

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06742

研究課題名（和文）内分泌顆粒を新生する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanism that endocrine secretory granule biogenesis

研究代表者

石井 順（Ishii, Jun）

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：80749599

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：内分泌顆粒（endocrine secretory granule, ESG）は内分泌細胞に特徴的な細胞内小器官であり、その形成異常は種々の疾患に寄与することが知られる。しかしこれまで、ESGの形成メカニズムは未解明であった。本研究では、ESGを有さない非内分泌細胞株H1299を用いて解析を行い、ESGの形成に重要な三つの要素を明らかにした。すなわち、REST遺伝子の低発現状態、PROX1遺伝子の高発現状態、そしてESGに内包される物質の存在である。H1299細胞に対して遺伝子編集・遺伝子導入操作を行い、ESG形成に重要な三要素を満たすことで、ESGを人為的に形成させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ESGは内分泌細胞に特異的な細胞内小器官であり、内分泌分化を示す腫瘍の診断マーカーとして用いられている。本研究によりESGの形成メカニズムが明らかにされたことにより、ESGを診断マーカーとして利用する根拠がより明確にされたと考えられる。またESGの形成異常は糖尿病やパーキンソン病といった種々の疾患で認められることが報告されている。本研究によりESGの形成に重要な諸要因が明らかにされたことから、今後はこの知見を元に、ESGの形成異常が関与する疾患の病態解明が進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Endocrine secretory granule (ESG) is an organelle characteristic of endocrine cells, and its malformation is known to contribute to the development of diabetes and other diseases. However, the mechanism of ESG formation has remained unclear. In this study, we focused on analyzing non-endocrine cell line H1299, which lacks ESG, and identified three crucial factors for ESG formation: the low expression state of REST gene, high expression state of PROX1 gene, and the presence of substances encapsulated within the ESG. By performing gene editing and gene introduction on H1299 cells to meet these three essential factors, we successfully induced the artificial formation of ESG in H1299 cells.

研究分野：実験病理学

キーワード：内分泌顆粒 REST PROX1 ホルモン POMC calcitonin vasopressin

1. 研究開始当初の背景

内分泌顆粒 (endocrine secretory granule, ESG) は内分泌細胞に特徴的な細胞内小器官であり、ホルモン等の分泌タンパク質の調節性分泌に機能する。ESG の形成異常は糖尿病をはじめとした種々の疾患に関与することが報告される一方、ESG の形成メカニズムは十分に解明されていなかった。研究代表者らはこれまで、ESG の主要な構成因子であるグラニンタンパクファミリーの発現が、RE1 silencing transcription factor (REST) 遺伝子により抑制され、prospero homeobox 1 (PROX1) 遺伝子によって誘導されることを明らかにしてきた。ESG を有さない非内分泌細胞株 H1299 (肺大細胞癌株) に対して、REST 発現をノックアウト (KO) して PROX1 を強制発現させることで、グラニンタンパクファミリーの発現が高度に亢進した。また REST および PROX1 発現を変化させた同細胞に対して、ESG を介して分泌されるホルモンの一種である Pro-opiomelanocortin (POMC) を強制発現させることで、ESG の形成が誘導されることを予備実験から確認した。すなわち限定的ではあるが、ESG の形成に重要な 3 要素 (REST 発現が減少していること、PROX1 の発現、ESG に内包される物質・POMC の発現) が見出されたわけである。しかしながら、PROX1 により誘導されるグラニンタンパクファミリーの発現量は数倍程度に留まっていたことから、ESG の形成をより強く誘導する遺伝子が他に存在する可能性が考えられた。また同様の実験系にて、POMC とは異なる分泌タンパク質を選択した際にも ESG 形成が誘導されるかは不明であった。

2. 研究の目的

非内分泌系の培養細胞株に ESG の形成を誘導する条件を明らかにすることが本研究の目的である。具体的には、まず ESG の形成を PROX1 よりも高度に誘導する遺伝子が存在するか確認する。ESG の形成を誘導する候補遺伝子としては、INSM transcriptional repressor 1 (INSM1) や myelin transcription factor 1 like (MYT1L) などの転写制御因子が挙げられる。INSM1 は内分泌細胞の分化制御に機能し、PROX1 に比べてより多くの ESG 構成遺伝子と共発現する傾向がある。一方 MYT1L は脳や副腎において高度に発現し、非内分泌系の遺伝子発現を抑制するとされる分子である。

