

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：11501
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K07498
 研究課題名(和文)CRY1結合蛋白質の解析を基にした新規膵癌生成機序及び概日リズム制御機構の解明

 研究課題名(英文)A new approach to the pathogenesis of pancreatic cancer and the disorders of circadian rhythm based on the analysis of CRY1-binding proteins

 研究代表者
 岡野 聡 (Okano, Satoshi)

 山形大学・医学部・助教

 研究者番号：60300860
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らCRY-時計遺伝子研究グループは、確立した変異型CRYの糖尿病モデルマウス(TGと略称)を用いて、膵島のリモデリングや前癌病変の生成の全体像の解明を主目的に研究を実施し、病態進展期のTGで新しい知見を得た。主な結果として下記の2点が示唆された：(1) 膵細胞が膵細胞の主な供給源となりうること及び(2) TFF2タンパク質が膵細胞の量の維持に重要な役割をし、膵細胞が膵管様の形質に転換しうる膵島内微小環境の形成に寄与する可能性である。また、新たに特定したCRY蛋白質複合体を構成する新規のタンパク質の機能を膵細胞株MIN6や膵癌細胞株Panc-1を用いた実験系で解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 膵癌の前駆病変が如何に生成されるかを明らかにする研究は広く行われ、一定の知見が得られている。しかしながら、膵細胞の異常に起因した膵癌前駆病変の発生機序に関しては、未だほとんど明らかになっていない。本研究に於いては、膵細胞が障害され、膵ラ氏島に前癌病変が多発するユニークなマウスと、すでに広く活用されている各種細胞株の両方を研究対象として用いた。プロテオミクス解析と網羅的発現解析から新たに特定した病態関連候補タンパク質の解析のアプローチから、膵島内微小環境、膵癌前駆病変、及び膵ラ氏島リモデリングの関係を具体的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cysteine414 (zinc-binding site of mCRY1)-alanine mutant CRY1 transgenic mice (established by the CRY-Clock Gene Research Group in Tohoku area; hereafter simply referred to as TG) show diabetes characterized by the reduction of β -cell proliferation due to the characters of senescence-associated secretory phenotype (SASP) in β -cells (reviewed in Okano S, 2016). To explore the mechanisms of keeping of the number of β -cells under hyperglycemia for prolonged period in TG, and also of the generation of mucin-producing atypical intra-islet ducts, we further conducted detailed analysis of TG. The results showed that trefoil factor family 2 (TFF2) is up-regulated in the β -cell of TG life-stage dependently. Our results suggest the possible β -cell to β -cell transdifferentiation in aged TG: β -cells may predominantly play roles as the source for β -cells to supply new β -cells for islets in TG. The function of newly found CRY-binding proteins were also analyzed in MIN6 and Panc-1 cells.

研究分野：実験病理学

キーワード：概日リズム 膵細胞 分化転換 脱分化 膵癌前駆病変 生物時計 糖尿病 上皮間葉転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者ら東北地域を横断する研究組織(CRY-時計遺伝子研究グループ)は、マウスにCRY1の亜鉛配位部位変異体を過剰発現させることで、概日リズム障害とMODY様の糖尿病を発症させる新しい動物モデルを以前に確立した。代表者ら研究グループは、20年近くに亘る研究から、このマウスが示すリズム異常と糖尿病発症の主要な分子機序を明らかにしてきた。さらにこのマウスでは(以後このマウスをTGと称する)、ライフステージの進行に伴い罹病期間が長期に及ぶと、膵癌へと進展しうる膵管異型細胞が高頻度に生成されることを見出していた(Okano S. 2016)。また亜鉛結合能を欠いたCRY1は膵細胞において細胞老化をもたらすことも、研究開始当初既に明らかにしていた(Okano S. 2016)。TGでは膵細胞の細胞老化に起因し、膵ラ氏島に特有の微小環境が形成され、このことが起点となり罹病期間に依存して、徐々に膵管異型細胞の生成を含む膵ラ氏島臓組の変容が進展する機序が想定された。一方で、安井明加(加齢研フェロー)らの加齢研チームは、プロテオミクス解析からCRY1蛋白質複合体を構成する新規のタンパク質を特定し、さらに新たなCRY結合タンパク質の探索を続けていた。

