

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：11501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2012～2014
 課題番号：24590473
 研究課題名(和文)変異型クリプトクロム過剰発現マウスにおける非肥満若齢発症糖尿病の分子機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms of unusual circadian locomotor behavior and non-obese early onset diabetes mellitus in mutant (Cys414-Ala) 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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：変異型mCRY1(Cys414[亜鉛配位部位]をAlaに置換)Tgマウスが示すインスリン分泌不全型糖尿病の発症機序を目的とし、4週齢マウスの単離膵島を用いたDNAマイクロアレイ解析を行った。Tgマウスでは、増殖抑制に働くCDKインヒビター、サイトカイン、ケモカインを含む各種分泌因子の増加を示すことを見いだした。老化細胞に特徴的なSASPと類似の発現パターンを示すこの結果から、Tgマウスの膵細胞は細胞老化様の状態へと変化し、増殖を低下させることが細胞消失の原因であることが示唆された。加えて、膵細胞の脱分化も、Tgマウス膵細胞消失の重要な要因であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We previously showed that Cys414(zinc-binding site)-Ala mutant mCRY1 Tg mice display diabetes characterized by β -cell dysfunction resembling human MODY. To uncover the molecular pathogenesis, we conducted DNA microarray analysis of the islet of the Tg mice at 4 weeks. mRNA levels of various secretory factors including cytokines and chemokines as well as CDK inhibitors were promoted in Tg mice. This expression pattern is similar to that of SASP. The cells, which are Sox9-positive and insulin-negative, were observed prominently in the islet of mature Tg mice, indicating that the dedifferentiation of β -cells occurs in Tg mice. The factors in the hedgehog signalling pathway were up-regulated from the young stage, suggesting that the factors are involved in the induction the dedifferentiation. Thus the dedifferentiation of β -cells, along with the lowered proliferation of β -cells due to the senescence-like changes, are accountable for the age-dependent β -cell failure in the Tg mice.

研究分野：時間生物学，分子糖尿病学，加齢医学

キーワード：膵細胞 mCRY1亜鉛結合部位(Cys414残基) 脱分化 細胞老化 ヘッジホッグシグナル伝達経路 分化転換 視交叉上核(SCN) 給餌同調振動体(FEO)

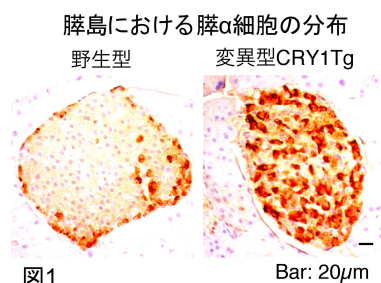
1. 研究開始当初の背景

近年生物時計と種々の疾患との関係が報告されているが、その詳細に関する理解は不十分であり、重要な研究課題となっている。哺乳類において、CRY (クリプトクロム) 蛋白質は、生物時計機構において中心的な役割を担っていることが、東北大加齢研の安井明教授らによる mCRY1/2 ダブルノックアウトマウスの解析から、1999 年に明らかにされた (G.T. van der Horst *et al.*, *Nature*, 398, 627-630, 1999)。

当時、代表者はポストドクとして、安井研究グループにおいて酵母 two-hybrid を用いた mCRY1 (マウス CRY1) の結合蛋白の探索に携わるとともに、ショウジョウバエ CRY の単離に成功し、生化学的解析や分子進化的解析に携わった (Okano S *et al.*, *Photochem Photobiol*, 69, 108-113, 1999)。この経験を生かし、山形大学に着任後、動物の時計蛋白質である CRY 間に、種を越えて保存されているシステイン残基を見いだした。なお、この残基は亜鉛結合部位であることが最近明らかにされた (後述)。

代表者らは、mCRY1 の当該システイン残基 (Cys414) をアラニンに置換した変異型 CRY1 タンパク質を全身的に高発現するトランスジェニックマウス (変異型 [Cys414-Ala] CRY1-Tg マウス) を確立し、同マウス (以下 Tg マウスと略称) は極めて特異な概日リズムの異常 (変異型 CRY1 の発現量に依存して活動のフリーラン周期が長くなり、高発現ラインではリズム分割を伴う: Okano S *et al.*, *Neurosci Lett.* 451, 246-251, 2009) を示すことを明らかにした。変異型 CRY1 は、E-box 制御下にある時計遺伝子の発現を強く抑制し、振動の振幅を小さくすることも示した (*Neurosci Lett.*, 2009)。

