

第4章

hARcDNAを導入した

トランスジェニックマウスの作成

[はじめに]

ポリオール代謝の亢進が糖尿病性慢性合併症の発症機序に深く関わっているとはいっても、糖尿病性合併症の成因をポリオール代謝の亢進だけから一元的に説明することは困難である。そこで、糖尿病状態における他の代謝異常や蛋白糖化(84~90)の影響を除外し、実験動物のポリオール代謝を亢進させるだけで、どこまで糖尿病性慢性合併症を再現でき、どの組織においてどの程度にまで合併症が進行し、通常の糖尿病性合併症とはどのような点が相違するのかなどを検討することは、ポリオール代謝の亢進と糖尿病性合併症との因果関係をより鮮明にする。また、ARが豊富な組織と糖尿病性慢性合併症の標的臓器はほぼ一致し、ARが少ない組織は合併症を被りにくいとされているが、それならば、ARの少ない組織に十分なARを発現させた場合にはどうなるのであろうか。通常、糖尿病性神経症が発症しない中枢神経系のような組織にも合併症が発症するのであろうか。このような問題点を検討するために、我々はhARcDNAを授精卵に導入し、ほとんど全ての組織にhARを発現するトランスジェニックマウスの作成を試みた。従来より、マウスでは水晶体のAR活性が低いため、糖尿病状態にしてもガラクトースを投与しても白内障は生じないといわれており(91)、hARを導入したトランスジェニックマウスで白内障を誘発できれば、hARがその原因として強く示唆される。またhARを導入したトランスジェニックマウスは糖尿病性慢性合併症の

モデル動物としての利用価値も考えられ、糖尿病性合併症の発症機序の解明や、AR阻害剤の効果の検討をはじめとする数多くの糖尿病性合併症の治療実験に供することができる。

このhARを導入したトランスジェニックマウスの作成において、我々が用いたベクターを図15に示した。全ての組織でhARが発現することを期待して、プロモーターにはマウスのMHCクラスI抗原(H-2Kd)のプロモーターを用いた。このプロモーターは胎生8日までは機能しないので、マウス胚の初期発生を障害しないという利点もある。また、このプロモーターの下流には順に、 β -グロビン遺伝子の5'側のflanking region、hAR cDNA、 β -グロビン遺伝子の3'側のflanking region、SV40ウィルスのポリアデニレーションシグナルを含む領域が続いている。 β -グロビン遺伝子の5'、3'側のflanking regionにはエンハンサーが含まれており、導入されたマウスゲノムのintegration siteの制御をほとんど受けずに、導入された遺伝子のコピー数に依存して、hARの発現量が高くなるという効果をもたらす(93、94)。また、SV40のポリアデニレーションシグナルを含む領域は、転写されたmRNAの安定性を高め半減期を延長する働きがある(95)。したがって、本ベクターを用いたトランスジェニックマウスでは、その発生を障害することなく、全ての組織でhARを大量に発現する個体を得ることが期待できる。

[方法]

(I) ベクターの作成

本庶 佑氏(京都大学遺伝子工学)より譲り受けたプラスミド(pKCRH2)中のインターロイキン-2受容体遺伝子を制限酵素で切り出し、同部にhAR cDNAをHind III linkerを用いて挿入した(図15)。完成したベクターのPvu II/Sal

I フラグメントをアガロースゲル電気泳動後、ガラスパウダーにて精製した。

(II) Founder の作成

妊娠した C57BL/6 × DBA/2 F1 (BDF1) 雌マウスの卵管采から授精卵を採取し、雄性前核に (I) で精製した DNA フラグメントをマイクロインジェクション法を用いて注入した。精管結紮した雄との交配によって作成した偽妊娠マウスの卵管に遺伝子注入後の授精卵を移植した。19日後に生育した胎仔を帝王切開によって取り出し、雌の里親マウスの仔とすり替えて哺乳、飼育させた。生後3週間のマウスの尾を切断し、DNA抽出後、Southern blotting を行い、founder mice を選別した。

