

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590429

研究課題名（和文）クリプトクロム変異体の過剰発現による新規糖尿病モデルマウスの解析

研究課題名（英文）Analysis of diabetes mellitus in 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

研究成果の概要（和文）：

時計蛋白質のCRY1に変異を導入し全身的に発現させたマウスは、異常な概日リズムを示すのみならず糖尿病を発症することを以前に見いだしたので、本研究では未知の糖尿病の発症機序を解析した。その結果、本マウスの糖尿病はインスリン分泌不全を特徴とするヒトの若年発症成人型糖尿病（MODY）と類似したものがあること示し、さらに膵β細胞の機能に重要であることが知られている遺伝子の若齢からの発現低下が糖尿病発症に関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We previously showed that transgenic mice ubiquitously expressing mouse cryptochrome1 (CRY1) with a mutation in cysteine414 display not only anomalous circadian behavior but also symptoms of diabetes mellitus.

In order to clarify yet uncovered pathogenesis of the diabetes, in this study we examined age-dependent characteristics of the disorder of the transgenic mice, and found that the symptom resemble human MODY (maturity onset diabetes mellitus of the young). We showed that the mice showed from young age reduced expression of insulin gene along with several genes whose expression is involved in the function of β-cells, which can cause early-onset diabetes similar to human MODY.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：糖尿病、インスリン分泌不全、膵β細胞、MODY(若年発症成人型糖尿病)、概日リズム、生物時計

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の行動や様々な生理現象は、概日リズムといわれる約24時間周期のリズムを

示す。概日リズムを作り出す生体内の自律的な振動体は生物時計と呼ばれており、時計振動を司る分子機構は負のフィードバックル

ープによる転写制御機構であることが明らかになっている。哺乳類の時計遺伝子産物の一つである CRY(cryptochrome)は、フィードバックループにおいて抑制因子として機能し、生物時計形成の上で中心的な役割を担っていることが知られている。

我々は、以前にマウス CRY のアミノ酸配列に cysteine-proline のモチーフ配列が存在することを見いだした。この配列は動物の CRY 間で種を超えて保存されていることから CRY の機能に重要であると考え、その生理機能の解明を目的として、モチーフ中の cysteine414 を alanine で置換する変異を導入し、この変異型 CRY1 蛋白質 (CRY1-AP) を全身的に過剰発現させたトランスジェニック (Tg) マウス (CRY1-AP Tg マウス) を作製した。活動リズムの解析を行った結果、CRY1-AP Tg マウスは非常に長周期 (28 時間) のフリーランリズムを示すとともに活動成分が 2 分割する (リズム分割する) という、これまでに例のない特徴的な概日リズムの異常を示すことを明らかにした。さらに、このリズム異常に加えて、CRY1-AP Tg マウスは週齢を経るに従い重篤な糖尿病の症状を呈することを見出した (Okano, S. et al., *Neurosci Lett.* 451, 246-251, 2009)。

当時まで、時計遺伝子のミュータント及び、時計遺伝子ノックアウト等の手法によって、種々のリズム異常のマウスが作りだされ、病態の解析がなされてきた。その中で、糖尿病との関連での主な報告としては、CLOCK ミュータントマウスにおいて、行動リズムの乱れと関連して肥満となり、メタボリックシンドロームの病態を示すことが報告されていた (Turek, F. W. et al. *Science.* 308, 1043-1045, 2005)。CRY1-AP Tg マウスは、行動リズムは異常であり、重度の糖尿病に至るが、糖尿病症状発症以前に肥満を伴わないことを当時既に明らかにしており (Okano, S. et al., 2009)、CRY1-AP Tg マウスの糖尿病は典

型的な 2 型糖尿病とは異なることが推測された。1 型糖尿病のような自己免疫的機序が関与する可能性は低いと予想され、CRY1-AP Tg マウスの糖尿病発症メカニズムの解明が課題として残されていた。

