

201128063B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

Wolfram 症候群の実態調査に基づく早期診断法の確立と
診療指針作成のための研究

平成 22 ～ 23 年度 総合研究報告書

研究代表者

谷 澤 幸 生

平成 24(2012)年 5 月

目 次

I. 総合研究報告

Wolfram 症候群の実態調査に基づく早期診断法の確立と

診療指針作成のための研究 ----- 1

谷澤 幸生

資料

1. 疾患概要 ----- 1 1

2. 診断基準 (案) ----- 1 2

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 1 3

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 1 7

Wolfram 症候群の実態調査に基づく早期診断法の確立と診療指針作成のための研究

研究代表者 谷澤 幸生 山口大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

Wolfram症候群(WFS)は糖尿病(DM)と視神経萎縮(OA)の合併を主徴とし、尿崩症(DI)、難聴(D)、尿路異常、多彩な神経・精神症状を合併する進行性の遺伝性難病で、治療法は確立されていない。主要な原因遺伝子は我々が同定した*WFS1*である。英国では770,000人に1人と推計されているが、日本での実態は不明であった。今回、DM + OAの合併例について過去10年間での経験の有無、その患者の他の随伴症候について、全国の糖尿病専門医・内分泌代謝専門医、平成18年度小児慢性特定疾患治療研究事業に登録された糖尿病患者のうち、糖尿病合併症以外の合併症候を持つ患者の主治医を対象にアンケート調査を行い、のべ104人のDMとOAの合併例が報告された。このうち、56症例が他の主要徴候を合併していた。合併徴候の頻度はDI 67.9%、D 85.7%、尿路異常50.0%、神経・精神症状64.3%であった。4徴候すべて揃っている症例は58.9%であった。さらに同意が得られた症例について遺伝子診断を含む2次調査を実施した。これまでに33例(29家系)について遺伝子解析を実施し、22例(18家系、62.1%)において*WFS1*遺伝子変異が同定された。*WFS1*遺伝子変異が同定された患者ではDM、OAの発症年齢が低く、合併徴候数が多い傾向が見られたが、有意ではなかった。del193Kを有する3症例(2家系)において疾患発症が有意に遅く、genotype-phenotype関係が示唆された。以上の結果から、日本におけるWFSの頻度は100万人に1人程度で、約6割が*WFS1*遺伝子変異による。WFSの診断は若年発症糖尿病と視神経萎縮の合併を基本とし、*WFS1*遺伝子解析により*WFS1*遺伝子異常に基づくWFSとそれ以外の原因によるWFSとの分類を行う。

WFSは希少疾患であり、認知度が低いため診断も遅れがちである。ホームページを開設して診断基準など診療情報の提供を開始している。患者さんへの情報提供を目的に、全国盲ろう者協会の会員向け情報誌に本疾患の紹介記事を掲載した。

これまで詳細な検討が行われてこなかった視神経萎縮について、今回、2姉妹例においてOptical Coherence Tomography(OCT)を用いて観察し得た。網膜全層および網膜神経線維層の全体にわたる薄化を認め、特に網膜神経線維層の薄化は視神経萎縮を生体でとらえたものとして貴重である。OCTが視神経萎縮の進展を把握するのに有用であることが示唆された。

治療法の開発は重要な課題である。先に*Wfs1*欠損肥満モデルマウスにおいてpioglitazone投与がβ細胞の脱落を顕著に改善し、糖尿病発症を抑制することを報告した。今回、WFS患者の糖尿病に対して、GLP-1受容体作動薬が部分的に有効である可能性が示唆された。*WFS1*遺伝子変異del1508YVYLLも持つインスリン分泌能が著しく低下した患者において、リラグルチドを投与したところ、インスリン必要量の減少が6ヶ月にわたって観察され、SUIT指数も改善した。*Wfs1*^{-/-}マウスにおいてもexendin-4がインスリン分泌障害を改善し、DPP-4阻害薬投与は膵β細胞の小胞体膨化、細胞死を抑制することを観察しており、インクレチン療法がWolfram症候群患者で膵β細胞機能を改善し、糖尿病の進展抑制に繋がるか、さらなる検討が待たれる。

WFS1蛋白質は小胞体に存在し、小胞体ストレス応答に重要である。加えて、今回、膵β細胞ではWFS1蛋白質がインスリン分泌顆粒に存在することを見いだした。顆粒内部の酸性化維持に重要で、*Wfs1*^{-/-}マウスで認められるインスリンのプロセッシング障害、ブドウ糖応答性インスリン分泌障害に関連すると考えられる。

動物モデルにおいては、*Wfs1*欠損が粥状動脈硬化を悪化させることも示された。小胞体ストレスが動脈硬化においても関与することと関連すると考えられ、WFS患者は若年で死亡することが多いためこれまで問題にされることが少なかったが、動脈硬化症がWFSの重要な合併症のひとつとなる可能性がある。WFS1蛋白質の分子機能を考える上でも重要な知見である。

