

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08417

研究課題名(和文) 時計蛋白質CRY1の変異が惹起する膵細胞の老化様変化と膵島機能異常の解明

研究課題名(英文) Elucidation the roles of senescence-like phenotype in pancreatic beta-cells in diabetic mutant cryptochrome1 transgenic mice

研究代表者

岡野 聡 (Okano, Satoshi)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：60300860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：代表者は、時計蛋白質CRY1の亜鉛結合部位変異体を過剰発現させることで新しいMODY様の糖尿病モデルマウスを確立し、CRYの研究グループを組織し、その膵細胞機能障害の主要な分子機序を明らかにしてきた。

本研究では、当該マウスでは加齢と共に繊維化を伴う膵構造変化が進行すること、及び膵島内にムチン産生性の膵管異型細胞が生成されることを新たに示した。膵細胞の細胞老化様の性質が、それらの加齢依存的な異常の進展の本質であると考えられる。KPNA2タンパク質に着目した実験も実施し、KPNA2は特にアダルト期のマウス膵島に於いて、膵細胞の機能維持に重要な役割を果たすことを示す結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Our research group (the study network of Cryptochrome in Tohoku Area [principal investigator: Sstoshi Okano]) have showed that, from the research over 10 years, the zinc-binding site-mutant (C414A) mCRY1 Tg mice display diabetes characterized by β -cell dysfunction due to senescence-like features of pancreatic β -cells.

To elucidate the pathogenesis, we conducted analyses of the pancreas of the aged Tg mice. We newly found that the extent of fibrosis of the islet was higher in Tg mice compared with wild-type controls. Unusual duct-like structures producing mucin developed inside islets in the Tg mice with age. Outside islets, PanIN-like ductal structures, which are surrounded by pancreatic duct glands (PDG), were prominently emerged in aged Tg mice. Our results strongly suggest that, SASP-like microenvironment in the islets of the Tg mice play stimulatory roles in the transdifferentiation of pancreatic β -cells to ductal cells and in the development of ductal dysplasia in the Tg mice.

研究分野：膵細胞の生物学, 膵癌前駆病変, 時間生物学

キーワード：糖尿病 細胞老化関連分泌形質(SASP) 膵島構造リモデリング 膵上皮内腫瘍性病変(PanIN) 膵癌前駆病変 KPNA2(インポータイン 1) 膵細胞-膵管細胞分化転換 亜鉛結合変異mCRY1(C414A-CRY1)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類のCRY(クリプトクロム)遺伝子は、当初光回復酵素/青色光受容体のファミリーに属する未知の機能の遺伝子として見いだされた。現在では、安井明教授(現加齢研フェロー、東北大学加齢医学研究所)/van der Horst 教授(Erasmus 大学)らの共同研究によるmCRYノックアウトマウスの作製と、その輪回し活動概日リズムの測定の成果や他の研究グループの研究成果も合わせ、CRYは生物時計を構成するnegative feedback loopの重要な要素であることが確立されている。

研究代表者は、ポスドク時代のCRY研究の経験をさらに進展させるべく、mCRY1の亜鉛結合サイトに変異を導入した(システイン414[C414]をアラニン[A]に置換した)変異型CRY1蛋白(C414A-CRY1)を全身的に過剰発現するトランスジェニックマウス(以下「Tgマウス」と略記)の研究を、山形大学遺伝子実験施設へ異動後に開始した。研究代表者は、早坂清前遺伝子実験施設長(現山形大学名誉教授・みゆき会病院小児科)を高次のアドバイザーとする、Tgマウスの概日リズム異常及び糖尿病病態解明を目的とする東北地方を横断するCRYの研究ネットワークを組織し、科研費に加え山形大学内公募助成(結城章夫プラン)や東北大学加齢研共同研究の助成を獲得し10数年にわたり研究を続けてきた。その結果、Tgマウスの膵細胞機能障害の主要な分子機序を明らかにすることが出来、若年発症成人型糖尿病(MODY)様糖尿病の動物モデルとしての側面を確立し、研究代表者が公表した総説論文に結実した(J Diabetes Res. 2016:3459246. doi: 10.1155/2016/3459246.)。時間生物学的研究から、Tgマウスが示すリズム異常の特徴についても、その大枠は既に明らかにした(同総説を参照)。本研究組織に以前から参画してきた五十嵐雅彦センター長(山形市立病院済生館 地域糖尿病センター)、安井明加齢研フェロー、菅野新一郎加齢研講師らに加え、28年度から新たに佐藤賢一教授(東北医科薬科大学 消化器内科・宮城県立がんセンター)が参画し、膵管異型の解析を加速させることが出来た。

