

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

糖尿病発症遺伝子WFS1の機能解明と新規治療法の開発

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡 芳知

平成17（2005）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

糖尿病発症遺伝子WFS1の機能解明と新規治療法の開発に関する研究	-----	1
岡 芳知		

II. 分担研究報告

1. WFS1の機能解明(膵 β 細胞維持再生機構)に関する研究	-----	5
片桐 秀樹		
2. 遺伝子解析・モデル動物解析に関する研究	-----	8
谷澤 幸生		
3. WFS1の機能解析(関連遺伝子クローニング)に関する研究	-----	11
浅野 知一郎		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	13
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	15
-----------------	-------	----

糖尿病発症遺伝子WFS1の機能解明と新規治療法の開発に関する研究

主任研究者 岡 芳知 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

なぜ糖尿病は増加しているのか。現代の飽食・肥満・運動不足は膵β細胞にインスリン分泌の増加を強要する。このような膵β細胞負荷状況下において、膵β細胞の維持・生存機構が遺伝的に脆弱な者が糖尿病を発症するのではないかと考え、糖尿病発症遺伝子WFS1は膵β細胞ストレス状況下での維持機構に関わることから、最近の糖尿病増加を解く鍵と考え、その機能解明を進めた。

我々が作製に成功したWFS1ノックアウトマウスは膵β細胞の進行性減少により糖尿病を発症するが、このWFS1蛋白欠損膵島では、小胞体(ER)ストレス誘導刺激に対し、DNA断片化が亢進し、アポトーシスを惹起しやすいことを明らかにした。さらに、正常膵島とWFS1蛋白欠損膵島間の遺伝子発現の差をDNA microarrayを用いて網羅的に解析を進めたところ、小胞体ストレスセンサーの活性化、小胞体ストレス応答における翻訳抑制経路の作動と転写誘導、折りたたみ異常蛋白を除去するための経路の作動、さらに、これらの小胞体ストレス応答に伴いアポトーシスを直接誘導する遺伝子発現の増加を認め、WFS1蛋白欠損膵島では、通常状態でもすでにER誘導性アポトーシスを惹起する方向にあることが明らかとなった。この膵β細胞に負荷をかけるとアポトーシスがさらに促進されることも明らかにした。すなわち、軽度の肥満と耐糖能異常を示すA^yマウスに交配すると、6週齢ですでに約半数の個体が明らかな高血糖を呈し、膵島ではβ細胞の選択的消失が認められた。このように、WFS1蛋白を欠損する膵β細胞では軽度のインスリン需要の増大に対して代償機能を働かせることができない。なお、膵β細胞への負荷を減少させる対策のひとつとして、個体でのインスリン抵抗性の改善が挙げられる。このインスリンシグナルについても研究を進め、肥満糖尿病マウスで肝でのエネルギー消費を亢進させることにより、脂肪肝の改善のみならず、全身の種々の臓器・組織で糖尿病改善につながる効果が発揮され、膵β細胞保護につながることを示した。さらに、欠乏した膵β細胞の補充として肝に着目し、活性型PDX1の遺伝子導入を行ったところ、効率的に肝においてインスリンが産生され、インスリン欠乏モデルマウスの血糖値を正常化させることに成功した。

分担研究者

片桐秀樹

東北大学・大学院医学系研究科・教授

谷澤 幸生

山口大学・大学院医学研究科・教授

浅野 知一郎

東京大学・大学院医学研究科・助教授

膵β細胞維持・再生の観点から解析を進める。また、WFS1機能に関連する遺伝子の同定とその機能の解明から新たな治療法開発を目指すことである。これにより、肥満すれば糖尿病を発症する可能性が高い予備軍を拾い上げられ、効率よい予防施策に反映でき、さらには、膵β細胞保護(維持・再生)という、新しいコンセプトの糖尿病治療法の開発につながる。

A. 研究目的

なぜ糖尿病は増加しているのか。たしかに、近年のライフスタイルの変化が糖尿病の増加を来していることに疑いはない。しかし、環境と遺伝とに分けてその成因を考えるのではなく、現代のインスリン分泌を強要する環境下で初めて問題となる遺伝的脆弱さに着目することが、最近の糖尿病増加を解く鍵と考え、本研究を進めている。キーワードは、ウォルフラム症候群原因遺伝子WFS1の機能、小胞体ストレス、肥満などの「負担」を契機に緩徐に進む膵β細胞脱落である。

本研究の目的はまず、糖尿病におけるWFS1とその関連遺伝子の関与を解明することである。特に、飽食の時代の

B. 研究方法

- 1) WFS1ノックアウトマウスを用いたWFS1蛋白機能解析
WFS1ノックアウトマウスの糖尿病発症の経過、膵組織所見、さらに膵島を用いて、WFS1機能を解析する。また、膵島、培養細胞に小胞体ストレスを負荷し、WFS1を含めた小胞体ストレス反応を解析する。
- 2) インスリン分泌強要下での糖尿病発症とWFS1機能
WFS1ノックアウトマウスをインスリン分泌強要下におくために、軽度の肥満と耐糖能異常を示すA^yマウスと交配し、糖尿病発症ならびに膵島変化を検討する。
- 3) 膵β細胞への負荷を減少させる対策のひとつとしてのエネルギー消費亢進

高脂肪職負荷により、肥満・糖尿病を発症させたマウスの肝臓に、アデノウィルスを用いて、ミトコンドリアでのATP産生を抑制し基礎代謝を亢進させる働きがあるUCP1遺伝子を後天的に発現させ、エネルギー消費亢進による全身の代謝への影響、特に、膵β細胞からのインスリン分泌に与える効果を検討する。

4) 膵ラ島におけるDNA microarrayを用いての検討
ノックアウトマウスと野生型マウスから膵ラ島を単離し、DNA microarrayを用いて発現に違いがある遺伝子を網羅的に見出す。糖尿病を発症してからでは代謝状態により発現が変化した遺伝子も検出してしまうため、糖尿病発症以前でしかも膵β細胞の減少が始まる前の若齢マウスの膵ラ島を用いる。また、単離膵ラ島にERストレスを負荷し、KOマウスと野生型マウス膵ラ島の間で発現変化に違いがみられる遺伝子をDNA microarrayで検出する。

5) 患者遺伝子解析のための候補遺伝子とそのSNP同定
WFS1が関与するシグナル伝達機構を明らかにするなかで、特にDNA microarrayで差異が検出される遺伝子群に着目して検討を進める。糖尿病では、種々の候補遺伝子が検討されてきたが、小胞体ストレス下での膵β細胞の維持・再生という切り口で検討されたことはない。

倫理面への配慮

本研究の中のヒト遺伝子解析研究は、3省庁合同指針「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して計画、実施され、東北大学医学部倫理委員会にて承認されている(承認番号2003-265 審査結果通知書添付)。すなわち、人権擁護に十分な配慮がなされており、DNA検体はインフォームド Consentのもとに取得され、非連結匿名化されている。WFS1ノックアウトマウス作製ならびにWFS1機能解析のための組替えDNA実験は東北大学倫理委員会にて承認されている。また、マウス動物実験については、麻酔薬を用いるなど疼痛除去に充分配慮している。

C. 研究結果

WFS1は膵β細胞の小胞体ストレス反応と関わり、小胞体ストレスから防御している

WFS1ノックアウトマウスは外見上の異常はなく、正常対照マウスと同様に成長した。10-16週齢より随時血糖の上昇を認め、その後もさらに上昇した(24週齢:対照 146 ± 34 mg/dl, ヘテロ 158 ± 29 , ホモ 267 ± 33)。また、膵インスリン含有量の著明な低下を認め、抗インスリン抗体を用いた膵の免疫染色では、β細胞の進行性の脱落が明らかとなった。このように、WFS1欠損マウスは膵β細胞の脱落により糖尿病を発症し、これはウオルフラム症候群と同様であった。

小胞体からのカルシウム放出を介してインスリン分泌を惹起するカルバコールおよびグルコースでWFS1欠損膵島を刺激した場合には、インスリン分泌は約30%低下していた。また細胞質のカルシウム濃度変化を単離β細胞で測定すると、どちらの刺激に対してもWFS1欠損β細胞において30-40%の低下を認めた。一方、WFS1蛋白を過剰発現させた

膵島では、インスリン分泌が両刺激に対し35-50%増加した。またHeLa細胞にWFS1を発現させ検討すると、WFS1発現HeLa細胞では、小胞体からカルシウムを放出させる小胞体カルシウムポンプ阻害剤タプシガルギンによるカルシウムの上昇が30-40%増加していた。これらの結果は、小胞体膜においてWFS1蛋白が細胞内カルシウムの調節に関わっている可能性を示唆する。

WFS1欠損膵島では、小胞体ストレスを惹起するツニカマイシンおよびタプシガルギン刺激に対しアポトーシスの指標であるDNAの断片化が増加していたが、一方、小胞体ストレス経路とは異なる経路でアポトーシスを誘導するTNF α とIFN γ によるDNA断片化には差を認めなかった。すなわち、WFS1は小胞体ストレスによるアポトーシスの経路に関わると考えられる。

また、タプシガルギンやツニカマイシン等の小胞体ストレスを誘導する薬剤処理をすることにより、ヒト線維芽細胞での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た。さらに、リポーター遺伝子を用いた解析から、WFS1の転写が亢進していることも示した。以上のデータから、WFS1が小胞体ストレスからの防御機能を果たしているとは結論される。

