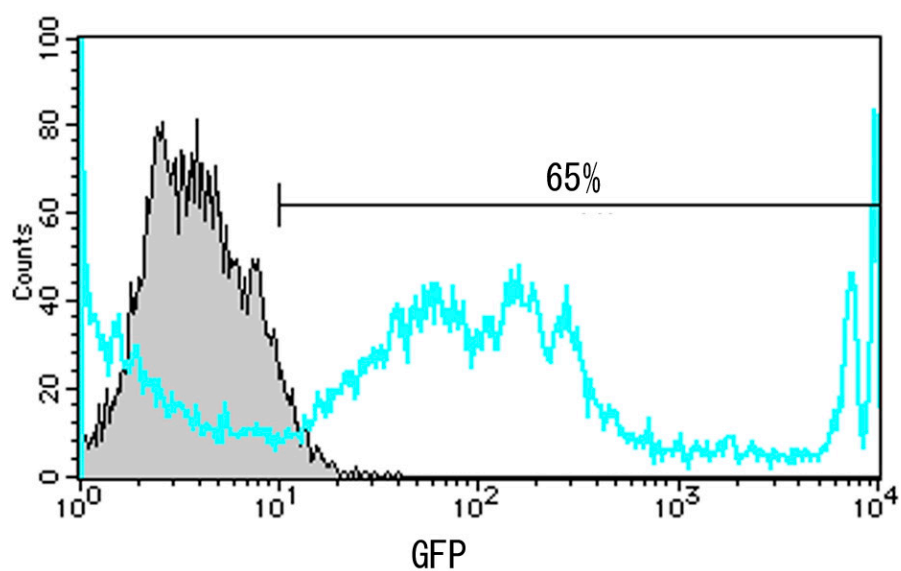
ば蛍光が観察されるはずである。実体顕微鏡で GFP マウスからの肝実質細胞を移植したマウスの肝臓の蛍光を観察したところ、図 1-15 のように肝臓全体で GFP 蛍光が観察された。このマウスより、肝細胞をコラゲナーゼ灌流によって分離し、フローサイトメーターによりその GFP 陽性細胞の割合を測定したところ、明らかに GFP 陽性となっている肝細胞が、全体の約 7 割を占めていることがわかった(図 1-16)。

GOT, GPT 濃度は、毒素投与後(移植後)3 日目から徐々に上昇し始め、毒素濃度を上げるごとにさらに値は高くなっていったが、16 日目をピークに下がり始めた(図 1-17)。Sham operation したマウスは 6 日目と 19 日目に死亡した。

#### 毒素連続投与による未発現細胞の増加

毒素の連続投与を行っていると、肝細胞を移植していないマウスでも GOT, GPT の値が一度少ないながらも上昇し、あるときから下がってくるマウスが観察された。このマウスが本当にヒト HB-EGF 遺伝子を持っていて、発現しているのかを確認するため、尻尾から抽出した DNA を用いて Southern 解析を、肝臓から RNA を抽出して Northern 解析を行った。毒素投与をしていない 6M2 のラインでは、Southern 解析でヒト HB-EGF cDNA が検出でき、Northern 解析によって肝臓にヒト HB-EGF の発現が認められた。しかし、毒素を連続投与し続けたマウスは(3 日おきに 50, 50, 100, 200, 500ng, 1, 2 $\mu$ g/kg DT 投与後、2 週間あけて 10 $\mu$ g/kg DT を投与)、ヒト HB-EGF cDNA がゲノム中に組み込まれているのが確認できるのに対し(図 1-18A)、肝臓での発現が確認できなくなっていた(図 1-18B)。

A



B

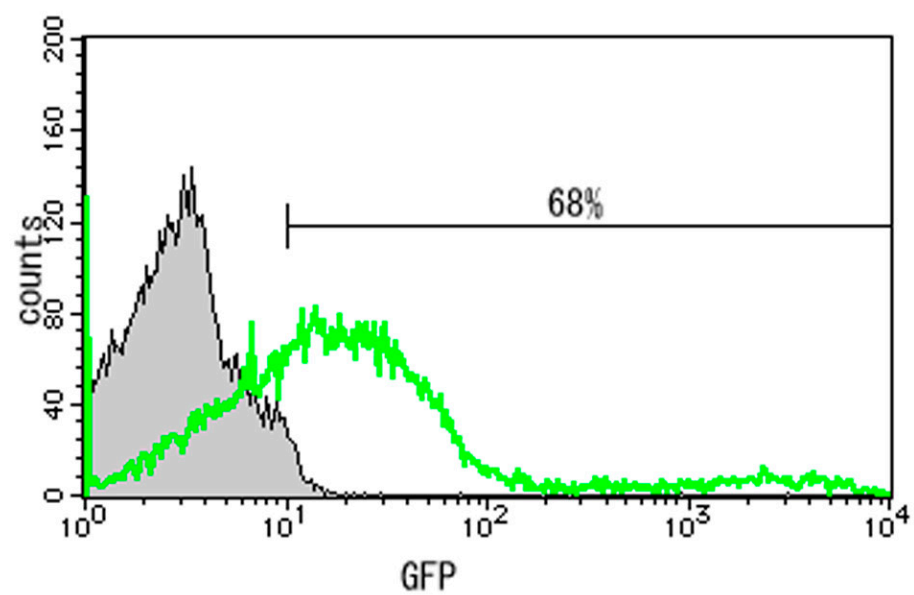


図 1-16 フローサイトメーターによる GFP 陽性細胞の解析  
 グレーは野生型マウス。A は（青）は GFP マウスより単離精製した肝細胞。  
 B（緑）は GFP マウスより単離精製した肝細胞を移植して 20 日目の肝細胞。  
 移植後、約 7 割の肝細胞が GFP 陽性細胞に置き換わっていた。



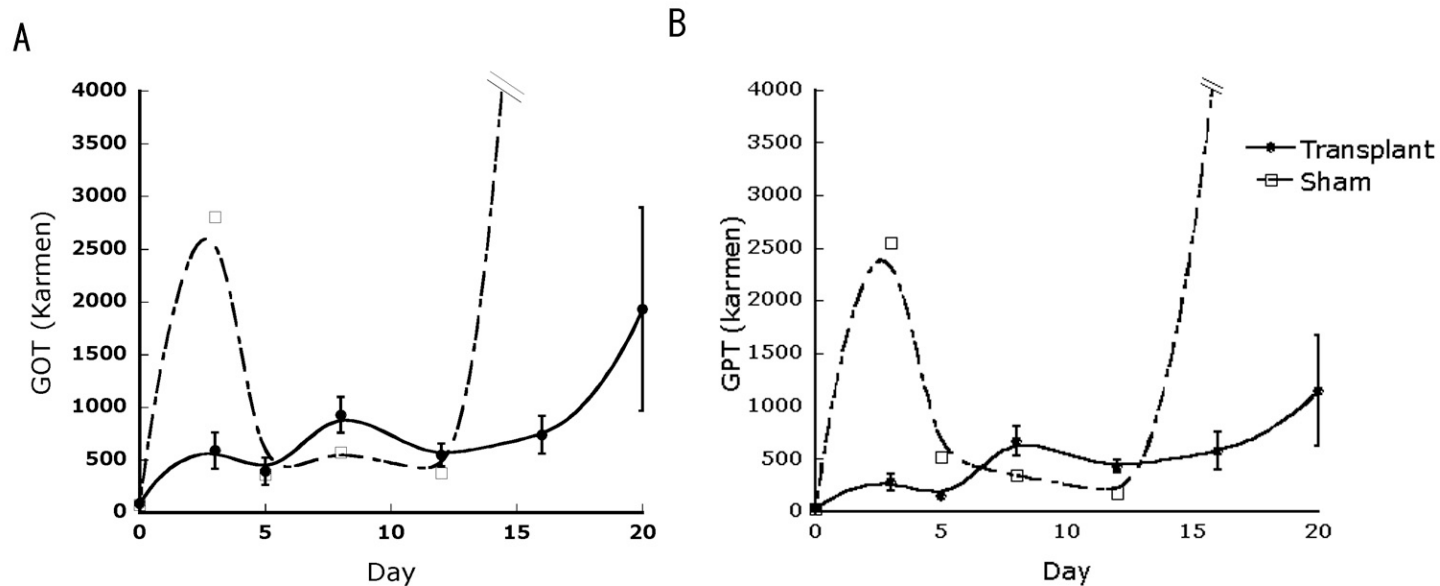


図 1-17 肝細胞移植後の GOT, GPT の変化

移植後の GOT, GPT 値。Day0 で移植、同時に毒素を 50ng/kg DT 投与した。移植後、Day5 に 50、Day9 に 100ng/kg DT 投与、Day13 に 200、Day17 に 400ng/kg DT を投与し、20 日目に麻酔をかけて開腹した。エラーバーは標準誤差。(Transplant n=4, sham n=2)

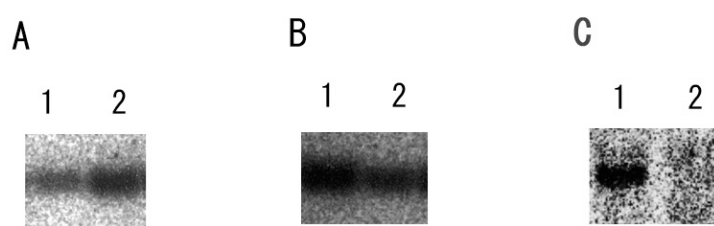


図 1-18 毒素投与後のヒト HB-EGF の発現

無処理のトランスジェニックマウス (lane 1) と毒素を 2 ヶ月にわたって連続投与し続け、細胞移植しなくても GOT/GPT 濃度が低下してきたマウス (lane 2) の tail DNA (A) と肝臓 DNA (B) の Southern 解析と同個体の肝臓の Northern 解析 (C)。どちらもプローブはヒト HB-EGF。

## 考察

外科的除去(レーザーによる破壊も含む)による組織や細胞欠失マウスは現在までにさまざまな面から検討されている。ある特定の細胞の生体内での役割を知るために、毒素を特定の細胞で発現させ、その細胞を破壊して機能を解析する方法もある。しかし、これらの手法では外科的に除去不可能な散在する組織の場合や、発生過程に必須の遺伝子の場合には解析が困難である。ある特定の細胞のみを任意の時期に破壊し、生体内における細胞や遺伝子の機能を知ることは、いまだ解明されていない疾患の研究や治療法の開発に役立つと考えられる。本論文では、任意の時期の毒素投与で特定の細胞を破壊できる時期特異的細胞ノックアウト法を考案し、実際に肝炎モデルマウスを作製してその有用性を確かめた。

マウスはジフテリア毒素に非感受性であり、高濃度の毒素(50 $\mu$ g/kg DT)投与でも個体に影響はない。そこで組織特異的なプロモーター支配下で毒素レセプターであるヒト HB-EGF を発現するトランスジェニックマウスを作製し、調べたい任意の時期にジフテリア毒素を投与することによって毒素レセプターを発現した細胞を特異的に破壊する方法を考案した。

この手法が実際に可能であるのかどうか確認するため、本実験では細胞破壊が簡単に血清中の GOT, GPT 濃度により測定でき、組織学的解析によっても容易に観察できる肝細胞に着目した。肝細胞特異的に発現することがわかっているアルブミンエンハンサー/プロモーターの下流に毒素レセプターであるヒト HB-EGF を接続した遺伝子を導入してトランスジェニックマウスを作製し、毒素投与を行ってその影響を観察した。

まず、マウスを作製する前に培養細胞にヒト HB-EGF 遺伝子を発現させ、培地中に毒素を加えてその影響をタンパク質合成阻害の程度を測定することで観察を行った。アルブミンエンハンサー/プロモーター部分を用いて、ヒト HB-EGF 遺伝子を発現したマウス肝臓由来 BNL CL.2 のジフテリア毒素感受性は、野生型 BNL CL.2 と比べ顕著に亢進することが明らかとなった。本実験で得られた 6 つの transfectant はジフテリア毒素に対する感受性に差異を認めたが、そのうちの 2 クローンを選びヒト HB-EGF 遺伝子の発現量を比較したところ、発現量の高いクロンのほうが毒素感受性がより高かった。したがって transfectant の感受性のばらつきは、導入したヒト HB-EGF 遺伝子の発現量に起因すると推測され、発現量が高いほどジフテリア毒素に対する感受性が高くなると考えられた。培養細胞レベルでは、毒素受容体であるヒト HB-EGF を発現させることにより、毒素に対する感受性が  $10^3 - 10^5$  倍以上高くなっていることが示された。

引き続き、マウス個体内で、実際にこの手法が利用可能であるかどうか調べる

ためトランスジェニックマウスの作製を行った。系の確立を目的としたため、排卵数が多く、卵が丈夫であるクローズドコロニーの ICR を用いることとし、受精卵へのヒト HB-EGF 遺伝子導入により 6 ラインのファウンダーマウスを得た。これらのうち、F1 に遺伝子が順調に伝わったものは 5 ラインであり、Northern 解析によりヒト HB-EGF の発現が確認できたのは 4 ラインであった。この 4 ラインのうち発現量の差による毒素の影響をよりわかりやすく確認できる 3 ラインを選び、その後の実験に用いることとした。この 3 ライン(Tg16, 24, 67)の発現量の比は 22:10:1 であった(図 1-7)。導入したヒト HB-EGF は Northern 解析、In situ ハイブリダイゼーション、ヒト HB-EGF を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学の解析(木曾博士らの未発表データ)により、肝細胞特異的に発現していることが確認された。肝臓では正常な場合には HB-EGF は発現していないが、部分的に肝切除を行うと実質細胞で HB-EGF mRNA の発現が増えることが報告されており(Kiso et al., 1995)、これは肝再生において HB-EGF が重要な役割を担っていることが推察される。しかし本実験において作製したトランスジェニックマウスは、形態学的、機能的、組織学的に異常は認められず、体重あたりの肝重量も野生型と変わらなかった。実際にマウス個体に毒素投与を行い、その影響を血清中 GOT, GPT 濃度、組織学的解析により調べたところ、肝細胞が特異的に破壊されていることが観察され、他の臓器には影響がなかった。このことより、マウス個体内でもヒト HB-EGF を発現したトランスジェニックマウスに毒素投与を行うことにより、その細胞を特異的に破壊できることが確認された。毒素受容体であるヒト HB-EGF は、それ単独で発現させても細胞や個体に影響を及ぼすことがなく、毒素投与によって任意の毒素受容体発現細胞を破壊することが可能である。毒素投与は出生後任意の時期に行うことが可能であるので、この方法は細胞特異的、時期特異的に細胞をノックアウトできる有効な手段である。

さらに、この細胞へのダメージは発現量に依存していることが観察された。今回肝細胞特異的に毒素受容体を発現させ、3 種類の発現量の異なるトランスジェニックマウスへの毒素投与を行ったが、発現量の高い Tg16、24 のラインでは 500ng/kg DT 投与でマウスは肝細胞に大きなダメージを受け死亡するが、発現量の少ない Tg67 のラインでは死亡には至らなかった。その 1/10 量である 50ng/kg DT 投与では、発現量の高いマウスラインでも肝細胞を一部破壊し一過的に血清中 GOT, GPT 値が上昇するが、後に回復した。したがって、この方法により作製されたトランスジェニックマウスの毒素投与による細胞破壊は、毒素受容体であるヒト HB-EGF の発現量と、その投与量に依存して破壊の程度を調節することが可能であると考えられる。

毒素投与方法の違いによる肝臓への影響の差を調べるため、それぞれの投与方

法でトランスジェニックマウス 3 匹を用いたが、3 匹とも筋肉内投与では血清中 GOT 値が 50ng/kgDT 投与と同程度までしかあがらなかった。このことから筋肉内投与では高濃度のジフテリア毒素でないと、効果が出にくいということも考えられた。この筋肉内投与で GOT,GPT 値が上がらなかったマウスに筋肉内投与したのと同量(200ng/kg DT)の毒素を腹腔内投与もしくは尾静脈投与したところ、どちらの投与方法でも GOT 値は高い値に上昇したため、やはり筋肉内投与は濃度によって効果に差がやすい、もしくは ICR での結果を考えると個体差が出やすいとも考えられる。腹腔内投与と尾静脈投与ではトランスジェニックマウス 3 匹とも高い値の GOT 値を示し、毒素が効率よく効果を示していることがわかった。したがって、投与方法としては筋肉内投与よりも麻酔なしで行える腹腔内投与や尾静脈投与のほうが、毒素の効果をよりよく反映していると考えられた。また、尾静脈投与では麻酔は行わないがマウスを固定する必要性があり、多少の熟練が必要であるので、片手でマウスを保持したまま投与が簡便に行える腹腔内投与が今後さまざまな人に使用できる方法と考え、毒素投与方法は腹腔内投与で統一することとした。

細胞特異的破壊法としては、他にもいくつか報告されている方法がある。ヘルペスウィルス由来のチミジンキナーゼを細胞特異的に発現させると、遺伝子の発現自体によっては細胞を破壊することはなく、任意の時期に FIAU のような核酸類似体を投与することにより標的細胞にダメージを与えることができる(Borrelli et al., 1988, Heyman et al., 1989)。しかしこの場合、標的細胞は増殖している細胞でなければならない。また、チミジンキナーゼが精巣に発現してしまうため、精子細胞が死んでしまい、メスのトランスジェニックマウスからしか子孫が得られないという難点がある(al-Shawi et al.,1991)。

増殖細胞だけでなく、任意の時期に細胞を破壊する方法として Immunotoxin-mediated conditional targeting(IMCT)法がある ( Kobayashi et al., 1996, Watanabe et al., 1998, Kaneko et al., 2000 )。ヒト型 IL-2 レセプターをある細胞特異的プロモーター支配下で発現させ、緑膿菌外毒素 A の PE40 部分に IL-2 レセプターに対する抗体をつなげた anti Tac(Fv)-PE40 (Immunotoxin)を用いることにより、IL-2 レセプターを発現した特定の細胞を破壊することに成功している。しかし、この方法で細胞を破壊するために必要な Immunotoxin の濃度と野生型マウスに影響のある濃度は 10~50 倍程度の幅しかない。したがって適量の毒素濃度を慎重に選択しなければならない。