次に、ESG 内容物質の融通性について検討する。予備実験では、REST を KO して PROX1 を強制発現させた H1299 細胞に対し、POMC を強制発現させることで ESG の形成が誘導された。本研究では、POMC とは異なる ESG 内容物質として calcitonin や vasopressin 等を強制発現させた際にも、POMC と同様に ESG の形成が誘導されるか明らかにする。上記の検討により、ESG の形成を誘導するマスターレギュレーターと、ESG 形成における内容物質の融通性・重要性が明らかとなる。こうした知見を、先に明らかにした ESG 形成の強力な抑制因子である REST と併せて考えることで、ESG 形成のメカニズムの全貌が明らかになると考えられる。

ESG は、細胞内で合成された分泌タンパク質が、細胞外からの刺激に応じて適切なタイミングで分泌される調節性分泌に必須の細胞内小器官である。調節性分泌機構の異常は、2 型糖尿病やパーキンソン病といった疾患の発症に関与すると考えられている。本研究により得られた知見は、調節性分泌機構の異常を原因とする種々の疾患の病態解明へと繋がるのが期待される。

3. 研究の方法

(1) INSM1、MYT1L 発現が ESG 形成に与える影響の解析

INSM1 および MYT1L を発現するレトロウイルスベクターを構築し、H1299 および REST を KO した H1299 細胞 (H1299-RESTKO) と同じく ESG を有さない肺腺癌株 A549 および A549-RESTKO 等に遺伝子導入する。その後、グラニンタンパクファミリーの発現を定量的 RT-PCR 法やウエスタンブロット法により解析する。INSM1 ないしは MYT1L が ESG 形成の誘導因子であった場合、グラニンタンパクファミリーの発現は PROX1 よりも INSM1 ないしは MYT1L によって高度に誘導されると推測される。

INSM1 ないしは MYT1L が ESG 形成の誘導因子である可能性が考えられた場合、それらを PROX1 と共導入した際の影響を確認する。INSM1 や PROX1 といった転写因子は、他の転写因子と協調して機能する可能性があるためである。INSM1 ないしは MYT1L と PROX1 を 2A 自己切断ペプチドで連結する形で、先に示した培養細胞株に強制発現させる。その後、グラニンタンパクファミリーの発現を解析する。

(2) ESG 内容物質の融通性の解析

Calcitonin および vasopressin を発現するレトロウイルスベクターを構築し、REST を KO した培養細胞や、REST を KO して PROX1 (ないしは INSM1、MYT1L) を遺伝子導入した培養細胞 (H1299-RESTKO-PROX1 など) に追加的に遺伝子導入する。その後、ESG 形成の有無を超微形態学的に解析する。また、同細胞におけるグラニンタンパクファミリー (CHGA、CHGB、SCG2、SCG3 など) の発

現を定量的 RT-PCR 法により解析し、ESG の内容物質が ESG の形成に与える影響を明らかにする。

(3) 人為的に形成された ESG の検証

方法(1)および(2)によって H1299 細胞に形成された ESG を対象に、ESG の構成成分であるグラニンタンパクと、ESG 内容物質として強制発現させたタンパク質が共局在しているかを確認する。確認は共焦点顕微鏡を用いた蛍光二重染色法および免疫電子顕微鏡法により行う。生体内の ESG では、グラニンタンパクと ESG 内容物質が共局在する。遺伝子導入・編集操作により培養細胞に人為的に形成された ESG が、生体で認められる ESG にどの程度近づいているかを明らかにする。

(4) ESG 形成に重要な分子のヒト組織における発現解析

方法(1)～(3)により明らかにされた ESG 形成に重要な要素について、ヒトの内分泌細胞における発現状態を、シングルセル解析データベース等を用いて確認する。得られたデータを元に、in vitro で得られた知見がヒト体内の ESG においても反映されているかを考察する。

