

課題番号 : 29指1001
研究課題名 : 細胞移植療法による次世代糖尿病治療法開発に不可欠な糖尿病モデル動物の開発
主任研究者名 : 岡村匡史
分担研究者名 : 岡村匡史、佐々木えりか、霜田雅之

キーワード : ゲノム編集、糖尿病、マーモセット、NOG マウス、ベータ細胞補充療法
研究成果 :

インスリン投与によっても血糖コントロールが困難な患者への細胞移植療法は、次世代の糖尿病治療法として期待されている。特に膵島移植は、低侵襲な移植医療として期待されているが、絶対的なドナー不足が問題である。細胞移植療法による糖尿病治療法開発には、実験動物を用いた移植細胞の有効性・安全性の評価データが必須である。より長期間かつ効率的に評価するためには、ヒト細胞の生着率が高く、薬剤あるいは外科処置無しに先天的に若齢から糖尿病を発症するモデルが必要である。本研究の目的は、ヒトiPS細胞由来膵ベータ細胞や異種膵島の有効性・安全性を長期間、かつ効率的に評価可能なげっ歯類、および非げっ歯糖尿病モデル動物を開発することを目的とする。

平成29年度の研究成果

1. 超免疫不全糖尿病マウスを用いた膵ベータ細胞の評価

iPS細胞由来膵ベータ細胞の評価にはNOD-*scid*マウスが主に用いられているが、構成される細胞系列の偏りや、生着効率の低さに問題がある。NOGマウスは、NK細胞欠損と樹状細胞のIFN- γ 産生障害により、ヒト細胞の生着率をさらに高めた、“超免疫不全”マウスである。ゲノム編集技術を用いて、NOGマウスに糖尿病関連遺伝子に変異を導入し、ホモ接合体の血糖値を測定した結果、雌雄共に4週齢から高血糖を呈していた。

2. 効率的糖尿病マーモセットモデル作製法の開発

昨年度までの本国際医療研究開発費で評価したゲノム編集ツールによる糖尿病関連遺伝子ノックアウト個体作出のため、Platinum TALEN および CRISPR/Cas9 注入胚の改変率と発生率の最終的な検討を実施し、個体作製に着手した。Platinum TALEN と ssODN をマーモセット受精卵に注入した結果、すべての注入胚で遺伝子が改変されていたため、Platinum TALEN 注入胚 21 個、CRISPR/Cas9 注入胚 6 個を仮親へ移植が、着床に至らなかった。マーモセットにおける糖尿病関連遺伝子の両アリル改変は、胎生致死になる可能性を考え、効率的にヘテロ改変胚を作製する方法を検討した。その方法を用いて、卵子注入法による個体作出を開始し、Platinum TALEN 卵子注入により得た胚 8 個を仮親へ移植した。現在、仮親 2 匹が妊娠継続中である。

3. 糖尿病マーモセットを用いた膵ベータ細胞の評価

健常マーモセット数匹を用いて多剤併用による免疫抑制剤投与法の検討を開始した。幹細胞由来膵島や動物（ブタ）膵島を細胞源とし、カプセル化技術を用いて散逸を防いだグラフトを作成して移植し、免疫抑制剤の有無による細胞生存や周囲生体反応の評価を行っている。ほぼ計画とおりの進捗である。移植細胞に対する拒絶反応の抑制に関しては概ね生着させることが可能である。異物反応等の制御は免疫抑制剤のみでは難しいため、グラフトの素材等の改良が必要である。

Subject No. : 29 指 1001
Title : Establishment of diabetic animal models for next generation cell-transplantation therapy
Researchers : Tadashi Okamura, Erika Sasaki and Masayuki Shimoda
Key word : Diabetes, NOG mice, Common marmoset, Genome editing, Cell-transplantation therapy
Abstract :

The aim of our study are to establish diabetic animal model to introduce the mutation for diabetes-associated gene by genome-editing technique using Platinum TALEN and CRISPR/Cas system, and to evaluate the efficacy and safety of autologous and xeno-islet cell transplantations using novel diabetic animal models.

1. Evaluation of novel diabetic NOG mice using pancreatic beta cells (Tadashi Okamura)

NOG mice are severely immuno-deficient animals by knockout introduction of IL-2 receptor gamma-chain into the NOD-scid strain. Because NOG mice lack the function of T and B lymphocytes and NK cells, NOD mice are able to integrate human cells and tissues into them efficiently. To introduce mutation in diabetes-associated gene into NOG mice, *in vitro* synthesized Platinum TALEN mRNAs for diabetes-associated gene and ssODN, were co-injected into the cytoplasm of pronuclear stage mouse embryos. We obtained four founders, which carried diabetes-associated gene mutation. Blood glucose levels of mice carrying homozygous mutation for diabetes gene were markedly higher than those of control mice at 4weeks of age.