そこで本研究においては、TGを用いた分子病理の解析を実施し、膵細胞機能障害と膵管異型細胞の具体的な関係性の解明を試みることにした。膵ラ氏島内に生じる膵管異型細胞の由来に関して、膵細胞が直接分化転換する(ダイレクトリプログラミング)以外にも、膵細胞が一旦未分化な形質へ変化し(脱分化; dedifferentiation)、この脱分化細胞が膵管細胞に転換する可能性も考えられる。そこで膵細胞の脱分化の制御機構に関する掘り下げて解析することとした。細胞株を用いて、膵癌の悪性化や、膵細胞の脱分化誘導における未知の制御メカニズムを、新規CRY結合蛋白質の機能と関連付けて追究することを目標とし研究を開始した。

2. 研究の目的

新規CRY1結合タンパク質を中心としたプロテオミクス解析と分子病理の解析とを組み合わせた研究から、(1)TGを用いての亜鉛結合不全CRY1タンパク質の過剰発現に起因する膵細胞機能障害と膵島内膵管異型病変生成の具体的な関係性の解明、(2)膵細胞及び膵癌における概日リズムに関わる分子機序を具体的に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

文献[1]で報告されている手法に従って、ヒト膵管癌細胞(Panc-1)の上皮間葉転換(EMT)の誘導実験を行った。Panc-1細胞をリコンビナントBMP4タンパク質で刺激し、24h後にRNAを採取し、qPCR法で発現解析を行なった

文献[2]で報告されている手法に従って、膵細胞株のMIN6細胞を40mM KClで24時間処理し、MIN6細胞内の亜鉛を枯渇させると共に慢性高血糖を模倣した状態を作った。その結果としてMIN6に誘起される脱分化様の特徴を、種々の観点から解析した(亜鉛検出蛍光試薬を用いての解析、qPCR法、RNA-seq及びバイオインフォマティクス解析等)。

TGの解析については、特異な病変である intra-islet ductal cells (膵島内膵管異型細胞、以後この病変を IIDC と称する) や膵島内分泌細胞の分化転換の解明を主目的とした組織学的実験を実施した。

4. 研究成果

得られた結果の内、主要なものを下記に記す。

(1) TG の解析

TG 及び野生型マウス[以下 WT と略記、糖尿病罹患が長期に及び高齢マウス (19 月齢以上)]の膵島をサンプルとした DNA マイクロアレイを実施し、TG で TFF2 (Trefoil factor 2) 遺伝子の発現が亢進していることが判明した(80th ADA, 2020)。

膵島内のどの細胞で TFF2 蛋白質が発現するかを明らかにする目的で、高齢マウス膵島内の蛋白質の分布を調べた。TFF2 蛋白質は、膵内分泌細胞の内、膵細胞(及び頻度は低いが一部の膵細胞; 詳細は後述)に発現することがわかった。同齡の WT の膵島では、TFF2 は観察されず、若齡では TG, WT 共に TFF2 は発現していなかった(80th ADA, 2020)。

各種の膵ホルモンの抗体を用いて、高齢マウス膵島内の細胞の 2 重染色の解析を実施したところ、インスリン/グルカゴンの 2 重陽性細胞は、ほとんど観察されなかった(82nd ADA, 2022)。一方、出現頻度は高くないものの、インスリン/ソマトスタチンの明確な 2 重陽性を示す細胞は観察された(82nd ADA, 2022)。この細胞は膵細胞から膵細胞へ転換(transdifferentiation)中の細胞の可能性がある。若齡では TG, WT 共に、インスリン/グルカゴン及びインスリン/ソマトスタチンの、どちらの 2 重陽性細胞も観察されなかった。TFF2 と膵ホルモンの抗体で染色したところ、高齢 TG ではインスリン/TFF2 の 2 重陽性細胞以外に、ソマトスタチン/TFF2 の 2 重陽性細胞が観察された(82nd ADA, 2022)。高齢 TG でグルカゴン/ TFF2 の 2 重陽性細胞は確認できなかった。若齡では TG, WT 共に、グルカゴン/ TFF2 及びソマトスタチン/ TFF2 の、どちらの 2 重陽性細胞も観察されなかった(82nd ADA, 2022)。

