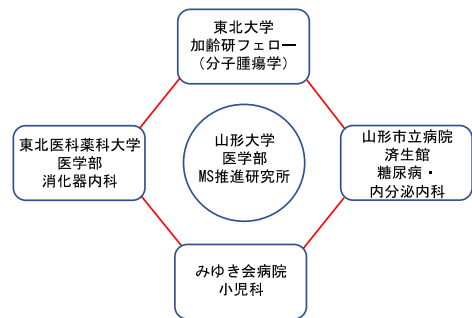


課題番号 38

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)

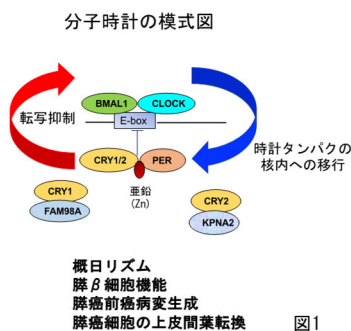


病院組織や大学の枠を超えた「クリプトクロム・時計遺伝子研究チーム」 図2

研究費：物件費 15 万円

[2] 研究経過

時計蛋白質 CRY1 は分子時計のループにおいて、転写因子 CLOCK と BMAL1 の転写活性化能を抑制する働きをしていることがよく知られている (図1)。



代表者は、山形大学医学部メディカルサイエンス推進研究所 (MS 推進研究所と略称) 附属実験センターにおける施設業務、医学部の教育業務を除いた自身の研究エフォートのほとんどを、ここ 20 年近くに亘り当研究チームの研究に割いて、一定の成果をあげることができた。研究チームの概要を図 2 に示した。

研究チームでは、亜鉛結合能を失われた変異型の時計蛋白質 CRY1 を全身的に過剰発現させることで、マウスに生物時計に異常をもたらすとともに、若年発症成人型糖尿病 (MODY) に類似した糖尿病を発症させるマウスを確立した (以後このマウスを「TG」と略称する)。亜鉛結合能を欠いた CRY1 が、視床下部の視交

又上核 (SCN)、及び細胞レベルでの分子時計に及ぼす影響については、文献[1]及び[2]を参照いただきたい。膵β細胞に対する影響に関しては、これまでの研究結果から、亜鉛結合不全 CRY1 は膵β細胞に細胞老化を誘導することが半明している。ライフステージの進行とともに TG では、膵ラ氏島内及び腺房域に、膵管癌前駆病変が観察されるようになるが、これは細胞老化に伴い SASP の形質を示す膵β細胞から分泌される SASP 因子が、膵ラ氏島の内外へ作用し、病変生成が促進された結果であると推定される[3]。

代表者らは、TG の分子病理の解析に加え、CRY を過剰発現させるヒト細胞の確立や、CRY の未知の結合タンパク質探索のアプローチからも CRY の分子機能に迫る解析を実施している。LC-MS/MS によるプロテオミクス解析を実施し、CRY1 及び CRY2 に関して結合する蛋白質複合体を特定し、その中に各々 FAM98A 及び KPNA2 を見出している (図1)。代表者らの、これまでの膵β細胞や膵管癌前駆病変における KPNA2 の研究成果については、文献[3]を参照されたい。

亜鉛と CRY の相互作用の不全が膵β細胞に及ぼす影響を解明する目的で、MIN6 細胞 (膵β細胞株) 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にすることによる細胞の変化を調べる解析も実施している。

連絡状況であるが、例年同様代表者が加齢研へ複数回

出張し、安井明 加齢研フェロー・菅野新一郎 講師と対面での研究打ち合わせを行った。新型コロナの感染状況を踏まえ、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、早坂清 山形大学名誉教授(みゆき会病院小児科・本研究チーム相談役)とは、メールにて研究打ち合わせや討論を行った。

[3] 成果 (3-1) 研究成果

KPNA2 は既に各種の癌で高発現することが報告されている。FAM98A についても幾つかの癌で悪性化に関与することが報告されている。膵癌細胞機能と関連する、CRY 及びその結合タンパク質の機能を明らかにする目的で、今年度の研究計画に従い、ヒト膵癌細胞 (Panc-1) を用いて上皮間葉転換 (epithelial to mesenchymal transition: EMT) の誘導実験を行った。文献[4]に従い BMP4 で Panc-1 細胞を処理し 24h 後に RNA を採取し発現解析を実施した。この処理により、間葉系マーカーである vimentin・n-cadherin の発現の増加と、上皮系マーカーである e-cadherin の発現低下が観察され、EMT が誘導されることを確認した。今回の EMT 誘導条件では、KPNA2 は少なくとも mRNA レベルでは、変化しなかった(図 3)。