研究分担者

岡 芳知

東北大学大学院医学系研究科 教授

山田祐一郎

秋田大学大学院医学系研究科 教授

和田 一彦

高知女子大学健康栄養学部 教授

雨宮伸

埼玉医科大学医学部 教授

杉原 茂孝

東京女子医科大学東医療センター 教授

中尾雄三

近畿大学医学部堺病院 教授

片桐 秀樹

東北大学大学院医学系研究科 教授

A. 研究目的

本研究では、Wolfram 症候群(WFS)患者の福祉向上のために日本での発症率・有病率、症候や治療の実態、予後を明らかにし、早期診断が可能な診断法を確立し、診療指針の作成をめざした。同時に治療法開発の分子基盤を得るため、発症に係わる分子機構を明らかにし、加えて、動物・細胞モデルを用いた基礎研究により Wolfram 症候群の分子病態を明らかにし、治療法の開発に繋げることを目的とした。

Wolfram 症候群は、一般に若年発症のインスリン欠乏型糖尿病と視神経萎縮の合併をもって診断される。他に尿崩症や難聴、尿路異常、脳幹・小脳失調などの神経症状や双極性障害、統合失調症などの精神症状をしばしば合併する。代表的な合併症である尿崩症(Diabetes Insipidus)、糖尿病(Diabetes Mellitus)、視神経萎縮(Optic Atrophy)、難聴(Deafness)の頭文字を取って DIDMOAD 症候群とも呼ばれる。常染色体性に劣性遺伝する。我々は Wolfram 症候群の原因遺伝子 *WFS1* を世界に先駆けて同定し、Wolfram 症候群の遺伝子診断を初めて可能にした(Inoue 他 Nature Genet 1998)。英国での調査によれば、若年(15歳未満)発症のインスリン依存性糖尿病と視神経萎縮を診断基準とすれば、90%以上の患者で *WFS1* 遺伝子に変異が同定されると報告されている。頻度は 770,000 に 1 人と極めて希少である。一方、他の報告によれば、*WFS1* 遺伝子に変異が同定できない患者も多数見られ、民族・人種により Wolfram 症候群には多様性が認められる。事実、Jordan の患者で第2の Wolfram 症候群遺伝子 *WFS2* として *ZCD2* 遺伝子が同定されているが、出血症状など、古典的な Wolfram 症候群に含まれない聴講を合併し、この遺伝子変異による患者は現在のところ Jordan の患者に限られている。

日本でもこれまでに Wolfram 症候群の患者が散発的に報告されているが、系統的な調査は行われたことはなかった。従って、頻度や、遺伝的多様性についても明らかにされていない。また、まれ

な疾患であるがために認知度も低く、診断が遅れることも多く、また、多彩な症候が進行してから診断されるために患者の生活の質は著しく障害される。

このような背景の中で、日本での Wolfram 症候群の実態を明らかにし、それぞれの症候についてもその臨床像をさらに明らかにすることによりの確な診断法を確立してゆく必要がある。さらにこの疾患について医療従事者ならびに社会に広く情報提供し、啓発することは意義深い。また、主要な原因遺伝子は同定されたものの、その遺伝子によりコードされる蛋白の機能も十分解明されているとは言えず、糖尿病をはじめとする症候の発症メカニズムも明らかでない。このような点を明らかにしてゆくことは治療法開発のために必須である。

B. 研究方法

日本での実態を明らかにするためのアンケート調査を行っている。一昨年、全国の糖尿病・内分泌専門医(内科、小児科)5,632名を対象として Wolfram 症候群と診断された、またはそれが疑われる患者の経験についてアンケート調査を実施した。平成22年度にはさらに、小児慢性特定疾患治療研究事業に登録された小児糖尿病患者のうち、糖尿病合併症以外の合併症を有する患者の主治医に対して追加調査を行った。これらの調査により報告された糖尿病患者に対して、合併徴候とその発症年齢、重症度等についての詳細な病歴、治療歴など関する第2次調査を行った。また、過去に遺伝子診断が行われていない患者で、同意が得られたものについては *WFS1* 遺伝子の変異解析を行った。ミトコンドリア遺伝子変異で類似の症候を呈することがあることから、代表的な3243変異(MIDDまたは MELAS)、および11778変異(Leber病)についても解析を行っている。

研究分担者および協力者が直接診療にあたっている患者についてより詳細な病歴、合併症、治療について調査を行った。特に、視神経萎縮につい

てその病態を明らかにする目的で、一般的な眼科検査の他に、OCT、MRI 検査を行った。治療法開発を目的として、同意が得られた患者において、倫理委員会の承認のもと GLP-1 受容体作動薬の効果について検討を行った。患者および家族から直接聞き取り調査によっては、療養上の問題点等について調査を行った。熊本大学江良教授との共同研究で、同意が得られた患者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞の樹立をすすめている。

