

概日リズム及び膵β細胞機能の制御における FSXN5 の役割の解明

〔1〕組織

代表者：岡野 聡（山形大学 医学部）
 対応者：安井 明（東北大学加齢医学研究所）
 分担者：佐々木 悠（山形大学 医学部）
 五十嵐 雅彦（公立高島病院 内科）
 中島 修（山形大学 医学部）
 佐藤 賢一（東北医科薬科大学 医学部）

研究費：物件費 20 万円

〔2〕研究経過

研究開始当時、分子時計を作り出している転写翻訳フィードバックループ（TTFL）には未知の部分が多く残されていた。代表者らの研究チーム（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」〔チーム相談役：早坂清 山形大学医学部小児科学講座・医学部遺伝子実験センター 名誉教授〕）は、クリプトクロム（CRY）の観点から TTFL の謎に迫るべく、mCRY1 のシステイン 414（亜鉛配位残基：CRY は亜鉛を介してペリオド〔PER〕蛋白質と結合する〔1, 図 1〕）をアラニンに置換させた亜鉛結合不全 CRY1 蛋白質（CRY1^{C414A}）をマウス個体やヒト細胞に過剰発現する実験系を確立した。22 年間に亘り、科研費、山形大学結城プラン（学内研究助成）および加齢研共同研究の支援も得て、CRY1^{C414A} の発現が TTFL および生体に及ぼす影響を継続して研究し、下記の成果を得ている。CRY1^{C414A} の過剰発現マウス（TG マウスと称する）は、概日リズムに多彩な異常を示す（恒暗条件下で、リズム分割を伴う極端に長周期のフリーランリズムを示す、明暗周期の位相前進に対し素早く再同調する等〔2, 3〕）。最近、PER 側の亜鉛配位残基に変異を導入したマウスを用いた研究結果が報告された〔4〕。この報告からも、正常な概日リズム表出における CRY-Zn-PER 結合の重要性が示されている。

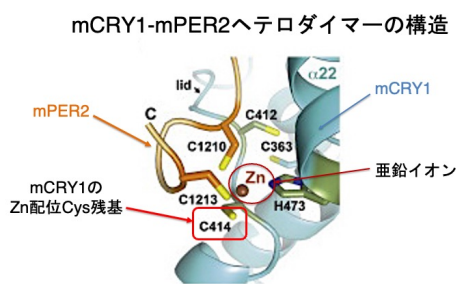


図1

TG マウスはまたインスリン分泌不全型糖尿病モデルの側面も有する：TG マウスでは、膵β細胞が細胞老化様の特徴を示し、β細胞が経時的に徐々に消失する。その結果、比較的若齢から血糖値が上昇し、糖尿病を発症する〔3, 5〕。代表者は2012年に弘前大学分子病態病理学講座へ出張し、水上先生・八木橋先生から、マウス膵島の単離技術を習得した。若齢のTG マウスから膵島を単離して網羅的発現解析を実施して、CRY1^{C414A} がβ細胞に障害をもたらす主要な経路を明らかにした〔3, 5〕。この網羅的発現解析において、野生型マウスと比較して、TG マウスで発現が低下している遺伝子としてsfxn5を特定した。sfxn5の発現低下はβ細胞機能障害と関連している可能性があると考え、2023年度加齢研共同研究から本遺伝子をテーマとした研究を開始した。

膵β細胞内の亜鉛動態の変化は、CRY-PER複合体形成に影響を及ぼし、その破綻は分子時計のみならず様々な分子経路に影響を与える可能性がある。研究チームでは以前より、膵β細胞株MIN6細胞を40mMのKClで長期処理（24h）することでβ細胞を持続的に脱分極させ、細胞内亜鉛を減少させる共に脱分化様の変化を誘導する実験系〔6〕を用いた研究を実施している。参照論文〔6〕で報告された結果のみからでは、この実験系において、真に脱分化が誘起されていると言えるかは不明瞭であった。そこでこの点を明らかにする実験を実施して、下記の結果を得た。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ところKCl処理により発現が亢進した。また、disallowed genes（成熟β細胞では発現が抑制されるべき遺伝子）として知られるHk1やMct1の遺伝子発現が増加した。成熟β細胞の機能維持に重要な転写因子MAFAが、核からほぼ消失していた。糖輸送担体のGLUT2タンパク質が大きく減少する結果も得た。従って確かに脱分化の形質に転換していると判断した〔7〕。今年度の報告としては、より長期に亘り（50h）KCl処理した条件での、sfxn5および時計遺伝子への影響を調べた解析結果を下記に述べる。

打ち合わせ状況について記す。安井明 加齢研フェロー・名誉教授、菅野新一郎 講師とは、代表者が加齢研に出向き実施した。五十嵐雅彦 先生、佐藤賢一 消化器内科教授・東北医科薬科大学病院 病院長とは学会参加時に、山形大学 消化器内科 佐々木悠 先生とは、

山形大学学内にて定期的実施した。早坂清 先生とは、代表者がメールで頻繁に意見交換をしている。

【3】成果（3－1）研究成果

まず、上述の実験系において脱分化に加えてβ細胞アポトーシスの寄与がどの程度あるのか否かが、以前より課題となっていた。この点について明らかにする実験も行なった。40mM の KCl で 50h 処理し Bax, Bcl2 の発現を qPCR にて解析した。KCl 処理細胞で Bax は僅かに増加したが、Bcl2 は有意な増加は見られなかった。アポトーシスの指標とされるに Bax/Bcl2 ついては、対照の細胞と KCl 処理細胞では有意な差がなく（図 2），KCl による脱分化誘導の実験系において、アポトーシスは誘導されていないことを示す結果を得た。

