

課題番号 7

新規 CRY1 結合タンパク質の解析を中心とした 膵組織構築変化の分子機構の解明

[1] 組織

代表者：岡野 聡

(山形大学医学系研究科)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

佐藤 賢一 (東北医科薬科大学)

五十嵐 雅彦 (山形市立病院済生館)

中島 修 (山形大学医学系研究科)

早坂 清 (山形大学・みゆき会病院)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

代表者らは、以前に特異な概日リズムの表現型を示すトランスジェニックマウスを確立した。このマウスは、哺乳類に於ける代表的な時計蛋白質（時計遺伝子産物）の一つであるクリプトクロム 1 (CRY1) 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 蛋白を β アクチンプロモーターの制御下に全身的に過剰発現するトランスジェニックマウス（変異型 CRY1 全身的発現マウス、以下「Tg マウス」と略記）である。

平成 27 年度に加齢研共同研究報告書（課題番号 3）に詳細は述べたが、代表者は、長年にわたり CRY の研究交流を一貫して行ってきた安井明フェローグループと正式に加齢研共同研究を実施し、早坂清・施設長（山形大学遺伝子実験施設、現名誉教授）を高次のアドバイザーとする糖尿病 / 膵臓研究の研究ネットワークを形成し、Tg マウスの膵 β 細胞機能障害の主要な分子機構を明らかにすることで MODY 様糖尿病の新しい動物モデルとしての側面を確立し、総説論文として公表した [Okano S. J Diabetes Res., 3459246, 2016]。

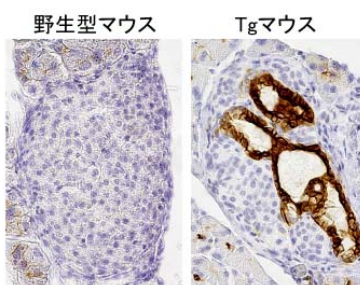
近年、CRY1 の C414 残基の機能解析を他の研究グループも実施しており、構造生物学を中心とした複数の研究報告から、C414 は亜鉛 (zinc) 結合サイトであることが既に確立されている。それらの研究を含め、CRY1-C414 残基の解析には、アラニン置換体が標準的に用いられている。多方面からの C414A 変異 CRY1 の分子的特性の知見を、個体レベルでの表現系の解釈

に直接的に活用できることは、Tg マウスの病態モデルとしての重要な特色の一つである。

Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) は浸潤性膵管癌の前駆病変であることが知られている。その生成機序については種々の動物モデルを用いた多くの研究から、外分泌腺細胞が導管細胞へと分化転換する Acinar to Ductal Metaplasia (ADM) を経て膵管形成が起こり、これが PanIN 病変へと進行する機序が提唱されている。

代表者は、高齢の Tg マウスでは PanIN 様病変が高頻度に出現すること新たに見出した。Tg マウスの PanIN 形成における特徴的な点として、特に膵島内に異常な膵管様構造が生成される傾向が顕著であり（図 1）、ADM を経由する機序以外にも、膵島細胞の分化転換が PanIN の生成に重要な役割を果たしていることが推測される。これまでに得ている Tg マウ

図1 膵島内の異常な膵管構造



ス由来の単離膵島を用いた発現解析の結果も [Okano S. J Diabetes Res., 2016], この機序を強く示唆している。

本研究は、分子病理の解析とプロテオミクス解析を組み合わせた研究から、

- ① 膵内分泌細胞機能不全
- ② 膵管前癌病変生成

に関わる新たな機序を具体的に明らかにすることを目的としている。

研究打ち合わせに関しては、山形大学における施設業務や教育業務への影響を最小限に抑えるべく、メールでの連絡を主とし、必要に応じて代表者が加齢研に出向き、安井明フェロー及び菅野新一郎講師とタンパ

ク質レベルでの解析の進展状況や、CRY の異常が如何に Tg マウスの表現型の異常に関与しているのか等、活発な議論を行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

1. プロテオミクス解析

CRY1 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、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。RNA 結合タンパク質についても同様に GST 融合タンパク質を得て pull down アッセイを実施した。その結果、RNA 結合タンパク質と CRY1 の結合が確認され、また、変異型では結合が弱まることも示された。他の候補タンパク質についても解析が進行している。

2. 病理解析

PanIN 様病変の解析を、種々の癌との関連が報告されている KPNA2 との関わりに着目した解析を実施した。

高齢 (1 年以降) のマウスの膵臓を採取し、病理解析を実施し、膵管異型細胞の特徴づけを行った。

得られた主要な知見を下記に記す。

- 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。
- 正常な膵管細胞では、KPNA2 の明確な発現が見られなかったが、異型度の進行に伴い発現が増加することを示した。
- 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。膵β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。

以上の結果から、Tg マウスでの膵β細胞機能障害及び PanIN 形成に KPNA2 の発現の変化が関与することが示唆された。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究と関連して、ごく最近、ヒトの 2 型糖尿病患者では PanIN 生成が増加することが報告された。さらに膵β細胞の炎症性変化がその機序に関与することが示唆された [Schludi B et al., JCI Insight. 6;2 (13) . pii: 92282. 2017]。糖尿病患者の膵癌リスクの低減の観点から、膵島の異常

と PanIN との関連の解明が、重要な学問的課題として一段と認識されつつある。

本研究から膵島を起点とする未知の PanIN 生成メカニズムの新しい分子機序が解明されると期待され、本研究の意義は小さくないと考えられる。

[4] 成果資料

成果の一部を下記の国際学会や国際会議で報告した。

1. Features of pancreatic intraepithelial neoplasia and tubular complex in diabetic cysteine414-alanine-mCRY1 transgenic mice
第 16 回ヨーロッパ生物リズム学会 (EBRS 2017)
[アムステルダム] 2017 年 8 月 1 日
2. Reduced expression of KPNA2 and dysfunction of β-cells in C414A-CRY1 transgenic mice (e-poster: 2184-P)
77th Scientific Sessions American Diabetes Association (ADA)
[サンディエゴ] 2017 年 6 月 12 日
3. Pancreatic intraepithelial neoplasia-like cells in diabetic cysteine414-alanine-mCRY1 transgenic mice
Tohoku Forum on Aging Science (IDAC, Tohoku Univ.)
[仙台] 2017 年 5 月 10 日