

氏 名（本籍）	やま だ たか ひろ 山 田 高 弘
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 博 第 2 3 6 5 号
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学位論文題目	ウオルフラム症候群モデルマウスにおける膵 β 細胞脱落機構の解析

（主 査）

論文審査委員 教授 岡 芳 知 教授 中 山 啓 子

教授 田 村 眞 理

論 文 内 容 要 旨

ウオルフラム症候群はインスリン分泌不全を伴う若年発症の糖尿病や視神経萎縮などを主徴とする常染色体劣性遺伝病である。ウオルフラム症候群の原因遺伝子 Wolfram syndrome 1 (WFS1) が同定され、本疾患が WFS1 遺伝子の異常に基づくものであることが明らかとなったが、その機能の多くは不明である。我々の作成した WFS1 遺伝子欠損マウスでは、進行性の膵β細胞変性脱落とインスリン分泌不全を伴う耐糖能異常が認められた。

本実験で DNA マイクロアレイにより WFS1 遺伝子欠損マウス膵島における網羅的な遺伝子解析を行ったが、WFS1 遺伝子欠損膵島では小胞体ストレス応答に関連する複数の遺伝子に発現増加が認められた。そこで WFS1 欠損膵島におけるβ細胞の変性脱落に小胞体ストレスが強く関係していると考え、WFS1 欠損マウスおよび野生型マウスの膵島を用いて、リアルタイム RT-PCR およびウエスタンブロットを行い、小胞体ストレス応答関連分子の発現を検討した。また、その他の WFS1 発現臓器である心筋組織においても同様の検討を行った。

その結果、WFS1 欠損膵島では unfolded protein response (UPR) に関わる三つの経路のうち、蛋白翻訳抑制に関わる PKR-like ER kinase (PERK) 経路と転写誘導や小胞体関連分解に関わる inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease (IRE1) 経路の活性化が認められたが、activating transcription factor 6 (ATF6) 経路で転写誘導される分子シャペロンの glucose-regulated protein of 78 kilodaltons (GRP78) の発現増加が認められず、ATF6 経路は活性が低いと考えられた。また、興味深いことに小胞体カルシウムポンプの阻害剤であるタプシガルギンで小胞体ストレスを誘導した際も、WFS1 欠損膵島では GRP78 の発現増加が認められなかった。また、WFS1 欠損膵島では C/EBP homologous protein (CHOP) や pro-caspase 12、活性化型 caspase 3 の発現が増加しており小胞体ストレスによるアポトーシスが誘導されていると考えられた。WFS1 欠損膵島では野生型膵島と比較して、BrdU 陽性細胞数が約 50% 低下しており、細胞増殖の低下が膵β細胞維持機構の障害に関係していることが示唆された。WFS1 欠損膵島では CDK 阻害因子である p21^{Cip1} や、過剰発現により G1 期の停止を引き起こすことが報告されている eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) などの蛋白が著明に増加が認められた。非常に興味深いことに、これらの蛋白は野生型膵島にタプシガルギンで刺激した小胞体ストレス誘導でも増加が認められた。膵島に次いで WFS1 を多く発現している心筋では UPR の亢進は認められず、WFS1 欠損マウスにおける UPR は膵β細胞や WFS1 を発現している一部の神経細胞で特異的に起こっていることが示唆された。