アンケート調査は全て匿名化し、個人を特定できる情報は収集しなかった。患者および患者家族への調査は、今回の研究の趣旨について十分な説明を行い、同意の下に調査に協力いただいた。遺伝子診断は遺伝医学関連学会による遺伝学的検査に関するガイドラインに従い、倫理委員会の許可のもとに実施した。

WFS1 蛋白の細胞内局在は、免疫電顕法により行い、インスリン分泌顆粒の pH は、DAMP (Invitrogen, OR, USA) および LysoTracker (Molecular Probes) を用いて、既報の方法により測定した。また、動物モデルにおいて、ecendine-4 (Sigma-Aldrich, MO, USA) に対するインスリン分泌応答を臍灌流法により解析した。

WFS の実態調査、遺伝子解析は山口大学医学部臨床研究と倫理審査委員会及び関連各施設の倫理委員会の審査、承認を受けて行った。動物実験は山口大学医学部、東北大学における動物実験に関する倫理委員会の審査、承認を受けて行った。iPS 細胞の樹立は秋田大学及び熊本大学の倫理委員会承認を受けた。

C. 研究結果

(1) Wolfram 症候群に関する実態調査

全国の糖尿病専門医および内分泌代謝専門医に加えて、小児慢性特定疾患治療研究事業（小児糖尿病）に登録された患者のうち、糖尿病合併症以外の合併症を有することが報告されている患者の主治医に対して追加アンケート調査を行った。その結果、合計のべ 104 人の糖尿病と視神経萎縮の合併例が報告された。このうち、56 症例が他の主要徴候を合併していた。図 1 に示すように、その内訳は、尿崩症 67.9% (38/56)、聴力障害 85.7% (48/56)、尿路異常 50.0% (28/56)、神経・精神症状 64.3% (36/56) であった。4 徴候すべて揃っている症例は 58.9% (33/56) であった。

糖尿病および尿崩症を 7 歳で発症し、18 歳時に視神経萎縮と難聴を診断された 1 例が報告された。通常、尿崩症の発症は糖尿病や視神経萎縮の発症に遅れることが多いが、本症例では視神経萎縮が診断された 18 歳時に始めて Wolfram 症候群と診断されている。診断時には全色盲で矯正視力 0.1 と

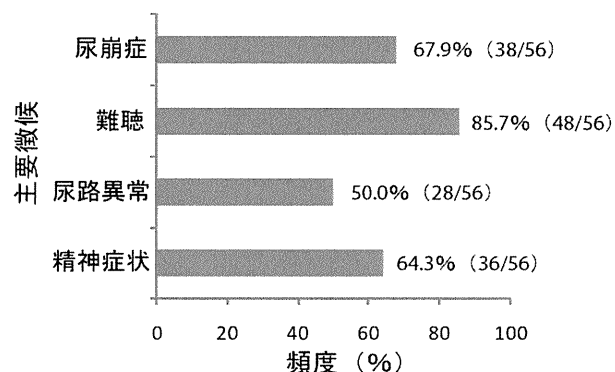


図1,日本人WFS1における各徴候の合併頻度

視神経萎縮は進行していたため、その発症はもっと以前であったと考えられるが、糖尿病と尿崩症が視神経萎縮に先だって顕在化する症例もあることを示しており、Wolfram 症候群の早期診断を考える上では重要な症例である。疑い例を含む 104 例について遺伝子診断を含む詳細な 2 次調査を継続して実施中である。

(2) Wolfram 症候群患者の遺伝子解析

WFS1 遺伝子検査は、今回の調査までに依頼を受けたものを合わせて、33 例 (30 家系) について行なっている。これらの患者の糖尿病の平均発症年齢は 8.8 歳、OA は 14.6 歳であった。変異が同定されたのは 22 例 (18 家系、62.1%) であった。WFS1 遺伝子に変異が同定された患者では、DM、OA の発症年齢が低く、合併徴候数が多い傾向があったが、両群に有意な差は見られなかった (表 1)。

表 1. WFS1 遺伝子変異の有無による臨床像の差異

	WFS1 変異なし (n = 10) mean ± SD	WFS1 変異あり (n = 22) mean ± SD
糖尿病発症年齢	11.5 ± 9.1	7.2 ± 6.0
視神経萎縮発症年齢	17.1 ± 12.9	14.7 ± 8.9
合併徴候数	2.9 ± 0.6	4.1 ± 1.4

変異の Hot Spot はみられず、図 2 に示すように、患者により変異の種類は様々であるため、phenotype-genotype relationship を明らかにすることは困難である。その中で、193 番アミノ酸の Lys を欠失する変異 (del193K) が 2 家系、3 名に同定された。1 家系 1 名はこの変異のホモ接合体であり、他の家系の姉妹例は 1 塩基欠失によるフレームシフト変異 (del650fs/ter710) との複合ヘテロ接合体であった。この変異を有する患者では、この変異以外の WFS1 遺伝子変異を持つ患者と比較すると糖尿病、視神経萎縮ともに発症年齢が有意に