今回開発したジフテリア毒素受容体を介した細胞ノックアウト法では、特異的に毒素受容体を発現させることができれば、標的細胞は増殖細胞にとどまらず、

どんな細胞でも利用可能である。また、受容体自体を発現させてもマウス個体に大きな影響はなく、生殖も野生型と同様に行える。毒素は毒素受容体との結合能が非常に高く、毒素受容体を発現させたトランスジェニックマウスでは、野生型マウスでは影響のない最大毒素量(50 $\mu$ g/kg DT)の 1/100-1/1000(500ng/kg-50ng/kg DT)の投与量で肝障害を引き起こすことが可能である。したがってマウス個体に余計なダメージを与えることなく、ある程度の毒素濃度の幅を持って投与、細胞破壊を行うことができる。この毒素のレセプターとの結合能の高さを利用すれば、発現量の少ないプロモーターを用いる場合に、毒素量を増加させても他の細胞、臓器に影響を与えることなく特異的に細胞破壊を起こすことができると考えられる。

TRECK 法の特徴は、移植した野生型マウス由来の外来細胞(以下ドナー細胞)は毒素耐性を示すが、TRECK 法によるトランスジェニックマウス由来の細胞(以下レシピエント細胞)は毒素に感受性を示し、毒素投与により容易にドナー細胞とレシピエント細胞を区別できることにある。野生型マウスより細胞を分離して移植した場合、その細胞が生着、増殖すれば毒素投与を重ねることによって細胞を置き換えていくことができる。実際にこの手法を用いて作製した肝炎モデルマウスに、肝実質細胞を移植し毒素投与を続けてレシピエント細胞のみを破壊していったところ、肝細胞は約7割がドナー細胞と置き換わった。現在肝臓への移植再生実験は多く行われているが、ドナー細胞を移植生着させるためにはレシピエント側の組織にある程度ダメージが加わっている必要があることがわかっている。したがって、肝臓に細胞を移植するときには肝臓にダメージを与えた肝炎モデルマウスが必要となるわけであるが、現在はこのとき使用するモデルマウスは肝切除もしくは四塩化炭素による肝細胞の破壊、その両方を組み合わせたものが利用されている。しかし、この方法では肝臓へのダメージの程度が一定しないといわれており、さらに外来の細胞を移植しても内在の細胞と区別して内在の細胞のみを破壊していくことはできない。TRECK 法は手術も必要とせず、他の臓器にも影響を与えず、レシピエント細胞のみを毒素の腹腔内投与により破壊することが可能である。さらに、毒素濃度依存的に細胞破壊の程度をコントロールすることができるので、生着するまでは程度の低いダメージを、生着したところに毒素濃度を上げ、レシピエント細胞をさらに破壊していくことが可能となる。この方法は細胞移植にも有効にそして簡便に用いることができ、今後の再生移植実験のよいモデルマウスになると期待できる。

しかしながら、この手法にもいくつか考慮しなければならない点がある。

HB-EGF は EGF 受容体に結合する EGF ファミリーに属する増殖因子で (Higashiyama et al., 1991)、膜結合型のタンパク質として合成された後、プロテアーゼにより細胞外領域が切断され分泌型となり血液中に遊離する。分泌型ヒト HB-EGF にはジフテリア毒素との結合部位が存在するが、分泌されると毒素が結合しても細胞内に取り込まれないため、ジフテリア毒素受容体としての活性はない。目的の細胞へ発現させた膜結合型ヒト HB-EGF が切断されてしまうと、ヒト HB-EGF のジフテリア毒素受容体としての活性が失われることや、血液中に遊離した分泌型ヒト HB-EGF がジフテリア毒素との結合において競合することにより、目的の細胞を破壊できなくなる可能性が考えられる。また増殖因子として機能するヒト HB-EGF をある特定の細胞に特異的に異所発現させることにより、組織や個体に異常を生じる可能性も考えられる。これまで HB-EGF が心肥大に関与するという報告があるように (Asakura et al., 2002)、この手法を用いてモデル疾患マウスを作製する場合は、ヒト HB-EGF の増殖因子としての活性が問題となる可能性が考えられる。そこでこれらの問題点を克服するために、膜結合型から分泌型への切断が起こらず、かつジフテリア毒素受容体活性を保持しつつ増殖因子活性を失った変異型ヒト HB-EGF (改良型ジフテリア毒素受容体) の作製を考慮する必要があると考え、当研究室において現在実験を進めている (当研究室古川智久修士論文参照)。

さらに、考えられる問題点として抗体の産生がある。標的にする細胞や疾患の種類によっては毒素の長期的な投与が必要になってくる場合が考えられるが、ジフテリア毒素はマウスにとっては異種蛋白であるため、毒素を連続投与すると体内に抗体が産生され、投与を続けていくとその抗体によって投与した毒素が中和されてしまう可能性が考えられる。この場合、長期の組織破壊ができなくなってしまう可能性がある。実際に野生型マウスに 50 $\mu$ g/kg の毒素を 3 日おきに投与し続けていくと、約 2 週間で抗体ができてくることがわかった。5 $\mu$ g/kg DT 投与でも 5 匹中 3 匹のマウスに 2 週間で抗体が産生された。この毒素抗体を産生したマウスに再び毒素を投与し、12 時間後の血清中毒素残存活性を調べたところ、明らかに投与した毒素が体内の抗体に中和され活性を失っていることが確認された (当研究室木村泰子修士論文参照)。例えば、実際に免疫系の細胞の機能解析に TRECK 法を利用した場合は、4 $\mu$ g/kg DT の毒素を投与しており (Jung et al., 2002)、この濃度で連続投与を行う必要があるとすると抗体が産生する可能性がある。また、骨芽細胞に毒素受容体を発現させ、骨粗しょう症のモデルマウスを作製することも可能であると考え当研究室で取り組んでいるが、この場合毒素を投与し一過的に障害を与えることは可能であるが、骨芽細胞は徐々に新しく骨髄細胞から分化してくるため、長期的に毒素を投与し続ける必要性が考えられる。さらに骨

表面ではなく骨内部を標的にした場合には毒素が骨内部まで届きにくく、かなりの高濃度での毒素投与が必要になるかもしれない。これらのことより、連続毒素投与をしても抗体を産生しない免疫寛容マウス作製の必要性があると考えられた。そこで体内で無毒化した毒素を産生させ、ジフテリア毒素を自己蛋白質として認識する毒素免疫寛容マウスを現在作製中である。

今回毒素の連続投与により、遺伝子が導入されているにもかかわらず、ヒト HB-EGF が発現していないマウスができた。Brinster らの作製した Albumin-Plasminogen activator トランスジェニックマウスへの細胞移植でも同様の結果を得ている (Sandgren et al., 1991, Rhim et al., 1994)。しかし、このようなヘテロマウスをレシピエントとしたドナー細胞の移植は、置き換わる細胞の率が 1% 以下のものから 92% のものまでさまざまなパターンが出てくるが、これをレシピエントにホモマウスを利用するとすべてのマウスにおいて、90-100% のドナー細胞に置き換わる (Rhim et al., 1995)。したがって、この TRECK マウスも現在はヘテロマウスで解析を続けているが、これをホモ化して移植用のレシピエントとして用いれば、毒素投与によってヒト HB-EGF が発現しなくなる細胞が減ると考え、現在 6M2 と 7M4 のラインについてホモマウスを作製中である。現在のところ、ホモマウスが死亡、不妊、不稔などになることもなく、毒素投与によってもヘテロマウスと同程度の効果を示すという結果を得ている。

さらに、この手法が脳内で使用可能かどうかにも検討の余地がある。先に述べたように、ジフテリア毒素は 58kDa の蛋白質である。この毒素を血中に投与したときに、血液脳関門を潜り抜け、脳内に侵入するかどうかはいまだ疑問の余地がある。しかし、この手法が脳内の細胞にも有効であれば、ますます利用価値が高まることが予想される。実際に脳内の特定の細胞群に毒素受容体を発現させ、毒素投与を行うことにより特定の細胞が破壊されるかどうかを確認し、毒素が血液脳関門を通過できるのかどうか、検討していきたいと考えている。

今後、この手法がより改良され、さまざまな組織、細胞の機能解析に用いられて未知の領域が少しでも解明されていくことを期待する。



## 第 2 章

### TRECK 法を用いた新たな糖尿病モデルマウスの作製

## 序論

疾患モデル動物は疾患の研究や治療法の開発などにはなくてはならない存在であり、現在種々の疾患に対するモデルマウスが自然発症、遺伝子工学を用いたトランスジェニックマウス、ノックアウトマウスなどにより、数多く作り出されている。

糖尿病は日本でも患者数 690 万人、糖尿病予備群を合わせると 1370 万人にも上る国民病とも呼ばれる疾患である。糖尿病は慢性の高血糖を呈し、さまざまな合併症を引き起こす。1 型糖尿病はインシュリン分泌細胞であるすい臓細胞の破壊性病変でインシュリンの欠乏が生じることによって起こる、インシュリン依存性、否肥満、若年性での発症を呈する糖尿病である。2 型糖尿病はインシュリン分泌低下とインシュリン感受性組織におけるインシュリン抵抗性の二者がさまざまな割合で混在して発症する。インシュリン非依存的であり、肥満を伴い、後年に発症するいわゆる成人病と呼ばれるタイプである。これら糖尿病の治療の研究にはモデル動物が不可欠であり、さまざまなノックアウト動物も作製されている。しかしながら現在存在するモデルマウスとしては 2 型糖尿病のモデルマウスがほとんどであり、ノックアウトマウスでは産まれたときからすでに病因が確定されており、その症状、発症時期はコントロールすることができない。1 型糖尿病のモデルマウスとしては nonobese マウス (NOD) が有名であるが、このマウスは自然発症モデルマウスであり、その発症率は生後 30 週齢までの累計でメス 70 ~ 80%、オス 20 ~ 30% と明らかな性差が見られ、その発症はコントロールできず、同時期に大量の同様の症状を呈する個体群を得るのは難しい。薬剤によって

細胞に炎症を起こさせて糖尿病を誘発する方法としてはストレプトゾトシン (STZ) やアロキサンのようなものが主に用いられているが、STZ による誘発は 100% ではなく、投与してからの血糖値上昇の時期も一定ではない。STZ を単回大量投与、または少量頻回投与などその量や回数を変えてモデルマウス作製が行われているが、その量的なコントロールで同様の程度の症状を呈すマウスを大量に得ることは難しいとされている。また STZ は非常に不安定であるため、溶液を調製してから 15 分以内に投与することが必須である。さらに STZ やアロキサンは、他の臓器に副作用を及ぼすことが知られており、これは各組織のダメージが高血糖によるのであるのか薬剤による影響なのか判断しにくいいため、その病態がランゲルハンス島のための破壊による影響を示しているとは言い難い (Mathews et al., 2002)。

近年我々は第 1 章で述べたように、ジフテリア毒素受容体を細胞特異的に発現させ、ここに毒素投与することによって標的細胞を特異的に破壊する Toxin receptor-mediated cell knockout 法 (TRECK 法) を開発した (Saito et al., 2001)。

TRECK 法を用いて作製したマウスは、任意の時期に適量の毒素を投与することにより、その疾患の発症時期や程度をコントロールすることが可能である。

今回この TRECK 法を用いて、新たな糖尿病モデルマウスを作製することを試みた。ヒト Insulin プロモーターの下流に毒素受容体(ヒト HB-EGF)を接続し、すい臓ランゲルハンス島の細胞特異的に毒素受容体を発現させた。このマウスに毒素を投与することにより、任意の時期に症状をコントロールできる糖尿病を誘発できるか、現在あるモデルマウスとの違いも含めて検討した。

## 材料と方法

### ジフテリア毒素とマウス

ジフテリア毒素はジフテリア菌 (PW8 株) の培養上清より精製したものをを用いた (Ishii-Kanei et al., 1979, Saito et al., 2001, 本研究室岩脇隆夫修士論文参照)。マウスはすべて日本クレアから購入したものをを用い、本学動物実験施設の指針に従い飼育し、飽食状態のまま実験に使用した。

### トランスジェニックマウスの作製

human Insulin promoter (Hotta et al., 1998) の下流 (*Eco* RI site) に pRcHBEGF (Iwamoto et al., 1994) より *Hin* dIII-*Not* I で切り出したヒト HB-EGF を DNA Blunting Kit (TaKaRa) を用い平滑末端にして挿入し、pIns-TR1 とした。pIns-TR1 より *Sph* I-*Xho* I で 3.8kb の断片を切り出し、QIAquick gel extraction kit (Qiagen) を用いて精製し、トランスジーンとして用いた (図 2-1A)。

C57BL/6J x C57BL/6J から得られた受精卵にこのトランスジーンを導入し、レシピエントマウス (ICR) の卵管に移植しトランスジェニックマウスを得た。トランスジェニックマウスの同定は promoter とヒト HB-EGF をはさむ primer (Ins-F001 ; 5'-tgccgtgtctccagatcactgtg-3', HBEGF-30R ; 5'-ttcagcaccaccgacggcagca-3') を用いた PCR 解析にて行った。

### Immunohistochemistry

マウスをペントバルビタールにて麻酔し、4% Paraformaldehyde を用いて灌流固定した。組織を取り出し、同じ固定液を用いて一晩後固定した後、30% sucrose に置換した。O.C.T.コンパウンド中で凍結後、クライオスタットにて 8 $\mu$ m の切片を作製した。PBS でコンパウンドを洗い流した後、PBST / NGS (or HS) (PBS / 0.2% Tween 20 / 5% Normal goat serum (or horse serum)) にて 30 分 blocking を行い、一次抗体 (Goat anti-HB-EGF (GT, 1000 倍希釈), Rabbit anti-Glucagon (Dako, 100 倍希釈), Guinea Pig anti-Insulin (DAKO, 200 倍希釈)) を用いて室温で 2 時間反応を行った。PBST / NGS で 3 回洗い、二次抗体 (Jackson) で室温 1 時間反応させた。二重染色の場合は洗浄後、同様に次の 1 次抗体、2 次抗体を反応させた。PBS で洗浄した後、VECTASheild with DAPI (Vector) を用いて封入、蛍光顕微鏡 (Axiophoto (Zeiss) もしくは Apotome (Zeiss)) にて観察を行った。

HE 染色と、可視光による免疫染色は株式会社エスアールエルに委託した。

### 血(清)中グルコース濃度、インシュリン濃度の測定

尾静脈を剃刀でカットし、グルコカードダイアメーター（アークレイ）を用いて血中グルコース濃度を測定した。もしくは、尻尾あるいは眼窩より採血を行い、5000rpm, 5 分, 4℃にて遠心し血清を得、この血清を用いて、グルコース CII-テストワコー（ムタロターゼ・GOD 法）(和光純薬)にて血清中グルコース濃度の測定を行った。血清中インシュリン濃度は、インシュリン測定キット(MORINAGA)を用いて測定した。

### インシュリン負荷試験

インシュリン（ヒューマリン R 注 U-100）（日本イーライリリー株式会社）溶液を 2U/kg になるように腹腔内投与し、投与直前（0）、30、100 分で採血を行い、血中グルコース濃度を測定した。

### ランゲルハンス島の分離精製

マウスをペントバルビタールで麻酔し、開腹、横隔膜を切開し胸腔内で動脈を切り脱血した。肝臓下にある総胆管を露出させ、十二指腸側にある胆管の先端（Vater 乳頭）を止血かんしで固定し、総胆管より 15% コラゲナーゼ P (Roche)/HBSS(0.8% NaCl, 5mM KCl, 0.17mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% Glucose, 1.2mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8mM MgSO<sub>4</sub>, 7.5mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.01% Phenol red)を 3ml 注入した(図 2-11 参照)。膵臓を十二指腸、大腸、胃、脾臓より剥離し摘出、20 分間 37℃で保温した後、HBSS (+10% NCS(Newborn Calf Serum, Gibco 16010))を 20ml 加え 250g, 4℃にて 2 分遠心した。沈殿に 20ml HBSS を加え懸濁し、250g, 4℃にて 2 分遠心した。この操作を 3 回繰り返した後の沈殿に HBSS を 15ml 加え懸濁し、茶漉しでこした。さらに 250g, 4℃にて 2 分遠心、この沈殿を 10ml の Histopaque-1077 (Sigma) にて懸濁し、10ml の HBSS(-NCS)を重層した。1700g, 4℃にて 20 分間遠心、中間層に位置するランゲルハンス島を回収、HBSS(+10% NCS)を 40ml 加えて 250g, 4℃にて 2 分遠心、沈殿を 30ml の HBSS で懸濁し 250g, 4℃にて 2 分遠心した。この操作を 3 回繰り返し、上清を除去、沈殿を 2-3ml の HBSS (+10% NCS)に懸濁して dish にとり実体顕微鏡下でランゲルハンス島のみをピペットで拾い、RPMI (Sigma)に移して移植に用いた。

### 腎臓皮膜下へのランゲルハンス島の移植

RPMI ごと 50PI チューブにランゲルハンス島を吸い込み、チューブを半分に折って 15ml ファルコンチューブに入れ、2,000 回転で 5 分間遠心した。チューブを取り出し、片側をハミルトンシリンジにつなげ、逆側のランゲルハンス島部分よ

り先を切り落とした。

マウスをペントバルビタールにて麻酔し、背側より切開、左腎臓を露出させた。23G 針にて皮膜を少量切開し、ガラスキャピラリーを用いて、皮膜下に隙間を作り、この隙間にランゲルハンス島の入ったチューブを差し込み静かに注入した。ランゲルハンス島が漏れでないように注意しながらチューブを引き抜き、腎臓を腹腔内に戻して縫合した(Hori et al., 2002, 図 2-12A 参照)。

#### 腎臓摘出

マウスをペントバルビタールにて麻酔し、移植時と同様左腎臓を露出させた。腎臓に伸びている血管を糸で結紮し、その先端側で腎臓を摘出し、縫合した(図 2-12B 参照)。