4. 研究成果

(1) INSM1 が ESG 形成に与える影響は PROX1 よりも小さかった

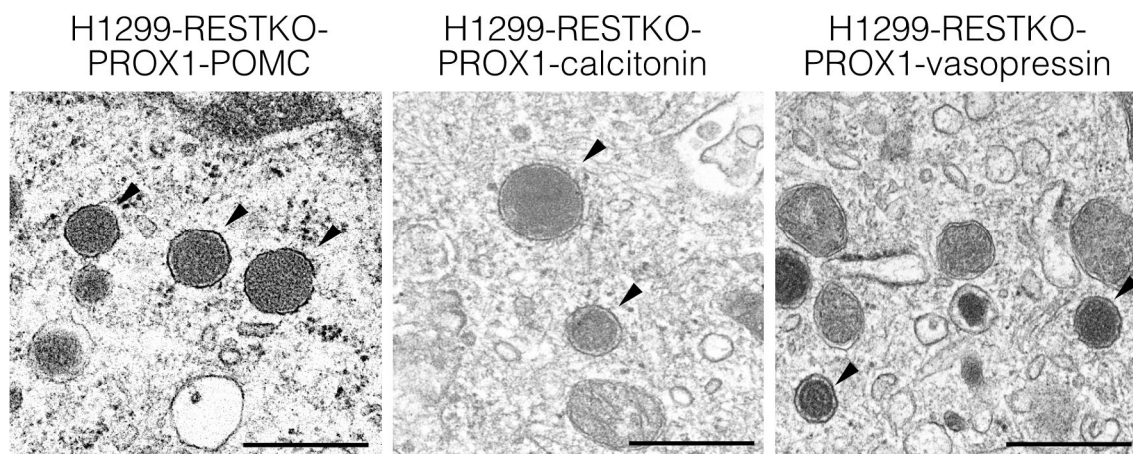
H1299 および H1299-RESTKO 株におけるグラニンファミリー遺伝子の発現は、INSM1 の導入によってほとんど変化しなかった。また INSM1 と PROX1 を共発現させた際にも、グラニンファミリー遺伝子の発現は PROX1 を単独で導入した場合とほとんど変わらなかった。以上の結果より、INSM1 が ESG の主要な誘導因子である可能性は低いことが明らかとなった。

MYT1L に関しては、発現ベクターを COS7 や HEK-293 細胞に一過性に導入した際には、その発現がウエスタンブロットで検出され、発現ベクターが機能することが確認された。しかしながら、H1299 および H1299-RESTKO 細胞等に安定的に遺伝子導入した際には、MYT1L の明確な発現が検出されなかった。この理由は明らかではないが、試験した培養細胞にとって MYT1L の恒常的な発現が好ましくない影響を及ぼし、MYT1L 安定発現株の樹立が妨げられた可能性が考えられた。以上の結果より、ESG の形成を誘導するマスターレギュレーターとしては、現状では PROX1 が最も有力であると考えられた。

(2) ESG は様々な内容物質から形成された

ESG の内容物質として calcitonin ないしは vasopressin を遺伝子導入した H1299-RESTKO-PROX1 細胞においては、POMC を遺伝子導入した場合と同様に ESG の形成が確認された。Vasopressin に関しては、H1299-RESTKO 細胞に遺伝子導入した際にも (PROX1 を強制発現させていない場合でも) 少数の ESG が確認された。以上の結果に加え、ESG 内容物質として POMC を遺伝子導入した予備実験の結果を合わせて考えると、REST を KO して PROX1 を強制発現させた H1299 細胞においては、どのような ESG 内容物質の強制発現によっても ESG が形成されることが示唆された (図 1)。また、ESG の形成において REST の KO は必須の条件であり、PROX1 は ESG の形成を促進する役割を果たしていることが明らかとなった。

図 1 REST を KO し、PROX1 および ESG 内容物質を強制発現した H1299 の電子顕微鏡像

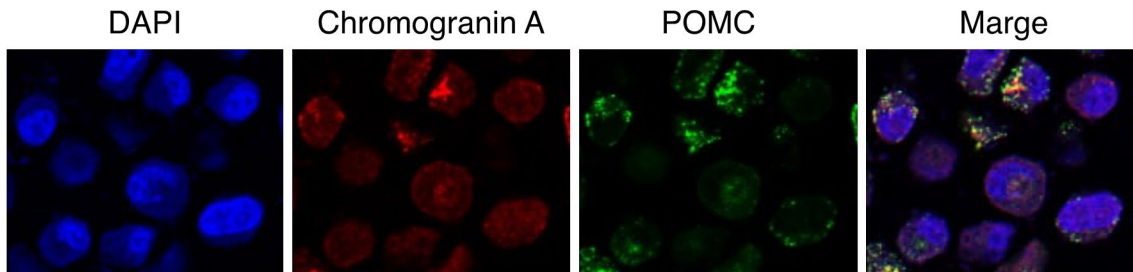


野生型の H1299 細胞は ESG を有していないが、H1299 細胞に対して REST をノックアウトし、PROX1 の強制発現、また POMC をはじめとした ESG 内容物質を強制発現させることで、ESG の形成が誘導された (矢頭)。REST のノックアウトと PROX1 の強制発現に加え、POMC を強制発現 (左の画像)、calcitonin を強制発現 (中央の画像)、vasopressin を強制発現 (右の画像) した際の画像である。スケールバーは 0.5 μ m を示す。