遅かった。特にこの変異をホモ接合体で持つ患者では27歳時に糖尿病を診断され、その後少なくとも8年は食事療法またはSU薬で治療されており、長期にインスリン分泌が保たれていた。この患者の妹も20歳で視神経萎縮、40歳で糖尿病の診断を受けており、臨床的にはWolfram症候群の主要2徴候を合併しているが、発症年齢が遅い点は興味深い。

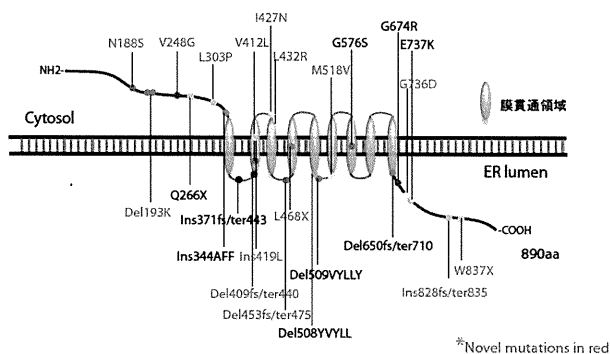


図2, WFS1遺伝子変異とWFS1蛋白構造異常

変異が片方の対立遺伝子のみで同定された症例が2例あった。それぞれE809KとDel409fs/ter440で、後者は1塩基の欠失のためにフレームシフトを来し、premature terminationが起こる変異であり、有意なものと考えられる。E809Kはこれまでに報告のないミスセンス変異であるが、非糖尿病症例194例、2型糖尿病174例では認められないまれなもので、酸性アミノ酸が塩基性アミノ酸に置換するため、WFS1蛋白質の機能に変化を来す可能性も高い。この2症例については、変異が同定されなかった対立遺伝子にエクソン単位等での欠失が存在する可能性について、MLPA法(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)法で検討したが、欠失は同定できなかった。

(3) 診断基準の提案と診療指針の作成

日本人Wolfram症候群の実態調査結果を基に欧米からの報告と合わせて、Wolfram症候群の診断基準(案)を作成した。現時点においては、日本においても、Wolfram症候群の診断は糖尿病と視神経萎縮の合併を最低条件とする、従来用いられている基準を用いるのが妥当と考えられた。糖尿病の発症は10歳未満のことが多いが、WFS1遺伝子の変異が証明されながら、遅発性であった患者が同定されていることから、発症年齢に関する基準は設定しない。尚、糖尿病の診断において、インスリン分泌能低下への免疫学的機序の関与を除外する必要がある。日本ではWFS1遺伝子に変異が同定された患者で、1例、膵島自己抗体が陽性であったことが報告されているが、例外的であると考えた。他の徴候は種々の頻度で合併することから参考所

見(1. 感音性難聴、2. 中枢性尿崩症、3. 尿路異常(水腎症、尿管の拡大、無力性膀胱など)、4. 神経症状(脳幹・小脳失調、ミオクローヌスなど)、5. 精神症状(うつ、情動障害など))としてあげる。今回の調査から、日本人Wolfram症候群約6割がWFS1遺伝子異常によると推察される。それ以外の原因によるWolfram症候群と臨床徴候で鑑別するのは難しい。遺伝子診断のためにはWFS1遺伝子解析を実施する。尚、患者ケアを中心とした診療指針を現在作成中である。

(4) 視神経萎縮の特徴

Wolfram症候群の2姉妹例の視神経萎縮について眼科的検討を行い得た。両症例ともに進行性の重篤な視力障害を認めた。視神経萎縮の所見は視神経乳頭の蒼白と陥凹であった。姉は色覚異常があり、視野はマリOTT盲点近くの感度低下がみられた。糖尿病網膜症はなかった(両眼)。ERGには異常が認められなかった。VEPはflash WEPは異常なく、pattern ERGは記録不能であった。MRIにおいては、STIR法で視神経は眼球後方から視交叉前まで全長が細く高信号となり、著しい視神経萎縮としてとらえられた。さらに、OCTによる検討では、網膜全層および網膜神経線維層が全体にわたって薄化していることを観察し得た。妹は、詳細な検査についての協力が得られなかった。

(5) Wolfram症候群における糖尿病の発症機構の解明

膝ランゲルハンス氏島におけるβ細胞の選択的消失に関しては、小胞体に存在するWFS1蛋白の欠損のためβ細胞が小胞体ストレスに対して脆弱となることが明らかになっている。加えて、今回、WFS1蛋白がインスリン分泌顆粒に存在し、顆粒内のpHを酸性に維持するために重要であることを見いだした。

