



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 森川 俊太郎

	主査	教授	渥美	達也
審査担当者	副査	教授	畠山	鎮次
	副査	教授	廣瀬	哲郎
	副査	教授	山下	啓子

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.)

本論文の研究対象である 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 つである非自己免疫性のインスリン依存性糖尿病は、主に学童期に発症するとされている。

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+} の恒常性維持などに関わる分子であることが報告されている。近年では、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注目されている。本論文では、乳児期早期に成長障害、難聴、白内障、インスリン依存性糖尿病を発症した重症 Wolfram 症候群の発症機序について検討した。

本研究での解析により新規のヘテロ接合性 *WFS1* 変異 (p.N325_I328del) を同定した。変異 WFS1 (p.N325_I328del) の細胞内局在は小胞体膜上に一致したが、その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) は優性阻害効果を有し、細胞外 Ca^{2+} 濃度の上昇、SERCA2b の発現量低下を誘導することを示した。以上より、変異 *WFS1*

(p.N325_I328del) は、①ATF6 の過剰な活性化、②SERCA2b の発現低下と小胞体からの 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した。早期の細胞アポトーシスが、本児における Wolfram 症候群の重症化の病因であると結論付けた。

学位審査にあたり、各審査担当者から挙げた内容は以下のとおりである。

まず、副査の山下啓子教授から、①Wolfram 症候群における *WFS1* の *de novo* 変異の頻度について、②胎児期の発育が障害されていない理由についての質問があった。それに対して申請者は、

de novo の報告はかなり少ないと説明した。また、今回の重症 Wolfram 症候群が胎児期のインスリン分泌に与えた影響は不明であるが、少なくとも出生時の体格に問題はなく、出生後の成長障害が顕著であったと回答した。

次に、副査の廣瀬哲郎教授からは「*WFS1* の新たな機能を解明したことは非常に興味深く、論文の内容として評価できる」という旨のコメントがあった。その上で、①ウェスタンブロットでは変異 *WFS1* の発現量が少ないがどのような機序で優性阻害効果をきたすと考えられるのか、②内因性 *WFS1* の影響は検討したのか（強制的に発現させた *WFS1*-FLAG や *WFS1*-GFP 発現量のほかに内因性 *WFS1* の発現量をウェスタンブロットで確認してはどうか）、③*WFS1* の細胞内局在を観察した今回の蛍光顕微鏡の画像ではタンパクがうまく検出できていないようにも見える（電子顕微鏡を用いてみてはどうか）、④細胞内局在のほかにタンパクの細胞内でのダイナミクスも検討した方がいいのではないか、⑤SERCA2b の発現量を検討する際、mRNA だけではなくタンパクの発現量もみるべきではないのか、以上 5 点の質問とコメントがあった。それに対して申請者は、過去に恒常的小胞体ストレスを誘導すると報告されている変異 *WFS1* (p. H313Y) でも同じくタンパク発現が少なかったことを例示したうえで、ウェスタンブロットでタンパク発現量が低下していた理由が現時点で同定できていないこと、少ないタンパク発現量であっても野生型の機能を凌駕する機序の存在が予想されることを説明した。そのほか廣瀬教授から提示のあった実験に関しては今後検討したいと回答した。

続いて、副査の畠山鎮次教授からは、①Wolfram 症候群が糖尿病をきたす機序はインスリン分泌能の低下なのか耐糖能異常なのか、②*WFS1* の発現部位の特異性と表現型の特異性についてはどう説明できるのか、③*WFS1* にシグナルペプチドはあるのか、④ウェスタンブロットで確認した *WFS1* (p. Q194X) -FLAG はタンパク発現が全くないように見え、一方で蛍光顕微鏡では *WFS1* (p. Q194X) -GFP の発現が確認された。この矛盾をどう説明するのか、⑤遺伝学的には両親の性腺モザイクである可能性は否定できないのではないか、また、今後の方針に関して、⑥患者由来の細胞で内因性 *WFS1* の発現量を検討するべきである、⑦ATF6 の分解能についての検討すべきである、⑧SERCA2b の発現量が落ちたメカニズムを検討するべきである、以上 8 点の質問とコメントがあった。それに対して申請者は、膵β細胞のアポトーシスによるインスリン分泌能の低下が Wolfram 症候群における糖尿病の病因と考えられていること、ユビキタスに発現している *WFS1* が異常を来すことで臓器特異的な症状を来す明確な理由は現時点で不明であること、また、*WFS1* にはシグナルペプチドが無いことを回答した。*WFS1* (p. Q194X) -FLAG を用いたウェスタンブロットと、*WFS1* (p. Q194X) -GFP を用いた蛍光顕微鏡との結果が乖離していることに関しては、今後、GFP 抗体を用いたウェスタンブロットを検討中であると回答した。また、提案のあった実験に関しても現在計画を立てている段階であると回答した。

最後に主査の渥美達也教授からは、①*WFS1* の発現量の差だけで臓器特異的な症状を説明できるのか、②*WFS1* のトランスジェニックマウスではどのような症状を来すのか、③ミトコンドリア機能への影響はないのか、④本研究を進めることによって今後どのような形で臨床の役に立つのか、以上 4 点の質問があった。申請者は、いずれの質問に対しても、自身の実験結果や知見、関連論文などを引用して、それぞれ適切に回答した。

審査員一同は、これらの成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。