

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06972

研究課題名(和文) ウォルフラム症候群の糖尿病発症の分子機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of the diabetes in Wolfram syndrome

研究代表者

藤田 英俊 (Fujita, Hidetoshi)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：90571802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Wolfram 症候群(ウォルフラム症候群)は、遺伝性の一型糖尿病であり、その原因遺伝子は、Wolfram syndrome 1 (WFS1) である。WFS1 遺伝子欠失マウスモデルの研究から、糖尿病発症には、タンパク質分解に重要な E3 ユビキチンリガーゼであるシノビオリンの発現の減弱が重要であることが報告された。しかしながら、シノビオリンの発現の減弱による病態発症の分子機序についてはいまだ不明である。本研究では、膵臓の細胞特異的なシノビオリンノックアウトマウスを作製・解析し、シノビオリンの欠失によりインスリン分泌異常が生じること、および、その分子メカニズムの一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Wolfram 症候群(ウォルフラム症候群)は、常染色体劣性遺伝性疾患であり、日本における患者数はおよそ200人である。代表的な遺伝性の一型糖尿病であり、いまだその根本的な治療法が確立していない疾患でもある。本研究では、シノビオリンの欠失により、インスリン分泌異常が生じることが認められ、かつ、その下流のシグナルの一端を同定した。これらの結果は、これまで報告されていない新規のインスリン分泌制御機構の発見のみならず、同定した下流のシグナル経路が新たな治療標的になる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Wolfram syndrome (WS) is the most common genetic type I Diabetes mellitus. Molecular genetic studies show that 90% of WS patients carry a loss-of-function mutation in the WFS1 gene. It has recently been discovered that downregulation of Synoviolin (SYVN1) has been observed in Wfs1-deficient mice and lymphocytes from patients with WS. However, the downstream pathways involved after the degradation of SYVN1 remain unclear. In this study, we generated and analyze pancreatic cell-specific SYVN1 knockout mice and found that Syvn1 deficiency in cells causes insufficient insulin secretion.

研究分野：分子生物学

キーワード：ウォルフラム症候群 シノビオリン 小胞体ストレス 細胞 インスリン分泌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難病は、原因が不明、治療方針未確定であり、かつ、後遺症を残すおそれがある疾病である。治療薬の対象となる患者数が少ない、開発のメリットが少ないなどの理由から研究開発が遅れてきた傾向がある。しかしながら、実在する患者の新規治療開発に向けて、病因・病態の解明のための基礎研究を推進することは重要である。Wolfram 症候群 (ウォルフラム症候群) は、常染色体劣性遺伝性疾患であり、日本における患者数はおよそ 200 人である。代表的な遺伝性の糖尿病であり、いまだその根本的な治療法が確立していない疾患でもある。若年で糖尿病が発症し、内分泌代謝系、精神神経系を広範に障害することが知られている。また、ウォルフラム症候群は、その主な症状である尿崩症 (diabetes insipidus (DI))、若年発症型糖尿病 (juvenile-onset Diabetes mellitus (DM))、視神経萎縮 (optic nerve atrophy (OA))、および難聴 (deafness (D)) であることから、DIDMOAD 症候群ともいわれている。その原因遺伝子として、Wolfram syndrome 1 (WFS1) が 1998 年に同定された (Inoue H et al. Nat. Genet. 1998, 20: 143-148)。WFS1 タンパク質は、主に細胞内小器官である小胞体に存在する膜タンパク質であり、細胞内カルシウム制御や小胞体ストレス応答に機能していると考えられている。WFS1 遺伝子欠失マウスでは、高血糖が認められ、 β 細胞量減少やインスリン分泌不全が報告されている。また、詳細な解析の結果、この WFS1 の変異により、膵臓の β 細胞において、小胞体ストレスが高度に上昇し、糖尿病を引き起こすことが明らかになってきた。さらに、糖尿病の発症には、タンパク質の分解制御に機能する E3 ユビキチンリガーゼであるシノビオリンの発現の減弱が重要であることが報告された (Fonseca SG et al. J. Clin. Invest. 2010, 120:744-55)。しかしながら、シノビオリンの発現の減弱による病態発症の分子機序についてはいまだ不明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、ウォルフラム症候群で認められる膵臓 β 細胞におけるシノビオリンの発現の減弱による糖尿病発症の分子基盤を明らかにすることを目的とし、膵臓の β 細胞特異的なシノビオリンノックアウトマウス、および、膵臓の培養細胞を用いて解析する。

ウォルフラム症候群はいまだ確立した治療法がない難病である。現在、ワシントン大学医学部浦野文彦教授らのグループが、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤やカルシウムチャンネル阻害剤を用いた治験を開始している。浦野教授らは、WFS1 遺伝子欠失マウスモデルを用いた研究から、糖尿病の発症に、シノビオリンの発現の減弱が重要であることを明らかにしているが、その詳細はいまだ不明である。本研究にて、膵臓の β 細胞特異的なシノビオリンノックアウトマウスを用いて研究を行うことは、単に、膵臓におけるシノビオリンの機能解析にとどまらず、ウォルフラム症候群の糖尿病発症の分子基盤の解明につながる極めて独創的な研究成果が得られることが期待される。さらに、本研究は、ウォルフラム症候群の病態病因解明のみならず、他の糖尿病のモデルになりえる重要な研究であり、タンパク質分解という側面から糖尿病発症をとらえることを目指す本研究は非常に意義ある基礎研究であると考えられる。本研究から見出した知見を基に、予防法やサプリメント、新規治療薬の創薬開発に貢献することができると期待される。