膵β細胞への負荷を減少させる方策として、肝のエネルギー消費亢進は有望な治療法である

食事性肥満・糖尿病モデルマウスの肝へのUCP1遺伝子導入により、基礎代謝は約13%亢進し、その結果、高カロリー食を継続しているにもかかわらず、体重の減少、血糖値の改善を示した。脂肪肝は改善し、脂肪組織や筋肉組織でのインスリン感受性の改善がもたらされた。また、視床下部におけるレプチン抵抗性が改善した。さらに興味深いことに、血中インスリン濃度は著明に低下を示しており、膵β細胞のさらなる肥大化や脱落を抑制した。このことは、摂取カロリーや基礎代謝量は、膵β細胞の再生や増殖、さらにはその維持機構に影響を与えることが示された。

WFS1ノックアウトマウスにインスリン分泌を強要すると糖尿病発症は早まり重症化する

yellow agouti mouse (A^yマウス)はC57BL/6Jを遺伝的背景とするが、agouti related peptideの視床下部での異所性発現により食欲の亢進をきたし、軽度の肥満と耐糖能異常を示す。このマウスでは軽度の高インスリン血症と糖負荷後の高血糖が見られるが、耐糖能障害の程度は軽い。膵の組織学的検索ではラ氏島数の増加と肥大が見られた。このマウスを[B6]WFS1^{-/-}マウスと交配することにより作出した[B6]WFS1^{-/-}・A^yマウスは、20週齢未満でA^yマウスと同様の軽度の肥満が認められる。このマウスでは、[B6]WFS1^{-/-}マウスやA^yマウスと比べて顕著な耐糖能異常を示し、6週齢ですでに約半数の個体で明らかな高血糖が認められた。20週以降には著しいインスリン分泌低下を来し、ケトアシドーシスのために体重減少が見られるようになる。膵の組織学的検索ではラ氏島での

β 細胞の選択的消失が認められた。

WFS1が欠損すると、翻訳抑制、転写誘導、小胞体関連分解の3つの小胞体ストレス応答経路が増強する

WFS1蛋白欠損膵島では、ERストレス誘導刺激に対し、DNA断片化が亢進し、アポトーシスを惹起しやすいことが明らかとなった。その原因を探るため、正常膵島とWFS1蛋白欠損膵島の間の遺伝子発現の差をDNA microarrayを用いた網羅的解析を行い、さらにRT-PCR, Western blotにより確認した。その結果、小胞体ストレスセンサーの一つであるPERK (PKR-like ER kinase)のリン酸化の亢進およびATF4 (activating Transcription Factor 4)の発現増強が認められ、小胞体ストレス応答における翻訳抑制経路が作動していることが明らかとなった。さらに、小胞体ストレス応答における転写誘導機構において重要な役割を担うXBP-1(X binding protein 1)のmRNA splicingによる活性化も認められた。また、折りたたみ異常蛋白を除去するために重要なEDEEM (ER-associated degradation enhancing mannosidase-like protein) および ubiquitin-ligase であるHRD-1の発現増強も認められた。これらの小胞体ストレス応答に伴いアポトーシスを直接誘導するCHOP(C/EBP homologue protein)の発現もWFS1蛋白欠損膵島では増加し、WFS1蛋白欠損膵島では、通常状態からER誘導性アポトーシスを惹起する方向にあることが明らかとなった。

解析する候補遺伝子:小胞体ストレス反応からの群分け

A) シャペロン分子誘導関連

A-1) GRP78, GRP94, ORP150

A-2)シャペロン誘導センサー/トランスデューサー

i) IRE1 α , β \rightarrow XBP1 \rightarrow シャペロン転写誘導

ii) IRE1 α , β \rightarrow TRAF2 \rightarrow Ask1 \rightarrow JNK \rightarrow apoptosis

B) unfolded proteinの蓄積 \rightarrow PERKが感知 \rightarrow eIF2 α \rightarrow 翻訳停止

(PERKはまたATF4を介してシャペロン転写に関与)

C) apoptosis関連 CHOP

D) ERAD (ER associated degradation) 関連 EDEM, HRD1

D. 考察

WFS1ノックアウトマウス膵島を用いたWFS1蛋白機能の解析、ならびにインスリン分泌強要下の糖尿病発症からは、WFS1が膵 β 細胞を小胞体ストレスからの防御、すなわち、小胞体ストレスによるアポトーシス、ならびにインスリン遺伝子の翻訳抑制から防御する役割を果たしていると考えられる。また、肝でのエネルギー消費亢進は、高カロリー食を継続した状態であっても、膵 β 細胞の負荷を減少させる効果をもつことを示している。WFS1が欠損した膵島では、XBP1の増加に示される転写誘導系、eIF2 α に示される翻訳抑制系および、EDEEMやHRD1の増加に示される小胞体関連分解系の3つの小胞体ストレス応答経路のいずれもが増強していることから、小胞体ストレス反応の根幹(ないしその近傍)に位置

すると推測される。

E. 結論

WFS1は膵 β 細胞を小胞体ストレスから防御する役割を果たしており、その根幹(ないしその近傍)に位置している。したがって、WFS1の機能解明は膵 β 細胞維持という新たなコンセプトの創薬につながる点できわめて重要であり、また、WFS1関わる遺伝子(群)は膵 β 細胞を守るという観点からの有力な糖尿病候補遺伝子と思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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 beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet*. 13:1159-1170, 2004
- Suzuki S, Zong Wenyi, Hirai M, Hinokio Y, Suzuki C, Yamada T, Yoshizumi S, Suzuki M, Tanizawa Y, Matsunami A, **Oka Y**. Genetic variations at urotensin II and urotensin II receptor genes and risk of type 2 diabetes mellitus in Japanese. *Peptides* 25: 1803-1808, 2004
- Takahashi K, Satoh J, Kojima Y, Negoro K, Hirai M, Hinokio Y, Kinouchi Y, Suzuki S, Matsuura N, Shimosegawa T, **Oka Y**. Promoter polymorphism of SLC11A1 (formerly NRAMP1) confers susceptibility to autoimmune type 1 diabetes mellitus in Japanese. *Tissue Antigens* 63: 231-236, 2004
- Anno T, Uehara S, Katagiri H, Ohta Y, Ueda K, Mizuguchi H, Moriyama Y, **Oka Y**, Tanizawa Y. Overexpression of constitutively activated glutamate dehydrogenase induces insulin secretion through enhanced glutamate oxidation. *Am J Physiol*. 286: E280-E285, 2004
- Inukai K, Shewan AM, Pascoe WS, Katayama S, James DE, **Oka Y**. Carboxy terminus of glucose transporter GLUT3 contains an apical membrane targeting domain. *Mol Endocrinol* 18:339-349, 2004
- Yamaguchi S, Ishihara H, Tamura A, Yamada T, Takahashi R, Takei D, Katagiri H, and **Oka Y**. Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 250-256, 2004
- Ishigaki Y, Katagiri H, Yamada T, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Gao Junhong, Ishihara H, Shimosegawa T, Sakoda H, Asano T, and **Oka Y**. Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity. *Diabetes* 54: 322-332,

2005

- Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Uno K, Hasegawa Y, Ishihara H, Sasano H, Mizuguchi H, Asano T and Oka Y. Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver. *Biochem Biophys Res Commun* 326:402-9, 2005
- Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, Yamada T, Yoshizumi S, Suzuki C, Satoh J, Oka Y. *WRN* Gene 1367 Arg Allele Protects Against Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* in press

2. 学会発表

第47回日本糖尿病学会年次学術集会, 2004年5月13-15日、東京

- 糖尿病をきたすウオルフラム症候群原因遺伝子産物 WFS1蛋白の機能
石原寿光、田村明、高橋累、山田高弘、山口賢、武井大祐、岡芳知
- 骨髄細胞による部分膵切除後のβ細胞再生の可能性
長谷川豊、片桐秀樹、荻原健英、石垣泰、山田哲也、今井淳太、宇野健司、高俊弘、檜尾好徳、鈴木進、佐藤譲、岡芳知
- 肝へのUCP1遺伝子導入による肥満・糖尿病治療の試み
石垣泰、片桐秀樹、山田哲也、高俊弘、長谷川豊、宇野健司、今井淳太、檜尾好徳、荻原健英、鈴木進、佐藤譲、岡芳知
- 内臓脂肪をターゲットにしたUCP1遺伝子導入による肥満2型糖尿病治療の試み
山田哲也、片桐秀樹、石垣泰、荻原健英、今井淳太、宇野健司、長谷川豊、高俊弘、檜尾好徳、鈴木進、佐藤譲、

岡芳知

- 肝へのPPAR γ 遺伝子導入による耐糖能改善とその機構
宇野健司、片桐秀樹、山田哲也、荻原健英、石垣泰、今井淳太、長谷川豊、高俊弘、檜尾好徳、鈴木進、佐藤譲、岡芳知
- NODマウス骨髄由来樹状細胞のinterleukin 6 低産生性とその意義
高橋和眞、佐藤譲、吉田あゆ美、平井完史、石原寿光、檜尾好徳、鈴木進、片桐秀樹、岡芳知
- WFS1欠損マウスの解析:系統差とアポトーシスの亢進
田村明、石原寿光、高橋累、山口賢、山田高弘、武井大祐、檜尾好徳、鈴木進、荻原健英、片桐秀樹、佐藤譲、岡芳知
- ガングリオシド糖鎖異常とインスリン抵抗性
檜尾好徳、鈴木進、平井完史、鈴木千登世、善積信介、山田高弘、石原寿光、高橋和眞、佐藤譲、荻原健英、片桐秀樹、佐々木明德、秦敬子、宮城妙子、岡芳知
- 2型糖尿病における甘み受容体遺伝子TAS1R2遺伝子多型の関連
平井完史、鈴木進、檜尾好徳、山田高弘、善積信介、石原寿光、高橋和眞、鈴木千登世、荻原健英、片桐秀樹、佐藤譲、岡芳知