我々は膵β細胞腫瘍発症マウスである IT6 マウスと WFS1 遺伝子欠損マウスを掛け合わせた

マウスから、WFS1 遺伝子欠損 MIN6 細胞を樹立した。WFS1 ホモ欠損 MIN6 細胞では UPR の亢進が認められたが、WFS1 欠損膵島と同様に GRP78 の増加は認められなかった。WFS1 ホモ欠損 MIN6 細胞にアデノウイルスで WFS1 の発現を回復させたところ、リン酸化 PERK や CHOP 発現の低下が認められた。また、WFS1 ホモ欠損 MIN6 細胞に GRP78 を過剰発現させたところ同様に UPR の低下が認められた。これらより WFS1 欠損細胞で生じた小胞体ストレス応答が慢性化する一因として、GRP78 の転写誘導を始めとする ATF6 経路の活性低下が関係していることが考えられた。MIN6 細胞にアデノウイルスで 4E-BP1 や p21^{CIP1} を過剰発現させると、細胞増殖に有意な低下が認められ、4E-BP1 と p21^{CIP1} 共に発現させた細胞では増殖は更に低下した。WFS1 欠損膵島では、UPR の亢進により CHOP や p21^{CIP1}、4E-BP1 などの発現が増加し、細胞周期の異常による増殖低下をきたしていることが考えられた。

WFS1 欠損マウスにおける糖尿病は、慢性的な UPR から引き起こされる膵β細胞のアポトーシスや細胞増殖の低下に基づく病態であると考えられた。UPR から引き起こされるアポトーシスや細胞周期の異常は、2 型糖尿病において膵β細胞減少が起こるメカニズムの解明にもつながる可能性があり今後更なる研究が期待される。

審査結果の要旨

ウオルフラム症候群はインスリン分泌不全を伴う若年発症の糖尿病や視神経萎縮などを主徴とする常染色体劣性遺伝病である。ウオルフラム症候群の原因遺伝子 Wolfram syndrome 1 (WFS1) が同定され、本疾患が WFS1 遺伝子の異常に基づくものであることが明らかとなったが、その機能の多くは不明である。我々の作成した WFS1 遺伝子欠損マウスでは、進行性の膵β細胞脱落とインスリン分泌不全を伴う耐糖能異常が認められ、ウオルフラム症候群のマウスモデルと考えられる。

本研究において、まず DNA マイクロアレイにより WFS1 遺伝子欠損マウス膵島における網羅的な遺伝子解析を行ったところ、WFS1 欠損膵島では小胞体ストレス応答 unfolded protein response (UPR) に関わる三つの経路のうち、蛋白翻訳抑制に関わる PKR-like ER kinase (PERK) 経路と転写誘導や小胞体関連分解に関わる inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease (IRE1) 経路の活性化が認められたが、activating transcription factor 6 (ATF6) 経路で転写誘導される分子シャペロンの glucose-regulated protein of 78 kilodaltons (GRP78) の有意な発現増加が認められず、ATF6 経路の活性化が弱いと考えられた。また、WFS1 欠損膵島では C/EBP homologous protein (CHOP) や pro-caspase 12、活性化型 caspase 3 の発現が増加しており小胞体ストレスによるアポトーシスが誘導されていると考えられた。さらに、WFS1 欠損膵島では BrdU 陽性細胞数が約 50% 低下しており、CDK 阻害因子である p21^{CIP1} や、過剰発現により G1 期の停止を引き起こすことが報告されている eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) などの蛋白の著明な増加が認められた。興味あることに、膵島に次いで WFS1 を多く発現している心筋では UPR の亢進は認められず、WFS1 欠損マウスにおける UPR は膵β細胞や WFS1 を発現している一部の神経細胞で特異的に起こっていることが示唆された。さらに、膵β細胞腫瘍発症マウスである IT6 マウスと WFS1 遺伝子欠損マウスを掛け合わせたマウスから WFS1 遺伝子欠損 MIN6 細胞を樹立した。この培養膵β細胞株での検討も進め、WFS1 遺伝子欠損マウス膵ラ島とほぼ同様の結果を得た。

このように、WFS1 欠損マウスにおける糖尿病は、慢性的な UPR から引き起こされる膵β細胞のアポトーシスや細胞増殖の低下に基づく病態であると考えられた。UPR から引き起こされるアポトーシスや細胞周期の異常は、2 型糖尿病において膵β細胞減少が起こるメカニズムの解明にもつながる可能性があり今後更なる研究が期待される。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。