(3) 誘導された ESG においてグラニンタンパクと内容物質は共局在していた

POMC の導入により H1299-RESTKO-PROX1 細胞に形成された ESG では、グラニンファミリーの代表格であるクロモグラニン A と POMC の共局在が確認された (図 2)。また calcitonin や vasopressin の導入により ESG が形成された H1299-RESTKO-PROX1 細胞においては、calcitonin や vasopressin の免疫組織化学的な陽性シグナルが細胞質において顆粒状に認められていた。以上の結果から、非内分泌細胞株に人為的に形成された ESG は、生体内で形成される ESG と構造的に違いがない可能性が考えられた。

図 2 培養細胞に誘導された ESG におけるクロモグラニン A と POMC 局在の確認



H1299-RESTKO-PROX1-POMC 細胞に形成された ESG を対象に、クロモグラニン A (Chromogranin A) と POMC の蛍光二重染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。クロモグラニン A (赤) と POMC (緑) のマージ画像 (Marge) では、両シグナルが合わさった黄色い顆粒状のシグナルが細胞質領域に認められたことから、クロモグラニン A と POMC が ESG において共局在していると考えられた。DAPI は核染色を示す。

(4) *in vitro* にて ESG 形成を誘導する 3 要素は *in vivo* の ESG 形成にも重要

データベース解析の結果、ESG を有する肺の神経内分泌細胞や、膵臓の細胞および細胞といった内分泌細胞においては、REST 発現が低く、かつ PROX1 発現が高度である傾向が確認された。例えばインスリンを分泌する膵臓の細胞は、当然ながらインスリン (INS 遺伝子) 発現が高度であり、また ESG の主要な構成タンパク質であるクロモグラニン A (CHGA 遺伝子) の発現も高度であった。この細胞において REST 発現は低く、PROX1 発現は中等度であったことから、

細胞では本研究で明らかにしてきた ESG の形成に重要な 3 つの要素が揃っていることが確認された。興味深いことに、INS 発現は細胞の他、膵管細胞や膵腺房細胞においても認められ、また PROX1 発現は膵管細胞においても認められた。こうした発現状態にも関わらず、膵管細胞や膵腺房細胞では ESG が認められない理由は、ESG 形成に重要な 3 要素が全て揃っていないためと推察された。以上の結果より、*in vitro* の解析から示された ESG の形成に重要な条件 (REST の低発現かつ PROX1 の高発現状態、ESG の内容物質を発現していること) が、生体内の内分泌細胞内における ESG の形成においても極めて重要である可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Ishii, J., Sato-Yazawa, H., Kashiwagi, K., Nakadate, K., Iwamoto, M., Kohno, K., Miyata-Hiramatsu, C., Masawa, M., Onozaki, M., Noda, S., Miyazawa, T., Takagi, M., & Yazawa, T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Endocrine secretory granule production is caused by a lack of REST and intragranular secretory content and accelerated by PROX1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of molecular histology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10735-021-10055-5	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高木 恵美、宮澤 公輔、上村 任、石井 順、矢澤 華子、柏木 維人、河野 翔、平松 千恵、鈴木 盛一朗、矢澤 卓也。
2. 発表標題 REST遺伝子の抑制およびPROX1、POMC遺伝子の強制発現は非内分泌細胞株H1299に内分泌顆粒様構造物の形成を誘導する
3. 学会等名 第25回 日本臨床内分泌病理学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井 順、矢澤 華子、柏木 維人、河野 翔、宮澤公輔、平松 千恵、小野崎聖人、金野晃大、野田修平、矢澤 卓也
2. 発表標題 内分泌顆粒はREST抑制およびPROX1・顆粒内容物質の発現により形成される
3. 学会等名 第27回 日本臨床内分泌病理学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮田 隼輔、高梨 歩夢、郷州 夏菜、杉山 瑠理、宮澤 公輔、石井 順、矢澤 華子、柏木 維人、平松 千恵、矢澤 卓也
2. 発表標題 内分泌顆粒の形成における顆粒内容物質の検討
3. 学会等名 第51回獨協医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮澤 公輔、宮田 隼輔、高梨 歩夢、石井 順、矢澤 華子、柏木 維人、平松 千恵、矢澤 卓也
2. 発表標題 Investigation of the effect of granule contents on the formation of endocrine granules
3. 学会等名 第113回 日本病理学会総会
4. 発表年 2024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	矢澤 華子 (佐藤華子) (Yazawa Hanako) (60438132)	獨協医科大学・医学部・講師 (32203)	
研究分担者	柏木 維人 (Kashiwagi Korehito) (50722451)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	

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
---------	---------