

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08517

研究課題名（和文）Wolfram症候群によって細胞死を引き起こすターゲットの同定と治療法の確立

研究課題名（英文）Identification and treatment of targets that cause beta cell death by Wolfram Syndrome

研究代表者

田口 昭彦 (Taguchi, Akihiko)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20634744

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：Wolfram症候群（WFS）は厚生労働省指定難病疾患に指定され、若年発症インスリン依存性の糖尿病と視神経萎縮を特徴とする非常に稀な疾患であり、未だに確立された治療法はない。我々の施設ではその原因遺伝子（WFS1）を世界に先駆けて同定し、その後、国内外でWolfram症候群の研究が展開されているが、治療に結びつく根本的なメカニズムの解明には至っていない。今回我々は、WFSがインスリン分泌低下をきたすメカニズムとして、ATP2A2に着目した。ATP2A2の活性化薬を用いると、インスリン分泌低下マウスにおいて、インスリン分泌促進作用を認めることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までWFSは根本的な治療法のない、難病である。WFSは細胞に小胞体ストレスという負荷がかかることで細胞死に至ると言われている。

今回同定したATP2A2活性化薬は、他施設では小胞体ストレスを改善する作用も報告されており、ATP2A2活性化薬はWFSのインスリン分泌作用のみならず、WFSの他の症状である視神経萎縮、難聴、精神障害などにも効果を発揮する可能性が期待できる。

WFS1遺伝子の変異・多型は、一般的な2型糖尿病でも検出されるものであり、WFSの治療が可能になれば、2型糖尿病への新たな治療法にもなりうる研究となった。

研究成果の概要（英文）：Wolfram syndrome (WFS) is a very rare disease characterized by juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus and optic atrophy, and there is still no established treatment. Our group was first to identify the causative gene (WFS1). Since then, research on WFS has been conducted both in Japan and overseas, but the fundamental mechanism leading to a cure has yet to be elucidated. In this study, we focused on ATP2A2 as the mechanism by which WFS causes decreased insulin secretion, and found that ATP2A2 activators had an insulin-promoting effect in mice with decreased insulin secretion.

研究分野：代謝学、免疫学

キーワード：小胞体ストレス Wolfram症候群 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

Wolfram 症候群 (WFS) は厚生労働省指定難病疾患に指定され、若年発症インスリン依存性の糖尿病と視神経萎縮を特徴とする非常に稀な疾患であり、未だに確立された治療法はない。我々の施設ではその原因遺伝子(WFS1)を世界に先駆けて同定し(*Nature Genetics*, 1998)、その後、国内外で Wolfram 症候群の研究が展開されているが、治療に結びつく根本的なメカニズムの解明には至っていない。Wolfram 症候群は小胞体(ER)ストレスを惹起することが知られているが、最近研究代表者が行った研究で、Wolfram 症候群をはじめとする ER ストレス下でのインスリン分泌不全には出力系時計遺伝子 E4BP4 を介した経路があることを証明した(*EBioMedicine*, 2017 研究代表者 Co-first author)。時計遺伝子とは生物が地球の環境サイクルに適応するための概日リズムを生み出す遺伝子群を指すが、概日リズムと代謝には密接な関係があり、「概日リズムと代謝」の関係の破綻が、肥満や糖尿病の要因になりうるということがわかっている。最近では、グルコース応答性のインスリン分泌が膵臓自体の持つ末梢の概日リズムによって調節されていることが報告され(*Nature*, 2010)、時計遺伝子の生み出すリズムが、インスリン分泌に関わる遺伝子発現をダイナミックに調節することが分かった(*Science*, 2014, 研究代表者 Co-author)。さらに筋肉においては時計遺伝子群がミトコンドリア機能を調節していることも明らかとなった(*Cell Metabolism*, 2017 Co-author)。しかしながら時計遺伝子群がどのように代謝調節因子を調節するかについては未だ不明な点が多い。そこで研究代表者は時計遺伝子の下流に存在する代謝調節因子を同定すべく、E4BP4 強発現マウスの膵ラ氏島の網羅的なトランスクリプトーム解析や、細胞での E4BP4 の ChIP シーケンスを行い、E4BP4 によって直接制御を受け、かつ顕著に発現低下をきたす遺伝子として小胞体膜に存在する ATP 依存性 Ca チャネル(*Atp2a2*)に着目した(注: E4BP4 は転写抑制因子であり、ターゲットとなる遺伝子の発現は抑制される)。ATP2A2 は ATP を利用して Ca を細胞質内から小胞内へと送り込む働きを持っている。細胞ではインスリン分泌、細胞内の ATP や Ca の恒常性維持に担っている遺伝子と考えられている(BBRC, 1999)。さらに研究代表者は *Wfs1*<sup>-/-</sup>マウスや E4BP4 強発現マウスに共通した表現型として、膵細胞において ATP や Ca ホメオスタシスが障害されていることを突き止めている。最近、ATP2A2 を選択的に活性化する低分子化合物(アロステリックアクチベーター: CDN1644)が開発されたため、今回この化合物を用いて *Wfs1*<sup>-/-</sup>マウスや E4BP4 強発現マウスの膵細胞機能不全を改善できることを証明する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は Wolfram 症候群によって膵細胞機能不全をもたらす中心的なターゲットを同定し、難病である Wolfram 症候群の治療に役立てることである。本研究では研究代表者が報告したこれまでの知見に加え、E4BP4 強発現マウスの膵ラ氏島の網羅的なトランスクリプトーム解析(未発表)や、細胞での E4BP4 の ChIP シーケンスの解析結果(未発表)から、Wolfram 症候群や概日リズムの異常に基づく細胞不全には、ATP2A2 が介在していると仮説立てた。今回この仮説を証明する。