なお本課題の最新の成果及び考察は、和文総説としてBio Clinica誌(2018年5月号[肥満症Update], 33, 453-462, 「亜鉛結合部位変異クリプトクロムタンパク質がマウスにもたらす概日リズムの異常と膵細胞の障害及び膵管異型病変の生成」)にも公表した。

2. 研究の目的

代表者らは、Tgマウスの膵細胞は若齢から細胞老化様の表現型を示し(SASP[後述]様の遺伝子発現パターンを示す)膵細胞の増殖が低下することにより膵細胞が消失して行くことが糖尿病発症の主因であることを、前回の基盤(C)[課題番号24590473:代表者岡野聡]の研究から示してきた。

細胞老化は、不可逆的な細胞増殖の停止であるが、老化細胞はSASPと呼ばれる表現型を獲得して、サイトカイン、組織リモデリング因子などの様々な蛋白質(細胞老化関連分泌因子[SASP因子])を分泌する。このことが周囲の組織に慢性炎症を引き起こし、癌を含む様々な疾患の原因や増悪因子となっていることが知られている。

研究代表者らのグループの報告も含め、膵細胞の生物学の分野においても、近年細胞老化の観点からの研究が急速に進展してきており、複数のタンパク質が、老化した膵細胞のマーカーとして特定された。さらに、研究代表者が2015年の第75回米国糖尿病学会発表(ADA, e-poster:2299-P)(e-posterはADAのwebアーカイブから閲覧可能)や、上記英文総説にて提唱してきた「膵細胞のSASP」の概念も、徐々に学界に浸透している様に感じられる。しかしながら、様々な研究者の努力にもかかわらず、膵細胞の老化細胞の機能的特徴や、老化膵細胞が及ぼす影響について、統一的な見解は未だ得られていない状況である。

本研究では、

Tgマウスの膵細胞の機能障害の原因を、さらに掘り下げて解析し、分子的機序の解明に迫る。

SASP様形質を示す膵細胞が、時間経過(マウス個体の加齢)とともに、膵島及び外分泌領域を含む膵臓全体にどのような影響を及ぼすかを病理学的に追求する。

安井明加齢研フェローらは、前回の基盤(C)においてC414A-CRY1を誘導的に発現することが出来るヒトHEK293を樹立し、プロテオミクス解析からCRY1結合タンパク質の探索とC414A変異の影響を解析してきた。このCRY1結合タンパク質の探索からのアプローチをさらに深化させ、病態解明に繋げることも目的とした。

3. 研究の方法

A) プロテオミクス解析

RNA 結合タンパク質を GST (グルタチオン S-トランスフェラーゼ) 融合タンパク質として大腸菌に発現させ、これを精製し、マウスの脳エキストラクトを用いた pull down アッセイを実施して C414A 変異がタンパク質間相互作用に及ぼす影響を調べた。CRY1 についても同様に GST 融合タンパク質を得て pull down アッセイを実施した。

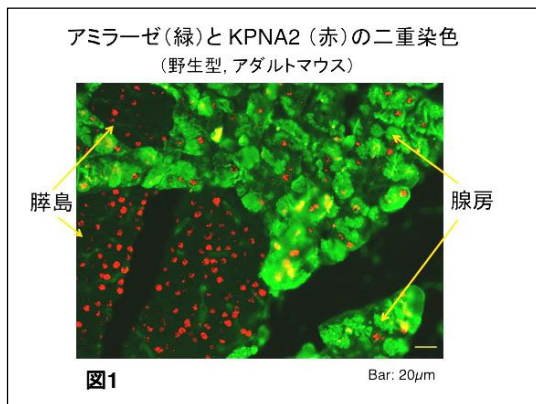
B) 病理解析

組織免疫染色では、種々の癌との関連が報告されている KPNA2 (インポーチン 1) との関わりに着目した解析を主に実施した。活性化膵星細胞の検出には抗-SMA 抗体を用いた。

