

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17450

研究課題名（和文）新規膵炎関連TRPチャンネル遺伝子の機能解明による治療開発基盤の構築

研究課題名（英文）Analysis of pancreatitis-related TRP channel function

研究代表者

中野 絵里子（Nakano, Eriko）

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90779729

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：研究期間全体において、Trpv6コンディショナルノックアウトマウスの作出と交配・コロニー維持を行い、通常の飼育条件下では膵組織に変化がみられないこと、薬剤投与による膵炎モデルにおいて炎症の増悪がみられることを確認した。若年発症膵炎患者において新たに同定された非同義変異について、機能解析に供するため変異体発現ベクターを構築、共同研究施設での解析に備え保管中である。マウスとヒトでの相溶性が高い点にも着目し、ヒトに見られた変異を導入したノックインマウス作成にも着手した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究により得られた知見は、新規膵炎関連遺伝子による膵炎発症機序解明にむけて基盤となる重要なものである。作出したマウスモデルや変異体発現ベクター、ノックインマウス樹立により病態解明が進むと期待される。

研究成果の概要（英文）：We established Trpv6 conditional knockout mouse. This mouse did not develop pancreatitis under normal condition, but administration of caerulein resulted in exacerbation of pancreatitis. We also identified new TRPV6 mutations in early-onset idiopathic pancreatitis. We constructed expression vectors of these mutants for future functional assay. We started to establish Trpv6 mutation knock-in mouse for further analysis.

研究分野：消化器内科

キーワード：慢性膵炎

1. 研究開始当初の背景

慢性膵炎は進行性の膵実質脱落と線維化により膵内外分泌機能の低下を来す疾患である。本邦における慢性膵炎の病因としてはアルコールが最多であるが、アルコール多飲がなくとも膵炎を発症し、かつ発症に遺伝的素因が関与する患者群が知られていた。1996年に遺伝性膵炎の疾患原因遺伝子としてカチオニックトリプシノーゲン (PRSS1) 遺伝子変異が同定されて以降 (Whitcomb, Nat Genet 1996)、主にトリプシンの活性調節に関わる膵分泌性トリプシンインヒビター (SPINK1) 遺伝子異常や (Witt, Nat Genet 2000)、トリプシン分解に寄与するキモトリプシン C (CTRC) 遺伝子異常が見出されてきた。以上の遺伝子変異は持続するトリプシン活性やトリプシン抑制機構の機能低下によって膵炎を発症する。その後に見出されたカルボキシペプチダーゼ A1 (CPA1) 遺伝子異常はそれとは異なり、変性蛋白質の misfolding が膵腺房細胞に小胞体ストレスを与えるという新たな機序で膵炎に至る (Witt, Nat Genet 2013)。しかしながら本邦での遺伝性・家族性膵炎家系を対象とした調査 (Masamune A, J. Gastroenterology, 2018) では、約 3 割の家系において原因遺伝子異常を認めていない。このことは膵炎発症に関わる未知の遺伝子の存在を示唆している。

研究代表者所属施設では、東北大学遺伝病学講座との連携のもとに次世代シーケンスによる新規膵炎関連遺伝子の同定を進めてきた。健常両親と若年発症膵炎患者でのトリオ解析を行った結果、膵炎患者において TRP チャネル遺伝子の de novo 変異が確認された。同遺伝子の変異は特発性慢性膵炎患者でも有意に高頻度であり、アミノ酸変異を伴う遺伝子変異が多数確認された。野生型チャネルおよび変異チャネル遺伝子の強制発現系でチャネル機能を確認したところ、膵炎患者でみられる変異はチャネル機能の低下または亢進を示すことが明らかとなり、新たな機序に基づく膵炎発症メカニズムが示唆された。