(III) Southern blotting

切断したマウスの尾を pronase E と proteinase K で1晩消化し、3回のフェノール抽出と RNase 処理とによって DNA を抽出し、EcoRI で1晩消化した後、Southern blotting を行った。マウス AR 遺伝子との交差を避けるため、hARcDNA の停止コドンとポリアダニレシオンシグナルとの間の、hAR に特異的と考えられる領域を PCR を用いて増幅し、プローブとして用いた。また、検出は BAS2000 イメージアナライザーを用いて行った。

(IV) Northern blotting

Southern blotting によって、hARcDNA の導入が確認されたマウス (AR 陽性マウス) の各臓器からグアニジンチオシアネート法により抽出した total RNA を用いて northern blotting を行った。やはり、マウス AR mRNA との交差を避けるために、(III) で用意した DNA プローブの、mRNA と相補的なストランドのみを、プライマーと Klenow fragment とを用いてラベルして northern blotting 用プローブとした。

(V) 病理組織学的検討

生後6週のAR陽性マウス2匹とそのlitter mate 2匹とから採取した各臓器をホルマリン固定し、HE、PTAH、PAM染色などを行った。

(VI) ガラクトース負荷

生後7週のAR陽性マウス15匹とそのlitter mate 17匹とに20%ガラクトース水を1週間飲用させ、頸椎脱臼死させた後、眼球を摘出した。摘出した眼球の水晶体の変化は肉眼で観察した。眼底と脈絡膜の血管は眼球後極から強力な光をあて、顕微鏡下で透過光による観察を行った。

[結果]

(I) Founder の作成と継代

hARcDNAを含むベクターを注入した授精卵から合計77匹のマウスが出生した。そのうち17匹にhAR遺伝子が導入されていることをSouthern blottingによって確認した。17匹の陽性マウスのうち、導入されたコピー数が数十～数百と多い雄3匹を選び、それぞれBDF1の雌と交配した。3匹のうち1匹のみが雌を妊娠させ、子孫を残す能力を備えていたので、その子孫を繁殖させた(図16)。導入されたhARのコピー数が多い雌は雄と交配しても妊娠を継続できないか、出産しても仔の数が少なく、しかも病弱であったので、それ以上の継代はしなかった。

(II) Northern blotting

導入されたhARのコピー数が、Southern blottingによって比較的多いと判定されたマウス(図17)の臓器を用いてnorthern blottingを行った。脳、肺、心臓、胸腺、脾臓、腸、肝臓、筋肉、腎臓など、検討した臓器には全てhARのmRNAが多量に検出され

た。眼球、脊髄、坐骨神経、膀胱からは規定のRNA量を採取できなかったが、northern blottingにおいて、やはりhAR mRNAのシグナルが検出された。AR陽性マウスの各臓器から採取されたmRNAの分子量はヒト培養細胞のHeLaで発現しているhAR mRNAの分子量よりもおよそ1 kbほど大きかった(図18)。

(III) 病理組織学的検討

病理組織学的検討を行った生後6週のAR陽性マウス2匹のうち、1匹から採取した腎臓のHE染色標本において、一部の小動脈内に血栓形成を認め、一部の糸球体にfibrin cap様、あるいはcapsular drop様の沈着物を認めた(図19)。この沈着物はPTAH染色によって濃青に染まることから、その主成分はfibrinであると考えられた(図20)。同じマウスの脳、肺、心臓、胸腺、脾臓、腸、肝臓、筋肉、脊髄、坐骨神経などには病理組織学的変化を認めなかった。もう一方のAR陽性マウスとlitter mate 2匹とは、腎臓を含め、調べた全ての臓器に変化を認めなかった。