H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

WFS1の機能解明（膵β細胞維持再生機構）に関する研究
分担研究者 片桐 秀樹 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

Wolfram症候群の原因遺伝子WFS1の変異による糖尿病発症メカニズムの解明として、小胞体ストレスによる膵β細胞の維持機構の障害が想定されている。また、肥満の状態は、膵β細胞にとって、負荷の増大をともなった強いストレスであることが知られている。我々は、膵β細胞の維持・再生機構の解明と新規治療法の開発とを目指し、まず、高脂肪食を負荷することで肥満・糖尿病を惹起させたマウスの肝臓に、エネルギー消費亢進を目的として脱共役蛋白UCP1を遺伝子導入した。その結果、肝はもちろん、全身の組織で治療効果が認められ、肥満・糖尿病は改善し、さらに、膵β細胞においてもインスリン過分泌の状況も改善された。つまり、高カロリー食の摂取は、膵β細胞の維持・再生機構にも影響を与え、基礎代謝亢進は、膵β細胞の負荷を減少させることが示唆された。次に、カロリーを同様にしても、栄養素の成分の違いにより、小胞体ストレスを介した膵β細胞の維持機構が影響されるか検討するため、WFS1欠損マウスに様々な成分の高カロリー餌を負荷したところ、WFS1欠損マウスの糖尿病発症を促進あるいは抑制する成分があることが示された。このことから、食事成分により膵β細胞の小胞体ストレスは増悪あるいは軽減し、特定の成分は膵β細胞の保護・維持・再生につながることを意味する。これらは、食事・生活習慣の欧米化により急増している日本人の糖尿病患者の多くに認められる膵β細胞の減少・脱落の機序の根本に迫るものであり、また、エネルギー消費や経口摂取でその制御が可能であることを示唆するものである。さらに、我々は、骨髄移植の手技を用いることで、インスリン欠乏糖尿病モデルマウスの膵β細胞の再生が誘導されることを観察しており、今後は、これらの詳細な機序を解明し、様々な手法を組み合わせ、より簡便により効果的に、膵β細胞の維持・再生機構に基づいた全く新しい視点からの治療法開発につなげていきたい。

A. 研究目的

肥満に基づく膵β細胞負荷を軽減し、膵β細胞の維持・再生に関わる機構を解明する。さらに、モデル動物を用いた解析により、この維持・再生機構に及ぼすWFS1遺伝子や小胞体ストレスの意義を解明し、糖尿病に対する新規治療法や予防法の開発を目指す。

B. 研究方法

1. エネルギー亢進による肥満・糖尿病に対する治療とその機序の解明

高脂肪食負荷により、肥満・糖尿病を発症させたマウスの肝臓に、アデノウイルスを用いて、ミトコンドリアでのATP産生を抑制し基礎代謝を亢進させる働きがあるUCP1遺伝子を後天的に発現させ、エネルギー消費亢進による全身の代謝への影響、特に、膵β細胞からのインスリン分泌に与える効果を観察する。

2. WFS1^{-/-}マウスへの様々な食事負荷による糖尿病発症機序の検討

WFS1^{-/-}マウスに様々な種類の食事を負荷し、WFS1^{-/-}マウスの糖尿病発症に与える影響を観察する。

3. 骨髄移植によるインスリン欠乏型糖尿病に対する再生治療

ストレプトゾトシン投与によるインスリン欠乏モデルマウスに骨髄移植を行い、血糖値やインスリン分泌能、さら

に、膵β細胞の再生を検討する。

4. 倫理面への配慮

本年度の研究は細胞及び動物モデルを用いた解析に限られているため、倫理面への配慮が必要な事項に該当しない。動物実験は東北大学動物実験指針に基づいて実施し、東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

食事性肥満・糖尿病モデルマウスの肝へのUCP1遺伝子導入により、基礎代謝は約13%亢進し、その結果、高カロリー食を継続しているにもかかわらず、体重の減少、血糖値の改善を示した。脂肪肝は改善し、脂肪組織や筋肉組織でのインスリン感受性の改善もたらされた。また、視床下部におけるレプチン抵抗性が改善した。さらに興味深いことに、血中インスリン濃度は著明に低下を示しており、膵β細胞のさらなる肥大化や脱落を抑制した。このことは、摂取カロリーや基礎代謝量は、膵β細胞の再生や増殖、さらにはその維持機構に影響を与えることが示された。

そこで、次に我々は、栄養素の成分が小胞体ストレスを介して膵β細胞の維持機構にどのように影響するかを検討する目的で、カロリーを一定とし、成分を様々な調整した餌を作製し、そのWFS1^{-/-}マウスの糖尿病発症に与え

る影響を検討した。一般的には、*WFS1*^{-/-}マウスは、膵β細胞が小胞体ストレスに脆弱となっているため、生後約30週齢で膵β細胞の脱落が生じ、糖尿病を発症する。しかし、同じカロリーであっても、成分の違いによって、生後20週齢程度の早期から糖尿病を発症させる餌、また、生後40週齢以上の長期にわたり糖尿病発症を予防することができる餌を見出した。つまり、食事成分により、膵β細胞における小胞体ストレスに及ぼす影響は異なることが示唆された。

また、我々は、骨髄移植により、膵β細胞の再生が惹起されることを観察した。ストレプトゾトシン投与によるインスリン分泌不全のモデルマウスに対し、放射線照射の後、同系等のマウスから採取した骨髄を移植を行ったところ、膵におけるランゲルハンス島の増加・肥大化を伴うインスリン分泌細胞(β細胞)の再生が惹起され、ほぼ正常値にまで血糖値が改善した。主にレシピエント由来の細胞から膵β細胞は再生しており、再生膵ランゲルハンス島の周囲にドナー由来の血球系細胞が散見された。

D. 考察

1. 肝でのエネルギー消費亢進にて、脂肪肝の改善のみならず、全身の糖代謝や筋・脂肪組織・視床下部などの遺伝子を導入していない臓器(組織)にも、糖尿病改善につながる効果を与えることが示された。特に、膵β細胞の保護効果をもたらしたことから、エネルギー消費亢進が、食事性の負荷による膵β細胞での小胞体ストレスに対しても、保護的に働くことを示唆するものである。つまり、高カロリー食の摂取は、膵β細胞の維持・再生機構にも影響を与え、さらに、基礎代謝亢進による肥満の改善は、高カロリー食を継続した状態であっても、膵β細胞の負荷を減少させる効果をもつことを意味する。
2. さらに、同カロリーであっても、食事の成分により、膵β細胞への小胞体ストレスを与えるの程度に違いがあり、悪化させる成分・改善につながる成分が存在することが示された。糖尿病発症を抑える成分は、膵β細胞における小胞体ストレスを軽減させ膵β細胞を維持させる働きがあるものと考えられ、糖尿病に対する新規予防・治療薬剤になりうるものと思われる。現在、これについては、特許申請の準備中であり、さらに機序や効果の検討を重ね、薬剤の開発につなげたいと考えている。
3. 骨髄移植は、インスリン欠乏モデルにおいて、膵β細胞の再生を惹起させることが示された。再生膵β細胞はレシピエント由来であり、移植骨髄由来の細胞からのなんらかの因子が、組織幹細胞に働きかけ、膵β細胞へと分化・増殖させているものと考えられる。そこで、これらの機序を詳細に検討するとともに、同様の手技により *WFS1*^{-/-}マウスにおいても糖尿病が予防ないし治療できるかについて、検討を進めている。

E. 結論

日本人の糖尿病患者の多くに認められる食事・生活習

慣の欧米化から惹起された膵β細胞の減少・脱落の機序には、食事に基づく膵β細胞における小胞体ストレス増大の影響があることが示唆された。また、食事の成分調整により、小胞体ストレスによる膵β細胞の脱落に対し、制御ができる可能性が考えられる。膵β細胞の再生を惹起させる骨髄移植もあわせ、これらは、インスリン産生細胞の維持・再生につながる全く新しい視点からの治療法となりうる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Ishigaki, Y., Katagiri, H., Yamada, T., Ogihara, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Shimosegawa, T., Sakoda, H., Asano, T., Oka, Y. (2005) Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity. *Diabetes*. 54, 322-332
- Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Ogihara, T., Uno, K., Hasegawa, Y., Ishihara, H., Sasano, H., Mizuguchi, H., Asano, T., Oka, Y. (2005) Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 326, 402-9
- Ogihara, T., Asano, T., Katagiri, H., Sakoda, H., Anai, M., Shojima, N., Ono, H., Fujishiro, M., Kushiya, A., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Noguchi, N., Aburatani, H., Gotoh, Y., Komuro, I., Fujita, T. (2004) Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappaB pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetologia*. 47, 794-805.
- Ishihara, H., Takeda, S., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Yamada, T., Inoue, H., Soga, H., Katagiri, H., Tanizawa, Y., Oka, Y. (2004) Disruption of the *WFS1* gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum. Mol. Genet*. 13, 1159-70.
- Yamaguchi, S., Ishihara, H., Tamura, A., Yamada, T., Takahashi, R., Takei, D., Katagiri, H., Oka, Y. (2004) Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation regulate expression of *WFS1* protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 325, 250-6
- Anno, T., Uehara, S., Katagiri, H., Ohta, Y., Ueda, K., Mizuguchi, H., Moriyama, Y., Oka, Y., & Tanizawa, Y. (2004) Overexpression of Constitutively Activated Glutamate Dehydrogenase Induces Insulin Secretion through Enhanced Glutamate Oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 286, E280-5.