2. Efficient generation and evaluation of novel diabetic marmoset using genome editing tools (Erika Sasaki and Masayuki Shimoda)

To efficiently generate the diabetes-associated gene modified common marmoset (marmoset) using genome editing tools, the target gene modification efficiencies of Platinum TALEN and CRISPR/Cas9 were investigated in marmoset embryos. All 27 marmoset embryos injected with Platinum TALEN or ssODN showed the target gene modification (100%). To generate the diabetes-associated gene modified marmoset, 21 Platinum TALEN-injected embryos and six CRISPR/Cas9-injected embryos were transferred into recipient marmosets, but implantation was not observed. It was considered that bi-allelic modification of the diabetes-associated gene might result in embryonic lethality, therefore, efficient production of hetero-modified embryos by injecting genome-editing tools into oocytes was examined. As a result, 15.8% of the blastomeres obtained from Platinum TALEN-injected oocytes were bi-allelic modified blastomeres and 21.1% were mono-allelic modified blastomeres. A total of 23.5% of the blastomeres obtained from CRISPR/Cas9-injected oocytes were bi-allelic modified blastomeres and 23.5% had the mono-allelic modification. These results suggest that the proportion of mono-allelic modified blastomeres was increased by oocyte injection as compared to embryo injection. Eight embryos obtained from Platinum TALEN injection into oocytes were transplanted, and two recipients have ongoing pregnancy. In addition, we started to study an immunosuppressant administration method using multiple drug combinations using several healthy marmosets. We developed the method to suppress the rejection reactions to transplanted cells. It is difficult to control the foreign body reaction, so further experiments are needed.

研究の概要

インスリン投与でも血糖コントロールが困難な患者の次世代糖尿病治療法として膵β細胞補充療法が期待されている。

同種膵島移植は低侵襲な移植療法として大いに期待されているが、**絶対的なドナー不足**が問題

ドナー不足の切り札として、ヒトiPS細胞由来膵β細胞、ブタ膵島を用いた異種移植が研究されているが、**その有効性と安全性の評価が課題**

ヒトiPS細胞



3D培養法



約30%以上の高効率で
機能的な膵β細胞を誘導
(大河内ら)



ブタ膵島



糖尿病モデル動物で効率的に評価

げっ歯類(マウス)
“超免疫不全”糖尿病マウスの作製(岡村)

非げっ歯類(マーモセット)
糖尿病マーモセットの作製(佐々木)

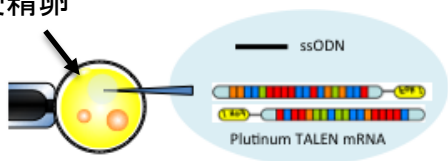
異種膵島の移植
(霜田)

平成29年度の成果

げっ歯類(マウス) “超免疫不全”糖尿病マウスの作製(岡村)

ゲノム編集技術を用いてNOGマウスの糖尿病関連遺伝子に変異を導入

NOGマウス
受精卵



雄のみ
軽度糖尿病を発症

ヘテロ
接合体



交配/ホモ化

雌雄共
高血糖

ホモ接合体



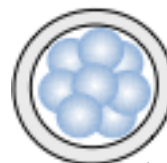
“超免疫不全”糖尿病マウス

非げっ歯類(マーモセット) 糖尿病マーモセットの作製(佐々木)



ゲノム編集技術でインスリン
遺伝子に変異を導入

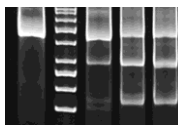
人工培養



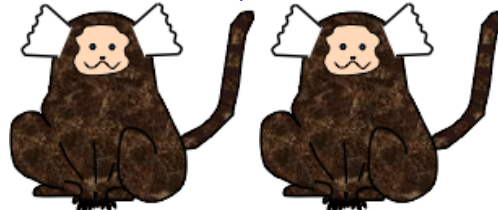
後期胚まで発生
割球分割



糖尿病関連遺伝子の両アレル
改変は、胎生致死になる可能性
が考えられたため、効率的
にヘテロ改変胚を作製



移植



2匹の仮親が妊娠中

課題番号 : 29指1001
研究課題名 : 超免疫不全糖尿病マウスを用いた膵β細胞の評価
主任研究者名 : 岡村匡史
分担研究者名 : 岡村匡史

キーワード : ゲノム編集、糖尿病、NOG マウス

研究成果 :