3. 研究の方法

本研究では、シノビオリンの発現の減弱による糖尿病発症の分子基盤を明らかにするため、膵臓 β 細胞特異的なシノビオリンノックアウトマウスの作製を行った。シノビオリン (floxed/floxed) マウスと、膵臓の β 細胞特異的な Cre マウス (Pdx-Cre) との掛け合わせにより、膵臓 β 細胞特異的なシノビオリンノックアウトマウス (Pdx-Syvn1) を作製した。

- (1) 経口ブドウ糖負荷試験では、コントロールマウス、および、膵臓 β 細胞特異的なシノビオリンノックアウトマウスを絶食させたのち、グルコースを経口投与し、0, 15, 30, 60, 120 分後にその血糖値を測定した。
- (2) マウスの膵臓の膵島の分離は、定法に従って行った。具体的には、マウスの膵臓にリベラーゼ (Roche) を注入後、37°C で処理を行った。その後、顕微鏡下で確認しながら膵島をピックアップした。膵島をカウント後、24 well plate で培養し、グルコースの有無によるインスリンの分泌量を ELISA (富士フィルムワコーシバヤギ) により測定した。
- (3) マウスの膵臓組織を採取後、10%ホルマリン溶液で固定し、パラフィンにて包埋した。切片作製後、定法に従い、HE 染色・マッソン・トリクローム染色を行った。
- (4) GST-pull down 実験では、GST が融合したシノビオリンタンパク質を用いた。このタンパク質は、大腸菌 BL21 を用いて作製し、グルタチオンビーズにより精製後、SDS PAGE、CBB 染色によりそのタンパク質を確認した。GST-pull down 実験において、細胞抽出液と GST 融合シノビオリンタンパク質を 4°C で反応させ、SDS PAGE でタンパク質を分離後、銀染

色により結合したタンパク質を染色した。その後、ゲルを切り出し、質量分析装置を用いて結合タンパク質を同定した。

- (5) *in vitro* ユビキチン化実験は、E1 タンパク質、E2 タンパク質、シノビオリンタンパク質、標的タンパク質、ATP を用いて、以前報告した論文 (Amano et al. Genes Dev. 2003, 17, 2436-2449) と同様に実験を行った。細胞内におけるユビキチン化実験は、培養細胞にシノビオリン、ユビキチンタンパク質、標的タンパク質を発現するプラスミドをトランスフェクション後、細胞抽出液を回収し、免疫沈降実験を行った。その後、SDS PAGE によりタンパク質を分離し、ウエスタンブロットを行い、ユビキチン化タンパク質を検出した。

4. 研究成果

- (1) 膵臓の β 細胞特異的 Cre マウス (Pdx-Cre) とシノビオリン flox マウスとの掛け合わせにより、膵臓 β 細胞特異的シノビオリンノックアウトマウス (Pdx-Syvn1) を作製し、解析した。経口ブドウ糖負荷試験を実施した結果、コントロールマウスと比較して、ノックアウトマウスで血糖値の戻りが悪く、高血糖状態が続いた。
- (2) マウスより膵臓の膵島を分離し、*in vitro* でグルコースに対する応答性を検証した結果、コントロールマウスと比較して、ノックアウトマウスでは、グルコース刺激によるインスリンの分泌が低下していた。
- (3) マウス膵臓の組織学的な異常があるかどうかを HE 染色・マッソン・トリクローム染色による組織の状態を確認した。その結果、コントロールマウスと比較して、ノックアウトマウスにおいて、膵臓 β 細胞の大きさに差が認められた。
- (4) 膵臓 β 細胞において、シノビオリンと結合する因子を探索するため、GST-pull down 実験を行った結果、様々な結合因子が得られ、インスリン分泌に関わる因子も得られた。同因子とシノビオリンとの結合を *in vitro*、および、細胞内において検証した結果、シノビオリンと同因子の結合が認められた。
- (5) シノビオリンはタンパク質分解に関わるユビキチン化酵素である。そこで、シノビオリンが同因子をユビキチン化できるかどうか検証した結果、*in vitro*、および、細胞内においてユビキチン化することを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujita Hidetoshi, Aratani Satoko, Yagishita Naoko, Nishioka Kusuki, Nakajima Toshihiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Identification of the inhibitory activity of walnut extract on the E3 ligase Synv1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 5701-5708
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2018.9576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Yusuke, Fujita Hidetoshi, Aratani Satoko, Chijiwa Miyuki, Taniguchi Noboru, Yokota Maho, Ogiwara Yukihiko, Uoshima Naomi, Nagashima Fumiaki, Uchino Hiroyuki, Nakajima Toshihiro	4. 巻 18
2. 論文標題 The NRF2?PGC?1 pathway activates kynurenine aminotransferase 4 via attenuation of an E3 ubiquitin ligase, synoviolin, in a cecal ligation/perforation?induced septic mouse model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 2467-2475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2018.9175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Hidetoshi, Aratani Satoko, Mizoguchi Izuru, Yagishita Naoko, Nakajima Toshihiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Enhanced expression of synoviolin in peripheral blood from obese/overweight donors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2020.9249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Hidetoshi, Aratani Satoko, Nakajima Toshihiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Grap2 cyclin D interacting protein negatively regulates CREB?binding protein, inhibiting fibroblast?like synoviocyte growth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2021.11916	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田 英俊、石田 裕介、荒谷 聡子、横田 真穂、内野 博之、中島 利博
2. 発表標題 脳内炎症に関わるキヌレニンの代謝機構の解明
3. 学会等名 日本線維筋痛症学会第 10 回学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ウォルフラム症候群の治療剤	発明者 中島、藤田、黒田、 金蔵、平本、熊谷、 青野	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許・特願2019- 61768	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------