従来膵炎発症メカニズムとして注目されてきたトリプシン活性の制御に関わる遺伝子変異や、小胞体ストレスを増加させる遺伝子変異を直接治療標的とすることは、以下の理由から困難である。(1)持続するトリプシン活性の制御 活性の持続的な抑制/腺房細胞へのデリバリーが困難、(2)小胞体ストレスの軽減 細胞内の普遍的な現象への介入が必要であり、標的も未解明。本研究課題の発端となった TRP チャネルの遺伝子変異は研究代表者所属施設にて見出された世界初の知見であり、極めて独自性の高い疾患原因遺伝子である。同遺伝子の産物であるチャネル蛋白の機能と膵外分泌系機能の関連は未解明であり、膵炎発症に至る機序も明らかになっていないという、新規性の高いターゲットである。

膵炎関連遺伝子として新たに同定された TRP チャネルはチャネル機能を正常化させる薬剤によって機能是正が可能と考えられ、対症療法に留まらない治療薬開発につながる可能性がある。さらに、他の要因によって発症する膵炎においても同遺伝子産物の機能異常が発症に寄与しているとすれば、慢性膵炎全体に使用しうる治療薬につながるという、大きな発展性を有している。慢性膵炎患者において同定された遺伝子変異については、電気生理学的な手法によって野生型に比べチャネル機能の低下または亢進があることが判明している。このような変化は腸管上皮からのイオン吸収や神経細胞の活動電位など多様な細胞機能に影響する可能性があり、イオンチャネル病という新たな疾患概念の確立にもつながるといふ大きな創造性を有する。膵における影響としては以下のものが考えられる。(1)導管細胞におけるイオン輸送の変化 重炭酸をはじめとした膵液の成分変化、(2)腺房細胞内のイオン濃度変化 腺房細胞内での不適切な膵酵素活性化

このような変化を解析するためにはヒト検体の解析や細胞モデルでの実験には限界があり、モデル動物作成による解析が必要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規膵炎関連 TRP チャネル遺伝子変異による膵炎発症機序の解明と、チャネル機能改善薬探索による新規治療開発の基盤構築である。

3. 研究の方法

ゲノム編集技術を用いて、該当 TRP チャネルの一部エクソンをはさむように LoxP 配列を挿入する。Pdx-1-Cre マウスとの交配により膵特異的のノックアウトマウスを作成し、通常飼育またはセルレイン投与による急性膵炎モデルへの影響を評価する。ヒト若年性慢性膵炎患者において同定された非同義変異について、site-directed mutagenesis により変異を導入した発現ベクターを作成する。ヒトにみられた変異のうち、マウスでも再現可能な変異についてノックインマウスを作成する。

4. 研究成果

(1) コンディショナルノックアウトマウスの表現型確認

通常の飼育条件下ではコンディショナルノックアウトマウスは野生型マウスと同様の発育を示し、体重減少などは認めなかった。生後 150 日までの飼育を行い、膵組織に炎症性変化を認め

ないことを確認した。セルレイン投与による急性膵炎モデルを作成したところ、一日8回の投与を1日のみ行うプロトコルでは膵炎の増悪は認めなかったが、全身性ノックアウトマウスで既報において膵炎の増悪がみられる1日8回、2日間のセルレイン投与を行うモデルでは腺房細胞の壊死や脱落、炎症細胞浸潤の増悪を確認することができた。コンディショナルノックアウトのバックグラウンドを膵発癌モデルマウスへ導入し、発癌への影響も評価予定である。

(2) 患者由来変異体発現ベクターの構築

若年発症慢性膵炎患者に診られた新たな変異については site-directed mutagenesis により変異体の発現ベクターを構築し、培養細胞での強制発現系をもちいてチャネル機能の評価や細胞死の誘導がみられるかを検討中である。

(3) 患者由来変異ノックインマウス作成

ヒトとマウスでの相同性が高いことに注目し、ヒトに見られた変異のうちマウスで再現可能な複数の変異体を選定し、ゲノム編集によるノックインマウス作成準備を進めている。すでにガイド RNA の設計を終了し、細胞への導入実験を行ってゲノム編集効率を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masamune A, Kotani H, Sorgel FL, Chen JM, Hamada S, Sakaguchi R, Masson E, Nakano E, et al.	4. 巻 158
2. 論文標題 Variants That Affect Function of Calcium Channel TRPV6 Are Associated With Early-Onset Chronic Pancreatitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1626-1641
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2020.01.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------