免疫電子顕微鏡解析を行ったところ、β細胞においては、小胞体だけではなく、むしろインスリン分泌顆粒にWFS1蛋白がより豊富に存在していた。インスリン分泌顆粒は顆粒内が酸性に維持されており、このことはプロインスリンのプロセッシングや、さらには、分泌顆粒の開口放出にあたってのプライミングに必要であることが知られている。Wfs1欠損マウスでのインスリン顆粒内酸性化についてDAMPあるいはLysoTrackerの集積を指標として検討したところ、Wfs1欠損β細胞では顆粒内の酸性化が障害されており、膵および血中でのプロインスリン/インスリン比が野生型に比べて高くなっていることからインスリンのプロセッシング障害を来していると考えられた。細胞内インスリン分泌顆粒の数には変化がみられなかったが、細

胞膜に接して存在する顆粒の比率が野生型と比較して減少していた。分泌顆粒の開口放出における「プライミング」との関連が興味深いところである。

膝灌流を用いてインスリン分泌能を解析すると、*Wfs1* 欠損マウスではグルコース刺激、及び KCl による脱分極刺激に対するインスリン分泌応答が著しく障害されていた (図 3)。このことは WFS 患者の膵では β 細胞のアポトーシスとともに、 β 細胞の機能的異常も存在することを示唆し、これはインスリン分泌顆粒上の WFS1 蛋白質の機能と関連することが示唆される。エキセナチドによるインスリン分泌の増強効果は保存されており、インクレチンシグナルによる分泌増強経路とは独立した、細胞膜の脱分極と分泌顆粒のエクソサイトシスのカップリングが WFS1 蛋白質の欠失で障害されていると考えられた。

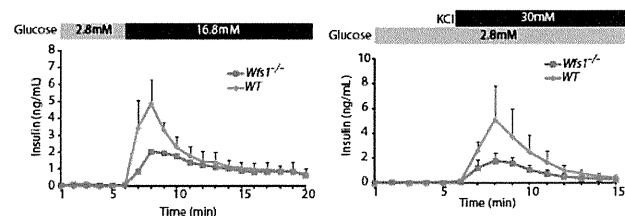


図3. *Wfs1*欠損マウスにおけるインスリン分泌障害(膝灌流実験)

(6) Wolfram 症候群と動脈硬化

動脈硬化プラーク部位において、WFS1 蛋白質の発現が強力に誘導されていることを見出した。このことから、WFS1 蛋白質、ひいては、小胞体ストレスが動脈硬化の発症・進展に役割を果たしていることが想定される。つまり、動脈硬化部位では小胞体ストレスが強くなり、それを軽減するために WFS1 蛋白質が誘導されているという仮説が考えられる。このことを明らかにすることは Wolfram 症候群の病態の解明・理解にもつながる。そこで、*Wfs1* 遺伝子欠損マウス、あるいは、小胞体ストレスを増強すると考えられる C/EBP Homologous Protein (CHOP) 遺伝子を欠損したマウスを用い、*ApoE* 欠損マウスと掛け合わせ、高コレステロール血症における粥状動脈硬化に及ぼす影響を検討した。

ApoE^{-/-}マウスと比較して、*Wfs1*^{-/-};*ApoE*^{-/-}マウスでは、粥状動脈硬化の発症進展は促進し、*Chop*^{-/-};*ApoE*^{-/-}マウスでは、抑制されていた。これは、カフ障害による大腿動脈内膜肥厚モデルにおいても、同様の傾向が認められた。さらに、大動脈における遺伝子発現を検討したところ、*ApoE*^{-/-}マウスと比較して、*Wfs1*^{-/-};*ApoE*^{-/-}マウスでは、小胞体ストレス関連蛋白質の発現が亢進し、かつ、炎症関連蛋白質も著明に発現亢進していた。これと反対に、*Chop*^{-/-};*ApoE*^{-/-}マウスでは、小胞体ストレス

関連蛋白質および炎症関連蛋白質の発現が抑制されていた。

さらに、骨髄移植実験から、血球細胞と血管細胞の相互作用、特に、血管細胞内での小胞体ストレス応答が動脈硬化の発症に強く関与することが示された。

以上から、高コレステロール血症にともなう粥状動脈硬化の発症機序として、動脈局所での小胞体ストレス反応が大きな役割を果たしており、小胞体ストレス反応が炎症反応を惹起していることが示唆された。さらに、WFS1 蛋白質は、この病態に関わる小胞体ストレスを軽減する働きがあり、これを欠損することは、動脈硬化の病態を促進することにつながると考えられる。

(7) 治療法開発

我々は先に *Wfs1*^{-/-}*A^YA* マウスで、pioglitazone 投与が β 細胞の脱落を顕著に抑制し、糖尿病発症を防止することを報告している。この β 細胞保護効果には全身性のインスリン抵抗性の軽減が主因と考えられたが、 β 細胞での小胞体ストレスマーカーの発現が必ずしも改善していないことから、 β 細胞への直接作用も示唆された。そのメカニズムについての解析を進めている。