2. 学会発表

- 片桐秀樹、荻原健英、今井淳太、長谷川豊、山田哲也、岡芳知 シンポジウム9 糖尿病における再生医療の基礎と臨床 インスリン欠乏モデルマウスを用いた再生治療

の試み 第47回日本糖尿病学会年次学術総会 2004年
5月15日 東京

- 片桐秀樹 シンポジウム1 脂肪細胞、脂肪蓄積と糖代謝異常 UCP1遺伝子導入による肥満・糖尿病に対する治療の試み 第77回日本内分泌学会学術総会 2004年6月24日京都
- 片桐秀樹 レクチャー 糖尿病の成因と病態に関する研究の進歩 UCP1遺伝子導入による肥満・糖尿病に対する治療法開発の試み 第39回糖尿病学の進歩 2005年2月19日仙台
- Ishigaki Y., Katagiri H., Yamada T., Oka Y. Dissipating Excess Energy Stored in the Liver Is a Potential Treatment Strategy for Diabetes Associated with Obesity. American Diabetes Association, 64th Scientific Sessions (June 4-8 2004 Orlando, Florida, USA)
- Katagiri H., Yamada T., Ishigaki Y., Oka Y. Ectopic

UCP1 Expression in Epididymal Fat Tissue Improves Insulin and Leptin Resistance in Obese Diabetic Mice. American Diabetes Association, 64th Scientific Sessions (June 4-8 2004 Orlando, Florida, USA)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
準備中
2. 実用新案登録
なし
3. その他(研究に関する新聞記事等)
2005年2月27日、Reuters (Health Information)にて、上記内容の一部が報道された。(Uncoupling Protein-1 Reduces Fat, Improves Insulin Resistance.)

遺伝子解析・モデル動物解析に関する研究

分担研究者 谷澤 幸生 山口大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

Wolfram症候群の原因遺伝子WFS1の変異による糖尿病発症メカニズムの解明とそれに基づく新規糖尿病治療薬開発への最初のステップとして、小胞体ストレスによるWFS1の発現調節について解析した。ヒト線維芽細胞及び膵β細胞由来の腫瘍細胞であるMIN6細胞、さらには内因性の小胞体ストレスモデルと考えられるAkita mouse由来の*ins2^{96Y/Y}*膵島腫瘍細胞を用いた研究により、WFS1が小胞体ストレスに転写レベルで調節を受け、発現が亢進することを見いだした。このことはWFS1が小胞体ストレスに対する応答に関与する可能性を示唆する。WFS1^{-/-}マウスは、糖尿病発症がマウスの遺伝的背景に影響される。すなわち、[(129SvxB6) x B6] F2・WFS1^{-/-}マウスは20週齢以降、6割以上の個体で顕性の糖尿病を発症するが、C57BL/6Jのバックグラウンドを持つ([B6]WFS1^{-/-}マウス)では耐糖能異常は示すものの、少なくとも30週齢まで顕性の糖尿病を発症しない。今回、軽度の肥満と耐糖能異常を示すA^yマウスを[B6]WFS1^{-/-}マウスに交配することによって得た[B6]WFS1^{-/-}・A^yマウスは、6週齢ですでに約半数の個体が明らかな高血糖を呈し、20週以降には著しいインスリン分泌低下を来し、著しい高血糖、ケトアシドーシスを発症することを見いだした。この際、膵ラ氏島ではβ細胞の選択的消失が認められた。このことは、WFS1を欠損する膵β細胞では、軽度のインスリン需要の増大に対して代償機能を働かせることができないことを意味すると推測している。すなわち、小胞体ストレスに対して脆弱であることを示唆すると考えている。今後この点をさらに明らかにし、小胞体ストレスの観点からのβ細胞保護治療の開発につなげてゆきたい。

A. 研究目的

細胞およびモデル動物を用いた解析により WFS1 遺伝子の機能およびその異常による糖尿病の発症機構を解明することにより糖尿病の新規治療薬の開発を目指す。

本年度の研究は細胞及び動物モデルを用いた解析に限られているため、倫理面への配慮が必要な事項に該当しない。動物実験は山口大学医学部動物実験指針に基づいて実施した。

B. 研究方法

1. 培養細胞における解析

線維芽細胞、膵β細胞由来の MIN6 細胞および Akita mouse 由来の膵β細胞腫瘍細胞を thapsigargin や tunicamycin など小胞体ストレスを惹起する薬剤で処理し、WFS1 蛋白の発現の変化を検討する。また、ヒト WFS1 遺伝子プロモーター・ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして、WFS1 遺伝子の発現調節について検討を加える。

2. 動物モデルを用いた解析

WFS1^{-/-}マウスの表現型がマウスの遺伝的背景により影響を受けることを報告している。糖尿病発症に対して抵抗性であるC57BL/6Jを背景とするWFS1^{-/-}マウスを軽度の肥満とインスリン抵抗性を有するyellow agouti mouse (A^yマウス)と交配し、WFS1^{-/-}・A^yマウスを作出する。A^yマウスではインスリン抵抗性によるインスリン産生増加により、β細胞に小胞体ストレスを生じていると仮説している。この仮説を検証するとともに、WFS1^{-/-}・A^yマウスの血糖値、インスリン分泌能および膵ランゲルハンス氏島の形態的变化、各種分子発現の変化等について解析し、WFS1蛋白の機能や小胞体ストレスとの関連を解明する。

3. 倫理面への配慮

C. 研究結果

thapsigarginやtunicamycin等の小胞体ストレスを誘導する薬剤処理をすることにより、ヒト線維芽細胞での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た。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Akita mouseでの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*ins2^{96Y/Y}*膵島腫瘍細胞ではBipの高発現が認められ、小胞体ストレスの存在が示唆された。この細胞においてもWFS1の発現は対象とした細胞に比較して有意に増加していた。ヒトWFS1遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子の5'上流に配置し、リポーター遺伝子を作製した。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*ins2^{96Y/Y}*膵島腫瘍細胞および対照とした*ins2^{wild/wild}*細胞にリポフェクション法でそれぞれ導

入し、ルシフェラーゼ活性を測定すると、*ins2*遺伝子C96Yホモ変異株におけるルシフェラーゼ活性は野生株に比べて約2倍に増加していた。

C57BL/6J・*WFS1*⁺マウスはヒトでのWolfram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る。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し、[(129SvxB6) x B6] F2では20週齢以降、6割以上の個体で顕性の糖尿病の発症が見られたが、バッククロスを重ね、C57BL/6Jのバックグラウンドとなった個体([B6]*WFS1*⁺マウス)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。

yellow agouti mouse (*A*^yマウス)はC57BL/6Jを遺伝的背景とするが、agouti related peptideの視床下部での異所性発現により食欲の亢進をきたし、軽度の肥満と耐糖能異常を示す。このマウスでは軽度の高インスリン血症と糖負荷後の高血糖が見られるが、耐糖能障害の程度は軽い。膵の組織学的検索ではラ氏島数の増加と肥大が見られた。このマウスを[B6]*WFS1*⁺マウスと交配することにより作出した[B6]*WFS1*⁺・*A*^yマウスは、20週齢未満で*A*^yマウスと同様の軽度の肥満が認められる。このマウスでは、[B6]*WFS1*⁺マウスや*A*^yマウスと比べて顕著な耐糖能異常を示し、6週齢ですでに約半数の個体で明らかな高血糖が認められた。20週以降には著しいインスリン分泌低下を来し、ケトアシドーシスのために体重減少が見られるようになる。膵の組織学的検索ではラ氏島でのβ細胞の選択的消失が認められた。この時期でもラ氏島は明瞭に認識でき、α細胞数は明らかに増加している。δ細胞も残存していた。この表現型は顕性糖尿病を発症した[(129SvxB6) x B6] F2 *WFS1*⁺マウスでのそれと本質的に同一であるが、発症はより若く、より重症である。β細胞が選択的に消失する機序について、小胞体ストレス関連分子、アポトーシス関連分子の発現を中心に現在解析を進めている。

D. 考察

細胞モデルでの解析の結果から *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が示された。このことは、*WFS1* が小胞体ストレスに対する細胞応答と機能的に関連する可能性を示唆する。小胞体ストレスに対して防御的に働き、その機能は小胞体ストレスにより誘導されるアポトーシスを回避させるのかもしれない。

膵β細胞は、インスリン抵抗性によりインスリン需要が増大するとそれを代償するためにインスリン遺伝子の転写、翻訳を増大させ、さらにインスリン分泌を亢進させる。この状態ではβ細胞は小胞体ストレスにさらされていると予想されるが、現在の所このことを直接的に示す証拠は少ない。この点についての検討が必要である。現時点では、[B6]*WFS1*⁺・*A*^yマウスで見られた早期のインスリン分泌低下、β細胞の選択的消失は、*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ことに起因すると推測している。このことを直接的に示すエビデンスを示してゆきたい。*WFS1* の機能解明のための示唆を得ることができると期

待される。

小胞体ストレスによるβ細胞の障害(アポトーシスによる減少)は、一般の糖尿病患者で見られる糖毒性や、スルフォニル尿素薬2次無効の機序としても働いている可能性がある。[B6]*WFS1*⁺・*A*^yマウスをモデルとして糖尿病発症を抑制する薬剤(小胞体ストレスからβ細胞を保護する薬剤)のスクリーニングを行ってゆく予定である。