## 結果

### トランスジェニックマウスの作製

PCR 解析の結果、5 匹 3 匹のトランスジェニックマウスを得た。このうち、F1 以降に遺伝子が伝わりライン化できたのは 2 ラインのみであった。これら 2 ラインのヒト HB-EGF の発現を確認するため、Northern 解析を行ったところ、どの組織でもヒト HB-EGF の発現は認められなかった(data not shown)。すい臓は RNase が多く産生されているため、RNA がとりにくく、またすい臓内のランゲルハンス島のみで発現があったとしても、全体量としては少ないために Northern 解析では検出できなかったと考え、ヒト HB-EGF の抗体を用いてすい臓の組織染色を行った。細胞での特異的発現を確認するため、抗インシュリン抗体との二重染色を行ったところ、1 ラインのみ(6F6) が、インシュリン陽性細胞でヒト HB-EGF を共発現していることが確認された(図 2-1B)。

抗グルカゴン抗体と抗インシュリン抗体を用いて染色を行ったところ、ランゲルハンス島全体にインシュリン陽性細胞が、その周辺にグルカゴン陽性細胞が分布している野生型マウスに比べ、トランスジェニックマウスではグルカゴン陽性細胞がランゲルハンス島に点在している像が観察された(図 2-2)。HE 染色では差は認められなかった。

### 毒素投与による糖尿病誘発

以下の実験はこの 6F6 のラインを使用することとし、次に毒素投与を行った。野生型マウスは 500 $\mu$ g/kg で受容体非依存的な毒素の取り込みにより死亡するが、その 1/10 の濃度である 50 $\mu$ g/kg の毒素投与ではほとんど影響がない。この野生型マウスで影響のない 50 $\mu$ g/kg の毒素を、得られたトランスジェニックマウスに腹腔内投与した。投与は午前 11 時に行い、投与直前に眼窩より採血、以後毎日 11 時から 13 時の間に採血を行った。採血した血液から血清を回収し、そのグルコース濃度とインシュリン濃度を測定した。血中グルコース濃度は毒素投与後翌日から上昇し始め、3 日目には 550mg/dl を超えた(図 2-3A)。マウスは多尿になり、尿糖値も上昇し、毛並みも悪くなった。血清中インシュリン濃度は 7 日目には 200 pg / ml 以下まで低下した(図 2-3B)。野生型マウスでは血糖値も外見上の変化も認められなかった。7 日目にこれらのマウスのすい臓を固定し、切片を作製して抗グルカゴン抗体( $\alpha$ 細胞を特異的に染色)、抗インシュリン抗体( $\beta$ 細胞を特異的に染色)で染色を行った。野生型に 50 $\mu$ g/kg DT 投与したマウスでは投与前後で変化はなかったが、トランスジェニックマウスではインシュリン陽性細胞はほとんど観察されず、グルカゴン陽性細胞がランゲルハンス島全体に確認された(図 2-4A)。

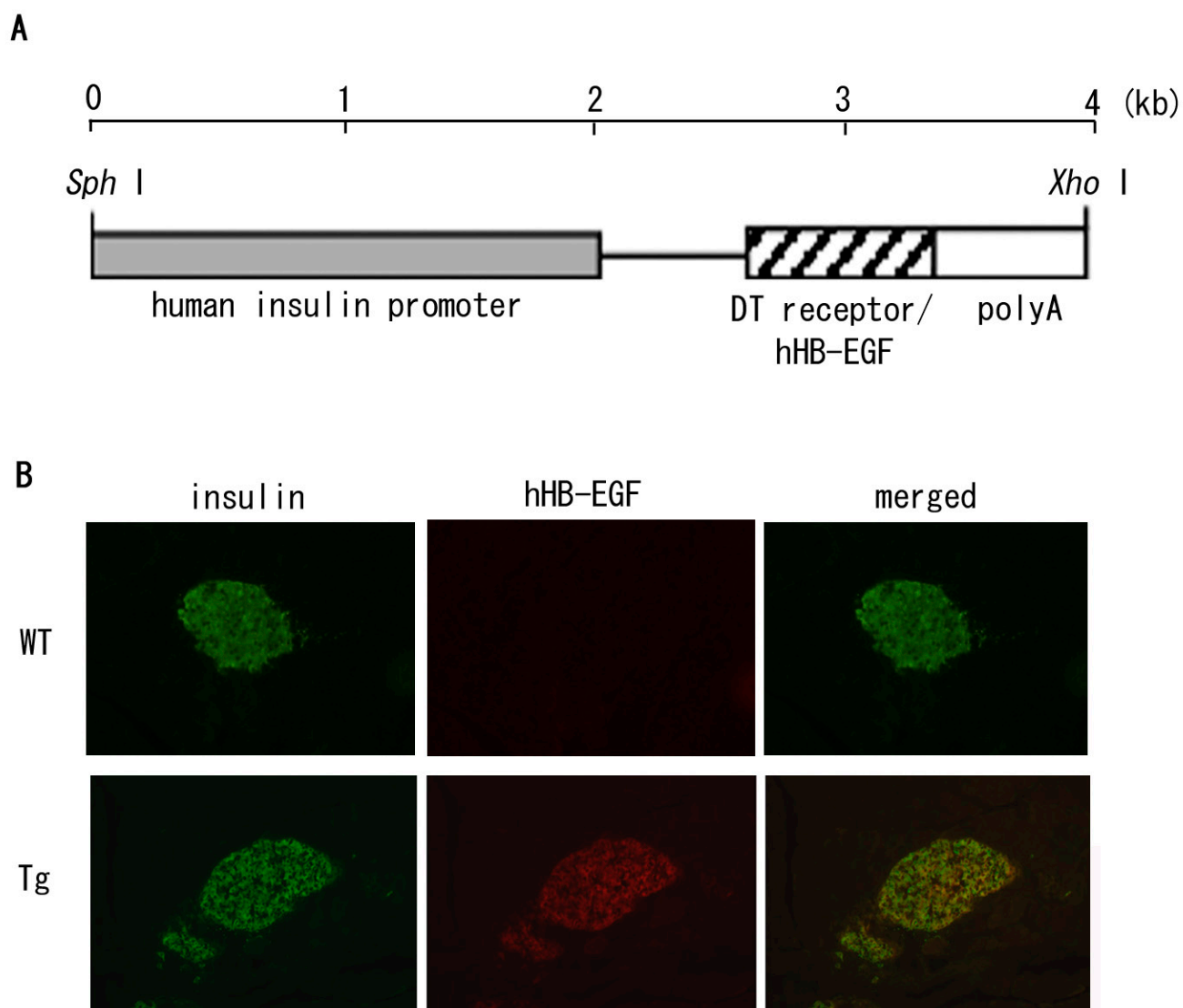


図 2-1 トランスジーンとその発現

A. トランスジーン。ヒトインシュリンプロモーターの下流に毒素受容体 (hHB-EGF) を接続した。*Sph* I/*Xho* I でベクターから切り出し、トランスジーンとして用いた。

B. インシュリンとヒト HB-EGF (hHB-EGF) の共発現。すい臓の切片を抗インシュリン抗体 (緑) ヒト HB-EGF (赤) 抗体で免疫染色した。トランスジェニックマウス (Tg) ではランゲルハンス島でインシュリンとヒト HB-EGF が共発現している像 (黄色) が確認された。



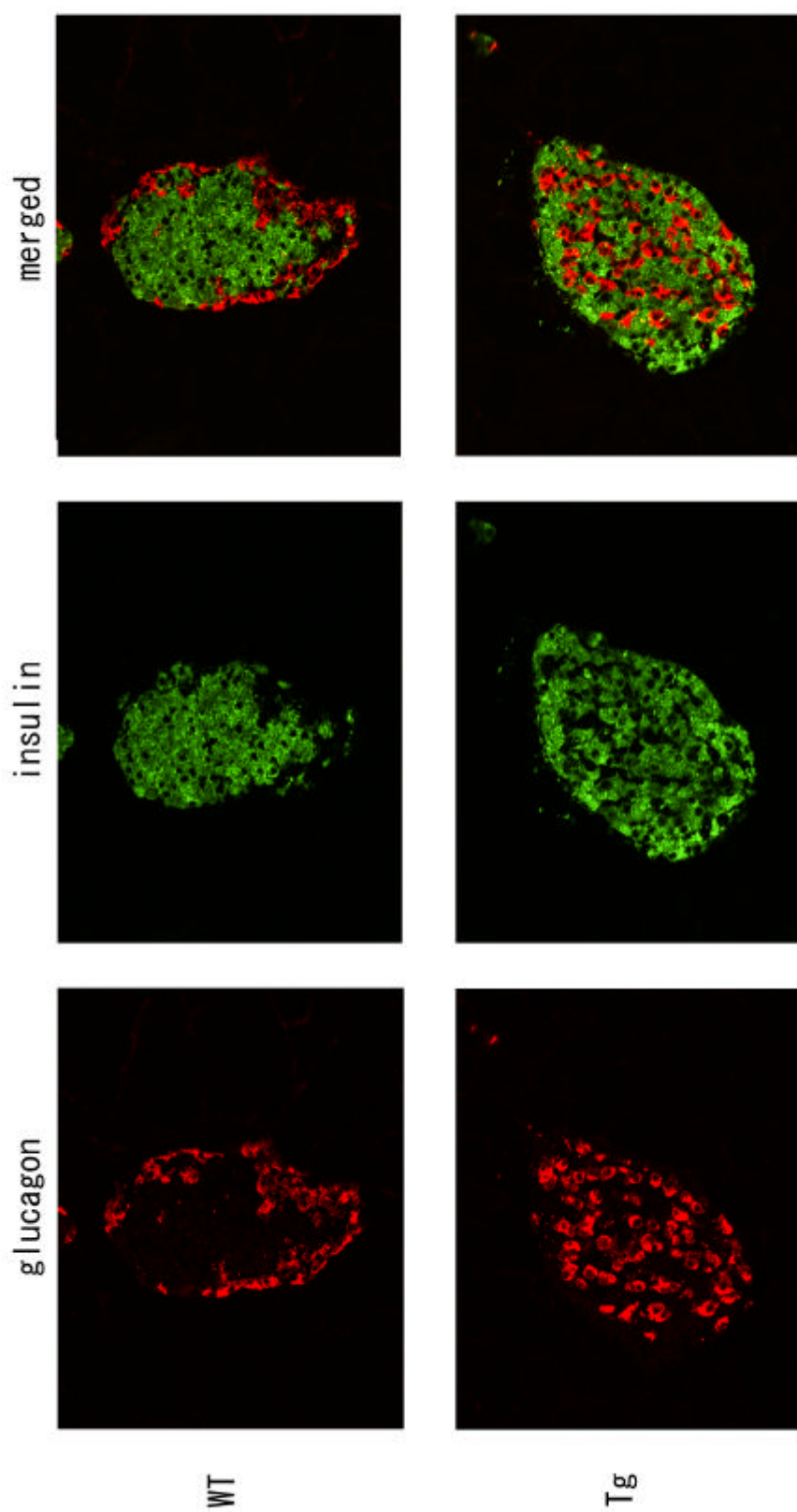
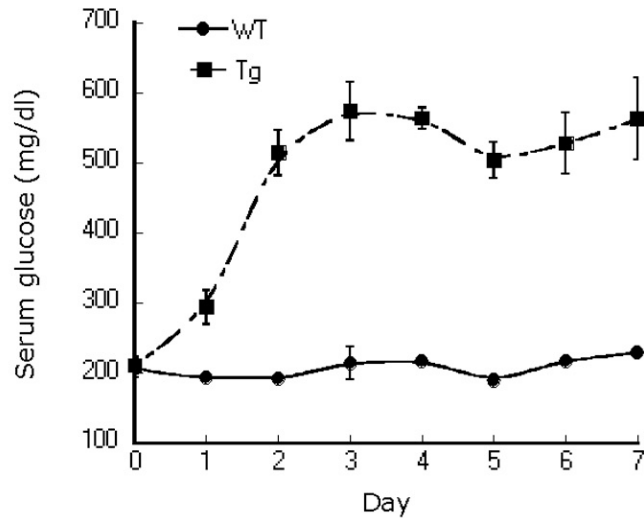


図 2-2 野生型マウス (WT) とトランスジェニックマウス (Tg) のランゲルハンス島  
WT はグルカゴン陽性細胞 ( $\alpha$  細胞) がインシュリン陽性細胞 ( $\beta$  細胞) の周辺に分布するのに比べて、Tg では  $\alpha$  細胞が全体に点在していた。

A



B

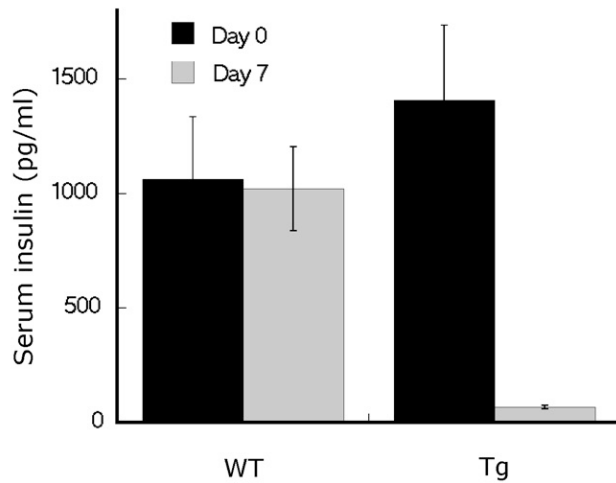


図 2-3 毒素投与後のグルコース濃度とインシュリン濃度

- A. 野生型マウス (WT) とトランスジェニックマウス (Tg) に 50mg/kg DT を投与したところ、野生型の血糖値に変化は見られなかったが、トランスジェニックマウスでは、投与翌日から血糖値が上昇し、3 日目には 600mg/dl 近くまで上がった。
- B. 野生型では毒素投与前 (day0) と投与 1 週間後 (day7) の血清中インシュリン濃度はほとんど変化がないのに比べ、トランスジェニックマウスでは 200pg/ml 以下まで低下していた。

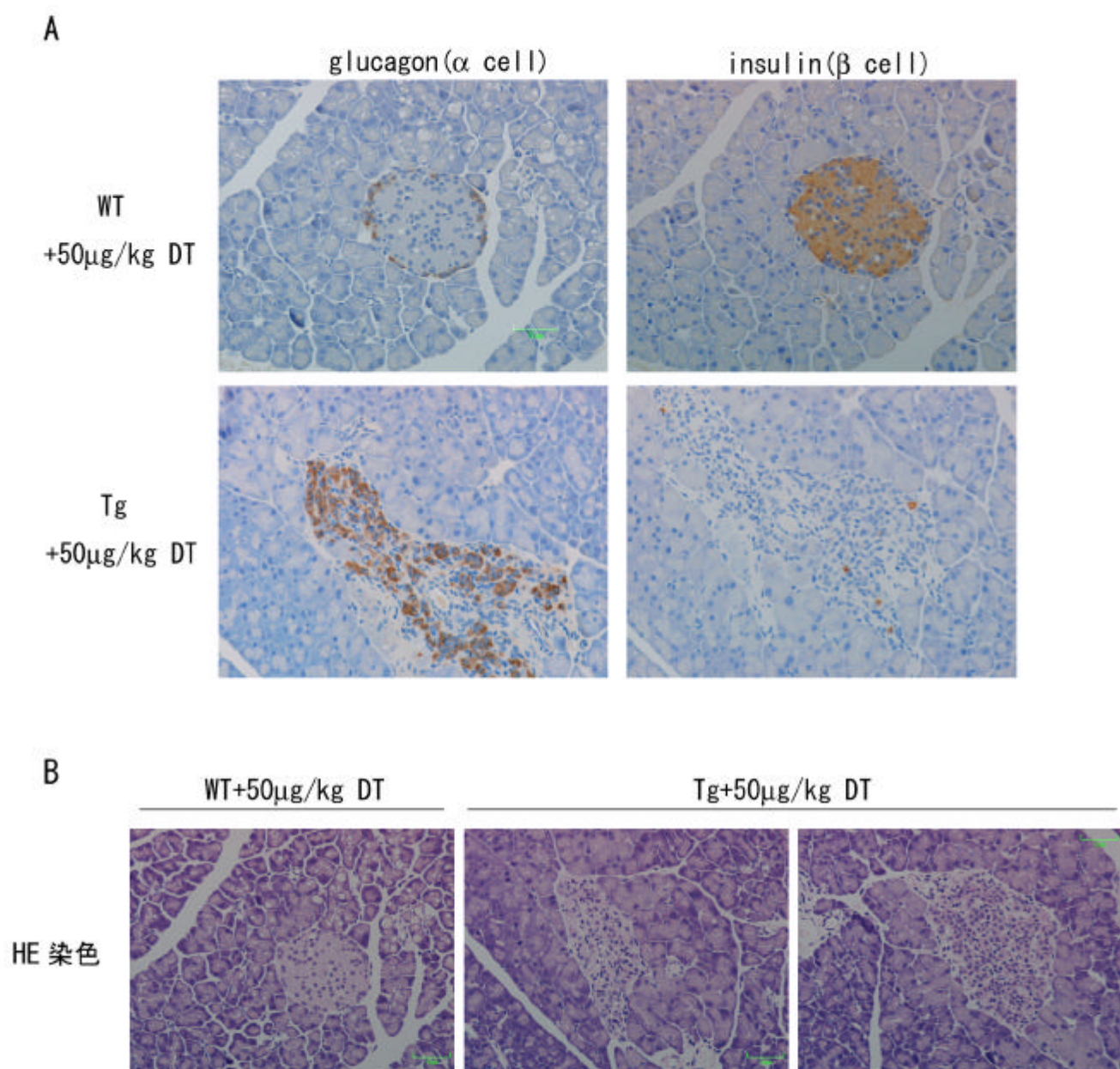


図 2-4 抗グルカゴン抗体、抗インシュリン抗体による染色像と HE 染色

A. 野生型 (WT) ではインシュリン陽性細胞の周辺にグルカゴン陽性細胞が分布する像が観察できるが、トランスジェニックマウス (Tg) ではインシュリン陽性細胞はほとんど観察できずグルカゴン陽性細胞がランゲルハンス島全体に分布している像が観察された。