(IV) ガラクトース負荷

AR陽性マウス15匹とそのlitter mate 17匹のうち、AR陽性マウス群に属する2匹に水晶体の白濁と眼底および脈絡膜血管の異常が認められた。水晶体白濁の程度は中等度であり、白濁は主に水晶体の中央部に認められた。眼底および、脈絡膜血管の異常所見としては、血管径と血管密度の減少、血管壁の数珠状変化と小動脈瘤形成、出血斑あるいは白斑様の変化、などがあげられる(図21)。残りのAR陽性マウス13匹のうち、5匹には水晶体混濁、網膜血管径の減少など、軽度の変化が認められ、8匹には明らかな変化を認めなかった。Litter mate 17匹には、いずれの変化も認めなかった。

[考察]

(I) Founder の作成と継代

ベクターを授精卵に注入後、出生した77匹のマウスのうち、17匹までにhAR遺伝子が導入されていたのは非常に高い効率である。この高い効率を実現した要因として、第一に、使用したプロモーターはマウス胚の発生初期には機能しないので、器官形成に対する障害が軽微であると考えられること、第2に、ARはたとえ大量に発現したとしても、正常の糖代謝が営まれている胎児においてはグルコースはほとんど解糖系を介して消費されてしまい、ソルビトールに転換されることは少ないので組織障害は起こりにくいと考えられることなどがあげられる。正常の雌にhAR陽性の雄を交配した場合には、hAR遺伝子が導入された胎児はほぼ正常と思われる発育を遂げるのに対して、正常の雄とhAR陽性の雌とを交配させた場合には、雌の妊容性は低い。胎児は出生したとしてもその数は1~3匹と少なく、非常に弱々しいことから、hAR陽性マウスの子宮内環境に異常が生じていると思われる。胎盤にはARが比較的豊富に含まれているので、ARは胎盤が正常な機能を営むために、なんらかの役割を果たしている可能性があり、hAR陽性の妊娠マウスでは胎盤におけるAR過剰が胎児に悪影響を及ぼしているのかもしれない。

(II) Northern blotting

hAR陽性のマウスでは検索した全ての臓器からhARのmRNAが検出され、マウスMHCクラスI抗原のプロモーターが十分に機能していることが確認された。Northern blottingを行った計4匹のAR陽性マウスに関して、導入されたhARのコピー数が多いマウスほど、mRNAの発現量が多いという傾向が認められ、ベクター内に含まれている β -グロビン遺伝子の3'、5'側のflanking regionがintegration siteの制御をほとんど受けずにエンハンサーとして機能していると考えられた。また、hAR mRNAの分子量が増加していたので、hAR cDNAのポリアデニレーションシグナルの位置からポリAがついたmRNAよりも、hAR cDNAの下流に存在するSV40

のポリアデニレーションシグナルの位置からポリAがついた、より長いmRNAが主に発現していると考えられる。また、両者とも発現していたとしても、前者は後者よりもmRNAの安定性が低く、寿命が短いために、すみやかに分解され、ほとんど検出されないのかもしれない。

現在、hARに対するポリクローナル抗体を用いたwestern blottingと、AR陽性マウスの各組織におけるAR活性の測定を進めている。予備的な結果ではあるが、AR陽性マウスにおいて、検索した全ての組織にhAR蛋白質が検出され、AR活性もlittermateに比較して、およそ10倍の値を示した。

(III) hAR陽性マウスにおける糖尿病性慢性合併症の発生

hAR陽性マウス組織の病理組織学的検討も、ガラクトース負荷による検討もいずれもまだ予備的な実験の域を出ず、さらに詳細な実験計画のもとに長期にわたる観察期間を設けて結論を下したいと考えている。現時点では6週齢のhAR陽性マウス2匹中1匹の腎臓において、糸球体にfibrin cap、あるいはcapsular drop様沈着物が存在し、小動脈内に血栓形成が認められたことと、ガラクトース水を1週間飲用させたところ中等度の白内障と、網膜・脈絡膜血管の異常とを認めたこと、が重要な所見であろう。

