



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 [全文の要約]
Author(s)	森川, 俊太郎
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2324 他
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/2115/66136
Type	doctoral thesis
File Information	Shuntaro_Morikawa_summary.pdf



学 位 論 文

(要約)

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.)

2017 年 3 月

北海道大学

森川 俊太郎

学 位 論 文

(要約)

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.)

2017 年 3 月

北海道大学

森川 俊太郎

【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 (OMIM 222300) は、中枢性尿崩症 (diabetes insipidus; DI)、非自己免疫性のインスリン依存性糖尿病 (diabetes mellitus; DM)、視神経萎縮 (optic atrophy; OA)、感音性難聴 (sensorineural deafness; D) の臨床症状を特徴とする難治性の遺伝性疾患であり、各症状の頭文字をとって「DIDMOAD」とも呼ばれる。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 症候群の責任遺伝子は4p16.1に位置する *WFS1* 遺伝子 (以下、*WFS1*) である。これまでに200以上の *WFS1* 変異が Wolfram 症候群の原因として報告されており、その大半は常染色体劣性遺伝形式で発症する。一方で、p.H313Y、p.W314Rをはじめとしたヘテロ接合性 *WFS1* 変異による常染色体優性遺伝形式で発症した症例や、母性片親性ダイソミーで発症した症例も報告されている (c.1348_1350 del ins TAG)。 *WFS1* の遺伝子型と表現型の明らかな関連についてはこれまで明らかにされていなかったが、近年のシステムティックレビューでは、各症状の発症時期や進行速度と遺伝子型との関連が見出されている。

WFS1 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。

我々は、非自己免疫学的機序により発症したインスリン依存性糖尿病の乳児に新規 *WFS1* 変異を同定し、Wolfram 症候群と診断した。乳児期早期に内因性インスリン分泌が枯渇しインスリン投与を必要としている点で糖尿病は重症であり、また、既に乳児期に難聴と白内障・視神経障害を合併している点で、これまでに報告されている Wolfram 症候群の自然歴と比較して早期に発症した症例である。

Wolfram 症候群の病因に関わる分子基盤は徐々に解明されているものの、症状が重 (軽) 症化する機序や、発症時期を規定する病態の機序は不明である。これまでに報告されている Wolfram 症候群に関する分子学的な知見をもとに、本研究では新規 *WFS1* 変異の機能解析を行った。

【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 症候群女兒において新規 *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、共焦点レーザー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】

① 患児において新規 *WFS1* 変異 (p.N325_I328del) を同定

患児の *WFS1* の PCR ダイレクトシーケンスを行ったところ、12 塩基欠失に伴うインフレームシフト変異をヘテロ接合性 (p.N325_I328del) に同定した。両親の解析では変異を認めない *de novo* 変異であった。この p.N325_I328del は *WFS1* のエクソン 8 に位置し、*WFS1* の第 1 膜貫通領域に位置している。

② 変異 *WFS1* (p.N325_I328del) は、野生型 *WFS1* よりもタンパク発現量が低い

今回同定した新規変異 *WFS1*-FLAG (p.N325_I328del) のほかに、コントロール (pcDNA3) と既報の変異 *WFS1*-FLAG (p.Q194X, p.L543R) を HEK293 細胞にトランスフェクションした。

HEK293 細胞からタンパクを回収してウェスタンブロットを行ったところ、野生型と比較して p.N325_I328del、p.Q194X、p.L543R では *WFS1* 単量体であると考えられる 100 kDa のバンドが薄く、*WFS1* 発現量が低下していた。特に p.Q194X はウェスタンブロットでタンパクが検出されなかった。内因性コントロールとして β アクチンを使用した、 β アクチンの発現量に変化がないことを確認した。

③ 変異 *WFS1* (p.N325_I328del) は小胞体膜上に局在する

蛍光免疫染色では、野生型、変異 (p.N325_I328del、p.Q194X、p.L543R) *WFS1*-GFP はいずれも小胞体の局在と一致していた。

④ 変異 *WFS1* (p.N325_I328del) は「恒常的小胞体ストレス」を誘導

小胞体ストレス誘導剤である thapsigargin (TG) を加えた条件下で、変異 (p.N325_I328del) *WFS1* と既報変異 (p.L543R) *WFS1* を発現した HEK293 細胞は、野生型 *WFS1* を発現した HEK293 細胞よりも高い ERSE 活性を示した。従って、この実験系は各変異 *WFS1* を発現した HEK293 細胞の小胞体ストレスを評価するのに適している。