B. HE 染色像。WT ではランゲルハンス島が円形を保ち周辺が滑らかであるが、Tg ではランゲルハンス島全体に形態の変化が認められた。

また、切片内に確認できるランゲルハンス島の数が極端に減っていた。また存在が確認できるランゲルハンス島においても形態に異常がみられた(図 2-4B)。抗ソマトスタチン抗体 ( $\delta$ 細胞を特異的に染色)によっても染色を行ったが野生型とトランスジェニックマウスで差は認められなかった(data not shown)。

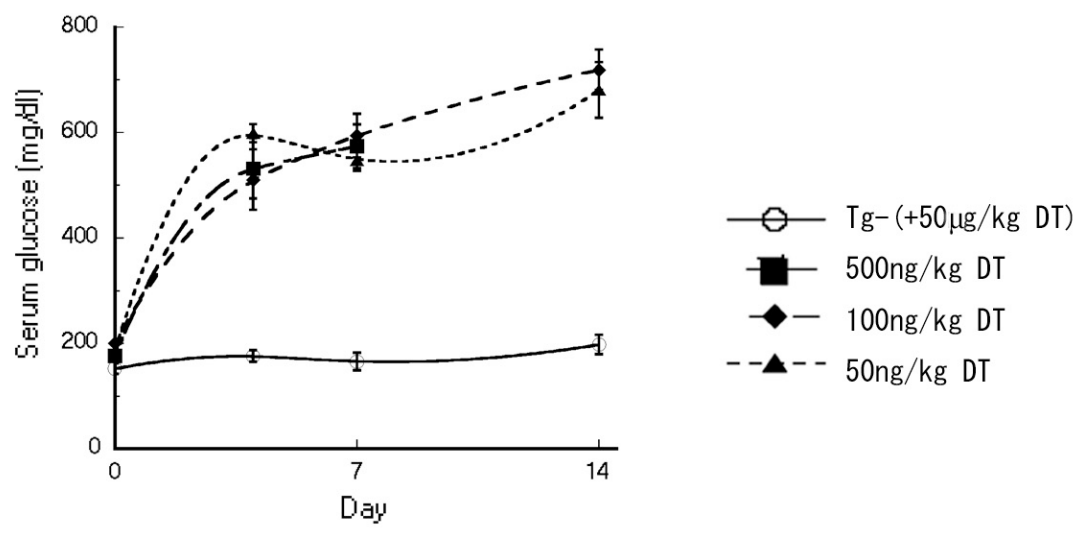
### 毒素濃度依存性

この 細胞破壊が投与する毒素濃度依存的に起こっている現象であるかどうか調べるため、50 $\mu$ g/kg, 500, 100, 50ng/kg の各濃度において毒素投与を行い、血糖値の変化と生存率を調べた。雌雄の差も確認するため、雌 5 匹、雄 5 匹を用いて毒素投与を行い、血糖値測定は 4, 7, 14 日目に行った。100ng/kg DT と 500ng/kg DT 投与群では 4 日目には血糖値が 500mg/dl まで上昇し、1 週間後には 600mg/dl 近くまで上昇した。50ng/kg DT 投与群ではそれらよりも低い血糖値を示した (図 2-5A)。500ng/kg DT 投与群においては 14 日目までにほとんどが死亡したため 14 日目の血糖値はグラフには表示しなかったが、残っていたマウスの血糖値は 600mg/dl を超えていた。50 $\mu$ g/kg の毒素投与では投与後、8 ~ 9 日目にすべての個体が死亡、500ng / kg 毒素投与では 10 ~ 15 日目ですべての個体が死亡した (図 2-5B)。100ng/kg 毒素投与群では 15 日目で 10 匹中 2 匹が死亡、20 日目で 1 匹死亡と徐々に死亡するマウスがでてきたが、高尿糖値、多尿、の状態を維持したまま 2 ヶ月以上生存したマウスも 3 割程度見られた。50ng/kg DT 投与群では 2 ヶ月以上全個体が生存した。

今回投与を行った毒素濃度のうち一番低濃度である 50ng /kg 毒素投与群において、血糖値測定を 80 日目まで続けたところ、血糖値は一時上昇し 400mg/dl 前後の血糖値をしばらく維持するが、2 ヶ月をすぎると血糖値、尿糖値が正常マウスと同程度まで下がった(図 2-6A)。このマウスを 100 日目に固定し、すい臓の切片を作製して抗グルカゴン抗体と抗インシュリン抗体で染色したところ、ランゲルハンス島に多数のインシュリン陽性細胞が観察された(図 2-6B)。HE 染色では duct 細胞と似た形態がランゲルハンス島内に見られ、明らかに正常とは異なった像が確認された(図 2-6C)。

観察された生存率の差が 細胞の破壊されている割合に依存しているのかどうか、各濃度(DT 50 $\mu$ g/kg, 500ng/kg, 100ng/kg, 50ng/kg および STZ 175mg/kg)の毒素投与後 7 日目にマウスを固定し、すい臓の切片を作製し抗グルカゴン抗体、抗インシュリン抗体による染色を行った。また肝臓への副作用を見るため、同時に STZ による糖尿病マウスも作製し、肝臓の HE 染色を行った。薄い濃度である 50ng/kg の毒素投与のときは、インシュリン陽性細胞もまだ多く残っていることが観察された。100ng/kg 毒素投与ではグルカゴン陽性細胞がランゲルハンス島全体に多数

A



B

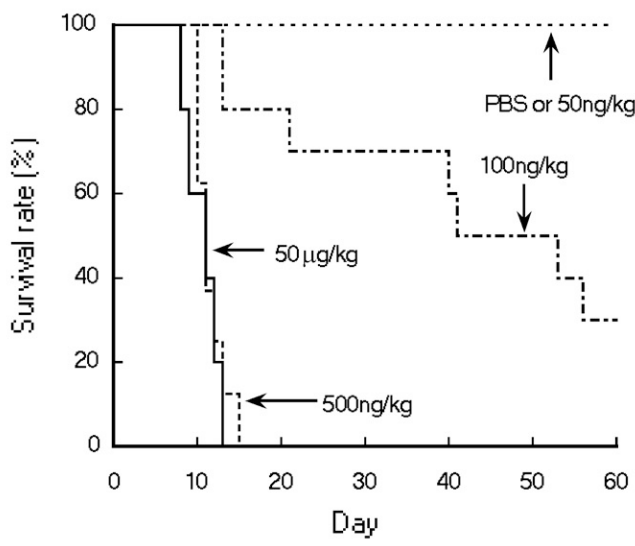
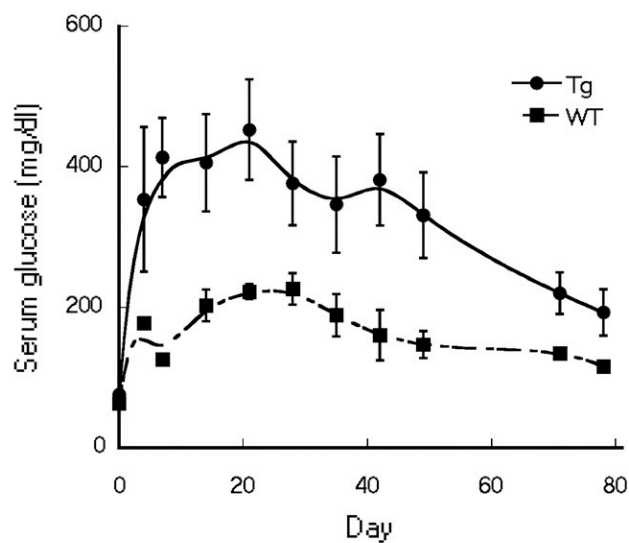


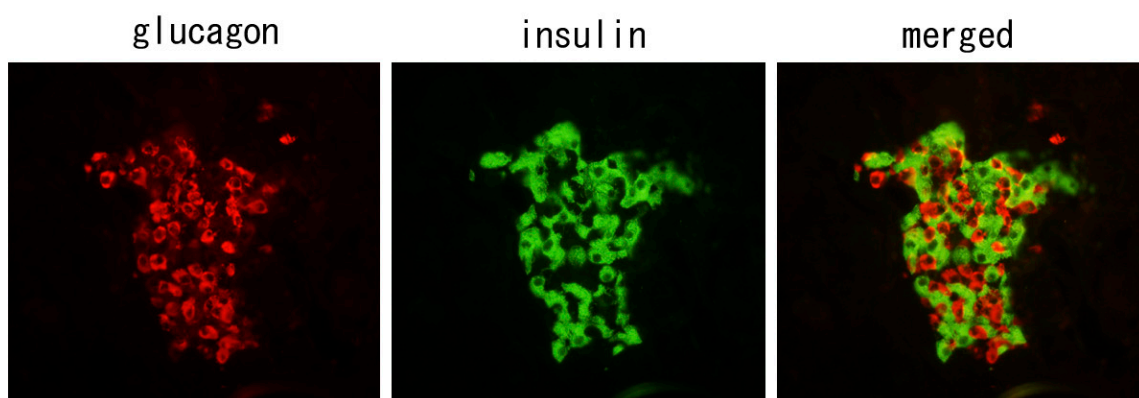
図 2-5 各毒素濃度を投与したときの血清中グルコース濃度と生存曲線  
A. 100ng/kg DT 以上の濃度では 4 日目に 500mg/dl 以上に、1 週間でほぼ 600mg/dl の血糖値となった。50ng/kg DT 投与ではそれらよりも低い血糖値であった。  
B. 500ng/kg 以上の毒素投与では 14 日以内にすべてのマウスが死亡した。(n=10)



A



B



C

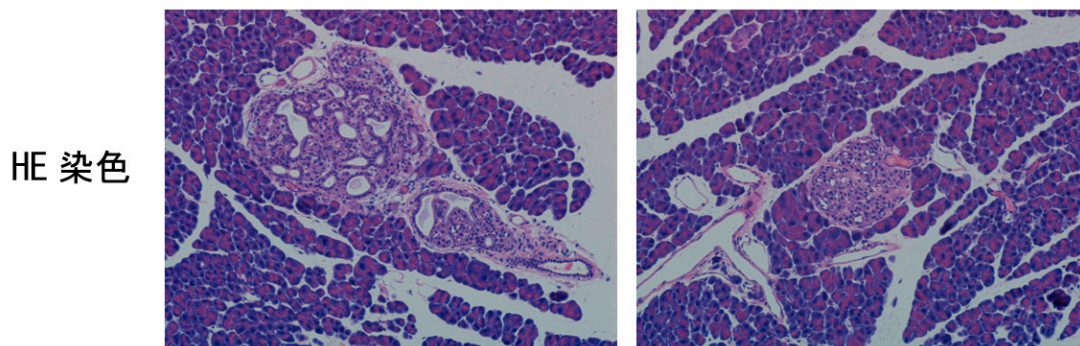


図 2-6 50ng/kg DT 投与したトランスジェニックマウス (Tg)

A. 血糖値の変化。1 週間で血糖値は上昇してしばらく高血糖を維持するが、徐々に低下し始め、80 日では正常値と同程度まで下がった。

B. 50ng/kg DT 投与した Tg マウスの投与後 100 日目のランゲルハンス島の染色像。インシュリン陽性細胞が多数観察できた。

C. 同じ個体の HE 染色像。明らかに変化し、duct 様の組織がランゲルハンス島内に確認できた。

見られるようになり、インシュリン陽性細胞の数が明らかに減ってきていることが観察された。500ng/kg 毒素投与では、ランゲルハンス島全体が抗グルカゴン抗体で染色され、抗インシュリン抗体で染色される細胞はさらに減少した。さらに一番濃度の濃い 50 $\mu$ g/kg 毒素投与では、インシュリン陽性細胞はほとんど見られなくなり、ランゲルハンス島はグルカゴン陽性細胞のみが観察された(図 2-7)。STZ175mg/kg 投与では同じ個体内のすい臓で、ランゲルハンス島全体にグルカゴン陽性細胞が観察されインシュリン陽性細胞がほとんど消失しているランゲルハンス島と、多数のインシュリン陽性細胞が認められるものと両方が観察された(図 2-8)。HE 染色によりランゲルハンス島の形態は、毒素投与では野生型とは明らかに異なり小さくなり、変形したものが多く観察されたが、STZ 投与では同様に萎縮し変形したものと、比較的野生型に近い形態を留めているものとが観察された(図 9)。また STZ 投与では 2 割が血糖値上昇せず、血糖値が上昇したもののでも上昇し始める時期がまちまちであった。肝臓の HE 染色により、毒素投与では肝臓には大きなダメージは観察されなかったが、STZ 投与マウスの肝臓では肝細胞に異常が認められた(図 2-9)。

#### インシュリン依存性の確認

次に血糖値の上昇がインシュリン依存性であるかどうかを調べるため、50 $\mu$ g/kg の毒素投与で血糖値の上昇したマウスにインシュリン負荷試験を行った。2u/kg のインシュリン(ヒューマリン R1000) を腹腔内投与し、投与前(0 分とする)、30、60、90 分後に採血、血糖値測定を行ったところ、すべての個体において血糖値が野生型と同じ 200 mg/dl 前後まで減少した(図 2-10A)。

さらに毒素投与により死亡した原因が、インシュリン低下によるものであることを確認するため、腎臓皮膜下に野生型マウスより分離精製したランゲルハンス島を移植し(図 2-11, 12)、その生存率が回復するかどうか調べた。トランスジェニックマウスに 500ng/kg の毒素投与を行い、血糖値が上昇したことを確かめた後、毒素投与 4 日後に C57BL/6J マウスより分離精製したランゲルハンス島 300 個を左腎臓皮膜下に移植した。このマウスは移植後 7 日目から血糖値が下がり始め、移植しなかったコントロール群がすべて死亡した後も生存した。血糖値は 1 ヶ月たっても正常値を保っていたため、ここにさらに毒素を 5 $\mu$ g/kg DT の濃度で投与した。初めに投与した 100ng/kg DT の 50 倍もの高い濃度の毒素を投与しているため、すい臓であらたに $\beta$ 細胞が増えてきた場合、または他の臓器に異所的にヒト HB-EGF が発現していた場合には、血糖値その他に異常が出てくると考えられたが、2 週間たっても何も異常は観察できなかった。腎臓に移植したランゲルハンス島がこのマウスらの血糖値を下げているということを確認するため、ランゲル