腎糸球体のfibrin capとcapsular drop(96)は浸出性病変として糖尿病に特徴的とされ、網膜血管の小動脈瘤形成(97)は単純性網膜症として、やはり糖尿病に特徴的な所見である。一方、糖尿病性慢性合併症の直接の標的器官ではない肝臓、脳、肺、などには組織学的変化は認められなかった。AR陽性マウスではほとんど全ての組織のほとんど全ての細胞中でhARが発現していると考えられるので、さまざまな臓器が同時に障害を受けるようにも思われるが糖尿病性合併症類似の病変が認められたのはなぜだろうか。考えられる理由としては、本来、糖尿病で障害を受けやすい臓器や細胞はAR活性の亢進によるソルビトールの蓄積に感受性が強く、優先的に障害されるのかもしれない。本来、ARが存在する細胞ではARが細胞の機能維持にとって重要な働きをしており、ARの過剰状態で機能障害を起こしやすいのかもしれない。また、同じように細

胞内のAR活性が上昇しても、インスリン非依存性に糖を取り込み、フルクトキナーゼが存在せず、ソルビトールが蓄積しやすい細胞と、逆にしにくい細胞とがあると予想される。

腎臓の小動脈内における血栓の形成については、糖尿病状態における血液凝固能の亢進（98、99）と同様の機序がはたしているのかもしれない。言い換えるならば、糖尿病状態における血液凝固能の亢進にポリオールの蓄積が重要なはたらきを担っていることを示唆する所見なのかもしれない。

一方、マウスの水晶体ではAR活性が非常に低いためマウスにガラクトースを投与しても白内障を誘導することは困難であるといわれている。したがって、hAR陽性マウスにおいて、ガラクトース水を1週間投与したのみで中等度の白内障を誘発し得たことは、糖尿病性白内障の発症機構におけるARの関与をより明確にしたと考えられる。水晶体の白濁は主に中央部に認められたが、その病変部位が後囊下の中央部であるのか、水晶体の他の部分の中央部であるのかは、今回、判別できなかった。今後、マウス用の細隙灯または眼底鏡の開発により、判別が可能になると考えられる。

一般的に、糖尿病性慢性合併症は糖尿病発症後、5年以上の期間を経て発症し、徐々に増悪してゆくため、寿命の短い実験動物に、進行した糖尿病性慢性合併症を誘導して研究することは困難であり、しかも長い年月を要する。たとえば、イヌにガラクトース食を摂取させて、糖尿病性網膜症が発症するまでには3年以上もかかる（100）。しかも、糖尿病性網膜症初期の単純性網膜症までしか進行しない。それ以上ガラクトース食を続ければ、さらに病変が進行し、増殖性網膜症となるのかもしれない。しかし、イヌの加齢による変化、寿命による死亡、実験に費やされる時間と労力とコストを考慮した場合に、実験の実施は困難であろう。一方、hARを導入したトランスジェニックマウスではガラクトースを1週間投与しただけで、一部のマウスではあるが単純性網膜症を発症した。したがって、ガラクトースの投与を続ければマウスの短い寿命の中でも十分に網膜症を進行させることが可能であると考えられる。もしも、AR陽性マウスにおいて、ガラクトース投与のみによって増殖性網膜症まで進行させ得たならば、高血糖

を伴わずにポリオール代謝の亢進のみが引金となって、糖尿病性網膜症が末期まで進行し得るという初めての証拠となるであろう。また、短期間に増殖性網膜症を発症する実験動物モデルが完成すれば、現在まで充分に行われていなかった増殖性網膜症の発症機構の詳細な研究が可能になり、その新たな予防、治療法を開発する道を開くことになるであろう。

[小括]

hARcDNAを含むベクターをマウス授精卵に注入し、hARmRNAをほとんど全ての組織で大量に発現するトランスジェニックマウスを確立した。このマウスの腎臓では糸球体に浸出性病変類似の変化、小動脈に血栓形成を認め、ガラクトース負荷によって、白内障と網膜血管の閉塞性変化、小動脈瘤とが生じたので、これらの病変の形成にAR活性の亢進が関与している可能性が示された。