

ゲノム資源を用いた糖尿病発症遺伝素因としてのERストレス関連分子の探求

●谷澤 幸生¹⁾ ◆野見山 淳¹⁾ ◆田部 勝也¹⁾ ◆植田 浩平²⁾

1) 山口大学大学院医学研究科生体シグナル解析医学講座分子病態解析学 2) 山口大学保健管理センター

＜研究の目的と進め方＞

膵β細胞の選択的喪失による糖尿病と視神経萎縮を主徴とするWofram症候群の原因遺伝子WFS1は小胞体中存在する膜蛋白をコードする。WFS1の機能解明を通してWofram症候群、特に糖尿病の発症機構を解明する。また、2型糖尿病発症素因としてのWFS1遺伝子多型の意義、WFS1の機能に関連する遺伝子の探査、同定と、2型糖尿病候補遺伝子としてのそれらの遺伝子変異の解析を特にERストレス応答との関連に焦点を当てて進めてゆく。

＜研究開始時の研究計画＞

1. Wolfam症候群原因遺伝子WFS1遺伝子多型を検索し、相関解析によりWFS1遺伝子多型が2型糖尿病発症素因となる可能性について検討する。
2. 細胞モデル及びWfs1-/-マウスの解析を通じてWolfam症候群、特にその部分症状である糖尿病の発症機序を解明する。
3. WFS1と機能的に関連する遺伝子の探査、同定を行い、糖尿病発症素因を決定する遺伝子候補として検証する。

＜研究期間の成果＞

1. PCR-direct sequence法及びPCR-SSCP法でWFS1遺伝子の変異の解析を行った。1型及び2型糖尿病患者を対象とした解析で新たな変異7つを含む18種の塩基置換を同定した。うち12種はアミノ酸の置換を伴うものであった。1型及び2型糖尿病患者で非糖尿病対照者と比較して有意に頻度の高いものは存在しなかった。2型糖尿病患者を対象とした臨床的パラメーターの解析において、I720Vのヘテロ保持者で糖尿病診断時年齢が若い傾向 ($p=0.026$) があった。WFS1遺伝子多型が2型糖尿病発症の弱いリスクとなる可能性が示唆された。
2. Wfs1ノックアウトマウスを作製した(成果公開リスト1)。Wfs1-/-マウスはヒトでのWofram症候群の症状からの予想に反して耐糖能異常は軽度であった。耐糖能異常の程度はマウスの遺伝的バックグラウンドに依存する。[(129SvxB6) x B6] F2では20週齢以降に6割以上の個体が顕性の糖尿病を発症する。一方、バッククロスを重ね、B6のバックグラウンドを持つ個体では耐糖能異常は示すものの、少なくとも30週齢までの観察で顕性の糖尿病を発症しなかった。いずれにしても耐糖能異常はインスリン分泌の低下によるものであり、顕性糖尿病を発症した[(129SvxB6) x B6] F2 Wfs1-/-マウスではラ氏島でのβ細胞の選択的減少とα細胞の増加、B6をバックグラウンドとするWfs1-/-マウスにおいても明らかなラ氏島の構造異常が認められた。この遺伝的背景に依存する表現型の差を決定する因子がWFS1蛋白の機能と関連するものと考え、現在解析を進めている。軽度の肥満と耐糖能異常を示す肥満マウスと[B6] Wfs1-/-マウスを交配することにより作出した軽度の肥満を伴うWfs1-/-マウスでは、早期より顕性糖尿病を発症し、20週以降にはケトアシドーシスを来すことを見だしている。ラ氏島ではβ細胞が

選択的に消失し、Wfs1を欠損するβ細胞では、軽度のインスリン需要の増大により細胞死が誘導されると推測している。このメカニズムの解明を通してWFS1の機能の解明がすすみ、さらには2型糖尿病患者で見られる進行性のβ細胞の減少と共通する機序の解明につながりうると考えている。

3. WFS1蛋白は膵ではランゲルハンス氏島、主にβ細胞に特異的に発現し、細胞内では小胞体膜に存在する。線維芽細胞をthapsigarginやtunicamycinで処理することにより小胞体ストレスを誘導すると、WFS1蛋白の発現亢進が認められた。膵β細胞株であるMIN6細胞でも同様に、これらの薬剤処理によりWFS1 mRNA及び蛋白の発現誘導が観察される。Akita mouseはInsulin-2遺伝子のC96Y変異により膵β細胞数が減少し、糖尿病を発症する。C96Y変異によりインスリンの分子内disulfide bondの形成が阻害されるため、異常なインスリン分子が細胞内に蓄積し、小胞体ストレスを惹起することがβ細胞障害の一因であると考えられている。この変異をホモ接合体でも持つAkita mouse由来のins296Y/Y膵島腫瘍細胞ではBipの高発現が認められ、小胞体ストレスの亢進が示唆された。この細胞においてもWfs1の発現は対照とした細胞に比較して増加していた。ヒトWFS1遺伝子のプロモーター領域をluciferase遺伝子の5'上流に配置し、reporter遺伝子を作製した。このリポーターを含むプラスミドをMIN6細胞に導入した後、thapsigarginやtunicamycinで処理するとリポーター活性は有意に増加した。また、このプラスミドをins296Y/Y膵島腫瘍細胞および対照としたins2wild/wild細胞にリポフェクション法でそれぞれ導入し、luciferase活性を測定すると、ins2遺伝子C96Yホモ変異株におけるluciferase活性は野生株に比べて約2倍に増加していた。これらのことは、WFS1は小胞体ストレスにより転写レベルで発現誘導されることを示し、小胞体ストレスに対する細胞応答に関与する可能性を示唆する。(成果公開リスト2)

＜国内外での成果の位置づけ＞

WFS1遺伝子の機能の解明、その異常による糖尿病発症機構についての研究は世界的にも端緒についたばかりである。また、近年、ERストレス応答に関与する蛋白リン酸化酵素PERKの欠損マウスやそのヒトホモログの欠損症であるWolcott-Rallison症候群の患者がβ細胞死による糖尿病をきたすことが示され、ERストレスとβ細胞異常や糖尿病との関連が注目されている。より一般に見られる2型糖尿病患者での1次的(遺伝素因による)あるいは2次的(糖毒性、SU薬2次無効なども関与、遺伝的にも規定されている可能性がある)なβ細胞機能あるいはβ細胞量の異常と小胞体ストレスとの関連についての研究は今後大きく展開してゆく可能性があり、我々の研究もその先駆けとなる。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

WFS1蛋白の機能の十分な解明には至らなかった。こ

れにはまだ基礎的な研究の積み重ねが必要である。WFS1蛋白と機能的に関連しうる蛋白をコードする遺伝子の異常が糖尿病発症素因となりうる可能性の検討は、着手はしているが、結果を出すまでには至らなかった。

〈今後の課題〉

マウスモデルを用いた膵 β 細胞での遺伝子、蛋白発現の網羅的解析を中心に、WFS1蛋白の機能の解明、それに連関する分子の異常が糖尿病発症に関連する可能性について研究を進めてゆきたい。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Ishihara H, Takeda S, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Yamada T, Inoue H, Soga H, Katagiri H, Tanizawa Y, Oka Y. Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive β -cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet.* 2004 13:1159-1170.
2. Ueda K, Kawano J, Takeda K, Yujiri T, Tanabe K, Anno T, Akiyama M, Nozaki J, Yoshinaga T, Koizumi A, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y. Endoplasmic Reticulum Stress Induces Wfs1 Gene Expression in Pancreatic β -cells via Transcriptional Activation. *Eur J Endocrinol* 153:167-176, 2005.