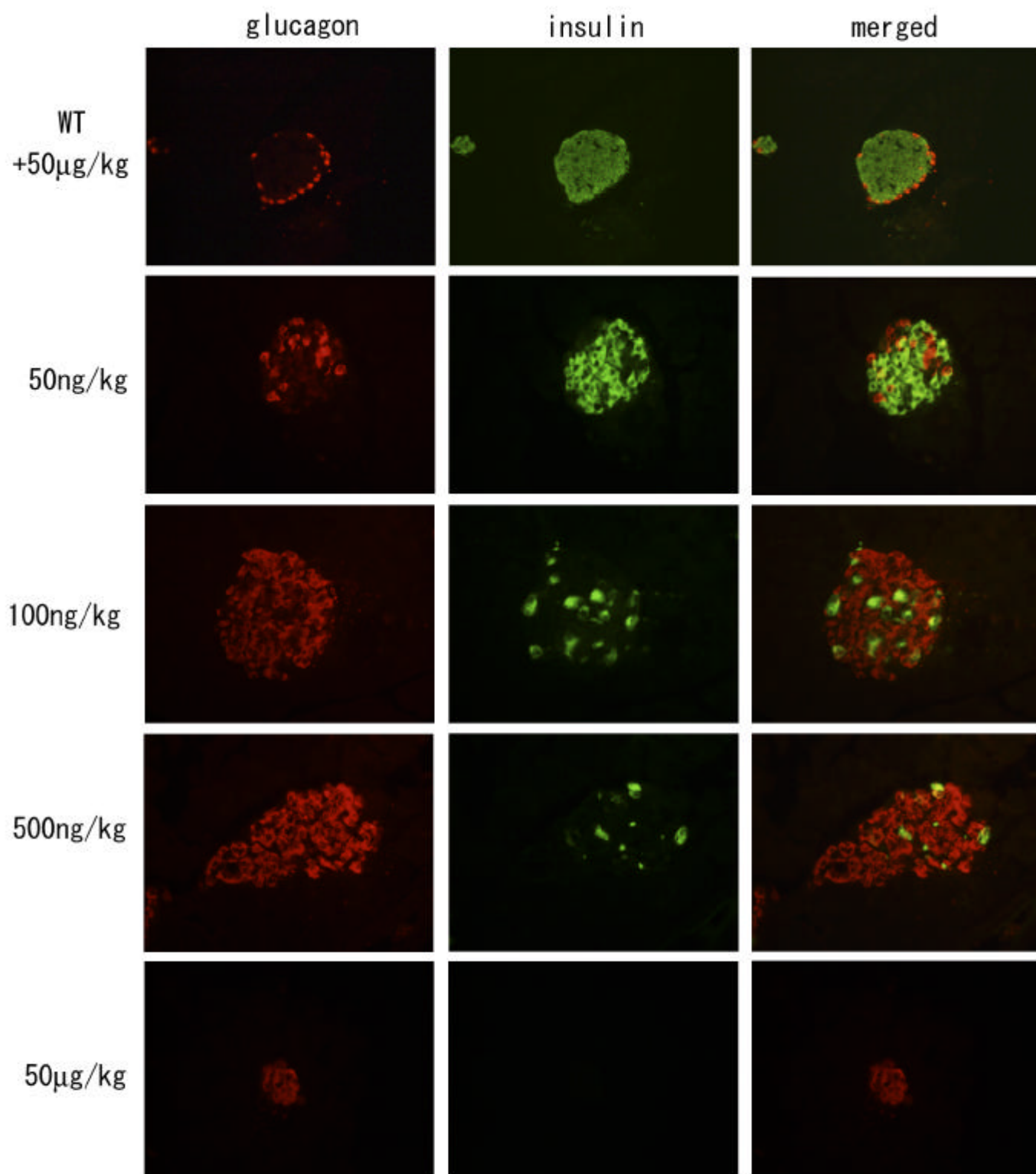


図 2-7 各濃度の毒素投与後 7 日目のランゲルハンス島の染色像

毒素濃度が高くなるにつれてインシュリン陽性細胞が減少していく様子が観察された。



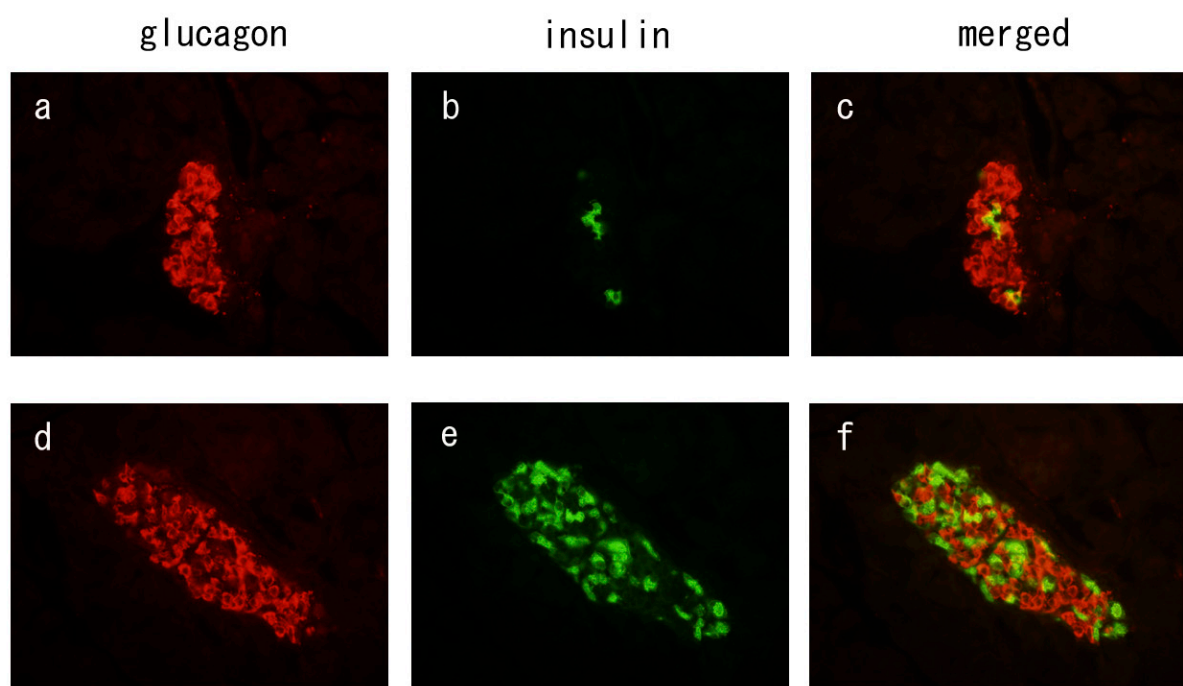


図 2-8 STZ 投与

野生型マウスに STZ 投与して 7 日後のランゲルハンス島の抗グルカゴン抗体、抗インシュリン抗体による染色像。同個体内でほとんどインシュリン陽性細胞が残っていないランゲルハンス島 (a-c) と多数残っているもの (d-f) とが観察された。

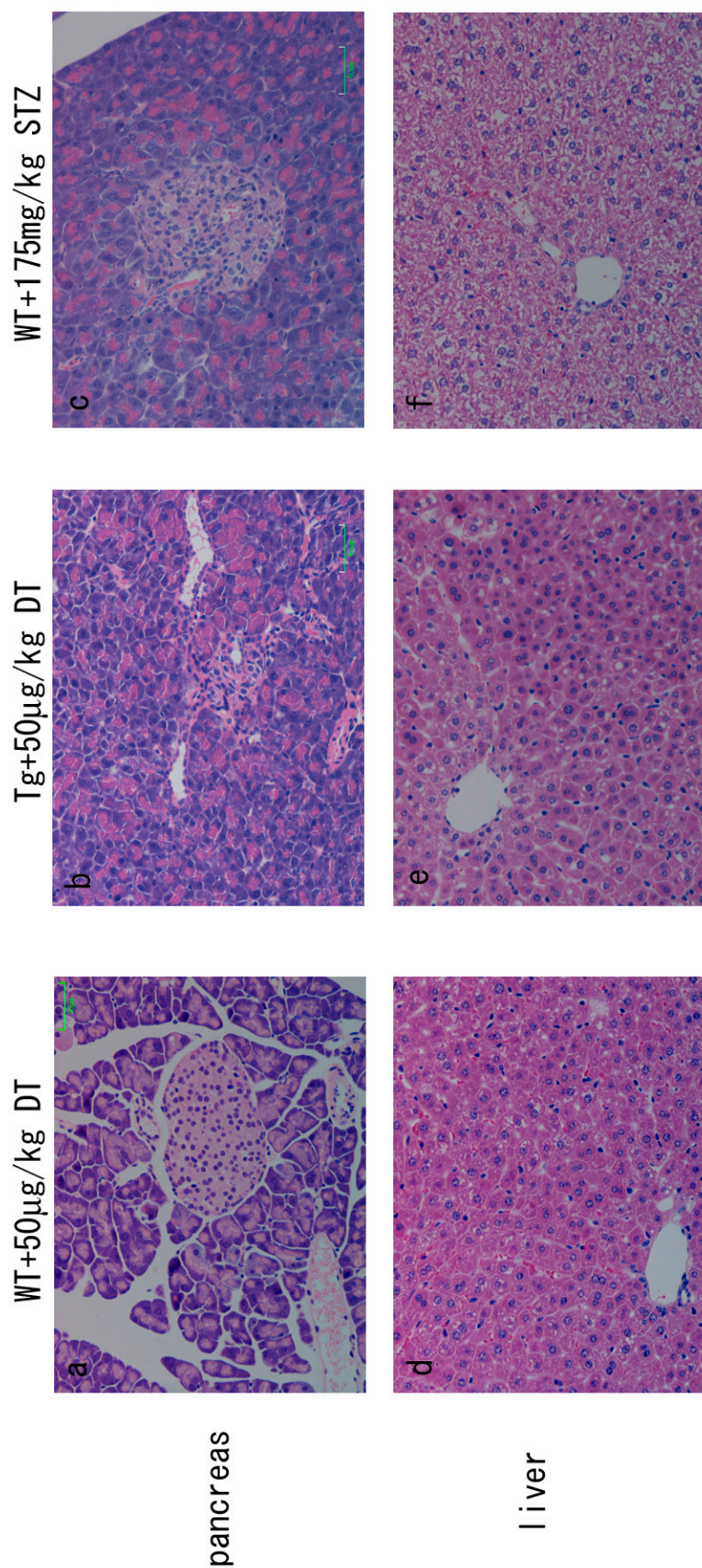


図 2-9 すい臓と肝臓の HE 染色像

Tg マウスに高濃度の毒素投与 (50μg/kg)、もしくは野生型マウス (WT) に 175mg/kg のストレプトゾトシン (STZ) を投与し、7 日後のすい臓と肝臓の HE 染色像。毒素投与した Tg ではランゲルハンス島が萎縮して変形した像が認められる (b)。STZ 投与では毒素投与と同様の変形したランゲルハンス島 (data not shown) と比較的野生型に近い形態を留めているもの (c) とが観察された。肝臓では高濃度の毒素投与にもかかわらず、肝細胞が正常な像を示しているのに対し (e)、STZ 投与では肝細胞が破壊されている像 (f) が観察された。野生型マウスに 50μg/kg DT 投与したものの (a, d) は、正常な形態を示している。

ハンス島を移植した左腎臓を摘出した。摘出 24 時間後には血糖値が 600mg/dl を超えた(図 2-10B)。このマウスをただちに固定し、すい臓、肝臓、右腎臓、脾臓の免疫染色を行ったところ、すい臓ではほとんどインシュリン陽性細胞は確認できなかった(図 2-13)。肝臓でもランゲルハンス島を移植していない右腎臓でもインシュリン陽性細胞は見られなかった(data not shown)。ランゲルハンス島を移植した左腎臓ではインシュリン陽性細胞とそれを取り囲むようにグルカゴン陽性細胞が確認された(図 2-13)。

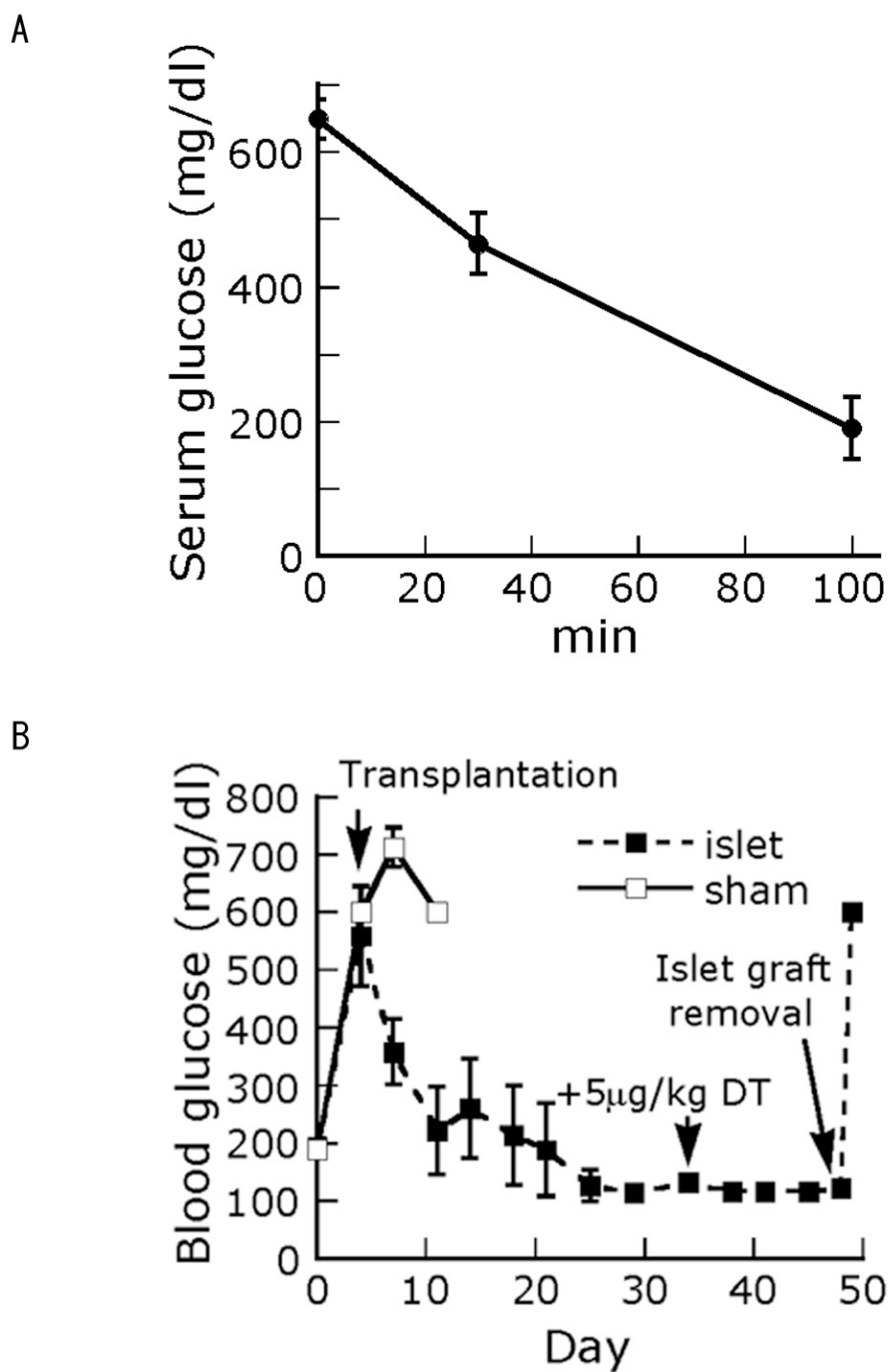
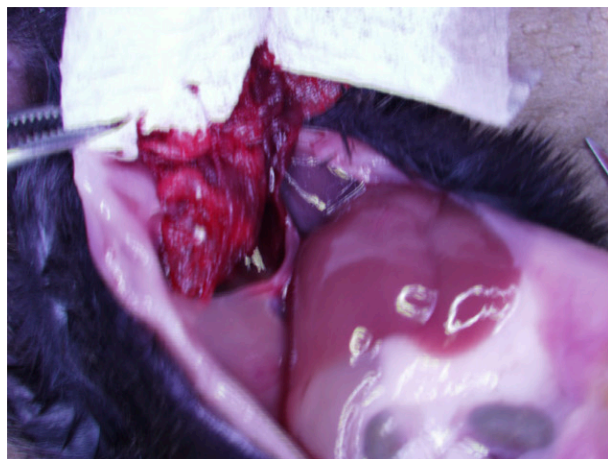


図 2-10 インシュリン負荷試験とランゲルハンス島移植後の血糖値の変化

A. トランスジェニックマウスに 50 $\mu$ g/kg DT を投与し、血糖値が上がったマウスにインシュリンを 2u/kg 腹腔内投与した。投与後 100 分で血糖値は正常値まで下がった。

B. 500ng/kg DT 投与後 4 日目にランゲルハンス島を脾臓皮下に移植した。sham(n=3) が 12 日前後で高血糖で死亡したのに対し、ランゲルハンス島を移植したマウス (n=3) は移植 3 日後には血糖値が下がり始めた。48 日目に移植した側の腎臓を摘出したところ、血糖値が上昇した。