さらに、膵 β 細胞に対してより直接的な作用を有するインクレチン作動薬による治療効果を検証した。*Wfs1*^{-/-}マウスに、DPP4 阻害薬 Vildagliptin を 1 日 2 回、4 週間経口投与したところ、腹腔内ブドウ糖負において耐糖能とインスリン分泌が改善し、膵インスリン含有量が増加した。 β 細胞での小胞体の膨化が抑制され、アポトーシスも軽減することも観察されている。次に、GLP-1 受容体作動薬である Exenatide の効果を検討した。前述のように *Wfs1* 欠損マウスで膝灌流を実施すると、16.7mM グルコース刺激下の第 1 相インスリン分泌および KCl 刺激によるインスリン分泌が野生型に比し著しく障害されていた。Exenatide 投与下で同じ検討を行うと、インスリン分泌応答は野生型同様に増強された。つまり、Exenatide に対する応答は保たれていた。すなわち、WFS 蛋白質がインスリン分泌調節に直接関与しており、GLP-1 受容体作動薬は WFS 蛋白質欠損による障害部位をバイパスしてインスリン分泌を増強しうることが示唆された。

WFS1 遺伝子変異 del1508YVYLL が同定されている家系の患者のひとりにおいては、インスリン分泌がわずかに残存していた。そこで、倫理委員会の承認を得て、この患者に GLP-1 受容体作動薬リラグルチドによる治療を試みたところ、若干のインスリン分泌の改善と投与インスリン必要量の減少が観察された。この結果は動物モデルでの検討結果と一致する。

(8) 患者由来 iPS 細胞の樹立

「難治性疾患由来外来因子フリー人工多能性幹細胞の委託作製とバンク化」(研究代表:熊本大学 江良沢実教授)の協力により、患者細胞由来の iPS 細胞を樹立した。今後、この細胞を利用して、病態解明、治療法開発に死してゆく予定である。

(9) 患者支援の必要性

患者および家族からの聞き取り調査では、医療従事者の Wolfram 症候群に対する認知度が低く、疾患に対する理解が十分に行えていないことがうかがえた。このことは診断の遅れに繋がるばかりでなく、その後のケアが不十分になりやすい。つまり、早期に正確な診断がなされると、視力障害、聴覚障害に対する早期からの患者支援が可能となる。病期が進行した症例では、インスリン注射手技や尿道カテーテル管理などの内科的管理に難渋することが判明した。Wolfram 症候群の患者は様々な理由により早期死亡を来す。この点について、特に神経症状を来している症例では、中枢性呼吸障害が死因として重要であることが示唆された。

Wolfram 症候群についての認知度を高めるために学会、論文発表、あるいはHP等を介して情報発信をしてゆく必要がある。患者に対しても同様である。この目的を達するためのひとつの方策として、全国盲ろう者協会の会員向け情報誌に本疾患の紹介記事を掲載した。

D. 考察

本邦においても Wolfram 症候群は希少である。報告例の重複、網羅性について、1次調査からの推計には課題もあるが、日本での患者数は150から200人程度、人口比では英国とほぼ同程度と推定している。各症候の頻度については、欧米における報告に比べ難聴の発現頻度が高い傾向にあったものの、他の徴候については同等であった。

WFS1 遺伝子の同定によって、Wolfram 症候群の遺伝子診断が可能となった。英国では、糖尿病の発症を15歳以下、と発症年齢の基準を診断基準に加えたとき、Wolfram 症候群と臨床的に診断された患者の95%に *WFS1* 遺伝子変異が同定されている。今回の調査では、糖尿病発症年齢には基準を設けていないが、*WFS1* 遺伝子に変異が同定されたのは33例(29家系)中22例(18家系、62.1%)であった。*WFS1* 遺伝子異常症である Wolfram 症候群と、他の原因が推察されるもの間で、糖尿病や視神経萎縮の発症年齢について、また、その他の合併症候数にも有意差がなかった。遅発例においても *WFS1* 遺伝子変異が同定されていることから、現時点では発症年齢について stringent な基準を設け

るのは適切でないように思われる。

一方、今回の調査で、糖尿病、尿崩症の発症(診断)から11年後に始めて視神経萎縮が認められ、Wolfram 症候群の診断に至った1例が登録されている。診断時には視力障害がかなり進行しており、実際の視神経萎縮の発症はもっと前であったと推測されるが、従来の「糖尿病と視神経萎縮の合併」という診断基準では診断の遅れる症例があることは注意を要する。さらなる症例の蓄積や各徴候の発症時期、経過についての詳細な検討が必要である。根本的治療や予防の方法が確立されていない現状では、早期に診断することにより、将来避け得ない視力低下や神経症状をはじめとする他の徴候の出現に対して早期からの援助やリハビリの開始が重要となる。

Wolfram 症候群患者の視神経萎縮について、これまでに病理組織学的検討により眼底の網膜、特に網膜神経線維層が薄いことが明らかにされている。今回、OCTを用いて生体で網膜全層および網膜神経線維層が全体にわたって薄いことを観察し得た。特に網膜神経線維層の薄化は視神経萎縮を網膜への退行変性として生体でとらえたものとして貴重である。このことから、OCTを用いた網膜の観察が視神経萎縮進展の把握および病態解明に有用であることが示唆された。