また、TG を添加しない条件においても、p.N325_I328del を発現させた HEK293 細胞では、野生型と既報変異 (p.Q194X、p.L543R) *WFS1* を発現させた HEK293 細胞よりも強い小胞体ストレスが誘導された。以上の結果より、p.N325_I328del を発現した HEK293 細胞における「恒常的小胞体ストレス」の存在を確認した。

一方で、TG を加えない条件において、既報変異 (p.Q194X、p.L543R) *WFS1* を発現した HEK293 細胞の ERSE 活性は、コントロールに設定した pcDNA3 や、野生型 *WFS1* を発

現した HEK293 細胞よりも低く観察された。特に p. Q194X は TG を加えた条件においても、野生型と同等の ERSE 活性を示した。

ウェスタンブロットによる検討では、いずれの変異 WFS1 (p. N325_I328del、p. Q194X、p. L543R) も野生型 WFS1 と比較してタンパク発現量が低下していた。特にタンパク発現量がほぼ同等であった p. N325_I328del と p. L543R WFS1 とでは、TG 非存在下での ERSE 活性がそれぞれ相反する結果であった。つまり、タンパク発現量の差とは別の機序で、これら ERSE 活性の差を生じているものと推測された。p. L543R *WFS1* によって Wolfram 症候群を発症した症例は、いずれも複合型ヘテロ接合性 *WFS1* 変異 (p. L543R/p. V546D、もしくは p. L543R/p. A133T) である。したがって、TG 非存在下での p. L543R の病原性は、今後これらの変異を共発現させることでも検討してゆく必要がある。

⑤ 変異 *WFS1* (p. N325_I328del) は優性阻害効果を有する

野生型と変異 (p. N325_I328del) *WFS1* を同量ずつ HEK293 細胞に発現させたところ、thapsigargin の有無に関わらない小胞体ストレスが観察された。以上の結果より、今回同定した p. N325_I328del には優性阻害効果があることが示された。

⑥ 変異 *WFS1* (p. N325_I328del) は HEK293 細胞のアポトーシスを誘導する

野生型、既報変異 (p. Q194X、p. L543R) *WFS1* を発現した HEK293 細胞と比較して、変異 (p. N325_I328del) *WFS1* を発現した HEK293 細胞では、*CHOP* mRNA が有意に多く発現していた。これは、p. N325_I328del の発現が HEK293 細胞にアポトーシスを誘導していることを示している。

⑦ 変異 *WFS1* (p. N325_I328del) は ATF6 を恒常的に活性化する

ATF6 プロモーター活性は変異 (p. N325_I328del) *WFS1* を発現した HEK293 細胞において恒常的に上昇していた。また、上昇した ATF6 のプロモーター活性は、化学シャペロンである 4-フェニル酪酸 (4-PBA) の添加により抑制された。

4-PBA は低分子の脂肪酸で、変性したタンパクの凝集を阻害する効果 (ケミカルシャペロン) と、ヒストン脱アセチル化酵素を阻害する効果があることも知られている。詳細な機序は不明だが、ケミカルシャペロン効果により小胞体ストレスが軽減されたと推測される。

⑧ 変異 *WFS1* (p. N325_I328del) は HEK293 細胞の細胞質内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる

pGL4.30 (Promega) を用いた検討では、thapsigargin の有無に関わらず、変異 (p. N325_I328del) *WFS1* を発現した HEK293 細胞において NFAT 活性が有意に上昇して

いた。これは、p. N325_I328del を発現した HEK293 細胞では細胞質内 Ca^{2+} 濃度が上昇していることを示唆している。

⑨ 変異 *WFS1* (p. N325_I328del) は HEK293 細胞の *SERCA2b* 発現量を低下させる

野生型、既報変異 (p. Q194X、p. L543R) *WFS1* を発現した HEK293 細胞と比較して、変異 (p. N325_I328del) *WFS1* を発現した HEK293 細胞では、*SERCA2b* mRNA の発現量が有意に低下していた。

【考察】

乳児糖尿病で発症した重症 Wolfram 症候群の女兒において、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。

【結論】

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。