E. 結論

WFS1 蛋白の機能は小胞体ストレスに対する細胞応答と関連する可能性が示唆された。[B6]*WFS1*⁺・*A*^yマウスの結果からは、*WFS1* が欠損するβ細胞ではインスリン抵抗性による負荷の増大を代償することができず、(小胞体ストレスを介して)細胞死に至ると推察される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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 {beta}-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet.* 13:1159-1170, 2004.
- Katsuki K, Fujimoto M, Zhang XY, Izu H, Takaki E, Tanizawa Y, Inouye S, Nakai A. Feeding induces expression of heat shock proteins that reduce oxidative stress. *FEBS Lett.* 571:187-91, 2004.
- Suzuki S, Wenyi Z, Hirai M, Hinokio Y, Suzuki C, Yamada T, Yoshizumi S, Suzuki M, Tanizawa Y, Matsutani A, Oka Y. Genetic variations at urotensin II and urotensin II receptor genes and risk of type 2 diabetes mellitus in Japanese. *Peptides.* 25:1803-8. 2004
- Iwasaki N, Horikawa Y, Tsuchiya T, Kitamura Y, Nakamura T, Tanizawa Y, Oka Y, Hara K, Kadowaki T, Awata T, Honda M, Yamashita K, Oda N, Yu L, Yamada N, Ogata M, Kamatani N, Iwamoto Y, Del Bosque-Plata L, Hayes MG, Cox NJ, Bell GI. Genetic variants in the calpain-10 gene and the development of type 2 diabetes in the Japanese population. *J Hum Genet.* 50(2):92-98, 2005

2. 学会発表

- 植田浩平、秋山優、田部勝也、阿武孝敏、小泉昭夫、谷澤幸生 *WFS1*は小胞体ストレスにより転写レベルで調節される 第47回日本糖尿病学会年次学術集会(平成16年5月15日、東京)
- 秋山優、植田浩平、谷澤幸生 インスリン抵抗性と膵β細胞における小胞体ストレス —agouti mouseを用いた解析— 第77回 日本内分泌学会学術総会(平成16年6月24日、京都市)
- 秋山 優、植田浩平、宮崎睦子、田部勝也、谷澤幸生 *wfs1*欠損マウスではインスリン需要増大時に膵β細胞が

選択的に脱落する 日本糖尿病学会中国四国地方会第
42回総会(平成16年11月22日、広島市)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他(研究に関する新聞記事等)
なし

WFS1の機能解析（関連遺伝子クローニング）に関する研究
分担研究者 浅野 知一郎 東京大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨

WFS1遺伝子の変異によって膵β細胞は脆弱になるが、糖尿病の発症にはさらにインスリン抵抗性の関与が大きな役割を果たしている。我々は、RELMβとγに対する特異的抗体を作成し、血液中濃度を測定したところ、db/dbマウスや高脂肪食負荷マウスといったインスリン抵抗性のモデルマウスにおいて有意に上昇していることを見いだした。また、これらの動物では主要な発現臓器である腸管における発現量が増加しており、血中濃度の上昇の原因と考えられた。そこで、今回、RELMβとγ濃度のインスリン抵抗性への関与を明らかにするために、これらを過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、糖・脂質代謝やインスリンシグナルにどのような変化が生じるかを検討した。

その結果、RELMβトランスジェニックマウスでは、高脂肪食を付加すると、コントロールと比べ、有意な高血糖と共に、血中中性脂肪値の上昇と脂肪肝も呈することが明らかとなった。IPGTTによってインスリン抵抗性が示され、すい臓β細胞の過形成も認められた。さらに、インスリンを門脈から注入し、シグナル伝達を検討したところ、インスリン依存性のIRS-1/2のチロシリン酸化とPI3-キナーゼ活性化、さらにはAktの活性化が、コントロールと比較し、有意に低下していることが明らかとなった。以上のことより、消化管より分泌されるRELMβ/γの増加はインスリンのシグナル伝達を障害することで、インスリン抵抗性や高脂血症を引き起こすメカニズムの一つであり、WFS1遺伝子の変異による膵β細胞の壊死と共に糖尿病の原因としての重要性が示唆された。

A. 研究目的

糖尿病の発症には、インスリンの分泌不全と抵抗性の両者が関与している。インスリンの分泌不全をもたらす遺伝子異常としてはWFS1遺伝子の変異が重要であるが、一方、インスリン抵抗性にも多くの遺伝的背景と後天的要因が関与している。我々は、マウス消化管からの免疫沈降によって、レジスチンの関連蛋白であるresistin-like molecule (RELM) β/γがhetero/homodimerを形成して分泌されることを証明した。興味深いことに、高脂肪食付加モデルや肥満モデルの動物において、RELMβ/γの消化管における発現量はmRNAと蛋白いずれのレベルにおいても明らかに増加し、血中濃度も2倍程度に上昇することを見出した。そこで、我々は、RELMβを肝臓において過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、糖・脂質代謝における影響を解明し、ヒト糖尿病において診断的マーカーや治療ターゲット分子となる可能性を検討することにした。

B. 研究方法

RELMβとγ濃度のインスリン抵抗性への関与を明らかにするために、これらを肝臓において過剰発現するトランスジェニックマウスを作成した。コンストラクトとしては肝臓での特異的発現をもたらすSAPプロモーター下にRELMβの全長を接続し、これをC57/Bl6マウスに導入することでRELMβトランスジェニックマウスを作成した。RELMβとγに対する特異的抗体を作成し、血液中濃度を測定した。

生体におけるインスリンのシグナル伝達を検討するために、これらの動物を麻酔後、腹腔を開いた後、門脈よりインスリンを注入し、30秒後と90秒後に、肝臓と筋肉をそれぞれ分離し、ホモジェナイズした後、インスリンの各シグナル伝達分子（インスリン受容体、IRS-1、IRS-2、PI3-キナーゼ、Akt等）の定量やリン酸化、活性などについて検討した。

倫理面については、ヒト由来のサンプルを用いた研究はしていない。また、動物実験に関しては、東京大学の定める動物実験指針に基づき、当該施設の管理の下で行っており、本研究計画では、動物愛護上の問題は生じない。

C. 研究結果

RELMβを肝で過剰発現するトランスジェニックマウスは複数の系統を得たが、血液中RELMβ濃度の有意な上昇を認めた系統を選択し、RELMβ高発現系統及びRELMβ中等度発現系統を得た。得られたRELMβトランスジェニックマウスはコントロール群と比較して、通常食下では血糖、体重に差が無いが、生後6週令で体重の重い個体ほど血糖が高くなる傾向を認めた。さらに生後10週令から4週間、高脂肪食負荷を行ったところ、トランスジェニック群では空腹時血糖が上昇し、高インスリン血症を認め、肝臓内及び血中脂質のプロファイルでも中性脂肪の上昇を認めた。肝臓内グリコーゲン量、血中FFAに関しては差を認めなかった。糖負荷試験、インスリン負荷試験、ピルビン酸負荷試験を行ったところ、高発現群、中等度発現群においてすべての負荷試験で血糖上昇を認めた。脂質に関してはコレステロールが上昇し、中性脂肪が1.5倍程度上昇していた。これらすべての傾向はこの傾向は高発現系統ほど顕著であった。各臓器の染色像を検討すると、トランスジェニック群では脂肪肝及び膵島の過形成及び膵島の数の増加を認め、高インスリン血症と高中性脂肪血症を裏付けるものと考えられた。臓器重量としては脂肪重量がトランスジェニック群で増加していた。上記プロファイルを総括すると、RELMβトランスジェニックマウスでは、内臓肥満、高インスリン血症、血中脂質増加、高血糖といった代謝症候群を呈しているといえると考えられた。そこで次に、肝、筋でのインスリンシグナルを検討した。まず、インスリンシグナル伝達において要衝とも言える

PI3-kinaseの活性を検討した。肝臓及び筋肉から蛋白を抽出し、同量の蛋白に関して、我々の作成したIRS-1、IRS-2、及びリン酸化チロシンに対するそれぞれの特異的抗体で免疫沈降した後、PIに対するPI-³²Pの産生能でIRS-1,2、リン酸化チロシンそれぞれに結合しているPI3-kinaseの活性を検討したが、肝臓及び筋肉でインスリン刺激後のPI3-kinase活性はトランスジェニック群でコントロール群に比して40%程度の低下を認めた。その上流、下流でのインスリンシグナル伝達レベルを、IRS-1,2のウエスタンブロット及びIRS-1,2で免疫沈降後抗リン酸化チロシン抗体でのウエスタンブロット、Aktのウエスタンブロット及びAkt^{Ser473}Pのウエスタンブロット、またAktの活性をAktを免疫沈降した後Akt基質蛋白のリン酸化能をリン酸化されたAkt基質蛋白の抗体を用いてウエスタンブロットで検討した。すると上流でのIRS1,2の蛋白量が低下を認めそれに伴うチロシンリン酸化レベルの低下を認め、またAktの蛋白量は変化が無いが、Aktのセリンリン酸化及びAktのkinase活性の低下が認められた。したがって、IRS蛋白の減少に伴いPI3-kinase活性の低下を介して、Aktの活性が低下していると考えられた。肝臓での発現レベルを検討したところ、IRS-1のmRNA量はトランスジェニック群では低下していたが、IRS-2のmRNA量はむしろ増加している、IRS-2に関しては、転写が亢進しているものの、翻訳以降のステップで蛋白量を低下させる働きが生じていることが示唆された。さらに中性脂肪の増加に関しては、肝臓での転写調節ではFASが上昇しCPT-1が低下しており、脂肪酸酸化の低下と脂質合成の亢進が脂質代謝異常を来す原因となっていることが示唆された。

