

課題番号 10

時計蛋白質 CRY1 の転写因子制御機構の解析を基にした 膵β細胞機能障害及び膵癌生成機序の解明

[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：中島 修（山形大学医学系研究科）
五十嵐 雅彦（山形市立病院済生館）
佐藤 賢一（東北医科薬科大学医学部）

研究費：物件費 15 万円

[2] 研究経過

代表者らは、時計蛋白質 mCRY1（クリプトクロム 1）の Cys 414 残基（亜鉛 [Zn] 結合サイト）をアラニンに置換した変異体（C414A-CRY1）を全身的に過剰発現させることで生物時計振動体に異常を生じさせ、マウスに若年発症成人型糖尿病（MODY）に類似した糖尿病を生じさせる新たなモデルを確立し（以下このマウスを「TG」、野生型マウスを「WT」と称する）膵β細胞機能障害に起因するインスリン分泌不全、及びβ細胞そのものの過齢依存的な消失がTGの糖尿病の主因であることを、東北地方を横断する研究チームにより、加齢研共同研究採択課題として明らかにしてきた [1]。研究チームの構成であるが、20 年来共同して研究を実施している安井明 加齢研フェロー・菅野新一郎 加齢研講師、当研究の初期から参加している早坂清 山形大学医学部小児科学講座 名誉教授（前遺伝子実験施設 施設長・現みゆき会病院 小児科）はもとより、各分野のエキスパートに参画いただき、現在の陣容に至っている。亜鉛結合能を欠いたCRY1は膵β細胞において細胞老化をもたらし、β細胞が減少するとともに、β細胞から分泌されるSASP因子が膵ラ氏島の内外へ影響を及ぼし、ライフステージの進行とともに膵臓に種々の病理学的な変化をもたらすと考えられる [1,2]。

ライフステージの後期になると、TGでは膵ラ氏島内に膵管様組織構成細胞（Intra-Islet Ductal Cell; 以下この病変を「IIDC」と称する）が高頻度に出現する。WTではそのような病変は観察されない [2]。IIDCの生成過程と特徴の解明は、膵癌の生成機序の理解の上で有意義であることから、概日リズムの研究、β細胞障害の機序追求に加え、自身の研究資源を重点的にIIDCの解析に割いてきた。これまでの研究の経緯を踏まえ、今年度からの共同研究は

1) 細胞内亜鉛の減少が膵β細胞におよぼす影響

2) IIDCの分子的特徴づけと発生機序の解明

3) 膵β細胞の生物時計機構の意義の解明

の3つを柱とし、転写因子、時計タンパク質、RGS（後述）に重心をおいた研究を実施した。アプローチとして、マウス組織の病理解析、培養細胞での解析、さらにクリプトクロムの結合タンパク質の探索と解析を目的としたプロテオミクス解析とを組み合わせ実験を遂行した。連絡状況については、代表者が加齢研へ複数回出張し、対面にて安井明 加齢研フェロー・菅野新一郎 講師と打ち合わせを行った。五十嵐雅彦 地域糖尿病センター長、佐藤賢一 消化器内科教授とはメールで打ち合わせを行った。早坂清 アドバイザーとは、メールにて意見交換や学問的議論を行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

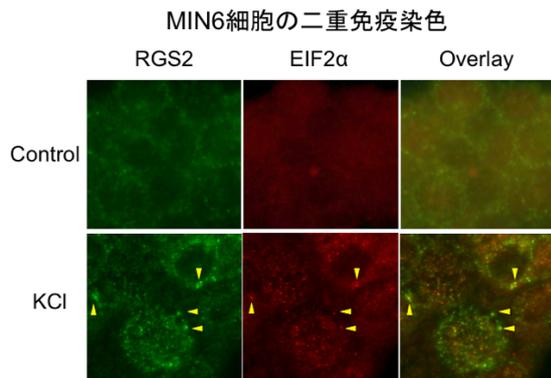
● 膵β細胞の亜鉛欠乏実験

膵β細胞株 MIN6 を KCl で長時間処理し、MIN6 細胞内の亜鉛を減少させると共に慢性高血糖を模倣した状態を実現し、その細胞への影響を調べる実験では、前年度 Chop 遺伝子の発現亢進を報告した（2019 年度加齢研共同研究報告書、No. 8）。この結果から、KCl 刺激による MIN6 細胞の慢性的な脱分極に起因しインスリンの過剰分泌がもたらされ、その負荷の結果、小胞体（ER）ストレスが誘導されると代表者は推測した。今年度さらに解析を進め、分子シャペロンの BiP (GRP78) が、KCl 処理をした細胞の小胞体で増加することを、新たに明らかにした。さらに、小胞体ストレス応答（Unfolded Protein Response: UPR）に中心的役割を果たす転写因子 ATF4 が細胞核で増加することを示し、KCl での長時間処理で ER ストレスが惹起されることを、より明確に示すことができた。

RGS (regulator of G protein signaling) タンパク質ファミリーは G protein-coupled receptor を介するシグナル伝達の制御に関わる。過去の加齢研共同研究において、TG マウス β 細胞で RGS の発現が変化する結果を得ており、TG 膵β細胞の機能不全の一因となっていることが推測される [1]。亜鉛欠乏に対する細胞応答に RGS が関与すると予想し、MIN6 の実験系において、3 種の RGS (RGS2, 4, 16) について、遺伝子発現と細胞内分布の変化を解析した。調べたいずれの Rgs 遺伝子も、KCl 処理にて発現が亢進した。亜鉛欠乏条件において、3 量体型 G 蛋白質を介するシグナル伝達の種々の経路の改変が起こり、またそのこと