以上の結果と、TFF2 は膵細胞において増殖促進性に働くという既報の報告をあわせると、罹病期間が長期にわたる TG では、膵細胞ではなく、主に膵細胞が膵細胞へ転換することで細胞の供給源となり、残存膵細胞及び新生膵細胞では TFF2 の発現が誘導され増殖が促進し、膵細胞数を維持すると研究代表者は推測している。代表者はまた、TFF2 は膵細胞から分泌され、膵細胞の膵管細胞への転換を促進する膵島内微小環境の形成に関与していると推測している。

IIDC の由来を明らかにする一助として、Dolichos biflorus Agglutinin (DBA)-レクチンとの反応性を組織学的にしらべた。IIDC は正常膵管と比較し、DBA-レクチンに対する反応性が弱いことを明らかにした(79th ADA, 2019)。また IIDC には、内分泌細胞のマーカーである chromogranin A 陽性の細胞が観察された(81st ADA, 2021)。以上の結果から、TG の IIDC は膵内

分泌細胞(おそらく膵細胞)に由来し、IDCは膵管細胞としてはDBAレクチンに対する反応性が弱い、未熟な段階にあることが示唆された。

(2) 膵細胞株 MIN6 細胞での解析

膵細胞株 MIN6 を KCl で長時間処理し、細胞内の亜鉛を減少させるとともに未分化状態へと移行させ、細胞への影響を調べる実験を実施した。文献の報告[2]と一致して、確かに細胞内亜鉛が減少することを、亜鉛を検出する蛍光試薬を用いて確かめた。成熟細胞の機能に重要な MafA と PDX-1 は、mRNA とタンパク質両方で明確に減少した。

Chop の発現が軽度亢進し、BiP (GRP78) 及び ATF4 の両蛋白質が増加することを示した。この条件下で、インスリンの過剰分泌に起因する、比較的マイルドな小胞体ストレスが誘起されたと考えられる。グルコース応答性インスリン分泌に関与する遺伝子の中では、Glut2 の発現が特に影響を受け、その発現は著しく減少した。各種の時計遺伝子の発現に変化が見られ(分子時計のフィードバックループにおいて転写活性化に働く正の因子群は減少し、転写抑制に働く負の因子群は増加する傾向が顕著であった)、細胞の未分化性の誘導と生物時計の消失に相関があることを明らかにした。タンパク質レベルでは CLOCK タンパク質の減少を示すことができた。

脱分化の誘導におけるシグナル伝達機構の関与を調べる目的で、3種のRGS (regulator of G protein signaling; 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。いずれのRGS遺伝子も発現が亢進した。G蛋白質共役型受容体を介するシグナル伝達の改変が起こっていると推測される。RGS2蛋白質は分布が大きく変化し、一部のRGS2は翻訳開始因子のeIF2と共局在した。RGS2は膵細胞において、シグナル伝達の機能に加え、タンパク質の翻訳制御にも関与すると考えられる。

さらに、脱分化マーカーの aldh1a3 遺伝子の発現を調べたところ、発現が亢進する結果を得、さらに複数の成熟細胞不許可遺伝子(disallowed genes)の発現が亢進する結果も得た。さらに細胞接着関連因子について調べたところ、上皮系マーカーとして知られる E-cadherin が減少する新しい知見を得た。細胞において細胞間コミュニケーションに関与する Cx36 については、発現は変化しなかった。MIN6細胞では未分化な状態への移行に伴い、EMT様の変化が誘導されると考えられる。

以上の様に、MIN6細胞に誘導される脱分化の特徴を新たに明らかにした。加えて、RNA-seq解析を実施し、その結果を基にしたバイオインフォマティクス解析を行なったところ、成熟細胞への分化や細胞機能維に関わる経路の遺伝子群の発現低下が示され、細胞が未分化な状態へ移行することを示す、これまでの研究成果をさらに支持する結果を得た。