D.E 考察および結論

以上の結果から、インスリン抵抗性状態において血中濃度が上昇している腸管由来RELMは、インスリン抵抗性の憎悪に関与しており、糖・脂質代謝を抑制することで代謝症候群を生じることが明らかとなった。さらに、ヒト糖尿病において遺伝子多型の有無が存在するか、さらには診断的マーカーとなりうるかについては今後の課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Obara S, Nakata M, Takeshima H, Katagiri H, Asano T, Oka Y, Maruyama I, Kuratsu J. Integrin-linked kinase (ILK) regulation of the cell viability in PTEN mutant glioblastoma and in vitro inhibition by the specific COX-2 inhibitor NS-398. *Cancer Lett.* 208: 115-22, 2004
- Fukushima Y, Matsui T, Saitoh T, Ichinose M, Tateishi K, Shindo T, Fujishiro M, Sakoda H, Shojima N, Kushiya A, Fukuda S, Anai M, Ono H, Oka M, Shimizu Y, Kurihara H, Nagai R, Ishikawa T, Asano T, Omata M. Unique roles of G protein-coupled histamine H2 and gastrin receptors in growth and differentiation of gastric mucosa. *Eur J*

Pharmacol. 502: 243-52,2004

- Nawata H, Shirasawa S, Asano T, et al. Genome-wide linkage analysis of type 2 diabetes mellitus reconfirms the susceptibility locus on 11p13-p12 in Japanese. *J Hum Genet.* 49: 629-34, 2004
- Okamoto T, Namikawa K, Asano T, Takaoka K, Kiyama H. Differential regulation of the regulatory subunits for phosphatidylinositol 3-kinase in response to motor nerve injury. *Brain Res Mol Brain Res.* 131: 119-25, 2004.
- Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., Ishigaki, Y., Ogihara, T., Uno, K., Hasegawa, Y., Ishihara, H., Sasano, H., Mizuguchi, H., Asano, T., Oka, Y. Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 326: 402-9, 2005
- Sasaoka T, Fukui K, Wada T, Murakami S, Kawahara J, Ishihara H, Funaki M, Asano T, Kobayashi M. Inhibition of endogenous SHIP2 ameliorates insulin resistance caused by chronic insulin treatment in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia.* 48: 336-44, 2005
- Ishigaki, Y., Katagiri, H., Yamada, T., Ogihara, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Gao, J., Ishihara, H., Shimosegawa, T., Sakoda, H., Asano, T., Oka, Y. Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity. *Diabetes.* 54: 322-332, 2005
- Anai, M., Shojima, N., Katagiri, H., Ogihara, T., Sakoda, H., Onishi, Y., Ono, H., Fujishiro, M., Fukushima, Y., Horike, N., Viana, A., Kikuchi, M., Noguchi, N., Takahashi, S.I., Takata, K., Oka, Y., Uchijima, Y., Kurihara, H. and Asano, T. A novel PKB/AKT-binding protein enhanced PKB kinase activity and regulates DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 2005 (in press)
- Shojima, N., Ogihara, T., Inukai, K., Fujishiro, M., Sakoda, H., Kushiya, A., Katagiri, H., Anai, M., Ono, H., Fukushima, Y., Horike, N., Viana, A., Uchijima, Y., Kurihara, H. and Asano, T. Serum concentrations of RELMBandy are elevated in high-fat diet fed and obese *db/db* mice, with increased productions in intestinal tract and bone marrow. *Diabetologia* 2005 (in press)

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他(研究に関する新聞記事等)

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion.	Hum Mol Genet.	13	1159-1170	2004
Suzuki S, Zong Wenyi, Hirai M, Hinokio Y, Suzuki C, Yamada T, Yoshizumi S, Suzuki M, Tanizawa Y, Matsunami A, Oka Y	Genetic variations at urotensin II and urotensin II receptor genes and risk of type 2 diabetes mellitus in Japanese.	Peptides	25	1803-1808	2004
Takahashi K, Satoh J, Kojima Y, Negoro K, Hirai M, Hinokio Y, Kinouchi Y, Suzuki S, Matsuura N, Shimosegawa T, Oka Y	Promoter polymorphism of SLC11A1 (formerly NRAMP1) confers susceptibility to autoimmune type 1 diabetes mellitus in Japanese.	Tissue Antigens	63	231-236	2004
Anno T, Uehara S, Katagiri H, Ohta Y, Ueda K, Mizuguchi H, Moriyama Y, Oka Y, Tanizawa Y	Overexpression of constitutively activated glutamate dehydrogenase induces insulin secretion through enhanced glutamate oxidation.	Am J Physiol	286	E280-E285	2004
Inukai K, Shewan AM, Pascoe WS, Katayama S, James DE, Oka Y	Carboxy terminus of glucose transporter GLUT3 contains an apical membrane targeting domain.	Mol Endocrinol	18	339-349	2004
Yamaguchi S, Ishihara H, Tamura A, Yamada T, Takahashi R, Takei D, Katagiri H, and Oka Y	Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein.	Biochem Biophys Res Commun	325	250-256	2004
Ishigaki Y, Katagiri H, Yamada T, Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Gao Junhong, Ishihara H, Shimosegawa T, Sakoda H, Asano T, and Oka Y	Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity.	Diabetes	54	322-332	2005
Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Uno K, Hasegawa Y, Ishihara H, Sasano H, Mizuguchi H, Asano T and Oka Y	Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver.	Biochem Biophys Res Commun	326	402-9	2005
Ogihara T, Asano T, Katagiri H, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Fujishiro M, Kushiyaama A, Fukushima Y, Kikuchi M, Noguchi N, Aburatani H, Gotoh Y, Komuro I, Fujita T	Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappaB pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase.	Diabetologia	47	794-805	2004
Katsuki K, Fujimoto M, Zhang XY, Izu H, Takaki E, Tanizawa Y, Inouye S, Nakai A	Feeding induces expression of heat shock proteins that reduce oxidative stress.	FEBS Lett.	571	187-91	2004
Iwasaki N, Tanizawa Y, Oka Y, et al.	Genetic variants in the calpain-10 gene and the development of type 2 diabetes in the Japanese population.	J Hum Genet.	50(2)	92-98	2005

Obara S, Nakata M, Takeshima H, Katagiri H, Asano T, Oka Y, Maruyama I, Kuratsu J	Integrin-linked kinase (ILK) regulation of the cell viability in PTEN mutant glioblastoma and in vitro inhibition by the specific COX-2 inhibitor NS-398.	Cancer Lett.	208	115-22	2004
Fukushima Y, Matsui T, Saitoh T, Ichinose M, Tateishi K, Shindo T, Fujishiro M, Sakoda H, Shojima N, Kushiyaama A, Fukuda S, Anai M, Ono H, Oka M, Shimizu Y, Kurihara H, Nagai R, Ishikawa T, Asano T, Omata M.	Unique roles of G protein-coupled histamine H2 and gastrin receptors in growth and differentiation of gastric mucosa.	Eur J Pharmacol.	502	243-52	2004
Nawata H, Shirasawa S, Asano T, et al.	Genome-wide linkage analysis of type 2 diabetes mellitus reconfirms the susceptibility locus on 11p13-p12 in Japanese.	J Hum Genet.	49	629-34	2004
Okamoto T, Namikawa K, Asano T, Takaoka K, Kiyama H	Differential regulation of the regulatory subunits for phosphatidylinositol 3-kinase in response to motor nerve injury.	Brain Res Mol Brain Res.	131	119-25	2004
Sasaoka T, Fukui K, Wada T, Murakami S, Kawahara J, Ishihara H, Funaki M, Asano T, Kobayashi M	Inhibition of endogenous SHIP2 ameliorates insulin resistance caused by chronic insulin treatment in 3T3-L1 adipocytes.	Diabetologia	48	336-44	2005

Disruption of the *WFS1* gene in mice causes progressive β -cell loss and impaired stimulus–secretion coupling in insulin secretion

Hisamitsu Ishihara¹, Satoshi Takeda⁴, Akira Tamura¹, Rui Takahashi¹, Suguru Yamaguchi¹, Daisuke Takei¹, Takahiro Yamada¹, Hiroshi Inoue⁵, Hiroyuki Soga², Hideki Katagiri³, Yukio Tanizawa⁶ and Yoshitomo Oka^{1,*}

¹Division of Molecular Metabolism and Diabetes, ²Division of Immunology and Embryology, and ³Division of Advanced Therapeutics for Metabolic Diseases, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan, ⁴Otsuka GEN Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Tokushima, Japan, ⁵Division of Diabetes and Endocrinology, Department of Medicine, Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan and ⁶Division of Molecular Analysis of Human Disorders, Department of Bio-Signal Analysis, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Ube, Japan

Received February 8, 2004; Revised and Accepted March 26, 2004

Wolfram syndrome, an autosomal recessive disorder characterized by juvenile-onset diabetes mellitus and optic atrophy, is caused by mutations in the *WFS1* gene. In order to gain insight into the pathophysiology of this disease, we disrupted the *wfs1* gene in mice. The mutant mice developed glucose intolerance or overt diabetes due to insufficient insulin secretion *in vivo*. Islets isolated from mutant mice exhibited a decrease in insulin secretion in response to glucose. The defective insulin secretion was accompanied by reduced cellular calcium responses to the secretagogue. Immunohistochemical analyses with morphometry and measurement of whole-pancreas insulin content demonstrated progressive β -cell loss in mutant mice, while the α -cell, which barely expresses *WFS1* protein, was preserved. Furthermore, isolated islets from mutant mice exhibited increased apoptosis, as assessed by DNA fragment formation, at high concentration of glucose or with exposure to endoplasmic reticulum-stress inducers. These results strongly suggest that *WFS1* protein plays an important role in both stimulus–secretion coupling for insulin exocytosis and maintenance of β -cell mass, deterioration of which leads to impaired glucose homeostasis. These *WFS1* mutant mice provide a valuable tool for understanding better the pathophysiology of Wolfram syndrome as well as *WFS1* function.

