

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	自然発症糖尿病モデルマウス樹立とモノアミンを介した膵臓発生機序の解明
Title(English)	
著者(和文)	井上愛里
Author(English)	Airi Inoue
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12429号, 授与年月日:2023年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:糸 昭苑,白木 伸明,川上 厚志,田口 英樹,廣田 順二
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12429号, Conferred date:2023/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 (工学)	Doctor of
学生氏名： Student's Name	井上 愛里		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	糸 昭苑	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)	白木 伸明	

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

糖尿病は膵β細胞から分泌されるインスリンの分泌不全やインスリンの感受性低下により発症する。重篤な患者には膵臓または膵島の移植が必要となる。しかし、ドナー不足という問題がある。そこで、その問題の解決策として注目されているのが、多能性幹細胞を用いた再生医療である。本研究では、以下2つの観点から多能性幹細胞を用いた移植治療法確立を目指した。

重度免疫不全自然発症糖尿病モデルマウス樹立

【背景】

多能性幹細胞から分化誘導した膵β細胞の機能評価は、糖尿病モデル動物に移植して高血糖状態の改善効果で行う。これまでインスリン遺伝子の変異 (*Ins2*^{96Y}、Akita 変異) に起因する自然発症糖尿病の Akita マウスが利用されてきた (Yoshioka et al., 1997) が、ヒト細胞の移植評価には、免疫不全マウスを用いることでより異種細胞が生着しやすいと考えた。そこで、遺伝子編集技術 CRISPR-Cas9 システムにより高度免疫不全マウス (BRJ : Balb/c マウスに Rag2^{-/-}、Jak3^{-/-}) (Okada et al., 2011) に Akita 変異を導入することで新たなマウス系統の樹立を試みた。

【方法と結果】

ヒト腫瘍生着実績のある BRJ マウスに Akita 変異 *Ins2*^{96Y} の導入を試みる過程で非相同末端組み換えによって *Ins2*^{Q104del1} 変異を持つマウス (Kuma マウス) を得た。Kuma ヘテロ接合体は3週齢頃から血糖が上昇していた。そこで、マウス単離膵島のグルコース刺激インスリン分泌を調べたところ、4週齢より Kuma ヘテロ接合体のインスリン分泌は著しく低かった。次に、グルコース濃度依存インスリン分泌能を持つマウスインスリノーマ6細胞に野生型と Kuma 変異型のプレプロインスリン-HaloTag 融合タンパク質を強制発現し、ウェスタンブロッティングにより解析した。野生型のインスリンとプロインスリントタンパク質は時間と共に蓄積したが、Kuma 変異型インスリンとプロインスリントタンパク質は経時的に分解されていくことが示唆された。

【考察と展望】

Kuma マウスはヘテロ接合体で糖尿病を発症するため、Kuma 変異型インスリントタンパク質がドミナントネガティブ作用を持つと考えている。また、Kuma マウスは3週齢頃より血糖値上昇が始まるため、3週齢以前の膵β細胞の細胞増殖と細胞死、成熟度が変化しているか検証していきたい。

モノアミンを介した膵臓発生機序の解明

【背景】

近年の再生医療研究では、ヒト膵島と同等のインスリン分泌能をもつ膵β細胞が作成可能となった。一方で膵臓の他の細胞も分化誘導し、かつ臓器を作成できればより生体に近い機能獲得ができると考えている。当研究室では、マウス胚性幹細胞の膵β細胞への分化過程で VMAT2 (小胞モノアミントランスポーター2) による分泌小胞へのモノアミン貯留を明らかにした (Sakano et al., 2014)。貯留したモノアミンは膵前駆細胞から内分泌前駆細胞への分化を負に制御した。しかし、生体でその制御機構が保存されているかは不明であるため、マウス発生期におけるモノアミンを介した制御機構を調べた。

【方法と結果】

胎生 12.5 日目の膵原基を VMAT2 阻害剤 Tetrabenazine (TBZ) 存在下で7日間培養した。免疫組織化学による解析は、膵β細胞量の増加と膵管構造の複雑化を示した。そこで、膵臓構造形成に対する影響を検証するため、胎生 12.5 日目の膵原基を TBZ 存在下で2日間培養しその膵管構造を解析したところ、膵管の分岐点が増加した。その効果が膵臓細胞由来か検証するため、胎生 12.5 日目の膵原基を免疫組織化学で解析した。ドパミン合成酵素 Tyrosine hydroxylase と Aromatic and L-amino acid Decarboxylase (AADC) 二重陽性細胞が VMAT2 を発現しており、ドパミン合成と貯蔵が可能な細胞が観察された。また、その細胞は膵β細胞マーカーのインスリンと膵α細胞マーカーのグルカゴンも発現していたので、膵臓細胞であることも分かった。そこで、RNA シーケンシングを行った結果、Antioxidant activity の遺伝子群が TBZ 阻害で有意に変化していた。VMAT2 阻害下など正常なモノアミンの取り込みができない場合、細胞質でモノアミンオキシダーゼによるモノアミン分解とそれに伴う ROS 産生が起こる。膵原基の Reactive oxygen species (ROS) 含量を検証したところ、コントロールでは AADC 陽性細胞