1. マウスを麻酔し腹部を開いて横隔膜を開き心臓もしくは下大静脈を切って脱血する（キムワイプで吸い取る）。



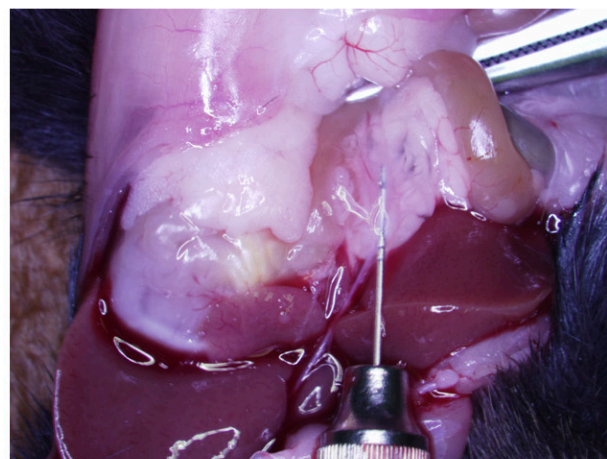
2. 肝臓をめくり上げ、十二指腸、総胆管を露出させる。



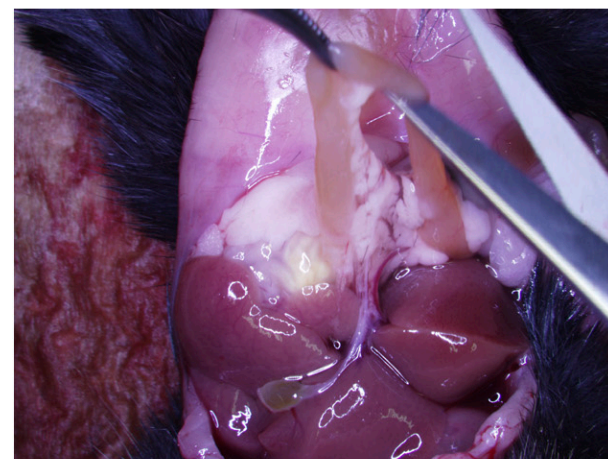
3. マウスを反転させ視野を逆にとる。（頭が視野の下側になる様におく）



4. 十二指腸側にある総胆管の先端（Vater 乳頭）を止血かんしで固定する。



5. 総胆管に針を挿入し、コラゲナーゼで灌流する。

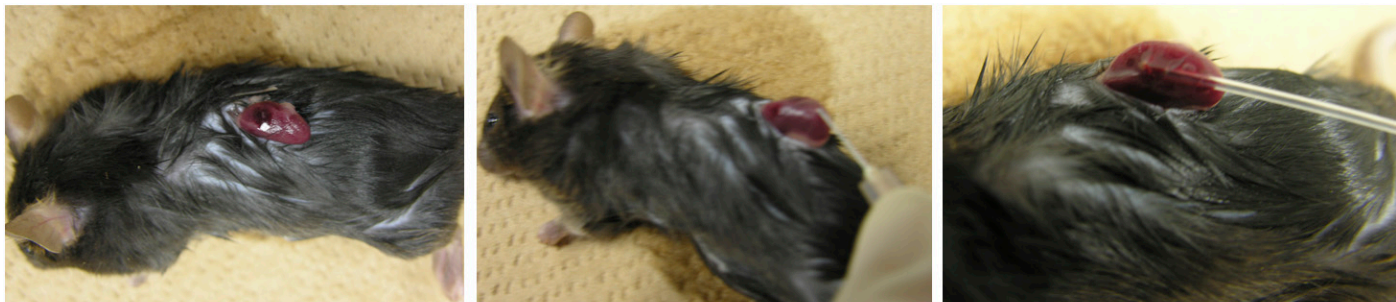


6. 灌流後、膵臓をはさみとピンセットを用いて十二指腸、胃、大腸、脾臓などから鈍的に剥離する。

図 2-11 ランゲルハンス島の分離  
詳細は方法の項を参照。



A



1. マウスを麻酔し背側から腎臓を露出させる
2. 針ではじくように腎皮膜を少量破く
3. 破いた穴から脾島のつまったチューブを差込み、静かに注入する

B



1. マウスを麻酔し背側から腎臓を露出させ、血管の下に糸を通す。
2. 血管を糸で結紮した後、その先で腎臓を摘出する。

図 2-12 手術法

腎皮膜下への脾島移植 (A) と腎臓摘出 (B)。詳細は方法の項参照。

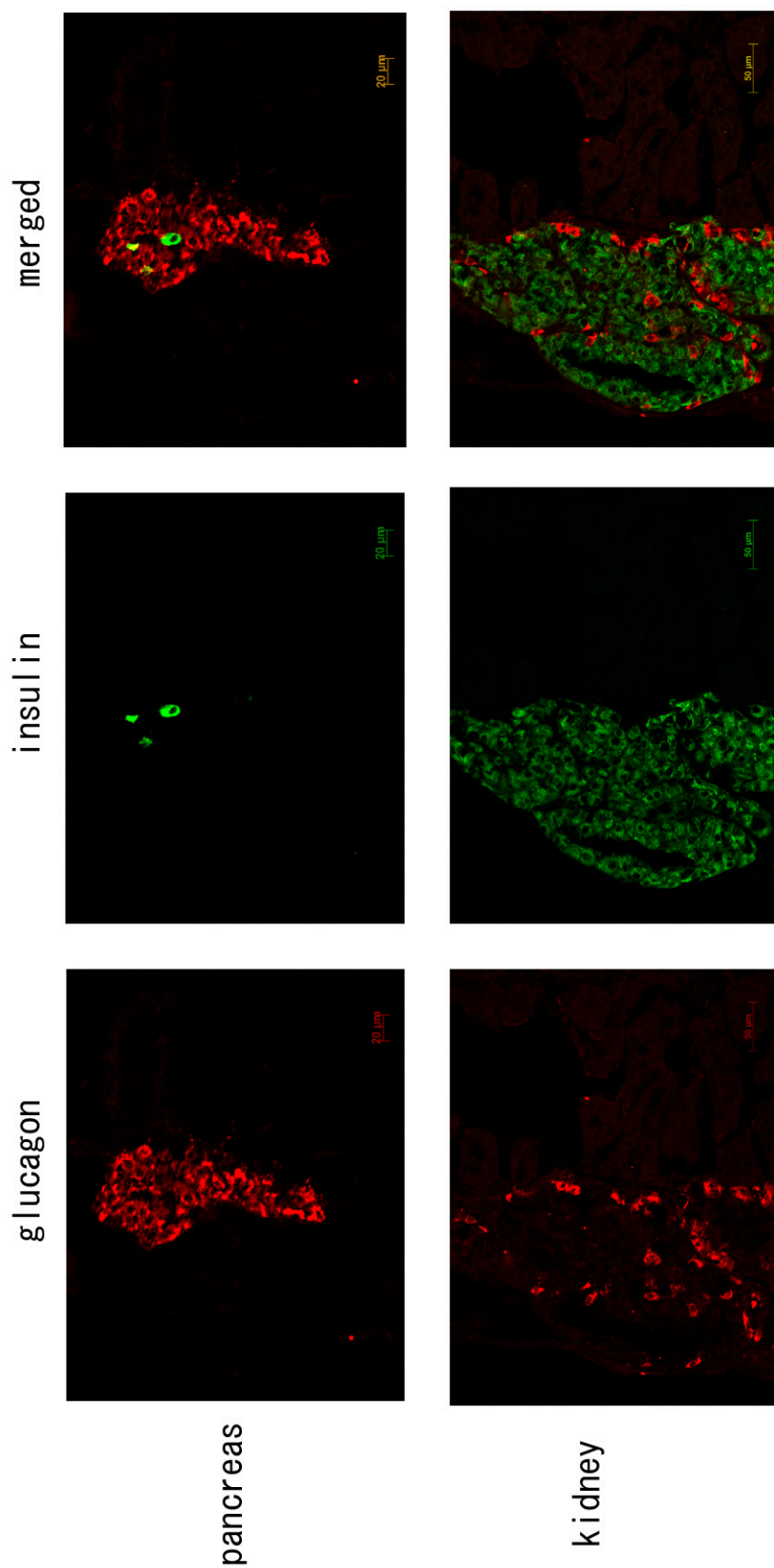


図 2-13 ランゲルハンス島移植した腎臓（移植後 48 日目）とすい臓（移植後 49 日目）の免疫染色像  
 ランゲルハンス島を移植した左腎臓を摘出後、切片を作製し抗グルカゴン抗体、抗インシュリン抗体により染色を行った。  
 腎臓でグルカゴン、インシュリン陽性細胞が観察された。すい臓ではインシュリン陽性細胞はほとんど観察されなかった。  
 （詳細は本文参照）

## 考察

以前に開発した TRECK 法を用いて、新たな糖尿病モデルマウスを作製した。ヒトインシュリンプロモーターによって制御されたジフテリア毒素受容体は、マウス個体内ですい臓細胞特異的に発現し、ジフテリア毒素を投与することによってその発現細胞である細胞のみを特異的に破壊することが確認された。Northern 解析による他臓器でのヒト HB-EGF の発現は認められず、肝臓、腎臓の組織切片における抗ヒト HB-EGF 抗体による免疫染色でも、発現は認められなかった。したがってこの TRECK 法によるトランスジェニックマウスは毒素投与によって細胞のみが破壊され、インシュリン分泌が減少、血糖値が上昇したと考えられる。この毒素投与により、毒素受容体を発現したトランスジェニックマウスのほぼ 100% が糖尿病様症状を呈した。これは現在用いられている NOD マウスや STZ 投与による糖尿病誘発よりも明らかに糖尿病誘発が確実であることを示している。また 2 週間で死に至る濃度である高濃度の 50 $\mu$ g/kg DT を投与した場合でも肝細胞に大きな影響は及ぼしておらず、STZ 投与による糖尿病モデルで問題となっていた肝細胞への副作用も解消できたと考えられる。

さらに毒素濃度依存的に $\beta$ 細胞の破壊をコントロールできることがわかった。500ng/kg DT 以上の毒素濃度投与では 3 日以内に毒素投与したすべてのマウスで血糖値が上昇し 2 週間で死亡にいたる。この死亡の原因はランゲルハンス島の腎被膜下への移植により生存が延びることによって、インシュリン依存的な理由による死亡であると考えられる。ランゲルハンス島内の $\beta$ 細胞はほとんど消失しており、インシュリン濃度は 1 週間で 200pg/ml 以下まで低下した。100ng/kg DT では $\beta$ 細胞は明らかに減少し、血糖値は上昇する。しかし、投与したうちの数匹は途中で死に到るが 3 割程度は高血糖を維持したまま 2 ヶ月以上生存し続ける。ランゲルハンス島の $\beta$ 細胞はかなり減少しているが、まだ残存してインシュリンを分泌しているものもあるために血糖を下げるまでにはいたらないが、個体によっては生存し続けられるのかもしれない。野生型マウスでは影響の出ない 50 $\mu$ g/kg DT の 1000 分の 1 の濃度である 50ng/kg DT 投与でも明らかに血糖値は上昇し、多尿、糖尿を示した。血糖値の上昇の程度は、幅があり、400mg/dl 程度までしか上昇せず、その血糖値をしばらく維持する個体もあれば、3-4 日で 100ng/kg DT 以上の毒素濃度投与と同様に 500-600mg/dl の血糖値を示す個体も現れた。したがって、一概に 50ng/kg DT では毒素濃度が低いために血糖値も常に 300-400mg/dl 程度に抑えられるとはいいいきれない。しかし、明らかに糖尿病の程度はそれより高い濃度の毒素投与による糖尿病症状よりは軽く、2 ヶ月以上経過しても死に至る個体は現れなかった。血糖値が上昇している 7 日目でもランゲルハンス島の $\beta$ 細胞は



多く確認できたことからインシュリンの分泌は微量に減少しただけでも血糖値に異常を及ぼすと考えられる。グルカゴンの分布については、毒素投与をしなくてもランゲルハンス島全体に散在していたため、50ng/kg DT 投与ではその差ははっきりとは見分けられなかった。50ng/kg DT 投与により一度血糖値が上昇し、3ヶ月弱で正常値に戻ったマウスのランゲルハンス島はインシュリン陽性細胞が多く確認できるが、血糖値の上昇している7日目のランゲルハンス島のインシュリン抗体による染色像とはあまり区別がつかなかった。しかし HE 染色による像では明らかに一度ランゲルハンス島が破壊された様子が観察できた。これは残存していたβ細胞が分裂して新たにインシュリンを分泌するβ細胞を作り血糖値を下げたのか、duct 細胞の様な形態が100日目のランゲルハンス島に多く見受けられることから、β細胞ではない他の細胞が分化してインシュリンを分泌するようになったのか、興味深いところである。

今回作製したトランスジェニックマウスではグルカゴン陽性細胞(細胞)の分布に異常が見られた。ランゲルハンス島の形態には HE 染色で認められる異常は見受けられなかったが、抗グルカゴン抗体による免疫染色により、野生型と同様に細胞がランゲルハンス島周囲に分布するのではなく、全体にまばらに分布している像が観察された。しかし、毒素投与による血糖値の上昇や血清中インシュリン濃度低下、インシュリン負荷試験、ランゲルハンス島の移植実験などによる糖尿病としての症状は、糖尿病モデル動物としては期待通りのものであったため、今回作製したトランスジェニックマウスは糖尿病モデルとしては利用可能であると考えられる。この細胞の分布の異常に関して理由はまったく不明であるが、同じトランスジーンを用いて異なった系統のマウスで作製したトランスジェニックマウスでもα細胞の分布異常が見受けられるため、ラインの差であるとも考えにくい。以前にすい臓β細胞に HB-EGF を過剰発現させると、すい臓の繊維化が起きることが報告されている (Means et al., 2003)。これは growth factor としての影響であると考えられるため、今回作製した糖尿病モデルマウスに関してもその影響がでたとも考えられる。膜結合型の毒素受容体でも同様の異常が見受けられるため、第1章で述べたように現在当研究室にて開発中の増殖能を低下させた変異型毒素受容体を用いて、新たにマウスを作製しなおすことも考えている。

TRECK 法による糖尿病モデルマウスは、雌雄差、週齢差を伴わず、毒素投与のみによって発症をコントロールできた。毒素は非常に安定であり、少量の毒素単回投与のみで、劇的に細胞のみに障害を与え、糖尿病様症状を呈することが可能である。このモデルマウスはほぼ100%毒素投与から2日~4日目で血糖値が上昇するため、同様の症状を呈する個体群を準備することが容易である。これは現在までにはなかった新しい1型糖尿病モデルマウスであり、今後様々な研究に

使用されることが期待される。第 1 章で述べたように、TRECK 法で作製されたマウスの毒素受容体発現細胞は毒素に感受性であるが、外来のマウス細胞は毒素に対し非感受性である。したがって外来の細胞を移植した場合には、内部の細胞と毒素投与により区別することが可能である。毒素の濃度によって症状をコントロールすることができるため、たとえば低濃度の毒素で糖尿病を誘発しておき、幹細胞を移植してインシュリン陽性細胞に分化するかどうか観察することが可能である。外来の幹細胞が分化すれば再び毒素を投与しても、そのマウスの血糖値は上昇しないはずである。内部の $\beta$ 細胞が分裂したり、内部の幹細胞が $\beta$ 細胞に分化した場合には、毒素投与によってやはり糖尿病が誘発されることになる。げっ歯類では腎臓被膜下に細胞を移植するという方法が可能であるために、移植実験もやりやすいと考えられる。 $\beta$ 細胞に分化すれば蛍光を発するように、インシュリンプロモーター下に蛍光蛋白質の遺伝子を接続したトランスジェニックマウスから候補となるドナー細胞を分離して移植に用いれば、さらに解析がしやすくなるであろう。またこの TRECK 法によるモデルマウスは低濃度の毒素投与でいったん糖尿病症状を誘発されたマウスの血糖値が数ヶ月で正常に戻ったため、体内での再生機構の研究にも役立つと考えられる。

現在根本的な糖尿病治療手段として、膵臓移植、そして近年においては膵島移植も行われている。しかしながらこれらの移植には臓器提供者が必要である。膵島移植の場合は一人の糖尿病患者につき、数人の脳死患者からの膵島が必要となる。また他人からの臓器移植や、細胞から細胞を再生させてからの移植では、常にドナーとレシピエントとの免疫反応が重大な問題となってついて回ることになる。このためには他人、あるいは他の動物の細胞から細胞を再生するのではなく、本人の腸管やその他の組織を分化転換などの手法を用いて、細胞を再生させるのが今後の課題である。このためには、今後さまざまな細胞のスクリーニングが必要であるが、そのスクリーニングの系に今回作製したモデルマウスは非常に有効な手段として利用可能であると思われる。また同時期に大量に同程度の症状を示す動物を作製することが可能であるため、糖尿病薬のスクリーニングにも利用価値が高いと考えられる。糖尿病研究において果たしてきたモデル動物の役割や貢献度には多大なものがあり、これからも重要性が小さくなるとは考えられない。ヒトでは不可能な、モデル動物ならではの研究によって糖尿病研究が飛躍、発展し、治療方法が確立されること、そしてその一端をこのモデルマウスが担ってくれることを期待している。

## 謝辞

トランスジェニックマウス作製の指導をしていただいた近畿大学農学部角田行雄博士、加藤容子博士、(財)東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所の米川博通博士、多屋長治博士に感謝いたします。In situ ハイブリダイゼーションの手技、手法などは本研究科細胞構造学講座の塩坂貞夫教授、谷口学氏にご指導いただきました。感謝いたします。ランゲルハンス島精製、移植の手技を直接ご指導していただいた神戸大学大学院医学系研究科、堀裕一助教授にこの場をかりて感謝いたします。本研究を与えてくださり、長期にわたってご指導いただきました河野憲二教授、研究に当たっての細かいご助力、ご指導いただきました都留秋雄助手、木俣行雄助手に感謝いたします。本研究を初期の頃から共に実験し、現在にわたってまで協力をしていただいた岩脇隆夫博士に感謝し、心よりお礼申し上げます。肝細胞移植や、動物のメンテナンスなどには当研究室、増田尚代氏に多大な協力をしていただきました。感謝いたします。最後に、研究その他にわたってのご助言、ご協力をいただきました動物細胞工学研究室の皆様にお礼申し上げます。

本研究は新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業(生研センター基礎研究推進事業)によりサポートされています。

## 参考資料

### Alb-TR1 transgene sequence

10	20	30	40	50	60
GGAGCTCCAC CGCGGTGGCG GCCGCTCTAG CTCCTTAGC ATGACGTTCC ACTTTTTTCT					
Sac I Bst XI		Not I			
Sac II		<b>Albumin enhancer/promoter</b>			
70	80	90	100	110	120
AAGGTGGAGC TTACTTCTTT GATTTGATCT TTTGTGAAAC TTTTGGAAAT TACCCATCTT					
130	140	150	160	170	180
CCTAAGCTTC TGCTTCTCTC AGTTTTCTGC TTGCTCATT CACTTTTCCA GCTGACCCTG					
Hin dIII		Pvu II			
190	200	210	220	230	240
CCCCCTACCA ACATTGCTCC ACAAGCACAA ATTCATCCAG AGAAAAATAA TTCTAAGTTT					
250	260	270	280	290	300
TATAGTTGTT TGGATCGCAT AGGTAGCTAA AGAGGTGGCA ACCCACACAT CCTTAGGCAT					
310	320	330	340	350	360
GAGCTTGATT TTTTTTGATT TAGAACCTTC CCCTCTCTGT TCCTAGACTA CACTACACAT					
370	380	390	400	410	420
TCTGCAAGCA TAGCACAGAG CAATGTTCTA CTTTAATTAC TTTCATTTTC TTGTATCCTC					
430	440	450	460	470	480
ACAGCCTAGA AAATAACCTG CGTTACAGCA TCCACTCAGT ATCCCTTGAG CATGAGGTGA					
490	500	510	520	530	540
CACTACTTAA CATAGGGACG AGATGGTACT TTGTGTCTCC TGCTCTGTCA GCAGGGCACT					
550	560	570	580	590	600
GTACTTGCTG ATACCAGGGA ATGTTTGTTC TTAAATACCA TCATTCCGGA CGTGTTTGCC					

610	620	630	640	650	660
TTGGCCAGTT	TTCCATGTAC	ATGCAGAAAG	AAGTTTGGAC	TGATCAATAC	AGTCCTCTGC

670	680	690	700	710	720
CTTTAAAGCA	ATAGGAAAAG	GCCAACTTGT	CTACGTTTAG	TATGTGGCTG	TAGAAAGGGT

730	740	750	760	770	780
ATAGATATAA	AAATTAAAAC	TAATGAAATG	GCAGTCTTAC	ACATTTTGG	CAGCTTATTT

790	800	810	820	830	840
AAAGTCTTGG	TGTTAAGTAC	GCTGGAGCTG	TCACAGCTAC	CAATCAGGCA	TGTCTGGGAA

850	860	870	880	890	900
TGAGTACACG	GGGACCATAA	GTTACTGACA	TTCGTTTCCC	ATTCCATTG	AATACACACT

910	920	930	940	950	960
TTTGTCAATG	TATTGCTTGC	TGAAATTGTT	TTGCAAAAAA	AACCCCTTCA	AATTCATATA

970	980	990	1000	1010	1020
TATTATTTTA	ATAAATGAAT	TTTAATTTAT	CTCAATGTTA	TAAAAAAGG	TCAATTTTAA

1030	1040	1050	1060	1070	1080
TAATTAGGTA	CTTATATACC	CAATAATATC	TACCAATCAT	TTTTAAACAT	TTGTTTATTG

1090	1100	1110	1120	1130	1140
AGCTTATTAT	GGATGAATCT	ATCTCTATAT	ACTCTATATA	CTCTAAAAAA	GAAGAAAGAC

1150	1160	1170	1180	1190	1200
CATAGACAAT	CATCTATTTG	ATATGTGTAA	AGTTTACATG	TGAGTAGACA	TCAGATGCTC

1210	1220	1230	1240	1250	1260
CATTTCTCAC	TGTAATACCA	TTTATAGTTA	CTTGCAAAAC	TAAGTGAAT	TCTAGGACTT

Eco RI

1270	1280	1290	1300	1310	1320
AAATATTTTA	AGTTTTAGCT	GGGTGACTGG	TTGGAAAATT	TTAGGTAAGT	<u>ACTGAAACCA</u>
				Sca I	

1330	1340	1350	1360	1370	1380
AGAGATTATA	AAACAATAAA	TTCTAAAGTT	TTAGAAGTGA	TCATAATCAA	ATATTACCCT

1390	1400	1410	1420	1430	1440
CTAATGAAAA	TATTCCAAAG	TTGAGCTACA	GAAATTTCAA	CATAAGATAA	TTTtagCTGT

1450	1460	1470	1480	1490	1500
AACAATGTAA	TTTGTGTCT	ATTTTCTTTT	GAGATACAGT	TTTTTCTGTC	TAGCTTTGGC

1510	1520	1530	1540	1550	1560
TGTCCTGGAC	CTTGCTCTGT	AGACCAGGTT	GGTCTTGAAC	TCAG <u>AGATCT</u>	GCTTGCCTCT
				Bgl II	

1570	1580	1590	1600	1610	1620
GCCTTGCAAG	TGCTAGGATT	AAAAGCATGT	GCCACCACTG	CCTGGCTACA	ATCTATGTTT

1630	1640	1650	1660	1670	1680
TATAAGAGAT	TATAAAGCTC	TGGCTTTGTG	ACATTAATCT	TTCAGATAAT	AAGTCTTTTG

1690	1700	1710	1720	1730	1740
GATTGTGTCT	GGAGAACATA	CAGACTGTGA	GCAGATGTTC	AGAGGTATAT	TTGCTTAGGG

1750	1760	1770	1780	1790	1800
<u>GTGAATTCAA</u>	<u>TCTGCAGCAA</u>	TAATTATGAG	CAGAATTACT	GACACTTCCA	TTTTATACAT
Eco RI	Pst I				

