



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	乳児糖尿病をきたす重症Wolfram症候群の発症機序に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	森川, 俊太郎
Description	配架番号 : 2324
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12583号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66135
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Shuntaro_Morikawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 森川 俊太郎

学 位 論 文 題 名

乳児糖尿病をきたす重症 Wolfram 症候群の発症機序に関する研究

(Studies on the pathogenic mechanism of severe Wolfram syndrome which causes infantile diabetes mellitus.)

【背景】

糖尿病はインスリン作用の不足により生じる慢性の高血糖を主徴とした代謝疾患群で、その発症には様々な遺伝要因と環境因子が関与することが知られている。成因の割合としては、1 型糖尿病、2 型糖尿病が多くを占めるが、そのほかにも遺伝子疾患や症候群に伴って発症する糖尿病も知られている。本研究の対象である Wolfram 症候群は、非自己免疫性のインスリン依存性糖尿病、中枢性尿崩症、視神経萎縮、感音性難聴を主徴とする希少難治性の遺伝性疾患である。主徴の 1 つであるインスリン依存性糖尿病は学童期（中央値 6 歳）に発症するとされ、その後の脳幹萎縮による呼吸障害や誤嚥、尿路合併症が死因となり、平均死亡年齢 30 歳（25～49 歳）と生命予後が不良な疾患である。Wolfram 症候群の原因遺伝子は *WFS1* 遺伝子（*WFS1*）であり、同遺伝子がコードする WFS1 は小胞体膜上に発現するタンパクである。WFS1 の詳細な機能は未解明であるが、小胞体ストレス応答（UPR）、インスリンの分泌・合成、細胞周期の調整、小胞体 Ca^{2+} の恒常性維持、イオンポンプである Na^+/K^+ ATPase 発現調整に関わる分子であることがこれまでに報告されている。特に、WFS1 が UPR 経路の分子の 1 つである activating transcription factor 6 (ATF6) を抑制的に制御していること、また、小胞体膜上に発現する Ca^{2+} ポンプの 1 つである sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase（SERCA）2b の活性や発現量を調整していることが近年注目されている。

【対象と目的】

出生後の成長障害に加え、0 歳 7 ヶ月に先天性白内障、0 歳 11 ヶ月に糖尿病と感音性難聴で発症した Wolfram 症候群女児において新規 *WFS1* 変異（p.N325_I328del）を同定した。本研究では、今回同定した新規 *WFS1* 変異の機能解析を通じて、Wolfram 症候群が早期に重症化する機序を解明する。

【方法】

- ① ***WFS1* の PCR ダイレクトシーケンス**：説明に基づき親権者より書面での同意を得た上で、遺伝子解析を目的として末梢血液を患者と両親より採取した。小児の成長障害を引き起こす疾患の遺伝子解析に関しては、北海道大学医学部の倫理委員会において承認を得た。
- ② ***WFS1* の細胞内局在とタンパク発現量の検討**：HEK293 細胞に GFP を融合した野生型

もしくは変異型 *WFS1* (p.N325_I328del, p.Q194X, p.L543R) を一過性に発現させ、共焦点レーザ走査型顕微鏡を用いて細胞内局在を観察した。小胞体と核の染色には ER-ID® Red Assay Kit (Enzo Life Science) を用いた。また、同様に FLAG タグを癒合した各 *WFS1* を HEK293 細胞に発現させ、タンパクを抽出し SDS-PAGE で分離後に、それぞれの発現量をウェスタンブロットで評価した。

- ③ レポーターアッセイによる小胞体ストレス、ATF6、細胞内 Ca^{2+} 濃度の検討：野生型もしくは変異型 *WFS1* (p.N325_I328del, p.Q194X, p.L543R) 発現ベクターを HEK293 細胞に一過性に発現させ、小胞体ストレス、ATF6 活性、細胞内 Ca^{2+} 濃度を、それぞれ ERSE-ルシフェラーゼレポータープラスミド、pGL4.39 (Promega)、pGL4.30 (Promega) と、*Renilla reniformis* ルシフェラーゼによる Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) で評価した。
- ④ 定量 PCR 法による *CHOP* と *SERCA2b* 発現量の検討：野生型もしくは変異型 *WFS1* (p.N325_I328del, p.Q194X, p.L543R) 発現ベクターを HEK293 細胞に一過性に発現させ、それぞれの *CHOP* mRNA、*SERCA2b* mRNA の発現量を SYBR Green 法で検討した。内在性コントロールには *ACTB* を用いた。

【結果】

患児において新規 *WFS1* 変異 (p.N325_I328del) をヘテロ接合性に同定した。p.N325_I328del *WFS1* タンパクの細胞内局在は小胞体に一致したが、発現量は野生型と比較して低下していた。野生型 *WFS1* を発現した HEK293 細胞と比較して、変異 *WFS1* (p.N325_I328del) を発現した HEK293 細胞では、thapsigargin の有無に関わらず小胞体ストレスと ATF6 活性が増強し、*CHOP* 発現量が上昇していた。また、変異 *WFS1* (p.N325_I328del) は細胞外 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、*SERCA2b* の発現量を低下させた。

【考察】

変異 *WFS1* (p.N325_I328del) は、①ATF6 の過剰な活性化と、②SERCA2b の発現低下・小胞体からの Ca^{2+} 流出という 2 つの経路によって、恒常的な小胞体ストレスと細胞アポトーシスを誘導していると推測された。早期の細胞アポトーシスが、本児における重症 Wolfram 症候群の病因であると考えられた。

【結論】

乳児糖尿病で発症した重症 Wolfram 症候群の女児において、新規 *WFS1* 変異 (p.N325_I328del) をヘテロ接合性に同定した。変異 *WFS1* (p.N325_I328del) は優性阻害効果を有し、恒常的な小胞体ストレスと細胞アポトーシスを誘導する。また、変異 *WFS1* (p.N325_I328del) は sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) 2b の発現抑制による細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇と、ATF6 の過剰な活性化を誘導しており、細胞アポトーシスにはこの両者が関与しているものと推測された。

Wolfram 症候群の病因となる変異 *WFS1* が、SERCA2b の発現を抑制することを証明したのは本研究が初である。細胞-小胞体内 Ca^{2+} の恒常性維持と、小胞体ストレス反応 (UPR) に関わる *WFS1* の役割に、本研究は新たな知見を加えた。また、ヘテロ接合性の変異 *WFS1* が優性阻害効果を来す機序と、Wolfram 症候群が早期に発症する機序に新たな知見を加えた。