## 3. 研究の方法

### (1)インスリン分泌試験

E4BP4 強発現マウスおよび *Wfs1*<sup>-/-</sup>マウスから膵ラ氏島を単離し、CDN1644 ± でインスリン分泌試験を行う。

### (2)ATP/ADP 比測定

E4BP4 強発現マウスおよび *Wfs1*<sup>-/-</sup>マウスから膵ラ氏島を単離し、CDN1644 ± で、グルコース刺激

後の ATP 濃度を測定する。

(3)Ca 測定(Fura-2, 小胞体 Ca)

これまでの検討で E4BP4 強発現マウスおよび *Wfs1*<sup>-/-</sup>マウスの膵ラ氏島において、グルコース刺激後の細胞内カルシウム濃度の上昇が障害されていることを報告している。これらのマウスの膵ラ氏島において、グルコース刺激後の ATP/ADP 比の上昇が障害されていることから、脱分極が十分に行われていない、もしくは、*Atp2a2* の発現低下によって、小胞体内のカルシウム貯蔵量の低下をきたしている可能性が高い。そこで細胞内カルシウム濃度測定には Fura-2、小胞体内カルシウム濃度の評価には、小胞体内に存在するカルシウム濃度を評価できる Genetically encoded Ca indicator(CEPIAer)を用いた。

#### 4 . 研究成果

E4BP4 強発現マウスや *Wfs1*<sup>-/-</sup>マウスの膵ラ氏島のインスリン分泌不全に対する CDN1644 の効果を確認した。

仮説通り E4BP4 強発現マウスにおいては、CDN1644 によってインスリン分泌は改善したが、*Wfs1*<sup>-/-</sup>マウスの膵ラ氏島では明らかな分泌促進効果は確認できなかった。理由としては、今回用いた *Wfs1*<sup>-/-</sup>マウスでは、すでに 細胞がアポトーシスをきたし、潜在的な 細胞量が減少していることで、CDN1644 の効果を発揮出来なかったと考えられた。

CDN1644 は小胞体ストレスを軽減させる効果も報告されており、現在、週齢の若い段階からの CDN1644 の投与を行い、少数例ではあるが、*Wfs1*<sup>-/-</sup>マウスにおいてもインスリン分泌の改善効果を示すデータが得られつつある。今後、E4BP4 強発現マウスおよび *Wfs1*<sup>-/-</sup>マウスの膵 細胞における CDN1644 の効果・メカニズムの解明を進めていく予定である。

## 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 4件）

1. 著者名 Matsumura T, Ohta Y, Taguchi A, Hiroshige S, Kajimura Y, Fukuda N, Yamamoto K, Nakabayashi H, Fujimoto R, Yanai A, Shinoda K, Watanabe K, Mizukami Y, Kanki K, Shiota G, Tanizawa Y.	4. 巻 534
2. 論文標題 Liver-specific dysregulation of clock-controlled output signal impairs energy metabolism in liver and muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun .	6. 最初と最後の頁 415-421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.066.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Suetomi R, Ohta Y, Akiyama M, Matsumura T, Taguchi A, Yamamoto K, Kamatani T, Tanizawa Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Adrenomedullin has a cytoprotective role against endoplasmic reticulum stress for pancreatic -cells in autocrine and paracrine manners	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig .	6. 最初と最後の頁 823-833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13218.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Suetomi Risa, Ohta Yasuharu, Akiyama Masaru, Matsumura Takuro, Taguchi Akihiko, Yamamoto Kaoru, Kamatani Takashi, Tanizawa Yukio	4. 巻 -
2. 論文標題 Adrenomedullin has a cytoprotective role against endoplasmic reticulum stress for pancreatic cells in autocrine and paracrine manners	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	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) 10.1111/jdi.13218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akihiko Taguchi Yasuharu Ohta Yukio Tanizawa	4. 巻 9
2. 論文標題 Molecular clock as a regulator of cell function	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of diabetes investigation	6. 最初と最後の頁 453-456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.12835	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田口 昭彦
2. 発表標題 小胞体ストレス下における膵 細胞での時計遺伝子E4BP4, DBPの役割
3. 学会等名 第62回 糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口 昭彦
2. 発表標題 時計遺伝子E4BP4/DBPの 膵 細胞における役割の解明
3. 学会等名 日本糖尿病学会中国四国地方会第56回総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口 昭彦
2. 発表標題 Circadian Dysregulationによる肝インスリン抵抗性と肝脂質代謝異常
3. 学会等名 第33回 日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口 昭彦
2. 発表標題 時計遺伝子E4BP4を介する肝臓での エネルギー代謝調節機構の解明
3. 学会等名 第68回日本体質医学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------