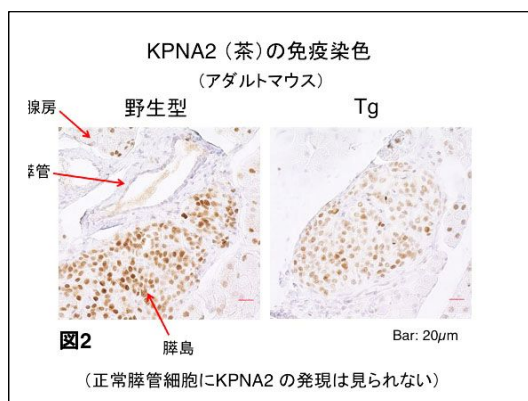
4. 研究成果

目的 の成果

- 腺房細胞に加え、膵内分泌細胞に KPNA2 が強く発現していることを見いだした (図 1)。



膵細胞における KPNA2 の発現は、Tg マウスでは野生型と比較して明確に低下していた (図 2)。



- 若齢 (4 週齢) マウスの膵島では、Tg、野生型共に KPNA2 の発現レベルは極めて低く、両者間で明確な相違は認められなかった。

以上の結果から、

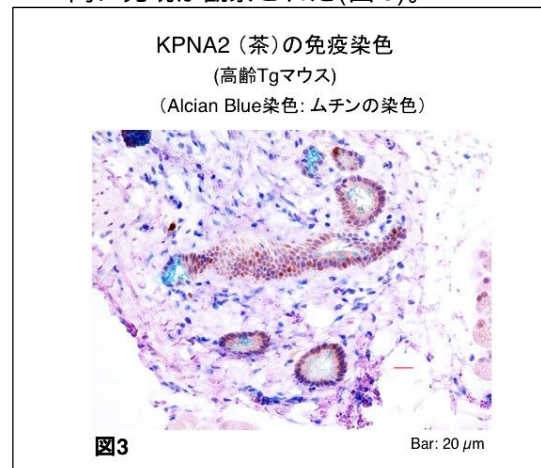
- KPNA2 の膵内分泌細胞における発現はマウスの発達ステージで変化することが判明した。代表者は膵島機能の成熟に、KPNA2 が何らかの役割を果たすと推測している。
- Tg マウスでの、特にアダルト期の膵細胞機能障害に KPNA2 の発現低下が関与することが示唆された。

目的 の成果 1

Tg マウスでは、加齢に伴い、膵細胞消失の進行とともに、膵臓の外分泌領域に、異常な膵管構造が多発することを見出した。

以下にその特徴を記す。

- PanIN 様細胞は、その周囲に膵繊維化を伴っており、活性化膵星細胞の繊維化領域への集積が見られることを明らかにした。
- Tg マウスの PanIN 様構造の周囲には、pancreatic duct gland (PDG) の名称で報告されている膵管異型構造 (Strobel 0. et al., Gastroenterology. 2010, 138, :1166-1177) が発達していた。正常な膵管細胞では、KPNA2 の明確な発現が見られなかった (図 2)。しかしこれらの異型膵管細胞、特に PDG 細胞で KPNA2 の高い発現が観察された (図 3)。