2. 研究の目的

変異型 CRY 蛋白質が関与する未知の糖尿病発症機序を明らかにする目的で、CRY1-AP Tg マウスの糖尿病病態の解析を行った。同時に CRY1-AP Tg マウスの生物時計の特徴を明らかにし、生物時計の異常がいかに糖尿病発症に関わるかを解明することを目標にした。

3. 研究の方法

野生型マウスと CRY1-AP Tg マウスについて、体重や摂食量の測定等、病態評価に必要なパラメーターを測定した。血糖値や血清インスリン、血清中の脂質等を動物用生化学自動分析装置や ELISA 等で測定した。組織切片を用い病理学的な解析を行い、組織免疫染色で各種蛋白質の発現を解析し、mRNA の発現はリアルタイム PCR で解析した。時間生物学的解析では、明暗または恒暗条件下で、給餌条件を変えてマウスの輪回し活動を記録し、アクトグラムを作成して活動リズムの解析を行った。

4. 研究成果

糖尿病の症状はオスで顕著であり、発現レベルには差がないが、症状には性差がある事が判明した。そこで、以下の病態解析はオスを用いて行った。CRY1-AP Tg マウスは離乳直後の 3 週齢の時点で既に顕著な耐糖能異常を示しており、そのレベルは週齢依存的に悪化した。体重の推移を詳細に調べたところ、5 週齢以前の幼若期は野生型マウスと比較して低体重であり、その後も肥満状態は観察されなかった。随時血糖値は週齢依存的に上昇し (性成熟する以前の 6 週齢の時点から野生型と比較して差が認められる)、相関して多

飲・多尿・高血糖等の糖尿病の症状を示し、白色脂肪組織の重量の減少が観察された。インスリン抵抗性（6週齢）及び高中性脂肪血症・高コレステロール血症（9週齢）は示さず、CRY1-AP Tg マウスの糖尿病の機序は、2型糖尿病とは異なることが判明した。膵炎の兆候は観察されないことから、1型糖尿病とも異なることが判った。十分成熟したマウス（19週齢及び40週齢）の組織免疫学的解析では、膵島のインスリン陽性領域は、野生型マウスと比較し著明に減少していた。また、週齢依存的にインスリン陽性領域はさらに減少する事が判った。この結果と一致して随時（40週齢）及び空腹時（27週齢）の血清インスリンレベルは顕著に低下していた。随時の血清インスリンレベルは、3週齢の若齢で既に野生型と比較し低下していることも判明した。野生型マウスで観察される糖負荷後の血清インスリン値の上昇は、CRY1-AP Tg マウスでは観察されなかった（27週齢）。以上の結果から、膵ベータ細胞の機能異常によるインスリン分泌不全が本マウスの糖尿病の主因であり、ヒトの MODY（若年発症成人型糖尿病）と類似した症状であることが判明し、これらの結果をまとめ論文に印刷公表した（Okano, S. et al., Eur J Clin Invest 40, 1011-1017, 2010）。

次いで膵島の週齢変化に着目した解析を行った。十分成熟したCRY1-AP Tgマウス（19週齢）では、膵島のインスリン陽性領域は、野生型マウスと比較し減少していることを上に述べたが、若齢期（4週齢）で膵島のインスリン陽性領域を調べたところ、野生型と比較して明確な異常は確認できなかった。次にグルカゴン陽性細胞（アルファ細胞）を調べた。若齢期（4週齢）ではアルファ細胞の分布に顕著な異常は見られないが、成熟期（19週齢）では分布異常及び細胞数の増加が見られた。これらの結果から、Tgマウスでは週齢依存的に膵島細胞の構成に異常が惹起されることが明

らかになった。さらに膵島のサイズを測定し、若齢期（4週齢）では野生型と比較し膵島のサイズに有意な差が見られないが、成熟期（19週齢）では膵島サイズが減少していることを明らかにした。TUNEL法にて組織切片上でアポトーシスの検出を行ったところ、4週齢及びベータ細胞の消失が著しい19週齢のいずれの膵島においても、野生型と比較し、アポトーシスの増加は見られなかった。