次いで、上記条件にて脱分化を誘導した際の sfxn5 発現の変化を調べた。2023 年度に加齢研共同研究報告書（No. 20）で報告したように、24h 処理で sfxn5 の発現は対照と比較して 1.5 倍増加した。50h 処理の場合、発現量はさらに増加し 2.5 倍であった（図 2）。

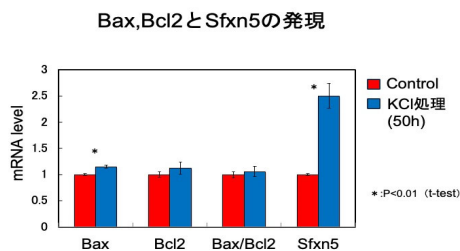


図2

TTFL は、Clock-Bmal1/Cry-Per を中心とするコアループに Ror/Rev-erb のループ、さらに Dbp/ E4bp4 のループがインターロックして相互に関係し、リズムの振幅及び安定性の維持に働いていると考えられている。以前の 24h 処理の結果と、今回の 50h 処理の結果を組み合わせ、両条件で共通して対照と比較して増加あるいは低下する遺伝子が新たに判明した（図 3）。

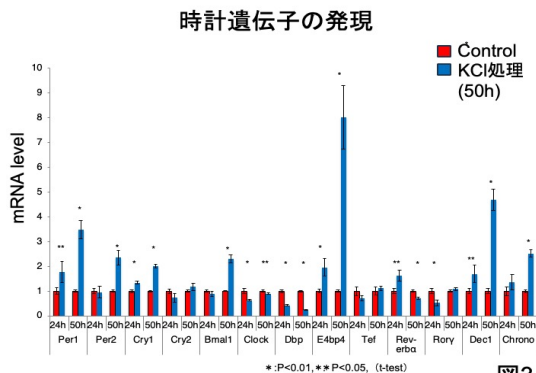


図3

3 つのループにおいて、転写抑制に働く負の因子については Cry1, Per1, Dec1, E4bp4, Chrono の増加が見られた。転写活性化に働く正の因子に関しては Dbp が顕著に低下した。結果を総合すると、負の因子の増加によ

り CLOCK-BMAL1 への抑制効果が増加することに加えて Dbp/ E4bp4 のループが破綻することで、脱分化時に分子時計の機能は抑制されると考えられる。

（3－2）波及効果と発展性など

前年度の結果と合わせて、SFXN5 がβ細胞における脱分化の誘導に関与する可能性を示すことができた。

β細胞においても TTFL が機能していることは既に明らかにされているが、脱分化時、TTFL が機能しているか否かについての報告は未だない。今年度の結果から脱分化時には、時計機能は抑制されていることをより明確に示し、その仕組みを明らかにできた。得られた結果は、将来的なβ細胞脱分化の制御技術の確立の上でも有益な知見であると思われる。

TG マウスに出現する特異な病変である膵島内膵管異型病変（IIDC）[3, 8] は、膵内分泌細胞（特に膵α細胞）の新生の場となりうることを 2023 年度の研究から明らかにしていた。今年度はさらに、このα細胞の新生と関連する IIDC の形質を明らかにして米国糖尿病学会および日本膵臓学会にて公表し、ワールドワイドに研究成果を発信することができた。さらに、膵内分泌細胞の新生と SFXN5 の関係を明らかにする組織学的実験を、上述の実験と並行して引き続き継続している。

【参考文献】

- [1] Schmalen I. et al., Cell. 157:1203-1215, 2014.
- [2] Okano S., et al., Neurosci Lett. 451, 246-251, 2009.
- [3] 岡野聡, 月刊「細胞」2022 年 6 月号 Page 410-420.
- [4] Kawabe J et al., PNAS Nexus. 3(12): pgae516, 2024.
- [5] Okano S., J Diabetes Res. 3459246, 2016. (doi: 10.1155/2016/3459246)
- [6] Lawson R. et al., J Trace Elem Med Biol. 49:51-59, 2018.
- [7] Okano S., et al., Research Square Platform LLC10.21203/rs.3.rs-1395694/v1 (プレプリント)
- [8] Okano S., et al., J Diabetes Res., 7234549, 2019. (doi: 10.1155/2019/7234549)

【4】成果資料（学会発表）

1. Characters of intra-Islet ductal cells related to alpha-cell regeneration in zinc-binding site-mutated CRY1-expressing diabetic mice. (ePoster: 2090-LB) Okano S., et al., 第 84 回米国糖尿病学会 (ADA) [Orland] 2024 年 6 月
2. Zn 結合不全型 CRY1 発現マウスの特異な膵管病変における TFF2 の発現と膵α細胞の新生. 岡野聡 他, 第 55 回日本膵臓学会大会 2024 年 7 月

（総説）

1. Zn 結合不全型 CRY1 発現マウスの膵管前癌病変からの膵内分泌細胞新生と TFF2. 岡野聡, 月刊「細胞」, 51-55, 2024 年 10 月号 炎症収束と組織炎症記憶