1810	1820	1830	1840	1850	1860
TCTACTTGCT	GATCTATGAA	ACATAGATAA	<u>GCA</u> TGCAGGC	ATTCATCATA	GTTTTCTTTA
			Sph I		

1870	1880	1890	1900	1910	1920
TCTGGAAAAA	CATTAAATAT	GAAAGAAGCA	CTTTATTAAT	ACAGTTTAGA	TGTGTTTTGC

1930	1940	1950	1960	1970	1980
CATCTTTTAA	TTTCTTAAGA	AATACTAAGC	TGATGCAGAG	TGAAGAGTGT	GTGAAAAGCA

Afl II

1990	2000	2010	2020	2030	2040
GTGGTGCAGC	TTGGCTTGAA	CTCGTTCTCC	AGCTTGGGAT	CGACCTGCAG	GCATGCTTCC

Pst I      Sph I

2050	2060	2070	2080	2090	2100
ATGCCAAGGC	CCACACTGAA	ATGCTCAAAT	GGGAGACAAA	GAGATTAAGC	TCTTATGTAA

2110	2120	2130	2140	2150	2160
AATTTGCTGT	TTTACATAAC	TTTAATGAAT	GGACAAAGTC	TTGTGCATGG	GGGTGGGGGT

2170	2180	2190	2200	2210	2220
GGGGTTAGAG	GGGAACAGCT	CCAGATGGCA	AACATACGCA	AGGGATTTAG	TCAAACAAC

2230	2240	2250	2260	2270	2280
TTTTGGCAAA	GATGGTATGA	TTTTGTAATG	GGGTAGGAAC	CAATGAAATG	CGAGGTAAGT

2290	2300	2310	2320	2330	2340
ATGGTTAATG	ATCTACAGTT	ATTGGTTAAA	GAAGTATATT	AGAGCGAGTC	TTTCTGCACA

2350	2360	2370	2380	2390	2400
CAGATCACCT	TTCCTATCAA	CCCCGGGATC	CTGAGAACTT	CAGGGTGAGT	TTGGGGACCC

Sma I    Bam HI

2410	2420	2430	2440	2450	2460
TTGATTGTTC	TTTCTTTTTT	GCTATTGTAA	AATTCATGTT	ATATGGAGGG	GGCAAAGTTT


2470	2480	2490	2500	2510	2520
TCAGGGTGTT	GTTTAGAATG	GGAAGATGTC	CCTTGTATCA	CCATGGACCC	TCATGATAAT

Nco I

2530	2540	2550	2560	2570	2580
TTTGTTCCTT	TCACTTTCTA	CTCTGTTGAC	AACCATTGTC	TCCTCTTATT	TTCTTTTCAT

2590	2600	2610	2620	2630	2640
TTTCTGTAAC TTTTTCGTTA AACTTTAGCT TGCATTTGTA ACGAATTTTT AAATTCACCT					
2650	2660	2670	2680	2690	2700
TTGTTTATTT GTCAGATTGT <u>AAGTAC</u> TTTC TCTAATCACT TTTTTTCAA GGCAATCAGG					
		Sca I			
2710	2720	2730	2740	2750	2760
GTATATTATA TTGTACTTCA GCACAGTTTT AGAGAACAAAT TGTATAATT AAATGATAAG					
2770	2780	2790	2800	2810	2820
GTAGAATATT TCTGCATATA AATTCTGGCT GGCCTGGAAA TATTCTTATT GGTAGAAACA					
2830	2840	2850	2860	2870	2880
ACTACATCCT GGTCATCATC CTGCCTTTCT CTTTATGGTT ACAATGATAT ACACTGTTTG					
2890	2900	2910	2920	2930	2940
AGATGAGGAT AAAATACTCT GAGTCCAAAC <u>CGGGCCC</u> CTC TGCTAACCAT GTTCATGCCT					
			Apa I		
2950	2960	2970	2980	2990	3000
TCTTCTTTTT CCTACAGCTC CTGGGCAACG TGCTGGTTAT TGTGCTGTCT CATCATTTTG					
3010	3020	3030	3040	3050	3060
GCAAAGAATT <u>CCGATCC</u> ACT AGTAACGGCC GCCAGTGTGC TCTAAAGCGC GTATCGAAAG					
Eco RI		Spe I			hHBEGF mRNA
3070	3080	3090	3100	3110	3120
TGA CTGCTGGTGC CTCGCCGCCT CCTCTCGGTG CGGGACCA <u>ATG</u> AAGCTGCTGC CGTCGGTGGT					
			hHB-EGF cDNA		
3130	3140	3150	3160	3170	3180
GCTGAAGCTC TTTCTGGCTG <u>CAGT</u> TCTCTC GGCAGTGGTG ACTGGCGAGA GCCTGGAGCG					
		Pst I			
3190	3200	3210	3220	3230	3240
GCTTCGGAGA GGGCTAGCTG CTGGAACCAG CAACCCGGAC CCTCCCACTG TATCCACGGA					
		Nhe I			



3250	3260	3270	3280	3290	3300
<u>CCAGCTG</u> CTA CCCCTAGGAG GCGGCCGGGA CCGGAAAGTC CGTGA <u>CTTGC</u> AAGAGGC <u>AGA</u>					
PvuII				Bgl II	
3310	3320	3330	3340	3350	3360
<u>TCTGGAC</u> CTT TTGAGAGTCA CTTTATCCTC CAAGCCACAA GCACTGGCCA CACCAAACAA					
3370	3380	3390	3400	3410	3420
GGAGGAGCAC GGGAAAAGAA AGAAGAAAGG CAAGGGGCTA GGGAAGAAGA GGGACCCATG					
3430	3440	3450	3460	3470	3480
TCTTCGAAA TACAAGGACT TCTGCATCCA <u>TGGAGA</u> ATGC AAATATGTGA AGGAGCT <u>CCG</u>					
				Nco I                      Sac I	
3490	3500	3510	3520	3530	3540
GGCTCCCTCC TGCATCTGCC <u>ACCCGGG</u> TTA <u>CCATGG</u> AGAG AGGTGTCATG GGCTGAGCCT					
		Sma I	Nco I		
3550	3560	3570	3580	3590	3600
CCCAGTGGA AATCGCTTAT ATACCTATGA CCACACAACC ATCCTGGCCG TGGTGGCTGT					
3610	3620	3630	3640	3650	3660
GGTGCTGTCA TCTGTCTGTC TGCTGGTCAT CGTGGGGCTT CTCATGTTTA <u>GGTACC</u> ATAG					
					Kpn I
3670	3680	3690	3700	3710	3720
GAGAGGAGGT TATGATGTGG AAAATGAAGA GAAAGTGAAG TTGGGCATGA CTAATTCCCA					
3730	3740	3750	3760	3770	3780
 CTGAGAGAGA CTTGTGCTCA AGGAATCGGC TGGGGACTGC TACCTCTGAG AAGACACAAG					
3790	3800	3810	3820	3830	3840
GTGATTTTCA <u>G</u> <u>ACTGCAGG</u> TC <u>GACTTT</u> AGAG CACACTGGCG GCCG <u>GAA</u> TTT <u>C</u> ACTCCTCAGG					
		Pst I    Sal I	Eco RI		
3850	3860	3870	3880	3890	3900
TGCAGGCTGC CTATCAGAAG GTGGTGGCTG GTGTGGCCAA <u>TGCCCTGG</u> CT CACAAATACC					
Bst XI					

3910	3920	3930	3940	3950	3960
ACTGAGATCT	TTTTCCCTCT	GCCAAAAATT	ATGGGGACAT	CATGAAGCCC	CTTGAGCATC
Bgl II					
3970	3980	3990	4000	4010	4020
TGACTTCTGG	CTAATAAAGG	AAATTTATTT	TCATTGCAAT	AGTGTGTTGG	AATTTTTTGT
4030	4040	4050	4060	4070	4080
GTCTCTCACT	CGGAAGGACA	TATGGGAGGG	CAAATCATTT	AAAACATCAG	AATGAGTATT
4090	4100	4110	4120	4130	4140
TGGTTTAGAG	TTTGGCAACA	TATGCCATAT	GCTGGCTGCC	ATGAACAAAG	GTGGCTATAA
4150	4160	4170	4180	4190	4200
AGAGGTCATC	AGTATATGAA	ACAGCCCCCT	GCTGTCCATT	CCTTATTCCA	TAGAAAAGCC
4210	4220	4230	4240	4250	4260
TTGACTTGAG	GTTAGATTTT	TTTTATATTT	TGTTTTGTGT	TATTTTTTTC	TTTAACATCC
4270	4280	4290	4300	4310	4320
CTAAATTTT	CCTTACATGT	TTTACTAGCC	AGATTTTTTC	TCCTCTCCTG	ACTACTCCCA
4330	4340	4350	4360	4370	4380
GTCATAGCTG	TCCCTCTTCT	CTTATGAAGA	<u>TCTTATTAAA</u>	GCAGAACTTG	TTTATTGCAG
Bgl II					
4390	4400	4410	4420	4430	4440
CTTATAATGG	TTACAAATAA	AGCAATAGCA	TCACAAATTT	CACAAATAAA	GCATTTTTTT
4450	4460	4470	4480	4490	4500
CACTGCATTC	TAGTTGTGGT	TTGTCCAAAC	TCATCAATGT	ATCTTATCAT	<u>GTCTGGATCG</u>
Cla I					
4510	4520	4530	4540	4550	4560
<u>ATCCTCTACG</u>	CCGGACGCAT	CGTGGCCGGC	ATCACCGGCG	CCACAGGTGC	GGTTGCTGGC

4570	4580	4590	4600	4610	4620
GCCTATATCG	CCGACATCAC	CGATGGGGAA	GATCGGGGCTC	GCCACTTCGG	GCTCATGAGC
4630	4640	4650	4660	4670	4680
GCTTGTTTCG	GCGTGGGTAT	GGTGGCAGGC	CCCGTGGCCG	GGGACTGTT	GGGCGCCATC
4690	4700	4710	4720	4730	4740
TCCTTGCATG	CACCATTCCT	TGCGGCGGCG	GTGCTCAACG	GCCTCAACCT	ACTACTGGGC
Sph I					
4750	4760	4770	4780	4790	4800
TGCTTCCTAA	TGCAGGAGTC	GCATAAGGGA	GAGCGTCGAC	CTCGAGGGGG	GGCCCGGTAC
			Sal I	Xho I	Apa I   Kpn I

4810

C

## Ins-TR1 transgene sequence

10	20	30	40	50	60
TTAATTCGGC GCAGCACCAT <u>GGC</u> NTGAAAT AACNTCTGAA AGAGGAACTT GGTTAGCTTC					
Nco I					
70	80	90	100	110	120
TGAGGCGGAA AGAACCAGCT <u>GTG</u> GAATGTG TGTCAGTTAG GGTGTGGAAA GTCCCCAGGC					
Pvu II					
130	140	150	160	170	180
TCCCCAGCAG GCAGAAGTAT GCAAAGCATG <u>CCAATTCGAG</u> CTCGCCCCGAT CCTGGATCTC					
Sph I                      Sac I					
human Insulin promoter					
190	200	210	220	230	240
AGCTCCCTGG CCGACAACAC TGGCAAATC CTAATCATCC ACGAAGGCC TCCTGGGCAT					
250	260	270	280	290	300
GGTGGTCCTT CCCAGCCTGG CAGTCTGTTC CTCACACACC TTGTAGTGC CCAGCCCCTG					
310	320	330	340	350	360
AGGTTGCAGC TGGGGGTGTC TCTGAAGGGC TGTGAGCCCC CAGGAAGCCC TGGGGAAGTG					
PvuII					
370	380	390	400	410	420
CCTGCCTTGC CTCCCCCGG CCCTGCCAGC GCCTGGCTCT GCCCTCCTAC CTGGGCTCCC					
430	440	450	460	470	480
CCCATCCAGC CTCCCTCCCT ACACACTCCT CTCAAGGAGG CACCCATGTC CTCTCCAGCT					
Pvu II					
490	500	510	520	530	540
GCCGGGCCTC AGAGCACTGT GCGTCCTGG GGCAGCCACC GCATGTCCTG CTGTGGCATG					
550	560	570	580	590	600
GCTCAGGGTG GAAAGGGCGG AAGGGAGGGG <u>TCCTGCAGAT</u> AGCTGGTGCC CACTACCAAA					
Pst I					
610	620	630	640	650	660
CCCGCTCGGG GCAGGAGAGC CAAAGGCTGG GTGTGTGCAG AGCGGCCCCG AGAGGTTCCG					

670	680	690	700	710	720
AGGCTGAGGC	CAGGGTGGGA	CATAGGGATG	CGAGGGGCCG	GGGCACAGGA	TACTCCAACC
730	740	750	760	770	780
TGCGTGCCCC	<u>CATGGTCTCA</u>	TCCTCCTGCT	TCTGGACCTC	CTGATCCTGC	CCCTGGTGCT
Nco I					
790	800	810	820	830	840
AAGAGGCAGG	TAGGGGCTGC	<u>AGGCAGCAGG</u>	GCTCGGAGCC	CATGCCCCCT	<u>CACCATGGGT</u>
Pst I			Nco I		
850	860	870	880	890	900
CAGGCTGGAC	CTCCAGGTGC	CTGTTCTGGG	GAGCTGGGAG	GGCCGGAGGG	GTGTACCCCA
910	920	930	940	950	960
GGGGCTCAGC	CCAGATGACA	CTATGGGGGT	GATGGTGTCA	TGGGACCTGG	CCAGGAGAGG
970	980	990	1000	1010	1020
GGAGATGGGC	TCCCAGAAGA	GGAGTGGGGG	CTGAGAGGGT	GCCTGGGGGG	CCAGGACGGA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GCTGGGCCAG	TGCACAGCTT	CCCACACCTG	CCCACCCCCA	GAGTCCTGCC	GCCACCCCCA
1090	1100	1110	1120	1130	1140
GATCACACGG	AAGATGAGGT	CCGAGTGGCC	TGCTGAGGAC	TTGCTGCTTG	TCCCCAGGTC
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CCCAGGTCAT	GCCCTCCTTC	TGCCACCCTG	GGGAGCTGAG	<u>GGCCTCAGCT</u>	<u>GGGGCTGCTG</u>
Pvu II					
1210	1220	1230	1240	1250	1260
TCCTAAGGCA	GGGTGGGAAC	TAGGCAGCCA	GCAGGGAGGG	GACCCCTCCC	TCACTCCAC
1270	1280	1290	1300	1310	1320
TCTCCCACCC	<u>CCACCACCTT</u>	<u>GGCCATCCA</u>	<u>TGGCGGCATC</u>	TTGGGCCATC	CGGGACTGGG
Bst XI		Nco I			
1330	1340	1350	1360	1370	1380
GACAGGGGTC	CTGGGGACAG	GGGTCTGAGG	ACAGGGGTGT	GGGCACAGGG	GTCCTGGGGA