WFS1 蛋白の機能については、小胞体での小胞体ストレスに関連する機能、特に、イオンチャネルまたはその機能を調節する作用によりカルシウムホメオスターシスの維持にかかわることが推測されてきたが、最近、ATF6を負に制御することにより、より直接的に小胞体ストレス応答に係わる可能性が示唆されている。さらに、今回我々の検討により、 β 細胞においては *WFS1* 蛋白がインスリン分泌顆粒にも存在し、顆粒内の低pH維持に必要であること、*WFS1* 蛋白がインスリン分泌調節に直接関与していることが明らかとなった。*WFS1* 蛋白の機能の解明は Wolfram 症候群の発症メカニズムの解明や治療薬の開発に必須である。

小胞体ストレスとの関連では、*WFS1* 蛋白質の欠損は動脈硬化を促進することが動物モデルで示された。Wolfram 症候群の患者は40歳台で死亡することも多く、これまで動脈硬化性疾患の合併についての報告はほとんど見られないが、今後、予後が改善するにつれて、動脈硬化性合併症が臨床的に問題となってくる可能性がある。

治療法の開発に関連して、肥満を合併する動物モデルで、*Wfs1* 欠損による糖尿病が pioglitazone により著明に抑制されることを報告してきた。さらに、インクレチン療法が Wolfram 症候群患者での β 細胞機能を改善することにより糖尿病の進行を遅延させる可能性が示唆された。 β 細胞死の

抑制、糖尿病の進行阻止に繋がるかが課題である。今後は患者由来 iPS 細胞も利用可能となっており、病態解明、治療法開発が加速されると期待している。

今回行った実態調査、患者・家族への聞き取り調査から、患者および医療従事者双方において本疾患の認知度の低さが浮き彫りとなった。今後、早期診断や患者福祉を充実させていくためには、個々の症例の情報の集積による実態把握に加えて疾患認知度の向上が不可欠である。そこで、今回我々はホームページ (<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~bara-a/wolfram/index.html>) を開設し、本疾患に関する知識の普及および患者同士や医療関係者間での情報の共有を目的として広く情報発信を行っている。さらに、集学的なケアと助言ができるリファレンスセンターの整備を進めつつあり、今回の調査に基づいて作成される診療指針を近くホームページで開示していく予定である。

E. 結論

日本での Wolfram 症候群の実態が明らかになりつつある。頻度は英国とほぼ同じと推測される一方、*WFS1* 遺伝子異常による比率は英国に比べると少なく、遺伝的により多様であることが示唆された。現在、次世代シーケンサーをもちいたエクソーム解析など、新たな手法によって原因遺伝子を同定することが可能になってきており、今後、今回 *WFS1* 遺伝子に変異が同定できなかった患者について、新たな原因遺伝子同定を試みたい。*WFS1* 遺伝子異常による患者の中には、糖尿病発症後、視神経萎縮による症状が顕在化する前に尿崩症が顕在化した例もあり、比較的まれな組み合わせである、糖尿病と尿崩症の合併をみた際にも Wolfram 症候群を疑って検査を進める必要があることが示唆され、早期診断を行う上で重要である。今後はさらに診断基準の検証と、診断後の診療指針の提案に向けて、患者の実態の詳細な検討を進める必要がある。

治療法開発に向けての基礎研究も順調に進みつつある。具体的な候補薬剤や、薬剤のターゲット分子も視野に入ってきているが、それらが果たして有効かどうかを検証するためには患者を対象とした臨床研究（試験）が欠かせない。この点においては、希少疾患であるだけに国際協力は必須である。国際的にも日、米、欧で Wolfram 症候群の成因解明と治療法開発に向けてコンソーシアムが形成されている (<http://asso.orpha.net/ASW/cgi-bin/index.php?lng=en>)。本研究班は上記活動の日本での核として期待されている。さらに、現在、樹立を目指しているヒト *WFS1* 欠損 iPS 細胞を用い