(3) ヒト膵管癌細胞 Panc-1 での解析

プロテオミクス解析から見出したCRYタンパク質複合体の構成タンパク質(FAM98A[CRY1結合タンパク質], KPNA2[CRY2結合タンパク質(図1)])の膵癌形成における機能を明らかにすることを

目的として、Panc-1 の EMT の誘導実験を行った。

BMP4 処理細胞では、対照の細胞と比較して、上皮系マーカーの E-cadherin の発現は低下し、間葉系マーカーの Vimentin 及び N-cadherin の発現が増加し、EMT の誘導が確認できた。

CRY については、Cry1 は変化せず、Cry2 は 2.4 倍発現が亢進した(図 2)。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。調べた範囲での他の時計遺伝子 (Per1, Per2) の発現は変化がみられず(図 2)、膵癌細胞の EMT において Cry2 に特有の調節機構の関与が推測される。Kpna2 の遺伝子発現は本条件では変化せず、Fam98A はわずかながら有意な発現増加が見られた(図 2)。今後、CRY1-FAM98A 及び CRY2-KPNA2 の経路が膵癌細胞 EMT へ如何に関与するのかを明らかにする研究を、CRY-時計遺伝子研究グループでさらに密接に連携して進める予定である。

図 1

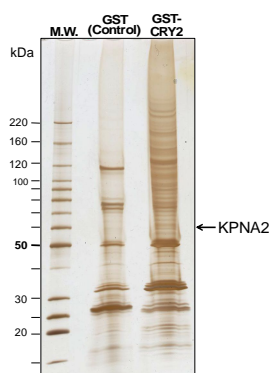
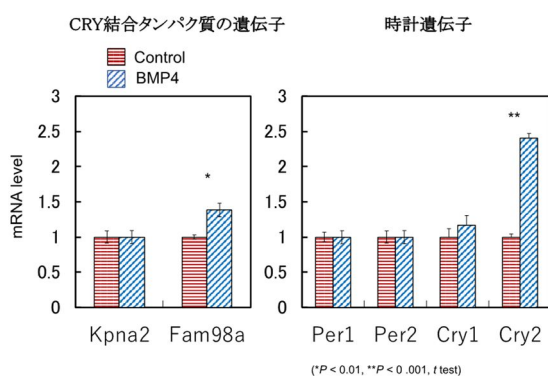


