

論文内容の要旨

申請者氏名 木村 泰子

これまでにジフテリア毒素 (DT) とその受容体を用いた新規細胞ノックアウト法である TRECK (Toxin Receptor-mediated Cell Knockout) 法を開発した。TRECK 法では、DT に対する感受性が低いマウスにおいて、組織特異的に DT 受容体であるヒトのヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (hHB-EGF) を発現させることで、DT 投与量や投与時期依存的に特定の組織にのみ障害を与えることが可能になる。実際に、これまで TRECK 法を用いた肝炎モデルや糖尿病モデルマウスの取得に成功しており、その有用性が証明されている。

しかし TRECK 法には、まだいくつかの解決すべき課題が残されている。その一つが、DT の連続投与により、マウスが体内に抗 DT 抗体を産生することである。再生可能な組織や DT の届きにくい組織を標的にする場合には、DT の連続投与が必要になる場合が想定されるが、DT はマウスにとって異種タンパク質であるため、連続投与を行うとマウスは毒素に対する中和抗体を産生する恐れがある。そのため、投与した DT が抗体により中和され効率の良い組織破壊が出来なくなってしまう可能性が考えられる。そこで、この点を改善するために活性を消失した変異型 DT を発生初期よりサイトゾルで発現させることで、DT を自己タンパク質として認識する DT 免疫寛容マウスの作製を試みた。

酵母や培養細胞で過剰発現させ、タンパク質合成量を測定することにより細胞毒性が低下していることが明らかになった K51E/E148K 変異型 DT を CMV/ β アクチンプロモーター制御下で発現するトランスジェニックマウスを作製した。取得した 23 ラインのうち 4 ラインで、変異型 DT の発現をタンパク質レベルで確認することができた。さらに DT を免疫した場合、野生型マウスでは中和抗体を産生しているのに対して、変異型 DT 発現マウスでは、抗 DT 抗体の産生は認められず、DT に対する免疫寛容を獲得していることが明らかになった。

さらに、TRECK 法による新たなモデルマウスとして骨粗鬆症モデルマウスの作製を行った。骨粗鬆症は今日の高齢化社会において重要な疾患の一つであり、モデルマウスのより簡便な取得が望まれている。骨は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が起こることで常にリモデリングが行われていることが知られている。そこで、骨芽細胞特異的にダメージを与えることで骨のリモデリングのバランスを崩すことにより骨粗鬆症を誘発させる TRECK 法を用いた骨粗鬆症モデルマウスの取得を試みた。骨組織特異的に hHB-EGF を発現することが明らかになったマウスに 1 ヶ月間 10 μ g/kg の DT を 3 日毎に連続投与すると、骨芽細胞が消失することが免疫染色によって明らかになった。しかし、同時に中和抗体を産生する個体が存在したため、上記免疫寛容マウスの利用も含めて検討を行った。これにより、長期間に渡る DT 投与を可能になり、容易に病態を再現できることができると考えられる。その結果、DT 免疫寛容マウスの有用性が示され、今後幅広い組織での TRECK 法の応用がなされることを期待している。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 木村 泰子

本論文は2つの大きな研究からなりたっている。1つは毒素受容体を利用した標的細胞ノックアウト法 (TRECK 法) により作製した TRECK-Tg マウスに、大量かつ長期のジフテリア毒素 (DT) を投与できるように、DT 免疫寛容マウスを作製した研究であり、後半の研究は、骨芽細胞特異的に TRECK 法を応用したマウスを作製し骨粗鬆症モデルマウス作製を目指した研究である。

申請者は DT の長期投与をしても、DT に対する自己抗体のできない DT 免疫寛容マウスの樹立を試みた。DT に対する免疫寛容を得るために、毒性のない変異型毒素を細胞質ゾルで発現するマウスを樹立することを考え、まず毒性を全く示さない DT の検討を行った。CRM197 と K51E/E148K に2重変異 DT のフラグメント A をサイトゾルに過剰発現する実験により毒性を検定したが、予想に反し無毒であると報告されていた CRM197 に毒性があること、一方 K51E/E148K の2重変異 DT は全く毒性を示さないという新知見を得た。この無毒型毒素は、従来無毒ということで臨床への応用を検討している CRM197 に代わる、安全な毒素となる可能性を秘めている。

次に DT(K51E/E148K)を細胞内で発現する Tg マウスを作製したところ、毒素を全身で発現するマウスを4系統得ることができた。これらのマウスは期待通り DT に対し免疫寛容を示すことが明らかとなり、目的の DT 免疫寛容マウスを樹立することに成功した。後半は TRECK 法を用いた、骨粗鬆症モデルマウス樹立の試みである。骨粗鬆症は骨組織形成を担う骨芽細胞と骨分解を担う破骨細胞とのバランスの不均衡により生じることが知られている。骨芽細胞を破壊することにより骨粗鬆症を誘発するために、骨芽細胞特異的なオステオカルシンプロモーター下流に毒素受容体遺伝子をつないだトランスジーンを用いて TRECK-Tg マウスを作製した。骨芽細胞を破壊するために 10 μ g/kg DT を3日おきに腹腔投与すると1ヶ月後に骨芽細胞が破壊されていることを組織染色により確認したが、骨粗鬆症の顕著な表現型はまだ現れていず、さらなる連続投与が必要と考えられた。一部のマウスはすでに抗 DT 中和抗体が生成していることを考えると、このマウス系統で骨粗鬆症症状を起こすためには、前半で作製した毒素免疫寛容形質を導入したマウスを利用すべきと考えられる。

以上のように、本論文は、完全に毒性を失活したジフテリア毒素変異を同定すると共に、その無毒型変異毒素を利用して新しく毒素免疫寛容マウスを樹立したもので、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。