血糖値が野生型と相違がなく糖毒性の影響がないステージの若齢期の膵臓（4週齢）と、病状の進行した成熟期（19週齢または21週齢）の膵臓を用いて、リアルタイムPCRにてベータ細胞の分化及び機能維持に重要な役割をはたす転写因子、ベータ細胞の機能分子及び時計遺伝子の発現を調べた。組織免疫染色が可能な蛋白質については、組織切片上で膵島での発現を免疫染色で調べた。MafA、PDX-1、NeuroD1、Hnf-1 α の転写因子（PDX-1、NeuroD1、Hnf-1 α はヒトMODYの原因遺伝子である）を調べたところ、いずれも成熟期ではCRY1-AP Tgマウスで発現が低下していた。一方若齢期では野生型と比較し発現の低下は認められなかった。これらの結果から、Tgマウスにおけるこれら転写因子の週齢依存的な発現低下が、ベータ細胞の機能異常の増悪に寄与している可能性が示唆された。一方で、インスリン、GLUT2、グルコキナーゼ等膵ベータ細胞の機能分子の発現は、いずれも野生型と比較し若齢期から有意に低下している事が判明した。これらの遺伝子の転写調節に関与するMafAやPDX-1、NeuroD1、Hnf-1 α は4週齢では低下が認められず、変異型CRY1はインスリン、GLUT2、グルコキナーゼの発現に直接的に影響を与える可能性が考えられる。時計遺伝子（PER1、PER2、Rev-erb α ）の発現を解析したところ、いずれも若齢期から野生型と比較し著しく低下している事が明らかになり、Tgマウス膵臓

の生物時計機能の若齢からの異常が示された。さらに膵臓のインスリン含量を測定したところ、若齢期（5週齢）で既に野生型と比較し約半分まで低下していることが判明した。以上の結果より、Tgマウスではインスリン及びグルコースセンシングに関与する遺伝子の発現が若齢から低下し、インスリン生合成不全及び分泌不全が惹起され、その結果糖尿病発症に至る可能性が強く示唆された。

上記糖尿病病態解析と並行し、CRY1-AP Tgマウスの時間生物学的解析を給餌性概日リズムに着目して行った。時間生物学的解析には主にメスを用いた。明暗条件(LD 12:12)下で制限給餌(L期の4時間のみ)に給餌を制限する)を実施し、引き続いて制限給餌を継続させたまま恒暗条件(DD)に移行させ、さらにDD下で自由摂食に戻すスケジュールで活動リズムを測定した。生物時計の中核である視交叉上核(SCN)は通常LD刺激には同調するが給餌刺激には同調しないことが知られている。リズム解析の結果、TgマウスのSCNは給餌刺激に同調しうる特異な性質を持つこと、同調因子として給餌刺激が明暗刺激よりも優位に働くこと強く示唆する結果を得、国際学会等で発表を行った。

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1件)

- ① Okano S, Hayasaka K, Igarashi M, Iwai H, Togashi Y, Nakajima O: "Non-obese early onset diabetes mellitus in mutant cryptochromel transgenic mice", *Eur J Clin Invest*, 40, 1011-1017, 2010, 査読有

[学会発表] (計16件)

- ① 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 富樫義之, 中島修: "Features of diabetes mellitus in mutant cryptochromel transgenic mice at young and mature stages" (一般講演「慢性疾患生物学」) 第34回日本分子生物学会年会

(20111214). パシフィコ横浜(神奈川県)