図 2



文献

- [1] Hamada S, Satoh K, Hirota M, et al. J Cell Physiol. 2007;213:768-74.
- [2] Lawson R, Maret W, Hogstrand C. J Trace Elem Med Biol. 2018;49:51-59.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 岡野聡 | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 時計タンパク質クリプトクロムと亜鉛 - 概日リズム, 膵細胞と膵癌前駆病変 - | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 アグリバイオ 2020年7月臨時増刊号「時間栄養学」 | 6. 最初と最後の頁 83 - 96 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 岡野聡 | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 膵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 - | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 アグリバイオ 2021年2月号「リン脂質の新たな代謝機構」 | 6. 最初と最後の頁 88 - 92 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Okano S, Yasui A, Kanno SI, Satoh K, Igarashi M, Nakajima O | 4. 巻 Volume 2019 |
| 2. 論文標題 Karyopherin Alpha 2-Expressing Pancreatic Duct Glands and Intra-Islet Ducts in Aged Diabetic C414A-Mutant-CRY1 Transgenic Mice | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Diabetes Research | 6. 最初と最後の頁 7234549 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/7234549. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 岡野聡 | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 膵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 - 成熟細胞としてのidentityの喪失と生物時計 - | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 アグリバイオ 2021年5月号「植物ペプチドの多様な生理機能と応用展開」 | 6. 最初と最後の頁 99-102 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 岡野聡 | 4. 巻 47 |
| 2. 論文標題 膵 細胞株MIN6の脱分化様変化と分子時計 - 膵癌と膵 細胞脱分化との関わり - | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Medical Science Digest 2021年6月臨時増刊号「膵臓がん診療の最近の進歩」 | 6. 最初と最後の頁 390-392 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 岡野聡 | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 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 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 アグリバイオ 2021年12月号「自然セラピーの科学」 | 6. 最初と最後の頁 1199-1203 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 岡野聡 | 4. 巻 54 |
| 2. 論文標題 亜鉛欠乏不全型Cryptochromeの過剰発現は概日リズムの異常,膵 細胞の分化転換及び膵癌前駆病変を誘起する | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 月刊 細胞 2022年6月号「低酸素生物学の新展開」 | 6. 最初と最後の頁 58-68 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 佐藤賢一, 五十嵐雅彦, 中島修 |
| 2. 発表標題 Atypical trefoil factor family 2 expressing β -cells of diabetic mutant CRY1 transgenic mice with intraislet ducts |
| 3. 学会等名 第80回米国糖尿病学会 (80th Scientific Sessions American Diabetes Association) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 佐藤賢一, 五十嵐雅彦, 中島修 |
| 2. 発表標題 膵 細胞における亜鉛の動態変化が引き起こすストレスに対する転写因子MTF1とRGS タンパク質の応答 |
| 3. 学会等名 43回日本分子生物学会・MBSJ2020 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 佐藤賢一, 五十嵐雅彦, 中島修 |
| 2. 発表標題 時計蛋白質CRY1のC414A変異体過剰発現マウスにおける膵島内膵管生成の分子機序の解析 |
| 3. 学会等名 第51回日本膵臓学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 佐藤賢一, 五十嵐雅彦, 中島修 |
| 2. 発表標題 Characteristic features in the intraislet ductal cells of diabetic C414A-CRY1 transgenic mice |
| 3. 学会等名 79th Scientific Sessions American Diabetes Association (ADA) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 佐藤賢一, 五十嵐雅彦, 中島修 |
| 2. 発表標題 Altered expression of karyopherin 2 and circadian clock genes in MIN6 cells mimicking hyperglycemia |
| 3. 学会等名 International Diabetes Federation (IDF) Congress 2019 in Busan (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 佐藤賢一, 五十嵐雅彦, 中島修 |
| 2. 発表標題 Characteristic distribution of GRP78 in islets and intra-islet ductal cells of diabetic C414A-CRY1 transgenic mice |
| 3. 学会等名 第81回米国糖尿病学会 (81st Scientific Sessions American Diabetes Association) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 佐藤賢一, 五十嵐雅彦, 中島修 |
| 2. 発表標題 Possible delta to beta-cell transdifferentiation in aged diabetic mutant CRY1 transgenic mice |
| 3. 学会等名 第82回米国糖尿病学会 (82nd Scientific Sessions American Diabetes Association) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 佐藤賢一, 五十嵐雅彦, 中島修 |
| 2. 発表標題 膵 細胞株MIN6の脱分化に伴う時計遺伝子とRGS遺伝子の応答 |
| 3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡野聡, 安井明, 菅野新一郎, 佐藤賢一, 五十嵐雅彦, 中島修 |
| 2. 発表標題 Molecular circadian clock and α -cell dedifferentiation in MIN6 cells |
| 3. 学会等名 第26回国際膵臓学会・第53回日本膵臓学会大会 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

〔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 |
|-------|--|-------------------------------------|----------------|
| 研究分担者 | 佐藤 賢一 (Sato Kennichi) (10282055) | 東北医科薬科大学・医学部・教授 (31305) | 東北医科薬科大学病院 病院長 |
| 研究分担者 | 中島 修 (Nakajima Osamu) (80312841) | 山形大学・医学部・教授 (11501) | |
| 研究分担者 | 安井 明 (Yasui Akira) (60191110) | 東北大学・加齢医学研究所・加齢研フェロー (11301) | |

| | 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 |
|-------|---|---------------------------------------|----|
| 研究協力者 | 五十嵐 雅彦 (Igarashi Masahiko) (10400417) | 山形市立病院済生館・地域糖尿病センター・室長 (11301) | |
| 研究協力者 | 菅野 新一郎 (Kanno Shin'ichiro) (10400417) | 東北大学・加齢医学研究所・講師 (11301) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|