INTRODUCTION

Wolfram syndrome (OMIM 222300) is a rare autosomal recessive disorder characterized by juvenile-onset non-autoimmune diabetes mellitus, optic atrophy, sensorineural deafness and diabetes insipidus (1). In addition, psychiatric illnesses such as depression and impulsive behavior are frequently observed in affected individuals (2). The nuclear gene responsible for this syndrome was identified by us (3) and others (4), and designated *WFS1* (3). More than 100 mutations of the *WFS1* gene have been identified to date in Wolfram syndrome patients. Most are inactivating mutations, suggesting loss of function to be responsible for the disease phenotype (5). *WFS1*

mutations underlie not only autosomal recessive Wolfram syndrome but also autosomal dominant low-frequency sensorineural hearing loss (LFSNHL). Heterozygous, non-inactivating *WFS1* mutations were recently found in families with LFSNHL linked to chromosome 4p16 (DFNA6/14/38) (OMIM 600965) (6,7). The observation that the first-degree relatives of Wolfram syndrome patients have increased frequencies of diabetes mellitus and certain psychiatric disorders suggests sequence variants of the *WFS1* gene predispose these individuals to such conditions (2,8). Indeed, several *WFS1* sequence variants have been shown to be significantly associated with more common forms of diabetes mellitus (9,10) as well as with suicidal and impulsive behavior (11).

*To whom correspondence should be addressed at: Division of Molecular Metabolism and Diabetes, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan. Tel: +81 227177173; Fax: +81 227177179; Email: oka@int3.med.tohoku.ac.jp

The WFS1 protein, also called wolframin (4), consists of 890 amino acids and was predicted to have nine or ten membrane spanning domains (3,4). Proteins with sequence similarity are now found in public databases of other organisms, *Drosophila melanogaster* (CG4917), *Anopheles gambiae* (EBIP3764) and *Fugu rubripes* (SINFRUP82345), but little is known about their functions, suggesting WFS1 protein to belong to a novel family. The WFS1 protein is expressed in various tissues but at higher levels in the brain, heart, lung and pancreas (3,4). We showed the WFS1 protein to be localized predominantly in the endoplasmic reticulum (ER) and suggested a possible role of this protein in membrane trafficking, protein processing and/or regulation of cellular calcium homeostasis (12). A recent study showed this protein to contain nine transmembrane domains and to be embedded in the ER membrane with the amino-terminus in the cytosol and the carboxy-terminus in the ER lumen (13). ER dysfunction is known to cause apoptosis, which underlies a number of genetic disorders (14,15), possibly including a subset of diabetes (15). Since severe atrophic changes have been reported in the brain and in pancreatic islets of subjects with Wolfram syndrome (16,17), it is reasonable to speculate that WFS1 protein plays an essential role in the survival of neuronal cells and islet β -cells.

In this study, to gain insight into the pathophysiology of Wolfram syndrome, we disrupted the *wfs1* gene in mice. The mice developed glucose intolerance or overt diabetes, depending on their genetic background. Our results demonstrate that the impaired glucose homeostasis in these mice results from insufficient insulin secretion due to defects in both stimulus-secretion coupling and maintenance of β -cell mass.

RESULTS

Targeted disruption of the *WFS1* gene

We first studied *wfs1* protein expression in the pancreas, as this was essential to understand the diabetic phenotype in mice with a disrupted *wfs1* gene. Mouse pancreas sections were stained using an antibody raised against the 290 amino acid amino-terminus peptide of murine WFS1 (α -mWFS1-N) and those against islet hormones (Fig. 1A–L). Importantly, the WFS1 protein is strongly expressed in β -cells, and the majority of α , δ and F-cells are essentially devoid of *wfs1* protein immunoreactivity. Double-staining of dispersed islet cells with these antibodies showed >80% of insulin-positive cells to be stained with anti-WFS1 antibody, while few cells express both WFS1 protein and one of the following: glucagon, somatostatin or pancreatic polypeptide (Fig. 1M–P).

In order to study the pathophysiology of Wolfram syndrome, we sought to inactivate the *wfs1* gene by inserting a neomycin-resistance gene into the second exon of the *wfs1* gene which contains the initial ATG codon (Fig. 2A and B). When analyzed using an antibody against α -mWFS1-N, WFS1 protein bands of 95 kDa were abolished in whole-brain lysates from mutant mice (Fig. 2C). In addition, WFS1 protein staining was detected in neither pancreatic islets (Fig. 2D and E) nor the hippocampus (Fig. 2F and G) in mutant animals. It was subsequently recognized that our disruption strategy resulted in altered splicing transcripts in

mutant animals. Reverse transcription-polymerase chain reaction on brain, heart and islet mRNA revealed existence of a *wfs1* mRNA that lacks exon 2 in mutant animals (data not shown). Such an altered mRNA was not detected in wild-type tissues. The mutant transcript could generate amino-terminus-truncated WFS1 protein resulting from initiation of translation from one of the internal methionines. There exist methionine residues at 81, 184, 230 and 299, as well as further downstream, in murine WFS1 protein. We constructed a cDNA encoding WFS1 protein lacking the first 80 amino acids (WFS1-del80) and expressed it in COS7 cells. The WFS1-del80 protein was recognized by the antibody α -mWFS1-N (data not shown), while no bands were detected in brain lysates from mutant animals (Fig. 2C), indicating that WFS1-del80 is not expressed in mutant mice and that mutant proteins, if present, would be WFS1 protein lacking the first 183 amino acids or with larger truncations. We speculate that such truncated WFS1 proteins do not have normal functions since human substitution mutations at alanine 126, alanine 133 or glutamate 169 and a deletion mutation that lacks both lysine 178 and alanine 179 residues cause Wolfram syndrome (5). Therefore, we conclude that WFS1 function is lost, or at least severely impaired, in mice with a disrupted *wfs1* gene.

Mice homozygous for the mutated *wfs1* gene constitute the expected 25% of offspring born to heterozygous mutant parents, and are normal in appearance, growth and fertility. We did not see ataxic posture or gait disturbance. In addition, there were no differences in urine osmolality between wild-type and mutant mice. In the following experiments only male mice were used because an earlier study indicated females to have a milder phenotype. Since juvenile-onset diabetes mellitus is the most prominent feature of Wolfram syndrome, we have focused on this issue herein. Detailed studies on other aspects of this syndrome, including optic atrophy, hearing disorders, diabetes insipidus or psychiatric illness, are currently underway.

Impaired glucose homeostasis in mutant mice

Blood glucose levels in these mice were studied in non-fasted states. Initially, using mice on the [(129Sv \times B6) \times B6]F2 hybrid background, we found that blood glucose levels of mutant mice started to rise at around 16 weeks of age and >60% of mice (8 out of 13) had overt diabetes by 36 weeks (Fig. 3A). Since the heterogeneous contribution of B6 and 129Sv strains in the mixed background mice could cause a large variance in data, making interpretation difficult, we sought to generate mutant animals on a nearly homogenous genetic background. For this purpose, male mice with a disrupted *wfs1* gene were backcrossed for five successive generations with female mice of the B6 strain, which is frequently used for diabetes and obesity research. On the B6 background, no apparent increase in blood glucose levels was observed even at 36 weeks in mice homozygous for disrupted *wfs1* alleles (Fig. 3B). However, impaired glucose homeostasis was evident in mice on the B6 background when they were subjected to oral glucose tolerance test (Fig. 3C). Blood glucose levels at 15 and 30 min were significantly higher in mutant than in wild-type mice at 17 weeks of