さらに若齢から、膵β細胞の機能不全によるインスリン分泌不全を示し、ヒトの遺伝性疾患の若年発症成人型糖尿病 (MODY) と類似した糖尿病を発症することを、連携研究者の早坂清名誉教授 (前山形大学医学部小児科学講座教授) らとともに明らかにした (Okano S *et al.*, *Eur J Clin Invest* 40, 1011-1017, 2010)。Tg マウス膵島では膵細胞消失に伴い、膵細胞の細胞数の増加と顕著な分布異常が見られ、膵島の細胞構成に特徴的な変化が見られた (図 1)。



2. 研究の目的

本研究は、上述の Tg マウスと、変異型 CRY1 発現ヒト細胞 (HEK293) を用いて、哺乳動物の膵細胞機能不全や膵島の構築異常及び概日リズム異常をもたらす分子メカニズムを、時間生物学と分子糖尿病学の観点から、プロテオミクス技術も取り入れて明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

代表者は弘前大学医学研究科に出張し、八木橋教授と水上講師 (当時) からマウス膵島の単離技術を習得した。

血糖値が正常で糖毒性の影響がない若齢マウス (4 週齢) から膵島を単離し、DNA マイクロアレイ解析、各種分子生物学的解析及び生理学的解析を実施した。研究協力者の五十嵐雅彦科長とも連携しつつ、マウス膵島組織を用いた組織免疫染色による各種解析を行った。

連携研究者の安井教授は、ドキシサイクリン添加により変異型 mCRY1 または野生型 mCRY1 を誘導的に過剰発現するヒト (HEK293) 細胞の確立を行った。対照として空ベクターを導入した細胞も作製した。これらの細胞を用いてプロテオミクス解析を実施し、mCRY1 蛋白質の豊富な解析経験をふまえた具体的研究支援を行った。研究分担者中島修教授は代表者の所属施設のセンター長として、全般にわたり支援を行った。

ヒト MODY の臨床に加え、栄養学の臨床応用実績を有し神経生理学にも造詣が深い連携研究者の早坂名誉教授は、糖尿病病態解析に加え給餌性概日リズム解析にも当初から関与し、時間生物学的・神経科学的解析にも具体的助言を行った。給餌性概日リズム解析については、制限給餌 (RF [Restricted Feeding]: 明暗条件下で、給餌を明期の特定の 4 時間のみ制限する) サイクルの時間タイミングを前進させる RF の jet-lag 実験の輪回し活動リズム解析に加え、前脳や肝臓を材料とした分子生物学的解析を実施した。

4. 研究成果

(1) マウス個体を用いた膵β細胞機能不全の解析

A. 膵β細胞の増殖能評価及び膵島の生理学的解析

以前の解析で、若齢期 (4 週齢) の Tg マウスでは膵島に顕著な異常は見られないが、成熟期 (19 週齢) では膵β細胞が著しく減少し、膵α細胞は増加すると共に分布異常を示すことを既に明らかにしている (図 1)。4 週齢のマウスを用いて、若齢期 Tg マウスの膵島を構成する細胞量をさらに詳細に解析した。その結果、Tg マウスでは野生型と比較し膵β細胞量は若干減少し、膵α細胞量は若干増加していることが新たに判明し、若齢期から既に、膵島細胞の構成に軽微な異常が生じていることを明らかにした。4 週齢のマウスから

膵島を単離し、グルコース応答性インスリン分泌反応を *in vitro* で評価したところ、Tg の膵島はインスリン分泌能が低下していることも判明した。

細胞増殖が活発なステージである若齢マウス(2週齢)の膵臓を用いて、細胞増殖マーカーとしてPCNAを検出する免疫組織化学的解析から膵β細胞の増殖能を調べ、Tgマウスではβ細胞の増殖が低下していることを明らかにした。増殖能の低下が、Tgマウスにおける週齢依存的なβ細胞の減少の主要な原因であることが新たに判明した。