胞の ROS 含量が高く、その細胞周辺で遠位の細胞ほど ROS 含量が低くなる濃度勾配ができていた。その ROS 含量が高い細胞を避けるように膵管細胞が形成されていた。一方、VMAT2 阻害下では ROS の濃度勾配が失われており、膵管構造の抑制機構も失われていた。

【考察と展望】

VMAT2 陽性細胞を中心に ROS の濃度勾配が形成され、膵管の過形成を抑制していた。VMAT2 阻害は濃度勾配を消失させた。モノアミンの受け渡しを介して細胞内 ROS 濃度を制御することにより、VMAT2 が膵臓構造形成を規定していると考えている。今後は、ROS がどのように膵臓構造形成を規定しているかを調べたい。

本研究では糖尿病移植治療を目指して、2つの観点から研究を進めた。

ヒト iPS 細胞から膵β細胞に分化誘導する際に、生体内の発生を理解し、その知見を用いてより効率よく分化誘導を行うため、モノアミンを介した膵臓発生機序の解明を行った。今回モノアミンによる ROS 産生を介して膵臓の立体構造形成機構があることを示した。この機構をヒト iPS 細胞分化系で再現することで、より生体に近い遺伝子発現やより効率的な内分泌細胞分化が可能であるか検討したい。

また、今回高度免疫不全自然発症糖尿病モデルマウス Kuma マウスを樹立した。このマウスはインスリン治療可能であった。ヒト iPS 細胞から分化培養した膵β細胞を Kuma マウスに移植し、その血糖改善効果で生体内の機能を評価したい。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース：	生命理工学	系
Department of, Graduate major in	生命理工学	コース
学生氏名：	井上 愛里	
Student's Name		

申請学位 (専攻分野)：	博士	(工学)
Academic Degree Requested	Doctor of	
指導教員 (主)：	糸 昭苑	
Academic Supervisor(main)		
指導教員 (副)：	白木 伸明	
Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

This presentation consists of two parts to aim establishing treatment of diabetes.

Theme 1 : Establishment of a diabetic model mouse

The function of pancreatic β -cells derived from pluripotent stem cells is evaluated by transplanting them into diabetic model animals. Here, we attempted to establish a new diabetic mouse model which has a higher engraftment efficiency by introducing the Akita mutation (*Ins2⁹⁶¹*) (Yoshioka et al., 1997) into severe immunodeficient mice (BRJ: Balb/c mice with Rag2-/- and Jak3-/-) (Okada et al., 2011) by CRISPR-Cas9 system. We obtained mice with the *Ins2^{Q104del}* mutation (Kuma mice) in the process of introducing the Akita mutation. Glucose-stimulated insulin secretion ability of the islets from Kuma heterozygotes was markedly lower than those from the wild-type mice at 4 weeks-old. HaloTag was fused to C-term of wild-type or Kuma mutant preproinsulin and overexpressed in mouse insulinoma 6 cells. Then, protein stability was monitored by western blotting. Compared to the wild-type proinsulin and insulin proteins that accumulated over time, Kuma mutant proinsulin and insulin proteins were degraded. Therefore, the Kuma mutant insulin protein has a dominant-negative effect. In the future, the impact of Kuma mutation on the maturation of β -cells should be determined.

Theme 2 : Elucidation of the mechanism of monoamine regulating pancreatic development

Intracellular monoamine storage by vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) negatively regulated the differentiation of mouse embryonic stem cells into pancreatic β -cells (Sakano et al., 2014). Here, I investigated the regulatory mechanism mediated by monoamine during mouse development, as I believe its understanding will lead to applications in regenerative medicine.

Pancreatic buds at E12.5 were cultured in the presence of VMAT2 inhibitor for 2 days. Their ductal structure showed an increase in branching points. AADC-positive cells, which also expressed VMAT2 as revealed in previous results, had high Reactive oxygen species (ROS) accumulation. Ducts were formed at regions away from cells showing high ROS activity, seemingly avoiding high ROS. In contrast, under VMAT2 inhibition, cells showing high ROS disappeared, and the suppression of the pancreatic duct also disappeared. I hypothesize that VMAT2 regulates pancreatic structural formation by controlling intracellular ROS concentration through monoamine delivery. Based on these results, we would like to investigate how ROS regulates pancreatic structure formation as a next topic.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).