1390 1400 1410 1420 1430 1440  
CAGGGGTCTT GGGGACAGGG GTCCTGGGGA CAGGGGTCTG GGGACAGCAG CGCAAAGAGC

1450 1460 1470 1480 1490 1500  
CCCGCCCTGC AGCCTCCAGC TCTCCTGGTC TAATGTGGAA AGTGGCCCAG GTGAGGGCTT  
Pst I

1510 1520 1530 1540 1550 1560  
TGCTCTCCTG GAGACATTTG CCCCAGCTG TGAGCAGGGA CAGGTCTGGC CACCGGGCCC  
Pvu II Apa I

1570 1580 1590 1600 1610 1620  
CTGGTTAAGA CTCTAATGAC CCGCTGGTCC TGAGGAAGAG GTGCTGACGA CCAAGGAGAT  
Bgl II

1630 1640 1650 1660 1670 1680  
CTTCCACAG ACCCAGCACC AGGGAAATGG TCCGGAAATT GCAGCCTCAG CCCCAGCCA  
Bst XI

1690 1700 1710 1720 1730 1740  
TCTGCCGACC CCCCACCCC AGGCCCTAAT GGGCCAGGCG GCAGGGGTTG ACAGGTAGGG

1750 1760 1770 1780 1790 1800  
GAGATGGGCT CTGAGACTAT AAAGCCAGCG GGGGCCAGC AGCCCTCAGC CCTCCAGGAC  
Apa I

1810 1820 1830 1840 1850 1860  
AGGCTGCATC AGAAGAGGCC ATCAAGCAGG TCTGTTCCAA GGGCCTTTGC GTCAGGTGGG

1870 1880 1890 1900 1910 1920  
CTCAGGGTTC CAGGGTGGCT GGACCCAGG CCCAGCTCT GCAGCAGGGA GGACGTGGCT  
Pst I

1930 1940 1950 1960 1970 1980  
GGGCTCGTGA AGCATGTGGG GGTGAGCCCA GGGGCCCAA GGCAGGGCAC CTGGCCTTCA  
Apa I

1990 2000 2010 2020 2030 2040  
GCCTGCCTCA GCCCTGCCTG TCTCCAGAT CACTGTCTT CTGCAGGAAG CAGGGATCGG  
Pst I Bam HI

2050 2060 2070 2080 2090 2100  
ATCCTGAGAA CTTCAGGGTG AGTTTGGGGA CCCTTGATTG TTCTTTCTTT TTCGCTATTG

2110 2120 2130 2140 2150 2160  
TAAAATTCAT GTTATATGGA GGGGGCAAAG TTTTCAGGGT GTTGTTTAGA ATGGGAAGAT

2170 2180 2190 2200 2210 2220  
GTCCCTTGTA TCACCATGGA CCCTCATGAT AATTTTGTTC CTTTCACTTT CTA CTCTGT  
Nco I

2230 2240 2250 2260 2270 2280  
GACAACCATT GTCTCCTCTT ATTTTCTTTT CATTTTCTGT AACTTTTTTCG TTAAACTTTA

2290 2300 2310 2320 2330 2340  
GCTTGCACTT GTAACGAATT TTAAATTCA CTTTGTGTTA TTTGTCAGAT TGTAAGTACT  
Sca I

2350 2360 2370 2380 2390 2400  
TTCTCTAATC ACTTTTTTTT CAAGGCAATC AGGGTATATT ATATTGTACT TCAGCACAGT

2410 2420 2430 2440 2450 2460  
TTTAGAGAAC AATTGTTATA ATTAAATGAT AAGGTAGAAT ATTTCTGCAT ATAAATTCTG

2470 2480 2490 2500 2510 2520  
GCTGGCGTGG AAATATTCTT ATTGGTAGAA ACAACTACAT CCTGGTCATC ATCCTGCCTT

2530 2540 2550 2560 2570 2580  
TCTCTTTATG GTTACAATGA TATACTGT TTGAGATGAG GATAAAATAC TCTGAGTCCA

2590 2600 2610 2620 2630 2640  
AACCGGGCCC CTCTGCTAAC CATGTTTCATG CCTTCTTCTT TTTCTACAG CTCCTGGGCA  
Apa I

2650 2660 2670 2680 2690 2700  
ACGTGCTGGT TATTGTGCTG TCTCATCATT TTGGCAAAGA ATTGATCCGG GAAGCTTGTG  
Hin dIII

2710 2720 2730 2740 2750 2760  
ACTGGTGCCT CGCCGCCTCC TCTCGGTGCG GGACCATGAA GCTGCTGCCG TCGGTGGTGC  
human HB-EGF cDNA

2770 2780 2790 2800 2810 2820  
TGAAGCTCTT TCTGGCTGCA GTTCTCTCGG CACTGGTGAC TGGCGAGAGC CTGGAGCGGC  
Pst I

2830	2840	2850	2860	2870	2880
TTCGGAGAGG <u>GCTAGCT</u> GCT GGAACCAGCA ACCCGGACCC TCCCACTGTA TCCACGGACC					
NheI			Pvu II		
2890	2900	2910	2920	2930	2940
<u>AGCTG</u> CTACC CCTAGGAGGC GGCCGGGACC GGAAAGTCCG TGA CTTGCAA GAGGC <u>AGATC</u>					
Bgl II					
2950	2960	2970	2980	2990	3000
<u>TGACCTTTT</u> GAGAGTCACT TTATCCTCCA AGCCACAAGC ACTGGCCACA CCAAACAAGG					
3010	3020	3030	3040	3050	3060
AGGAGCACGG GAAAAGAAAG AAGAAAGGCA AGGGGCTAGG GAAGAAGAGG GACCCATGTC					
3070	3080	3090	3100	3110	3120
TTCGGAAATA CAAGGACTTC TGCATCCATG <u>GAGAATG</u> CAA ATATGTGAAG <u>GAGCTCCGGG</u>					
Nco I			Sac I		
3130	3140	3150	3160	3170	3180
CTCCCTCCTG CATCTGCCAC <u>CCGGGTTACC</u> ATGGAGAGAG GTGTCATGGG CTGAGCCTCC					
Sma I		Nco I			
3190	3200	3210	3220	3230	3240
CAGTGGAAAA TCGCTTATAT ACCTATGACC ACACAACCAT CCTGGCCGTG GTGGCTGTGG					
3250	3260	3270	3280	3290	3300
TGCTGTCATC TGTCTGTCTG CTGGTCATCG TGGGGCTTCT CATGTTTAGG <u>TACCATAGGA</u>					
Kpn I					
3310	3320	3330	3340	3350	3360
GAGGAGGTTA TGATGTGGAA AATGAAGAGA AAGTGAAGTT GGGCATGACT AATTCCAC <u>T</u>					
3370	3380	3390	3400	3410	3420
<u>GAGAGAGACT</u>	TGTGCTCAAG	GAATCGGCTG	GGGACTGCTA	CCTCTGAGAA	GACACAAGGT
3430	3440	3450	3460	3470	3480
GATTTGAGAC <u>TGCAGGTCGA</u> <u>CTTTAGAGCA</u> CACTGGCGGC <u>CGGAATT</u> CAC TCCTCAGGTG					
Pst I		Sal I		Eco RI	



3490 3500 3510 3520 3530 3540  
 CAGGCTGCCT ATCAGAAGGT GGTGGCTGGT GTGGCCAATG CCCTGGCTCA CAAATACCAC  
 Bst XI

3550 3560 3570 3580 3590 3600  
 TGAGATCTTT TTCCCTCTGC CAAAAATTAT GGGGACATCA TGAAGCCCCT TGAGCATCTG  
 Bgl II

3610 3620 3630 3640 3650 3660  
 ACTTCTGGCT AATAAAGGAA ATTTATTTTC ATTGCAATAG TGTGTTGGAA TTTTTTGTGT

3670 3680 3690 3700 3710 3720  
 CTCTCACTCG GAAGGACATA TGGGAGGGCA AATCATTTAA AACATCAGAA TGAGTATTG

3730 3740 3750 3760 3770 3780  
 GTTTAGAGTT TGGCAACATA TGCCATATGC TGGCTGCCAT GAACAAAGGT GGCTATAAAG

3790 3800 3810 3820 3830 3840  
 AGGTCATCAG TATATGAAAC AGCCCCCTGC TGTCCATTCC TTATTCCATA GAAAAGCCTT

3850 3860 3870 3880 3890 3900  
 GACTTGAGGT TAGATTTTTT TTATATTTTG TTTTGTGTTA TTTTTTCTT TAACATCCCT

3910 3920 3930 3940 3950 3960  
 AAAATTTTCC TTACATGTTT TACTAGCCAG ATTTTCTCTC CTCTCCTGAC TACTCCCAGT

3970 3980 3990 4000 4010 4020  
 CATAGCTGTC CCTCTTCTCT TATGAAGATC TTATTAAAGC AGAACTTGTT TATTGCAGCT  
 Bgl II

4030 4040 4050 4060 4070 4080  
 TATAATGGTT ACAAATAAAG CAATAGCATC ACAAATTTCA CAAATAAAGC ATTTTTTTCA

4090 4100 4110 4120 4130 4140  
 CTGCATTCTA GTTGTGGTTT GTCCAACTC ATCAATGTAT CTTATCATGT CTGGATCGAT  
 Cla I

4150 4160 4170 4180 4190 4200  
 CCTCTACGCC GGACGCATCG TGGCCGGCAT CACCGGCGCC ACAGGTGCGG TTGCTGGCGC

4210	4220	4230	4240	4250	4260
CTATATCGCC	GACATCACCG	ATGGGGAAGA	TCGGGCTCGC	CACTTCGGGC	TCATGAGCGC
4270	4280	4290	4300	4310	4320
TTGTTTCGGC	GTGGGTATGG	TGGCAGGCCC	CGTGGCCGGG	GGA CTGTTGG	GCGCCATCTC
4330	4340	4350	4360	4370	4380
CTTGCATGCA	CCATTCCTTG	CGGCGGCGGT	GCTCAACGGC	CTCAACCTAC	TACTGGGCTG
Sph I					
4390	4400	4410	4420	4430	4440
CTTCCTAATG	CAGGAGTCGC	ATAAGGGAGA	GCCTCGACCT	CGAGGGGGGG	CCCGGTACC
			Sal I	Xho I	Apa I   Kpn I

## 参考文献

al-Shawi, R., Burke, J., Wallace, H., Jones, C., Harrison, S., Buxton, D., Maley, S., Chandley, A. and Bishop, J. O. (1991). The herpes simplex virus type 1 thymidine kinase is expressed in the testes of transgenic mice under the control of a cryptic promoter. *Mol Cell Biol* 11, 4207-16.

Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H. et al. (2002). Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med* 8, 35-40.

Behringer, R. R., Mathews, L. S., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. (1988). Dwarf mice produced by genetic ablation of growth hormone-expressing cells. *Genes Dev* 2, 453-61.

Borrelli, E., Heyman, R., Hsi, M. and Evans, R. M. (1988). Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7572-6.

Breitman, M. L., Clapoff, S., Rossant, J., Tsui, L. C., Glode, L. M., Maxwell, I. H. and Bernstein, A. (1987). Genetic ablation: targeted expression of a toxin gene causes microphthalmia in transgenic mice. *Science* 238, 1563-5.

Chen, C. A. and Okayama, H. (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6, 632-8.

Draper, R. K. and Simon, M. I. (1980). The entry of diphtheria toxin into the mammalian cell cytoplasm: evidence for lysosomal involvement. *J Cell Biol* 87, 849-54.

Han, J. H., Stratowa, C. and Rutter, W. J. (1987). Isolation of full-length putative rat lysophospholipase cDNA using improved methods for mRNA isolation and cDNA cloning. *Biochemistry* 26, 1617-25.

Heyman, R. A., Borrelli, E., Lesley, J., Anderson, D., Richman, D. D., Baird, S. M., Hyman, R. and Evans, R. M. (1989). Thymidine kinase obliteration: creation of transgenic mice with controlled immune deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86,

2698-702.

Higashiyama, S., Abraham, J. A., Miller, J., Fiddes, J. C. and Klagsbrun, M. (1991). A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 251, 936-9.

Honjo T, N. Y., Hayaishi O. (1968). Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem.* 243(12), 3553-5.

Hori, Y., Rulifson, I. C., Tsai, B. C., Heit, J. J., Cahoy, J. D. and Kim, S. K. (2002). Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16105-10.

Hotta, M., Tashiro, F., Ikegami, H., Niwa, H., Ogihara, T., Yodoi, J. and Miyazaki, J. (1998). Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *J Exp Med* 188, 1445-51.

Ishii-Kanei, C., Uchida, T. and Yoneda, M. (1979). Isolation of a cured strain from *Corynebacterium diphtheriae* PW8. *Infect Immun* 25, 1081-3.

Iwamoto, R., Higashiyama, S., Mitamura, T., Taniguchi, N., Klagsbrun, M. and Mekada, E. (1994). Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *EMBO J* 13, 2322-30.

Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F. et al. (2002). In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17, 211-20.

Kaneko, S., Hikida, T., Watanabe, D., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kreitman, R. J., Pastan, I. and Nakanishi, S. (2000). Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science* 289, 633-7.

Kiso, S., Kawata, S., Tamura, S., Higashiyama, S., Ito, N., Tsushima, H., Taniguchi, N. and Matsuzawa, Y. (1995). Role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a hepatotrophic factor in rat liver regeneration after partial hepatectomy.

*Hepatology* 22, 1584-90.

Kobayashi, K., Morita, S., Sawada, H., Mizuguchi, T., Yamada, K., Nagatsu, I., Fujita, K., Kreitman, R. J., Pastan, I. and Nagatsu, T. (1995). Immunotoxin-mediated conditional disruption of specific neurons in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1132-6.

Kobayashi, K., Ohye, T., Pastan, I. and Nagatsu, T. (1996). A novel strategy for the negative selection in mouse embryonic stem cells operated with immunotoxin-mediated cell targeting. *Nucleic Acids Res* 24, 3653-5.

Kohno, K., Uchida, T., Mekada, E. and Okada, Y. (1985). Characterization of diphtheria-toxin-resistant mutants lacking receptor function or containing nonribosylatable elongation factor 2. *Somat Cell Mol Genet* 11, 421-31.

Kohno, K., Uchida, T., Ohkubo, H., Nakanishi, S., Nakanishi, T., Fukui, T., Ohtsuka, E., Ikehara, M. and Okada, Y. (1986). Amino acid sequence of mammalian elongation factor 2 deduced from the cDNA sequence: homology with GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4978-82.

Lowell, B. B., V, S. S., Hamann, A., Lawitts, J. A., Himms-Hagen, J., Boyer, B. B., Kozak, L. P. and Flier, J. S. (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 366, 740-2.

Mathews, C. E., Langley, S. H. and Leiter, E. H. (2002). New mouse model to study islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus. *Transplantation* 73, 1333-6.

Means AL, R. K., Singh AB, Washington MK, Whitehead RH, Harris RC Jr, Wright CV, Coffey RJ Jr, Leach SD. (2003). Overexpression of heparin-binding EGF-like growth factor in mouse pancreas results in fibrosis and epithelial metaplasia. *Gastroenterology*. 124(4), 1020-36.

- Mekada, E., Kohno, K., Ishiura, M., Uchida, T. and Okada, Y. (1982). Methylamine facilitates demonstration of specific uptake of diphtheria toxin by CHO cell and toxin-resistant CHO cell mutants. *Biochem Biophys Res Commun.* 109(3), 792-9.
- Mekada, E., Okada, Y. and Uchida, T. (1988). Identification of diphtheria toxin receptor and a nonproteinous diphtheria toxin-binding molecule in Vero cell membrane. *J Cell Biol* 107, 511-9.
- Mitamura, T., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Klagsbrun, M. and Mekada, E. (1995). Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J Biol Chem* 270, 1015-9.
- Moskaug, J. O., Stenmark, H. and Olsnes, S. (1991). Insertion of diphtheria toxin B-fragment into the plasma membrane at low pH. Characterization and topology of inserted regions. *J Biol Chem* 266, 2652-9.
- Naglich, J. G., Metherall, J. E., Russell, D. W. and Eidels, L. (1992). Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* 69, 1051-61.
- Palmiter, R. (2001). Interrogation by toxin. *Nat Biotechnol* 19, 731-2.
- Palmiter, R. D., Behringer, R. R., Quaife, C. J., Maxwell, F., Maxwell, I. H. and Brinster, R. L. (1987). Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene. *Cell* 50, 435-43.
- Pappenheimer, A. M., Jr. (1977). Diphtheria toxin. *Annu Rev Biochem* 46, 69-94.
- Pappenheimer, A. M., Jr., Harper, A. A., Moynihan, M. and Brockes, J. P. (1982). Diphtheria toxin and related proteins: effect of route of injection on toxicity and the determination of cytotoxicity for various cultured cells. *J Infect Dis* 145, 94-102.
- Rhim, J. A., Sandgren, E. P., Degen, J. L., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. (1994). Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 263,

1149-52.

Rhim, J. A., Sandgren, E. P., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. (1995). Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4942-6.

Ross, S. R., Graves, R. A. and Spiegelman, B. M. (1993). Targeted expression of a toxin gene to adipose tissue: transgenic mice resistant to obesity. *Genes Dev* 7, 1318-24.

Saito, M., Iwawaki, T., Taya, C., Yonekawa, H., Noda, M., Inui, Y., Mekada, E., Kimata, Y., Tsuru, A. and Kohno, K. (2001). Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 19, 746-50.

Sandgren, E. P., Palmiter, R. D., Heckel, J. L., Daugherty, C. C., Brinster, R. L. and Degen, J. L. (1991). Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 66, 245-56.

Sandvig, K. and Olsnes, S. (1980). Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J Cell Biol* 87, 828-32.

Tsuneoka, M., Nakayama, K., Hatsuzawa, K., Komada, M., Kitamura, N. and Mekada, E. (1993). Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *J Biol Chem* 268, 26461-5.

Umata, T., Moriyama, Y., Futai, M. and Mekada, E. (1990). The cytotoxic action of diphtheria toxin and its degradation in intact Vero cells are inhibited by bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase. *J Biol Chem* 265, 21940-5.

Valdizan, E. M., Loukianov, E. V. and Olsnes, S. (1995). Induction of toxin sensitivity in insect cells by infection with baculovirus encoding diphtheria toxin receptor. *J Biol Chem* 270, 16879-85.

Watanabe, D., Inokawa, H., Hashimoto, K., Suzuki, N., Kano, M., Shigemoto, R., Hirano, T., Toyama, K., Kaneko, S., Yokoi, M. et al. (1998). Ablation of cerebellar Golgi cells disrupts synaptic integration involving GABA inhibition and NMDA receptor

activation in motor coordination. *Cell* 95, 17-27.

Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T. and Okada, Y. (1978). One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* 15, 245-50.

河野憲二、斉藤美知子、岩脇隆夫、木俣行雄（1998）ジフテリア毒素を用いた細胞機能の解析． 蛋白質 核酸 酵素 43, 11-24

斉藤美知子、河野憲二（2001）毒素受容体を利用した新しい細胞ノックアウト法 TRECK - 肝炎モデルマウスの作製と応用 - 実験医学 19（17）2306-2308

斉藤美知子（1996）毒素受容体遺伝子の肝細胞特異的発現による劇症肝炎モデルマウス作成の試み 奈良先端科学技術大学院大学修士論文（修士論文番号 9471058）

岩脇隆夫（1997）動物個体内での組織特異的細胞ノックアウト法の開発 奈良先端科学技術大学院大学修士論文（修士論文番号 9571016）

古川智久（2003）改良型ジフテリア毒素受容体の作成と解析 奈良先端科学技術大学院大学修士論文（修士論文番号 0171095）

木村泰子（2004）ジフテリア毒素免疫寛容マウスの作製～毒素受容体を介した細胞ノックアウト法の改良～ 奈良先端科学技術大学院大学修士論文（修士論文番号 0271045）