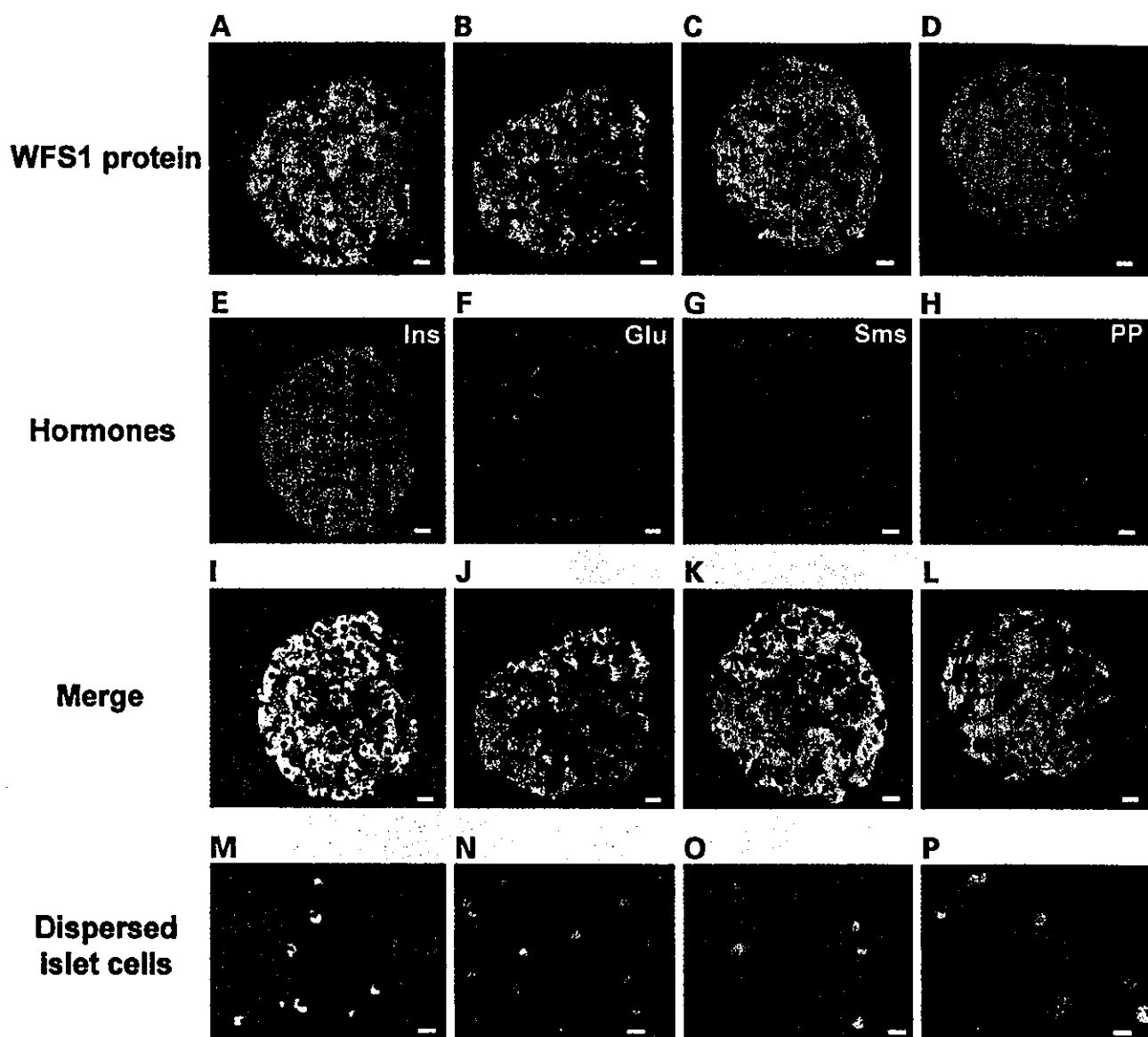


Figure 1. β -Cell specific expression of WFS1 protein in the pancreas. (A–L) Paraffin embedded mouse pancreatic sections were immunostained with antibodies against WFS1 protein (green) (A–D) and islet hormones (red): insulin (E), glucagon (F), somatostatin (G), or pancreatic polypeptide (H). A and E are the same section, and the two are merged in I. Similarly, J, K, L are merged versions of B and F, C and G, D and H, respectively. Bars = 10 μ m. Ins, insulin; Glu, glucagon; Sms, somatostatin; PP, pancreatic polypeptide. (M–P) Dispersed islet cells were stained with anti-WFS1 antibody (green) together with those against islet hormones (red): insulin (M), glucagon (N), somatostatin (O) or pancreatic polypeptide (P). Bars = 10 μ m.

age. These data indicated that disruption of the *wfs1* locus induced impaired glucose homeostasis in mice, as is seen in human Wolfram syndrome.

In order to investigate the pathophysiology of impaired glucose homeostasis in mutant mice, plasma immunoreactive insulin (IRI) levels in response to a glucose load were evaluated. Although plasma insulin levels after a 6 h fast were comparable between wild-type and mutant animals at 17 weeks of age (Fig. 3D), hormone responses were markedly blunted in WFS1-deficient mice. We also studied non-fasting plasma insulin levels in these mice. Plasma insulin levels in mutant mice were similar to that in wild-type mice at 24 weeks but had decreased to half the wild-type level at 36 weeks (Fig. 3E). Intraperitoneal insulin injection tests did not show

insulin resistance in mutant mice at 14 (data not shown) and 19 weeks (Fig. 3F). In fact, WFS1-deficient mice were somewhat more insulin sensitive. Taken together, these data indicate impaired glucose homeostasis in mice with a disrupted *wfs1* gene to be due to insulin secretory defects rather than insulin resistance.

Impaired stimulus–secretion coupling in β -cells from mutant mice

Since defects in both stimulus–secretion coupling and insulin production could be the cause of insulin secretory defects *in vivo*, insulin secretory responses were studied using isolated islets. When we isolated islets from these mice, we noticed that

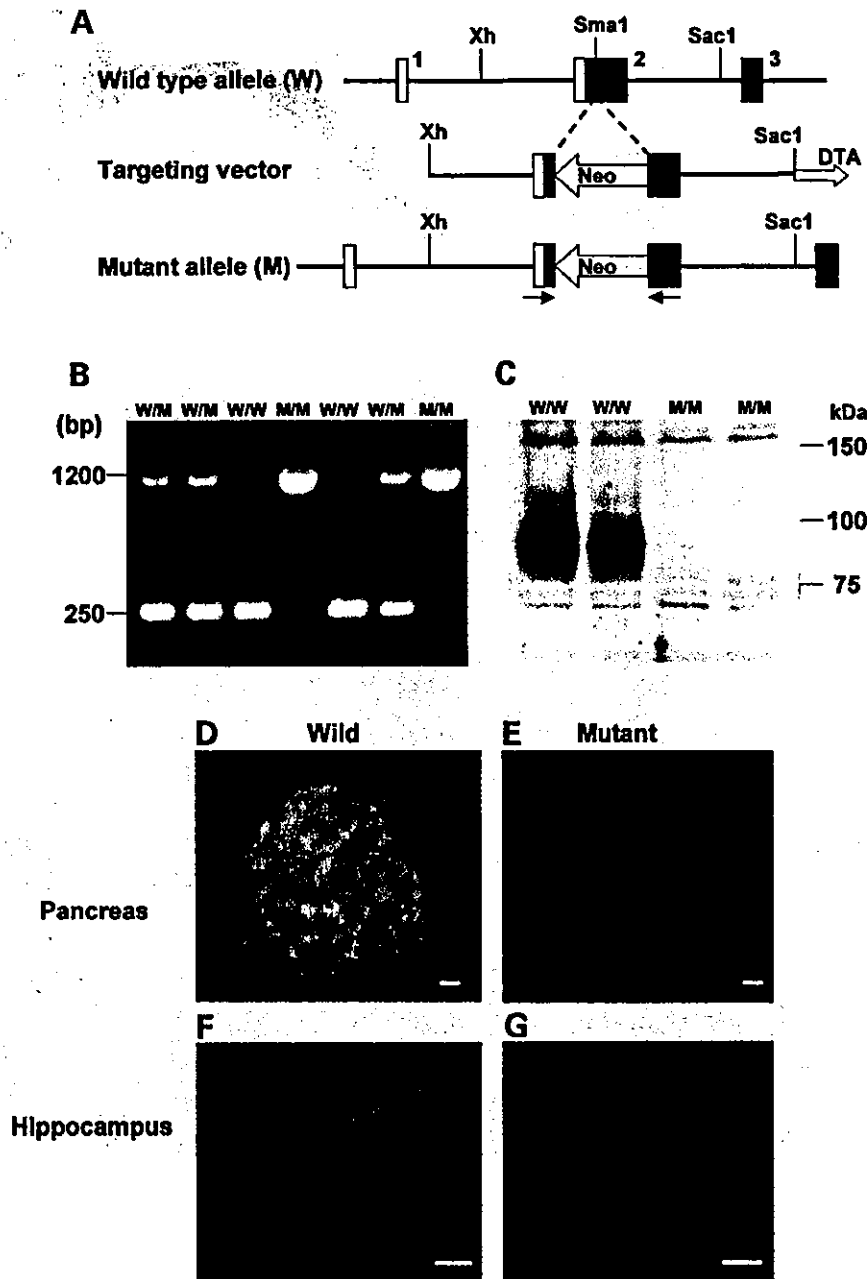


Figure 2. Targeted disruption of the *WFS1* gene. (A) Schematic representation of the mouse *wfs1* targeting strategy. Boxes are exons. Neo, neomycin resistance gene; DTA, diphtheria toxin A chain gene. (B) PCR genotyping of mutant mice. A 1200 bp longer band is observed in DNA from the disrupted allele. (C) Western blot analysis using whole-brain lysates from wild-type and mutant animals probed with anti-WFS1 antibody. (D–G) Immunohistochemical analyses using anti-WFS1 antibody in pancreatic (D, E) and hippocampal (F, G) tissues from 14-week-old wild-type and mutant mice. Bars = 10 μ m for pancreatic sections and 50 μ m for hippocampal sections.

it was possible to obtain only 100 islets or even less from a mutant mouse, while around 200 islets can normally be isolated from a wild-type mouse. Insulin content in the WFS1-deficient islets was slightly (16%) but significantly less than that in islets of wild-type mice [61.8 ± 2.3 ng/islet ($n = 10$ experiments) versus 73.4 ± 3.3 ($n = 10$ experiments), $P = 0.039$, mutant and wild-type islets, respectively]. We used these islets infected with either AdCAGlacZ (as a control) or AdCAGmWFS1 (Fig. 4A), because we also wanted to examine effects of WFS1

re-expression in WFS1-deficient islets and of its overexpression in wild-type islets. Glucose (15 mM)-stimulated insulin secretion, after normalization with insulin content, was reduced by 23% in islets from mutant mice (Fig. 4B). Carbachol (1.0 mM)-stimulated insulin secretion, which is thought to be evoked by Ca^{2+} release from the ER and Ca^{2+} entry through the Ca^{2+} release-activated channel, was also reduced by 26% (Fig. 4C). When WFS1 protein was re-expressed in islets from mutant animals via a recombinant adenovirus,