iPS 細胞由来膵β細胞の評価には NOD-*scid* マウスが主に用いられている。NOD-*scid* マウスは、T 細胞および B 細胞の欠損により重度免疫不全を呈する SCID マウスを、自然免疫を構成する細胞機能の一部が低下した NOD マウスに戻し交配して樹立された系統である。ヒト造血幹細胞移植による造血系再構築モデルやヒトがん細胞移植モデルとして広く用いられているが、構成される細胞系列の偏りや、生着効率の低さに問題がある。NOG マウスは、NOD-*scid* マウスの IL-2 受容体 γ 鎖遺伝子をノックアウトした系統であり、NK 細胞欠損と樹状細胞の IFN- γ 産生障害により、ヒト細胞の生着率をさらに高めた、“超免疫不全”マウスである。NOD-*scid* および NOG マウス共に糖尿病を発症しないため、移植した膵β細胞の機能評価をするためには、ストレプトゾトシン (STZ) 投与により、糖尿病を誘導しなければならない。STZ による糖尿病誘発効率は個体毎のばらつきが多く、また STZ による膵β細胞以外の臓器への毒性も懸念され、効率的に長期期間、移植した膵β細胞の有効性・安全性を評価するためには、先天的に若齢から安定して高血糖を呈する、免疫不全マウスの開発が必須である。本分担研究は、ゲノム編集技術を用いて糖尿病関連遺伝子に変異を導入することで、先天的に若齢から糖尿病を発症する NOG マウスを作製し、長期間ヒト iPS 由来膵β細胞、および動物由来膵島の機能と安全性を評価することである。

平成 29 年度は、糖尿病関連遺伝子に変異を導入する platinum TALEN および一本鎖長鎖オリゴヌクレオチド (ssODN) を NOG マウス核期胚の細胞質にマイクロインジェクションした結果、18 匹のファウンダーマウスが得られ、そのうち 4 匹のマウスに目的の変異が導入されていた。得られた変異導入 NOG マウスを交配、あるいは体外受精法により系統化し、ホモ接合体の血糖値を測定した結果、雌雄共に 4 週齢から高血糖を呈していた。今後より詳細に糖尿病病態を解析すると共に、ヒト iPS 由来膵β細胞、および動物由来膵島を移植し、その有効性と安全性を評価する予定である。

課題番号 : 29指1001
研究課題名 : 効率的糖尿病マーマセットモデル作製法の開発
主任研究者名 : 岡村匡史
分担研究者名 : 佐々木 えりか

キーワード : 糖尿病、マーマセット、ゲノム編集

研究成果 :

昨年度までの本国際医療研究開発費で評価したゲノム編集ツールによる糖尿病関連遺伝子ノックアウト個体作出のため、平成 29 年度は Platinum TALEN および CRISPR/Cas9 注入胚の改変率と発生率の最終的な検討を実施し、個体作製に着手した。また、糖尿病を誘発する変異を導入する一本鎖長鎖オリゴヌクレオチド (ssODN) をドナー遺伝子とした、ノックイン (KI) 検討も並行して行った。

Platinum TALEN と ssODN をマーマセット受精卵 27 個に注入した場合、すべての注入胚で目的遺伝子が改変されており (100%)、後期胚発生率は 22%であった。また改変内容の詳細を調べるため、注入胚 6 個を割球レベルで解析したところ、割球 44 個のうち 22 個 (50%) が両アレル改変、18 個 (18.1%) が片アレル改変であった。KI に関しては、Platinum TALEN と 80bp 長センス鎖 ssODN を受精卵へ共注入した場合、解析胚 8 個のうち 1 個 (8 細胞期胚) において、割球 2 個に KI が確認された。これはモザイク変異胚であったが、KI 率は 12.5% (胚 8 個のうち 1 個) であった。また CRISPR/Cas9 と ssODN を共注入した場合、28 個の注入胚すべてが改変されており (100%)、後期胚発生率は 14%であった。注入胚 6 個をもちいた割球レベル解析では、割球 46 個中 39 個 (84.8%) が両アレル改変、2 個 (4.3%) が片アレル改変を示した。CRISPR/Cas9 と ssODN による、KI 胚は認められなかった。

