

## 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 13 万円

### [2] 研究経過

代表者は加齢研研究員時代のクリプトクロムの研究を進展させ、山形大学遺伝子実験施設へ異動後に、亜鉛(Zn)結合不全型のクリプトクロム(CRY)変異蛋白質をマウスやヒト細胞に過剰発現させる実験系を確立した。山形大学所属施設においての研究業務においては、現在に至るまで21年間に亘りこの研究を継続させている(CRY研究の経緯につきましては、平成27年度加齢研共同研究報告書, No. 3 及び文献[1]を参照下さい)。「クリプトクロム・時計遺伝子研究チーム」は、上述の実験系を柱に、概日時計の異常の影響を病院組織や大学の枠を超えて研究を展開して、研究者の叡智を集結させて明らかにすることを目的とした、早坂清先生(山形大学医学部名誉教授)を相談役とした研究チームである。

Zn 結合不全型 CRY1 の過剰発現マウス(以下 TG マウスと称する)は、β 細胞が消失することを主因とする糖尿病を発症する[1]。sfxn5 は TG マウスの膵島を材料とした網羅的発現解析において、野生型マウス(以後 WT マウスと略称する)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特定し、本研究グループで解析に注力している。

SFXN5 はミトコンドリアに局在し、クエン酸輸送の活性を有することが以前に報告されている以外には、機能に関する報告はほとんどない。ラットを用いた実験から SFXN5 は膵島の再生に関与することが示唆され[2]、β 細胞の新生や分化における何らかの機能があると考えられるが、具体的には明らかにされていない。

今年度も代表者が加齢研へ出張して、安井明 加齢研フェロー・名誉教授と菅野新一郎 講師と打ち合わせを行った。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、メールでの連絡に加えて、学会参加の機会を活用し打ち合わせを行った。佐々木悠先生(山形大学 消化器内科)とは、代表者が定期的に打ち合わせを実施した。また、早坂

清先生とメールにて頻繁に意見交換を行った。

### [3] 成果(3-1) 研究成果

① sfxn5 遺伝子発現の概日変動のメカニズム  
 高血糖を呈する週齢以前の週齢(4週齢)のTGマウスの膵臓のサンプル[3]を用いて、sfxn5 の発現をqPCRで調べた。その結果、E-box エレメントの制御下にある時計遺伝子と同様に、sfxn5 の遺伝子発現は低下していた(図1)。この結果から、sfxn5 はE-box の

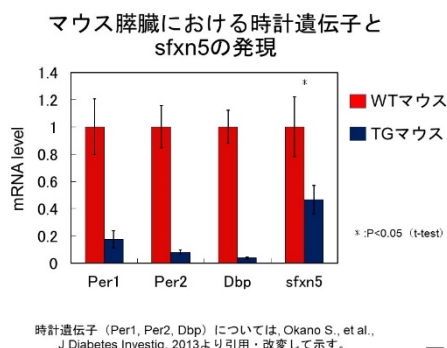


図1

制御下にある遺伝子であり、糖毒性などの二次的な影響とは無関係に、CRY1により直接的に発現が抑制される可能性が考えられた。

sfxn5 発現制御におけるCRY1の関与を明らかにする目的で、Zn 結合不全型CRY1を薬剤誘導性に過剰発現させることが出来るHEK293細胞[4]を用いて、Zn 結合不全型CRY1を誘導した際のsfxn5発現の変化を調べた。

### HEK293細胞における時計遺伝子と sfxn5 の発現

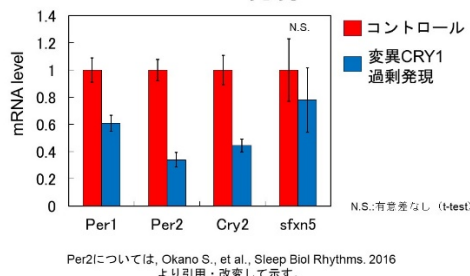


図2

Zn 結合不全型CRY1は、正常型CRY1と比較しCLOCK/BMAL1に対する抑制能が増強している為(詳細につきましては[1]を参照ください)、sfxn5がE-box被制御遺伝子であれば、Zn 結合不全型CRY1高発現により発現が抑制されることが期待される。結果を図2に示す。空ベクターを導入した細胞(コントロール)とZn 結合不全型CRY1高発現細胞の間に、sfxn5の発

現量に有意な差は見られなかった。

次にLD 12:12の照明サイクル下で飼育したTGマウスの肝臓 [4]での, *sfxn5* の概日変動を調べた。結果を図3に示す。ZT8とZT20の2点のタイムポイントで比較した結果を示す。WTマウス, TGマウス共に, *sfxn5* の発現レベルはZT20の方がZT8と比較して約2倍高く (WT:  $p < 0.05$ , TG:  $p < 0.01$ , t-test, 図3), *sfxn5* の発現は肝臓において概日変動することが判明した。同じタイムポイントで, WTマウスとTGマウスの間で比較したところ *sfxn5* の発現レベルに差は見られなかった (図3)。