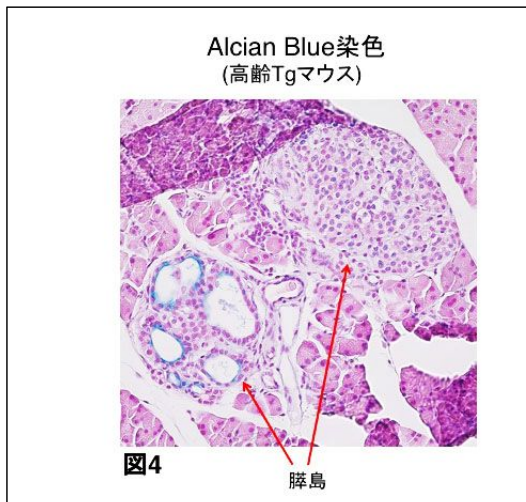
以上の結果から、

- 膵島は種々の SASP 様分泌因子を放出することにより、外分泌腺域に異型膵管細胞の増殖を促すと、代表者は推測している。
- KPNA2 は膵管異型の進展に関与すると考えられる。

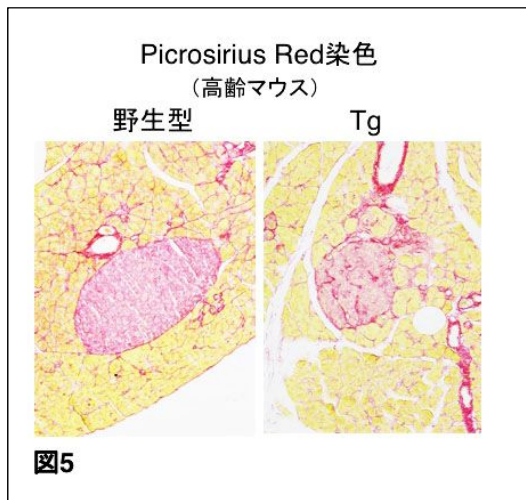
目的 の成果 2

- Tg マウスでは加齢に伴い膵島内に異常な膵管が形成されることは前回の基盤 (C) 研究からも判明していた。この構造を詳

細に調べた。膵島膵管細胞は PanIN 様ではなく平坦な形状をしていた。マウスの加齢に伴いムチンの産生を認めた(図 4)。



- 高齢 Tg マウス膵島周囲への CD3 陽性 T 細胞の集簇を高頻度に観察した。
- 高齢 Tg マウスは、野生型と比較し、明確な膵島繊維化が観察された(図 5)。



以上の結果から、

1. Tg マウスでは膵島内の SASP 様微小環境により、膵 細胞を中心とする内分泌細胞の膵管細胞への分化転換が惹起されると代表者は推測している。
2. 若齢からの SASP 様特徴(分泌性・炎症性・組織リモデリングの性質)から、加齢と共に徐々に膵島の繊維化が進展すると考えられる。SASP 因子による免疫細胞のリクルートも、分化転換の促進や繊維化に促進的に働く可能性が高い。
3. 膵島内膵管細胞は PanIN ひいては膵癌の形成の起源として重要な役割を果たす可能性がある、代表者は推測している。この機序の解明は今後の課題である。

目的 の結果

複数の RNA 結合タンパク質と CRY1 の結合が確認され、変異型では結合が弱まることも示された。現在これらのタンパク質がどの様に病態と関わるかを鋭意解析中である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. 岡野聡: 亜鉛結合部位変異クリプトクロムタンパク質がマウスにもたらす概日リズムの異常と膵 細胞の障害及び膵管異型病変の生成, Bio Clinica, 2018 年 33 巻 5 号(5 月号): 453-462. 査読無(依頼有).
2. Okano S: Unique Aspects of Cryptochrome in Chronobiology and Metabolism, Pancreatic -Cell Dysfunction, and Regeneration: Research into Cysteine414-Alanine Mutant CRY1. J Diabetes Res, 2016: 3459246, 2016. 査読有.
3. 岡野聡: 変異型クリプトクロムタンパク質がマウスにもたらす概日リズムの異常と膵 細胞の障害と新生, Bio Clinica, 2016 年 31 巻 12 号(10 月号): 90-99. 査読無(依頼有).
4. 岡野聡: 変異型クリプトクロムタンパク質がマウスにもたらす概日リズムの異常と膵 細胞の障害, Bio Clinica, 2016 年 31 巻 7 号(6 月号): 79-87. 査読無(依頼有).
5. Okano S, Yasui A, Hayasaka K, Nakajima Q: Unique food-entrained circadian rhythm in cysteine414-alanine mutant mCRY1 transgenic mice. Sleep Biol Rhythms. 14,261-269,2016. 査読有.