B. 膵β細胞の細胞老化様変化と膵β細胞の脱分化及び分化転換の解析

マウス膵島(4週齢)を用いたDNAマイクロアレイ解析やqPCR解析等から下記の結果を得た。

E-box 制御下にある種々の時計遺伝子(PER1, PER2等)及び出力系遺伝子(DBP等)の発現が、野生型マウスと比較してTgマウス膵島で強く抑制されていることが判った。Tgマウス膵島の生物時計機能は障害されていることがあらためて示された。

BMAL1 ノックアウトマウスにおいて、比較的軽微なインスリン分泌不全型糖尿病の症状をしめすことが、米国のグループから、代表者らの報告(Okano S et al., *Eur J Clin Invest* 40, 1011-1017, 2010)と同時期に報告されている(Marcheva B et al., *Nature* 466, 627-631, 2010)。BMAL1 ノックアウトマウスにおいては膵β細胞のエクソサイトーシスの障害がインスリン分泌不全の主因であることが報告された。同マウスの膵島のマイクロアレイ解析において、小胞の輸送やドッキングに関与する一群の分子の発現が変化していることも報告されている(同 *Nature* 論文)。本 Tg マウスにおいては、野生型マウスと比較し BMAL1 の発現は亢進していることが判明した。小胞制御分子の発現が変化する傾向は、本 Tg マウスで見られなかった。以前の研究結果も総合し、BMAL1 ノックアウトマウスと本 Tg マウスでは、インスリン分泌不全をもたらす分子機序は本質的に異なるものであると考えられる。

膵細胞において、M₃ ムスカリン性アセチルコリン受容体を介するインスリン分泌促進経路の抑制因子として働くことが報告されている、Rgs (regulator of G protein

膵島(4週齢)のqPCR

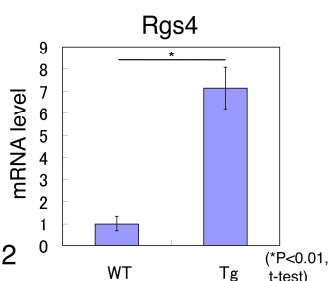


図2

signalling) 4 の発現が、Tg マウス膵島で顕著に亢進(7.3倍:膵島 qPCR; 図2)していることを見いだした。このことは、Tg マウスの若齢からのインスリン分泌不全の、重要な要因の一つであると考えられる。

上述の膵β細胞の増殖能評価実験の結果と一致して、細胞周期阻害因子である CDK インヒビター(p15 及び p21)の発現が、Tg マウス膵島で増加していることを発見した。CDK インヒビターの発現亢進は老化細胞で報告されている。さらに、細胞老化に特徴的な SASP (senescence-associated secretory phenotype) と類似した、一群の炎症性サイトカイン・ケモカイン(Ccl2, Cxcl1, IL6等)各種分泌因子(Angpt2, BMP2, Fgf18等)遺伝子の発現が、野生型と比較して増加していることを明らかにした。4週齢マウス膵臓のqPCRではマクロファージマーカー(F4/80)の発現がTgマウスにおいて軽度増加(1.6倍)していた。しかしながら、典型的細胞老化に見られるマトリックスメタロプロテナーゼ(MMP)の増加は認められなかった。この SASP 様の発現パターンから、Tg マウスの膵細胞の特徴は、細胞老化の亜型に相当する可能性がある。

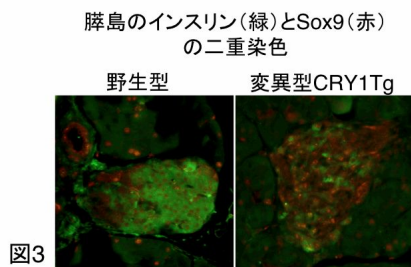
以上の結果から、(I)変異型CRY1は膵島において時計遺伝子のみならず、膵細胞のインスリン分泌制御に関与する遺伝子の発現に影響を及ぼすこと、(II)変異型CRY1は膵細胞の細胞老化様変化を惹起し、老化様変化と機能破綻・糖尿病発症は密接に関連していること、が強く示唆された。