マウス肝臓における *sfxn5* の発現の概日変動

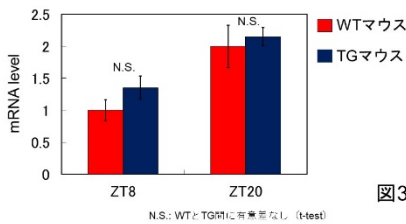


図3

以上の結果を総合すると, *sfxn5* の発現は肝臓において日周変動する。その変動はZn結合不全型CRY1によって影響を受けないことから, E-boxを介した制御以外の機構が関与する可能性が高い。TGマウス膵臓で発現が低下する機序については, 今後さらなる解析が必要である。

## ② SFXN5の膵臓の細胞と組織レベルでの分布

SFXN5は, 細胞種によっては, ミトコンドリア以外に核にも局在することが報告されている[5]。そこで膵臓の細胞での局在を調べた。ヒト膵癌細胞でSFXN5の分布を調べた。BxPC-3, MIAPaCa-2, Panc-1いずれもミトコンドリアに局在した。膵β細胞株MIN6においてもSFXN5はミトコンドリアに局在していた(図4A)。

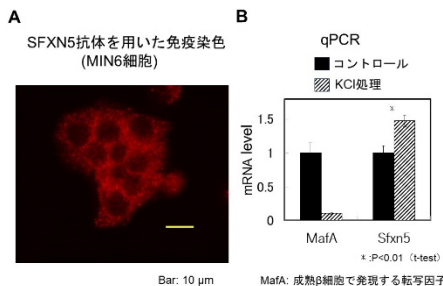


図4

膵β細胞株MIN6をKClで長時間刺激し, 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系において *Sfxn5* の発現量を解析した(加齢研共同研究報告書, 令和元年度No. 8, 令和2年度No. 10も参照下さい)。 *sfxn5* の mRNA は, KClで増加した(図4B)。SFXN5は糖毒性によるβ細胞機能障害やβ細胞脱分化誘導に関与する可能性が示された。

SFXN5抗体を用いた免疫染色 (WTマウス, 膵臓)

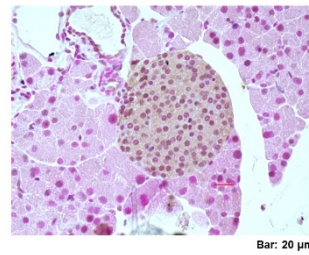


図5

マウス膵臓組織でのSFXN5の分布を免疫組織化学染色により調べた。膵臓内ではβ細胞に豊富に現

れていることが判明した(図5)。

## (3-2) 波及効果と発展性など

マウス膵臓組織でのSFXN5の分布を調べ, 膵臓内ではβ細胞に豊富に現していることを示すデータが得られ, 膵組織でのSFXN5の特徴的な分布が初めて明らかにされた。詳細は割愛するが, 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 [6] (加齢研共同研究報告書, 令和29年度No. 7も参照下さい)は, 膵内分泌細胞(特に膵α細胞)の新生の場として機能しうることを組織学的に明らかにし, 米国糖尿病学会にて公表し, 研究成果をワールドワイドに発信することができた。今後は, TGマウス膵島におけるSFXN5の異常の有無を調べ, IIDCを含む各種の膵癌前駆病変での発現について解析する。膵内分泌細胞の新生とSFXN5の関係を明らかにする実験も行う予定である。

参考文献: [1] 岡野聡, 月刊「細胞」2022年6月号 Page 410-420 [2] Yoshikumi Y., et al., J Cell Biochem. 2005 95:1157-1168. [3] Okano S., et al., J Diabetes Investig. 2013 13:428-435. [4] Okano S., et al., Sleep Biol Rhythms. 2016 14:261-269. [5] Attwood M M, et al., Front Cell Dev Biol. 2021 19:9:708754. [6] Okano S., et al., J Diabetes Res., 7234549, 2019.

## [4] 成果資料 (学会発表)

- Possible alpha-cell regeneration from mucin-producing ducts in zinc-binding site-mutated CRY1-expressing diabetic mice (ePoster: 291-LB) Okano S., et al., 第83回米国糖尿病学会 (ADA) [サンディエゴ] 2023年6月
- 亜鉛結合不全型の時計蛋白質CRY1発現マウスの膵島内膵管における膵α細胞の新生, 岡野聡 他, 第54回日本膵臓学会大会 2023年7月 (総説)
- Zn結合不全型CRY1発現マウスを用いた膵管前癌病変からの膵内分泌細胞新生の新知見 岡野聡 Precision Medicine 2023年12月臨時増刊号 63-67 2023
- 亜鉛結合不全型CRY1がマウスの概日リズムに及ぼす影響と膵内分泌細胞の分化転換 岡野聡 Precision Medicine 2023年5月号 60-64 2023