[学会発表](計 11 件)

1. mCRY1-C414A 変異体過剰発現マウスの膵臓における tubular complex からの膵細胞の新生と KPNA2 の発現: 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 佐藤賢一, 早坂清, 五十嵐雅彦, 中島修: 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月
2. Features of pancreatic intraepithelial neoplasia and tubular complex in diabetic cysteine414-alanine-mCRY1 transgenic mic: 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 佐藤賢一, 早坂清, 五十嵐雅彦, 中島修: 第 16 回ヨーロッパ時間生物学会 (EBRS

- 2017) [アムステルダム], 2017年8月
3. Reduced expression of KPNA2 and dysfunction of β -cells in C414A-CRY1 transgenic mice (e-poster: 2184-P): 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 早坂清, 五十嵐雅彦, 中島修: 77th Scientific Sessions American Diabetes Association (ADA) [サンディエゴ], 2017年6月
 4. Pancreatic intraepithelial neoplasia-like cells in diabetic cysteine414-alanine-mCRY1 transgenic mice: 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 佐藤賢一, 早坂清, 五十嵐雅彦, 中島修: Tohoku Forum on Aging Science (IDAC, Tohoku Univ.) [仙台], 2017年5月
 5. C414A 変異 mCRY1 トランスジェニックマウスの膵島の異常と導管構造: 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 早坂清, 五十嵐雅彦, 中島修: 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016年11月
 6. Anomalous islet structure in diabetic cysteine414-alanine-mCRY1 transgenic mice: 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 早坂清, 五十嵐雅彦, 中島修: 第 89 回日本生化学会大会, 2016年9月
 7. Anomalous ductal structure in the islet of diabetic cysteine414-alanine-mCRY1 transgenic mice (e-poster: 2073-P): 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 早坂清, 五十嵐雅彦, 中島修: 76th Scientific Sessions American Diabetes Association (ADA) [ニューオリンズ], 2016年6月
 8. システイン 414-アラニン変異型 CRY1 過剰発現マウス膵島の導管様細胞: 岡野聡, 安井明, 早坂清, 五十嵐雅彦, 中島修: 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016年5月
 9. Unusual ductal structure in the islet of diabetic cysteine414-alanine mutant mCRY1 transgenic mice: 岡野聡, 安井明, 早坂清, 五十嵐雅彦, 中島修: キーストンシンポジア (糖尿病: 新しい分子メカニズムと治療戦略) [京都], 2015年10月
 10. Food-entrainable circadian rhythm and pathophysiology in Cys414-Ala mCRY1 transgenic mice: 岡野聡, 安井明, 早坂清, 五十嵐雅彦, 中島修: 第 15 回ヨーロッパ時間生物学会 (EBRS 2015) [マ

- ンチェスター], 2015年8月
11. Senescence-like phenotype in pancreatic β -cells in diabetic mutant cryptochrome1 transgenic mice (e-poster: 2299-P): 岡野聡, 安井明, 早坂清, 五十嵐雅彦, 中島修: 第 75 回米国糖尿病学会 (ADA) [ボストン], 2015年6月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

- 岡野聡 (OKANO SATOSHI)
山形大学・医学部・助教
研究者番号:60300860

(2)研究分担者

- 中島修 (NAKAJIMA OSAMU)
山形大学・医学部・教授
研究者番号:80312841
- 安井明 (YASUI AKIRA)
東北大学・加齢医学研究所・加齢研フェロー
研究者番号:60191110

(3)連携研究者

- 佐藤賢一 (SATO KENNICHI)
東北医科薬科大学・医学部・教授
研究者番号:10282055
- 早坂清 (HAYASAKA KIYOSHI)
山形大学・医学部・名誉教授
研究者番号:20142961

(4)研究協力者

- 菅野新一郎 (KANNO SHINICHIROU)
東北大学・加齢医学研究所・講師
- 五十嵐雅彦 (IGARASHI MASAHIKO)
山形市立病院済生館・地域糖尿病センター・センター長