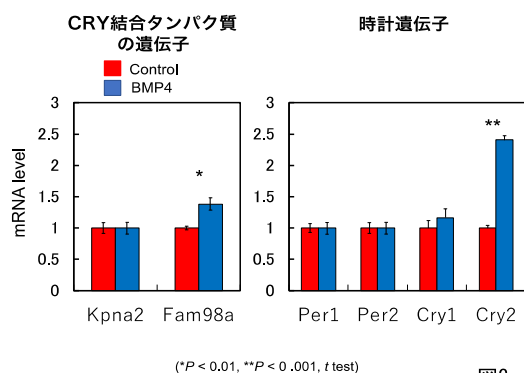


図3

FAM98A はわずかではあるが、有意な増加が見られた(図 3)。さらに、Cry2 の発現が亢進することを発見した(図 3)。CRY2 は膵癌細胞の EMT において、何らかの役割を果たすことが想定される。調べた範囲での Cry2 以外の時計遺伝子(Per1, Per2, Cry1)の発現は変化がみられず(図 3)、膵癌細胞 EMT において Cry2 特異的な調節機構の関与が推測される。今年度の結果を踏まえ、膵癌細胞 EMT の分子機序を明らかにする解析を、CRY1-FAM98A 及び CRY2-KPNA2 の軸を中心として、具体的に解明するべく研究を進める。

TG の膵前癌病変生成機序や膵β細胞の他の内分泌細胞への分化転換の解析も並行して実施した。紙幅の関係で詳細は割愛するが、β細胞の分化転換についての新たな成果が得られている。この研究の成果は、米国糖尿病学会学術集会(82nd Scientific Sessions)に演題が既に採択されており、2022年6月に公表予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

CRY は生物時計以外にも種々の細胞機能に関与する。時計蛋白質 CRY2 は、哺乳動物の生物時計においては CRY1 と一部重複した機能を有することが明らかにされているが、各々に特有の機能の相違について、未知の部分が多く残されている。本研究では、CRY1/2 自身と、その結合蛋白質として特定した KPNA2 や FAM98A の TG における膵管異型病変形成や、膵癌細胞 EMT の分子機能解明の切り口から、分子時計とも関連付けて解明することも目的としている。今後、複製ストレスや DNA 損傷応答との関わりも含めて解明を試みることを予定しており、がん細胞に対する創薬に向けての基礎的な知見が得られると考えている。

参考文献:

- [1] Okano S. et al. J Diabetes Res. 3459246, 2016. [2] Okano S. et al. Sleep Biol Rhythms 4:261-269, 2016. [3] Okano S. et al., J Diabetes Res. 7234549, 2019. [4] Hamada S. et al. J Cell Physiol. 213:768-774, 2007.

[4] 成果資料 国際学会発表、及び総説の印刷公表

- Okano S., et al., Characteristic distribution of GRP78 in islets and intra-islet ductal cells of diabetic C414A-CRY1 transgenic mice. 81th Scientific Sessions American Diabetes Association (ADA). Jun 26, 2021 (ポスターは学会の web site にて自由に閲覧可能, e-poster: 1245-P, 2021).
- 岡野聡: 変異型の時計タンパク質 CRY1 発現マウスの膵ラ氏島内部に生じる膵管がん前駆病変細胞の生成とマイクロ RNA, アグリバイオ, 2021年12月号 5(13) 1199-1203.
- 岡野聡: 膵β細胞株 MIN6 の脱分化様変化と分子時計 - 膵癌と膵β細胞脱分化との関わり -, Medical Science Digest, 2021年6月臨時増刊号「膵臓がん診療の最近の進歩」47(7) 390-339.
- 岡野聡: 膵β細胞内の亜鉛動態の変化がもたらすシグナル伝達と時計タンパク質への影響 - 成熟β細胞としての identity の喪失と生物時計 - アグリバイオ, 2021年5月号 5(5) 99-102.