

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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

(博士課程)

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	井上 愛里	
論文審査 審査員		氏名	職名	氏名	職名
	主査	条 昭苑	教授	廣田 順二	教授
	審査員	白木 申明	准教授		
		田口 英樹	教授		
川上 厚志		准教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「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」と題し、四章より構成されている。

第一章「序言」では、本研究の背景について、多能性幹細胞を用いた移植治療法確立につなげるため、2つの課題を進めたという本研究の目的についても述べている。

第二章「自然発症糖尿病モデルマウス樹立」では、これまで糖尿病の治療評価に用いられてきた自然発症糖尿病 Akita マウスのインスリン遺伝子変異 (*Ins2^{C96Y}*) を高度免疫不全マウス (BRJ : Balb/c マウスに *Rag2^{-/-}*、*Jak3^{-/-}*) に導入することにより、ヒト iPS 細胞から作成した膵島の生着率を高めることを目的とした新たなマウス系統を樹立について述べられている。遺伝子編集技術 CRISPR-Cas9 システムによる *Ins2^{C96Y}* 変異導入の過程で、非相同末端組み換えによって目的とは異なっていたものの新たに *Ins2^{Q104del}* 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おり、4 週齢 Kuma ヘテロ接合体の単離膵島におけるグルコース刺激インスリン分泌能は著しく損なわれていた。そこで、マウス膵臓β細胞株のインスリノーマ 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、ウエスタンブロッティングにより解析した。野生型は時間と共に蓄積したが、Kuma 変異型インスリン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。Kuma マウスはヘテロ接合体で糖尿病を発症することから、*Ins2^{Q104del}* 変異インスリンタンパク質はドミナントネガティブ作用を持つと考えられ、それはタンパク質の安定性に起因する可能性があるとして述べている。

第三章「モノアミンを介した膵臓発生機序の解明」では、マウス胚性幹細胞の膵β細胞への分化過程で VMAT2 (小房型モノアミントランスポーター2) によって分泌小胞へ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するという本稿の研究背景を述べているとともに、発生期におけるモノアミンの作用とその制御機構を調べることを目的としたことを述べている。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、免疫組織化学による解析の結果、膵β細胞量の増加と膵管構造の複雑化がみられたと述べている。そこで、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ことを述べている。胎生 12.5 日目の膵原基を免疫組織化学で解析したところ、ドパミン合成酵素が VMAT2 を発現しており、ドパミン合成と貯蔵が可能な細胞が存在していることを示すとともに、その細胞がインスリンとグルカゴンの両方を発現する発生初期に現れる膵臓細胞であることを確認している。VMAT2 阻害下など正常なモノアミンが小胞内へ取り込まれない場合、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。そこで、膵原基の Reactive oxygen species (ROS) 含量を検証したところ、コントロールではドパミン合成酵素を発現する細胞の ROS 含量が高く、より遠位の細胞ほど ROS 含量が低くなる濃度勾配ができており、この ROS 濃度勾配を避けるように膵臓領域が形成される。一方で、VMAT2 阻害下では ROS の濃度勾配が消失し、膵臓領域の抑制機構も失われていたことを述べている。これらの結果は、VMAT2 を介したモノアミン分泌制御によって生じる ROS 濃度勾配が、膵臓領域拡大を抑制することを示唆していると述べている。

第四章「結語」では、本論文の要点を総括し、本研究の意義と今後の展望を述べている。

以上を要するに、本論文は重度免疫不全糖尿病モデル Kuma マウスがヒト iPS 細胞由来の膵島細胞を移植評価するモデルとして有用であることを示すとともに、胎生期の膵臓細胞のモノアミン受け渡しを介した ROS の濃度勾配形成が膵臓予定領域を決定することを明らかにした。これらの知見は、ヒト多能性幹細胞由来膵島の作成ならびにその評価に資するものであり、新たな細胞治療法につながると期待され、工学上ならびに工業上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。