Vgf 遺伝子の発現が、若齢 Tg マウス膵島で野生型と比較し増加していることを新たに見いだした(1.9倍:膵島 qPCR)。Vgf はプロホルモンをコードしており、この産物は、膵細胞の細胞死の抑制効果を有することが報告されている。代表者らは、Tg マウスで膵細胞のアポトーシスの亢進は認められないことを以前にことを以前に明らかにしている。Vgf の増加は、この機序の要因の一つであり、膵細胞においてストレス対応として発現が亢進し、膵細胞の保護作用をもたらしている可能性がある。

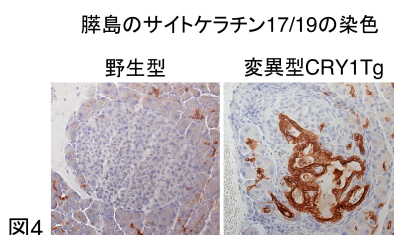
若齢 Tg マウス膵島において膵前駆細胞に発現する Sox9 等複数の転写因子の発現亢進を認めた。また、発生や分化に関わることが知られるヘッジホッグシグナル経路の因子(Gli1, Ihh)の亢進も認められた。そこで、膵細胞の消失が顕著な、成熟 Tg マウスの膵臓を用いて、インスリンと Sox9 の二重免疫染色をおこなったところ、Tg マウスの膵島ではインスリン陰性かつ Sox9 陽性の細胞が多数観察された(図3)。

これらの結果から、Tg マウスの膵細胞では脱分化が亢進しており、増殖能低下に加え

脱分化の亢進も、膵細胞の消失の重要な要因であることが強く示唆された。脱分化の誘導の経路の一つとして、ヘッジホッグシグナル経路の関与が強く示唆された。一群の Wntシグナル経路因子(Wnt7a、Wnt6、Fzd6等)も増加しており、これらも脱分化誘導に関与する可能性がある。



上述の Sox9 転写因子は膵前駆細胞に加え、膵管細胞でも発現することが知られている。Sox9 に加え一群の膵管細胞のマーカー遺伝子(Cytokeratin19、Carbonic anhydrase 2、Osteopontin)が、若齢 Tg マウス膵島で野生型と比較し増加していることを発見した。そこでサイトケラチン 17/19 に対する抗体を用いて、成熟 Tg マウスの膵臓を用いて染色をおこなったところ、Tg マウスでは、サイトケラチン 17/19 陽性の、異常な膵管様構造を伴う膵島が高頻度に存在することが判明した(図4)。



以上の結果から、Tg マウスの膵細胞では、若齢から既に脱分化誘導をもたらす一群の遺伝子に発現の促進が開始され、過齢を経るに従い脱分化が顕著となり、脱分化した細胞は膵管の特徴を有する細胞へ分化転換することが示唆された。

(2) CRY1 発現ヒト細胞の解析

HEK293細胞でドキシサイクリン添加により変異型CRY1蛋白質を過剰発現させると、E-box制御下にある時計遺伝子(PER2等)の発現が対照細胞(空ベクター導入HEK293細胞)と比較して顕著に減少し、BMAL1は増加

した。この結果は個体レベルで得られた結果(上記DNAマイクロアレイ・qPCR、及び以前の結果結果: Okano S et al., Neurosci Lett. 451, 2009)と一致しており、変異型CRY1の機能をヒト細胞で明らかにする上で、本細胞は適した実験系であることが裏付けられた。

変異型CRY1を発現させると、CDKインヒビターp21は軽度増加した。各種ケモカイン・サイトカインの発現についても、空ベクター導入細胞と比較し、明確に発現は増加するが、野生型CRY1過剰発現細胞でも同様に増加するものも認められた。H2AXフォーカス形成の程度を解析したが、各細胞間で明確な相違は観察されず、HEK293細胞においては、変異型CRY1は細胞老化を強く誘導するものではないと考えられる。