以上の検討により、効率的な KO 個体獲得が可能と判断し、Platinum TALEN 注入胚 21 個、CRISPR/Cas9 注入胚 6 個を仮親へ移植した。しかしながら、これらは着床に至らなかった。原因として、マーマセットにおける糖尿病関連遺伝子の両アレル改変は、胎生致死になる可能性を考え、マーマセット卵子にゲノム編集ツールを注入することによる、効率的なヘテロ改変胚を作製する検討を開始した。Platinum TALEN または CRISPR/Cas9 を卵子へ注入し、体外受精後、発生した胚を 2 個ずつ割球レベルで解析した。その結果、Platinum TALEN 注入から得た割球 19 個のうち、3 個 (15.8%) が両アレル改変割球、4 個 (21.1%) が片アレル改変割球であった。また CRISPR/Cas9 注入から得た割球 17 個では 4 個 (23.5%) が両アレル改変割球、4 個 (23.5%) が片アレル改変割球であった。この結果から、受精卵注入時よりも片アレル割球の割合が増加したことが示された。そこで卵子注入法による個体作出を開始し、Platinum TALEN 卵子注入により得た胚 8 個を仮親へ移植した。現在、仮親 2 匹が妊娠継続中である。次いで、CRISPR/Cas9 卵子注入による個体作出も開始している。

課題番号 : 29指1001
研究課題名 : 糖尿病マーマセットを用いた膵β細胞の評価
主任研究者名 : 岡村匡史
分担研究者名 : 霜田雅之
キーワード : 糖尿病、細胞移植療法
研究成果 :

インスリン投与によっても血糖コントロールが困難な患者は、著しくQOLを損なう。こうした重篤な患者に対しては、膵臓移植または膵島移植というβ細胞補充療法が有効な治療と考えられている。中でも膵島移植は、低侵襲な移植医療として期待されているが、絶対的なドナー不足が問題である。厚生労働省は、国内でブタなどの細胞をヒトに移植する異種移植を、一定の条件下で承認する方向性を打ち出しており、申請者らは臨床研究に向けた準備を進めている。さらに、iPS細胞由来膵β細胞も膵島移植のソースとして極めて強く期待されている。

本分担研究は、臨床研究には動物モデルのデータが必要不可欠であるため、ヒトiPS細胞由来膵β細胞や異種膵島の有効性・安全性を長期間、かつ効率的に評価可能な、げっ歯類、および非げっ歯糖尿病モデル動物を用いて、その治療効果を解析することである。

平成29年度は健常マーマセット数匹を用いて多剤併用による免疫抑制剤投与方法の検討を開始した。幹細胞由来膵島や動物（ブタ）膵島を細胞源とし、カプセル化技術を用いて散逸を防いだグラフトを作成して移植し、免疫抑制剤の有無による細胞生存や周囲生体反応の評価を行っている。ほぼ計画とおりの進捗である。移植細胞に対する拒絶反応の抑制に関しては概ね生着させることが可能である。異物反応等の制御は免疫抑制剤のみでは難しいため、グラフトの素材等の改良が必要である。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 29指1001

研究課題名：細胞移植療法による次世代糖尿病治療法開発に不可欠な糖尿病モデル動物の開発

主任研究者名：岡村 匡史

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
IL-36 α Regulates Tubulointerstitial Inflammation in the Mouse Kidney	Ichii O, Kimura J, Okamura T, Horino T, Nakamura T, Sasaki H, Elewa YHA, Kon Y.	Front. Immunol.	Vol 8:1346	2017
γ δ TCR recruits the Syk-PI3K axis to drive proinflammatory differentiation program	Muro R, Nitta T, Nakano K, Okamura T, Hiroshi Takayanagi H, and Suzuki H.	J. Clin. Invest.	28(1):415-426	2017

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
CRISPR/Casシステムを用いた効率的遺伝子改変マウスの作製とその応用	岡村 匡史	第28回東北実験動物研究会	仙台	2017年11月
新規インスリン分泌不全型糖尿病モデルマウスの表現系解析	中野堅太、清水有紀子、高梨理絵子、佐々木隼人、岡村匡史、佐々木宣哉	第160回日本獣医学会学術集会	鹿児島	2017年9月
Towards the genetically modified Diabetic models in common marmoset (Award for Runner-up Presentation 受賞)	Wakako Kumita, Yasuhiro Suzuki, Tadashi Okamura and Erika Sasaki	Kyoto Diabetes Mini-Symposium - Beta-Cell Replacement Strategies	京都	2017年6月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。