が、後述する脱分化(dedifferentiation)の誘導に何らかの役割をはたしているかと代表者は推測している。

ストレス負荷時 RGS2 は翻訳開始因子の eIF2B と直接結合してタンパク質翻訳を抑制することが、他の哺乳類細胞を用いた実験から報告されている[3]。そこで翻訳開始因子として eIF2 α を選び、eIF2 α と RGS2 の関係を調べた。KCl 処理により MIN6 細胞内の RGS2 蛋白質は増加すると共に、一部の RGS2 は翻訳開始因子の eIF2 α と共局在した。この結果から RGS2 は、膵 β 細胞においてもシグナル伝達に加え、翻訳制御にも関与すると考えられる。



本研究と同様の実験条件下で、 β 細胞の分化誘導や機能維持に関わる様々な転写因子の mRNA が低下し、MIN6 細胞が脱分化 β 細胞様の特徴を示すようになることが、他のグループからの先行する論文で報告されている[4]。脱分化との関連をさらに詳細に調べる目的で、 β 細胞の脱分化マーカーとして報告のある aldh1a3 遺伝子の発現を調べた。その結果、亜鉛欠乏条件下で aldh1a3 の発現が亢進する結果を得た。また、紙幅の関係上詳細は割愛するが、複数の disallowed genes (成熟 β 細胞では発現が抑制されるべき遺伝子)の遺伝子発現が活性化されていることや、成熟 β 細胞で重要な転写因子 MafA が、核からほぼ消失する知見も得ており、新たな側面から脱分化様 MIN6 細胞の特徴を明らかにすることが出来た。

● 分子病理の解析

TG と WT 各々の高齢 (19 月齢) マウスの膵臓パラフィン切片から、レーザーマイクロダイセクションによりラ氏島を採取した。これらのサンプルから RNA を精製し、DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現の解析を行った。その結果、TG のラ氏島にて Tff2 (Trefoil factor family 2) 遺伝子の発現が亢進していることが判明した。そこで、抗 TFF2 抗体を用いて免疫組織染色を実施したところ、IIDC の内、ムチン産生性の細胞において TFF2 タンパク質が局在していることを見出した。次いで、ラ氏島を形成している膵内分泌細胞に着目したところ、TG の β 細胞で TFF2 は発現していることが明らかとなった。WT では β 細胞に TFF2 は発現していなかった。

若齢 (4 週齢) の TG では、 β 細胞に TFF2 タンパク質は見られなかった (画像等は、web 上の e-poster を参照下さい [80th ADA meeting, e-poster: 2057-P, 2020])。TG では β 細胞から分泌される SASP 因子により、ラ氏島にリモデリングが起こり、正常ラ氏島とは異なる環境が形成され、その様な微小環境下に置かれた β 細胞は TFF2 を発現するような性質を獲得したと推測している。

● プロテオミクス解析

CRY1 と転写因子 PDX-1 との関係 (2019 年度加齢研共同研究報告書 No. 8 を参照)を明らかにする目的で HEK293 細胞株(腎臓由来細胞株)抽出液を用いて免疫沈降実験を実施したところ、PDX-1 と CRY1 の結合は確認されず、膵臓組織あるいは膵 β 細胞抽出液を用いた解析を検討している。さらに CRY2 のリコンビナント蛋白質を用いて LC-MS/MS によるプロテオミクス解析を実施し、CRY2 結合候補蛋白質を新たに複数特定し、相互作用を確認する実験が進行中である。

(3-2) 波及効果と発展性など

前年度の時計遺伝子の発現の解析結果と合わせて、亜鉛欠乏に対する応答としてのシグナル伝達の切り替え・小胞体ストレス応答・脱分化誘導が、RGS の調節により、相互に関連していることを示唆した。

SASP 因子によりもたらされる微小環境が膵 β 細胞の分化転換 (transdifferentiation) を経て IIDC の発生を促す機序については、既に論文で議論した [2]。今年度 TFF2 を特定したことにより、膵 β 細胞-膵管細胞分化転換の分子機序を、今後さらに具体的に解明していく上で重要な手がかりを得たと考えている。

参考文献： [1] Okano S., J Diabetes Res., 3459246, 2016. [2] Okano S., et al., J Diabetes Res., 7234549, 2019. [3] Nguyen CH., et al., J Cell Biol., 186: 755-765. 2009. [4] Lawson R. et al., J Trace Elem Med Biol. 49: 51-59, 2018.

[4] 成果資料 国際学会発表、及び総説の印刷公表

1) Okano S. et al., Atypical trefoil factor family 2 expressing β -cells of diabetic mutant CRY1 transgenic mice with intraislet ducts (e-poster: 2057-P, 2020) 80th Scientific Sessions American Diabetes Association (ADA). Jun 12, 2020.

2) 岡野聡：時計タンパク質クリプトクロムと亜鉛 - 概日リズム、膵 β 細胞と膵癌前駆病変 -, アグリバイオ, 2020 年 7 月臨時増刊号「時間栄養学」 4(8) 83-96.

3) 岡野聡：膵 β 細胞における亜鉛動態の変化に対する時計遺伝子と RGS 蛋白質の応答 - シグナル伝達変換との関連 -, アグリバイオ, 2021 年 2 月号「リン脂質の新たな代謝機構」 5(2) 88-92.