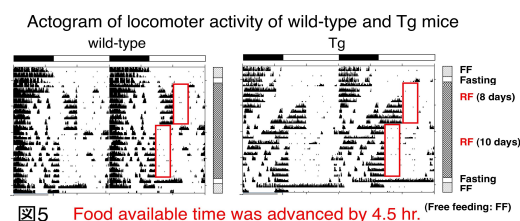
プロテオミクス解析では、変異型mCRY1結合蛋白質候補をnano-LC MS/MSで解析した結果、新規な結合タンパクの同定には至らず、さらに条件を変え探索を行っている。

分子機序解明の新たなブレイクスルーとすべく、安井教授がマウス膵細胞株(MIN6)を宮崎純一教授(大阪大学)から入手し、レンチウイルスを用いたCys414-Ala変異CRY1発現細胞の構築を行っている。さらに、下記の神経科学的解析の深化をも目指した、Cys414-Ala変異CRY1マウスの個体や脳スライスレベルでの概日リズムの新規発光モニター系の構築と、genetic lineage tracingを導入し膵細胞の運命追跡を行う具体的計画を進めている。

(3) マウス個体を用いた時間生物学的解析 A. 輪回し活動を指標とした概日リズムの解析

以前の解析において、Tgマウスにおいては同調因子として給餌刺激(RF)が明暗刺激よりも優位に働き、Tgマウスの視交叉上核(SCN)の生物時計は、野生型マウスと異なりRF周期に同調してしまうという、特異な性質を持つことを既に明らかにしている。

RFの時間タイミングを前進させる給餌の jet lag実験を実施したところ、Tgマウスは新たな給餌時刻に合わせてRF同調活動の位相が前進した(図5)。



この結果から、TgマウスSCNの生物時計はRFに同調するのみならず、RFの位相前進に合わせて新たなRF時刻に再同調が可能であることが新たに示された。

B. 分子生物学的解析

分子的機序を明らかにする目的で、肝臓及びSCNで発現が強い概日変動を示し、SCNニューロン間の同期(coupling)や、RF同調リズム形成にも関与することが報告されているRgs (Regulators of G protein signalling) 16を、qPCRにてマウスの肝臓で調べた。その結果、TgマウスではRgs16の概日発現変動の振幅が顕著に抑制されていることを明らかにした。加えて前脳において、変異型CRY1 Tgマウス特異的にRgs4とRgs2の発現が増加していることを見いだした。

近年の時間生物学領域の報告と、Tgマウスの概日リズムの活動レベルの異常と分子的变化の実験結果を総合すると、変異型CRY1 Tgマウスでは、SCN及びFEO(給餌同調振動体)においてcAMPやカルシウム関与のシグナル経路が擾乱され、SCN内ニューロン間のcouplingが障害され、SCN-FEO間連携にも不全を来し、その結果、給餌入力にSCNに強く影響するようにSCNの特性が変化しRFに同調する可能性が考えられる。代表者が研究成果をまとめ論文執筆作業を行っている。

なお、国内外の研究者と積極的に交流し、本共同研究の成果を発信した。時間生物学における波及効果の一端を下記に示す。

代表者は2013年ミュンヘンで開催されたヨーロッパ時間生物学会(EBRS)に出席し、研究の成果を発表した。その折、ルートヴィヒ・マクシミリアン大学(ミュンヘン大学)のEva Wolf教授と、構造生物学的な観点からのmCRY1のCys414の役割と、変異型CRY1-Tgマウスの表現形との関連について議論した。

Wolf教授らの研究グループは最近、mCRY1-mPER2複合体の結晶構造をCell誌に報告し、mCRY1 Cys414の役割も解明した(Cys414はmCRY1のPER蛋白との結合面のC-terminal lid上に位置し、複合体においてPER蛋白の特定の残基と共に、亜鉛を配位する残基として機能する)。従って、mCRY1-mPER2の相互作用を制御し、mCRY1の時計制御機能の上で重要なアミノ酸残基であることが、構造生物学的にも示された(Schmalen I et al., Cell, 157, 1203-1215, 2014; 図6)。

mCRY2の当該システイン残基についても、同様に亜鉛結合部位であることが、他のグループから報告された(Nangle et al., eLife, 3, e03674, 2014)。