- ② 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 富樫義之, 中島修: "Features of diabetes mellitus in mutant cryptochromel transgenic mice at young and mature stages" (ポスター発表) 第34回日本分子生物学会年会 (20111214). パシフィコ横浜(神奈川県)
- ③ 岡野聡, 中島修: "変異型CRY1過剰発現マウスが示す明暗条件下での給餌性概日リズムの異常" 第18回日本時間生物学会学術大会. (20111124). 名古屋大学東山キャンパス(愛知県)
- ④ 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 富樫義之, 中島修: "変異型CRY1過剰発現マウスの若齢における膵臓の異常" 日本糖尿病学会第49回東北地方会. (20111105). 仙台国際センター(宮城県)
- ⑤ 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 富樫義之, 中島修: "Diabetes mellitus in mutant cryptochromel transgenic mice at young and mature stages" The 16th Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus. (20111022). ヒルトン東京ベイ(東京都)
- ⑥ 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 富樫義之, 中島修: "Unusual circadian rhythm and diabetes mellitus in mutant cryptochromel transgenic mice" Worldsleap2011. (20111017). 京都国際会議場(京都府)
- ⑦ 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 富樫義之, 中島修: "非肥満若齢発症の糖尿病を示す変異型CRY1過剰発現マウスの膵島の異常" 第54回日本糖尿病学会年次学術集会. (20110520). 札幌プリンスホテル国際館パミール(北海道)
- ⑧ 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 富樫義之, 中島修: "Abnormal islet architecture in diabetic mutant cryptochromel transgenic mice" 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(BMB2010). (20101210). 神戸国際展示場(兵庫県)
- ⑨ 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 岩井晴恵, 富樫義之, 中島修: "変異型CRY1過剰発現マウスの膵島の異常" 第17回日本時間生物学会学術大会. (20101121). 早稲田大学(東京都)
- ⑩ 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 岩井晴恵, 富樫義之, 中島修: "変異型CRY過剰発現マウスの膵島の構成異常" 第48回日本糖尿病学会東北地方会. (20101106). 仙台国際センター(宮城県)

- ⑪ 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 岩井晴恵, 富樫義之, 中島修: “変異型 CRY1 トランスジェニックマウスの示す非肥満・若年発症糖尿病” (プレジデントポスター発表) 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会. (20100528). 岡山コンベンションセンター (岡山県)
- ⑫ 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 岩井晴恵, 富樫義之, 中島修: “変異型 CRY1 トランスジェニックマウスの示す非肥満・若年発症糖尿病” 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会. (20100527). 岡山市デジタルミュージアム (岡山県)
- ⑬ 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 岩井晴恵, 中島修: “Diabetes mellitus in mutant CRY1 transgenic mice” ワークショップ「癌・生活習慣病の発現と時計遺伝子」第 32 回日本分子生物学会年会. (20091212). パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑭ 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 岩井晴恵, 中島修: “変異型 CRY1 トランスジェニックマウスの示す糖尿病” (ポスター発表) 第 32 回日本分子生物学会年会. (20091210). パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑮ 岡野聡, 早坂清, 中島修: “Food-entrained circadian rhythm in mutant CRY1 transgenic mice” The 6th Congress of Asian Sleep Research Society (the 6th ASRS), the 34th Annual Meeting of Japanese Society of Sleep Research (the 34th JSSR) and the 16th Annual Meeting of Japanese Society for Chronobiology (the 16th JSC). (20091027). 大阪国際会議場 (大阪府)
- ⑯ 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 岩井晴恵, 中島修: “Unusual circadian behavior and diabetes mellitus in mutant CRY1 transgenic mice” The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009). (20090801). 京都国際会議場 (京都府)

[その他]

研究会における発表

1. 岡野聡, 中島修: “変異型 CRY1 過剰発現マウスが示す明暗条件下での給餌性概日リズムの異常” 第 19 回山形分子生物学セミナー. (20111116). 山形大学医学部 (山形県)
2. 岡野聡, 早坂清, 中島修: “変異型 CRY1 過剰発現マウスの給餌性概日リズム” 第 10 回山形ニューロサイエンス研究会. (20090613). 山形大学医学部 (山形県)

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

早坂 清 (HAYASAKA KIYOSHI)
山形大学・医学部・教授
研究者番号: 20142961
中島 修 (NAKAJIMA OSAMU)
山形大学・医学部・教授
研究者番号: 80312841

(3) 連携研究者

なし