同論文では、さらに、Cys414変異mCRY1をCRY欠損MEF細胞に導入し、Per2-Lucレポーターを用いて分子時計

への影響を調べている。その結果、変異型mCRY1導入により分子時計の振幅は低下し、周期は長くなることが示された(同eLife論文のFigure 5B)。これは、代表者らのマウス個体レベルでの結果を裏付ける結果である。

2014年の第87回日本生化学会大会(京都)でのシンポジウムでは、mCRY1の各ドメイン上の、機能上重要なアミノ酸に、網羅的に1アミノ酸置換をもたらす変異を導入した種々のmCRY1変異マウス個体の作製や、それらmCRY1変異体をMEF細胞に導入した、マウス個体と細胞レベルでの概日リズムの測定結果が、東大及び理研の研究グループから報告された(演題番号4S08a-3、「CRY1のp-loopリン酸化と電子伝達系は哺乳類概日周期長を制御する」;大出晃士, 鳴海良平, 上田泰己)。Cys414変異が概日周期や振幅に与える効果については、上述の報告と同様の、代表者らの結果をサポートする結果が報告されている。

mCRY1-mPER2 structure

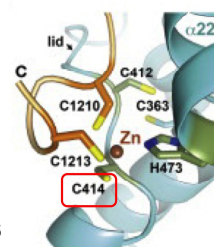


図6

(Schmalen I et al., Cell, 157, 1203-1215, 2014)

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, Togashi Y, Nakajima O:

“Characterization of age-associated alterations of islet function and structure in diabetic mutant cryptochrome 1 transgenic mice” Journal of Diabetes Investigation 4 428-435 (2013), 査読有, 10.1111/jdi.12080

[学会発表](計16件)

主要なものを下記に記す。

1. 岡野聡, 安井明, 早坂清, 五十嵐雅彦, 中島修: “時計タンパク質CRY1の変異体過剰発現マウスにおける膵β細胞の機能不全” 第26回分子糖尿病学シンポジウム(20141206). 高知市文化プラザ かるぼーと(高知県)

2. 岡野聡, 安井明, 早坂清, 五十嵐雅彦, 中島修: “時計タンパク質 CRY1 の変異体過剰発現マウスの膵 B 細胞の老化様変化と脱分化” 第 37 回日本分子生物学会年会 (20141126). パシフィコ横浜 (神奈川県)
3. 岡野聡: “時計遺伝子クリプトクロムと糖尿病・クリプトクロムとの出会いから糖尿病まで”(招待講演) 生活習慣病と睡眠障害を考える研究会 [山形県医師会共催] (20141028). ホテルメトロポリタン山形(山形県)
4. 岡野聡, 安井明, 早坂清, 五十嵐雅彦, 中島修: “Regulation of Rgs4 in the islet of mutant cryptochrome1 transgenic mice” Homeodynamics in Clocks, Sleep and Metabolism Tokyo Translational Therapeutics Meeting (20140924). 東京大学伊藤謝恩ホール (東京都)
5. 岡野聡, 安井明, 早坂清, 五十嵐雅彦, 中島修: “糖尿病を示す変異型 CRY1 過剰発現マウス膵島の遺伝子発現及び CRY1 結合タンパク質の解析” 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 (20140524). リーガロイヤルホテル (大阪府)
6. 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 富樫義之, 中島修: “Unusual food-entrained circadian rhythm and diabetes mellitus in mutant CRY1 transgenic mice” 第 13 回ヨーロッパ時間生物学会 (EBRS) (20130818-20130822). ルートヴィヒ・マクシミリアン大学ミュンヘン (ドイツ)
7. 岡野聡, 早坂清, 五十嵐雅彦, 富樫義之, 中島修: “Features of diabetes mellitus in mutant cryptochrome1 transgenic mice at young stage” 第 9 回国際糖尿病連合西太平洋地区 (IDF-WPR) 会議 / 第 4 回アジア糖尿病学会 (AASD) 学術集会 (20121125). 国立京都国際会館 (京都府)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

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

(3) 連携研究者

安井 明 (YASUI AKIRA)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号 : 60191110

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

五十嵐 雅彦 (IGARASHI MASAHIKO)

山形市立病院済生館・糖尿病内分泌内科・科長