た薬剤スクリーニングシステムの確立により、より効果的な治療薬の探索が可能となることが期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Miyazaki M, Emoto M, Fukuda N, Hatanaka M, Taguchi A, Miyamoto S, Tanizawa Y. DOC2b is a SNARE regulator of glucose-stimulated delayed insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009, 384(4):461-465.
- Kawano J, Fujinaga R, Yamamoto-Hanada K, Oka Y, Tanizawa Y, Shinoda K. Wolfram syndrome 1 (*Wfs1*) mRNA expression in the normal mouse brain during postnatal development. *Neurosci Res.* 2009 64(2):213-230.
- Tanimura A, Yujiri T, Tanaka Y, Hatanaka M, Mitani N, Nakamura Y, Mori K, Tanizawa Y. The anti-apoptotic role of the unfolded protein response in Bcr-Abl-positive leukemia cells. *Leuk Res* 2009, 33: 924-928.
- Akiyama M, Hatanaka M, Ohta Y, Ueda K, Yanai A, Uehara Y, Tanabe K, Tsuru M, Miyazaki M, Saeki S, Saito T, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y. Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in *Wfs1* knockout mice. *Diabetologia.* 2009, 52(4):653-663.
- Fukuda N, Emoto M, Nakamori Y, Taguchi A, Miyamoto S, Uraki S, Oka Y, Tanizawa Y. DOC2B: a novel syntaxin-4 binding protein mediating insulin-regulated GLUT4 vesicle fusion in adipocytes. *Diabetes.* 2009, 58(2):377-384
- Hatanaka M, Tanabe K, Yanai A, Ohta Y, Kondo M, Akiyama M, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y. Wolfram syndrome 1 gene (*WFS1*) product localizes to secretory granules and determines granule acidification in pancreatic β -cells. *Hum Mol Genet.* 2011 20(7):1274-84.
- Tanabe K, Liu Y, Hasan SD, Martinez SC, Cras-Méneur C, et al. (2011) Glucose and Fatty Acids Synergize to Promote β -Cell Apoptosis through Activation of Glycogen Synthase Kinase β 3 Independent of JNK Activation. *PLoS ONE* 2011 6(4):e18146.
- Gao J, Ishigaki Y, Yamada T, Kondo K, Yamaguchi S, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Sawada S, Ishihara H, Oyadomari S, Mori M, Oka Y, Katagiri H. Involvement of Endoplasmic Stress Protein C/EBP Homolo-

gous Protein in Arteriosclerosis Acceleration With Augmented Biological Stress Responses. *Circulation*. 124(7):830-9,2011

- 太田康晴、谷澤幸生 膵β細胞死 臨床検査 2010 54(9):1040-1047.
- 松永仁恵、谷澤幸生 Wolfram 症候群 月刊糖尿病 2011 3(4):50-57.
- 谷澤幸生 糖尿病の遺伝子診断・治療と生命倫理 糖尿病ナビゲータ 第2版(編集 門脇孝) 2010 メディカルレビュー社 324-325.
- 田部勝也、谷澤幸生 特集;膵β細胞増殖を調節するシグナル、インスリンシグナル(3)Glycogen synthase kinase-3β(GSK-3β)による膵β細胞増殖の制御 内分泌・糖尿病・代謝内科 科学評論社 2010 30(1) 25-30.
- 谷澤幸生 糖尿病性ケトアシドーシス 今日の治療指針 2011(山口徹 北原光夫 福井次矢総編集) 医学書院 2011 643-644.
- 松原 淳、谷澤幸生 インスリン製剤の種類と特性 最新インスリン療法(編集荒木栄一 綿田裕孝) 中山書店 2011 23-31.

2. 学会発表

- Tanizawa Y. Beta cell failure in type 2 diabetes. Asian Diabetes Forum in Tokushima 2010, Aug.11,2010,Tokushima, Japan.
- Hatanaka M., Tanabe K., Ohta Y., Yanai A., Akiyama M., Kondo M., Shinoda K., Oka Y. Tanizawa Y. Wolfram syndrome 1 gene(wfs1)product localizes to insulin granule in mouse pancreatic beta cells. The 2nd Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, May 28-29, 2010, Okayama, Japan.
- Matsui K., Emoto M., Miyamoto S., Tanizawa Y. A role for SNARE binding protein p34 in GLUT4-vesicle recycling. The 2nd Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes, May 28-29, 2010, Okayama, Japan.
- Hatanaka M., Tanabe K., Ohta Y., Yanai A., Akiyama M., Kondo M., Shinoda K., Oka Y. Tanizawa Y. Wolfram Syndrome 1 Gene(wfs1)Product Localizes to Secretory Granule and Contributes to Maintenance of Granular Acidification in Pancreatic Beta Cells. 70th Annual Meeting and Scientific Sessions of the American Diabetes Association, June 25 - 29, 2010, Orlando, FL,USA.
- Nakabayashi H, Tanabe K., Oka Y., Hatanaka M., Kondo M., Emoto M., Tanizawa Y. Glycogen synthase Kinase 3 Promotes ATF4 Protein Degradation in Pancreatic Beta Cell During ER Stress. 8th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress, Oct.17 - 20, 2010, Busan, Korea.
- Kondo M., Ohta Y., Hatanaka M, Tanabe K., Tanizawa Y. Chronic Administration of Exendin-4 Improves Glucose Tolerance and Insulin Secretion. 8th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress (Abstract 173P), Oct.17 - 20, 2010, Busan, Korea.
- Tanizawa Y. Genetic and acquired factors determining natural history of type 2 diabetes mellitus. The 3th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes(Abstract 17P), July 22-24, 2011, Beijing, China.
- Matsunaga K., Tanabe K., Ohta Y., Okuya S., Tanizawa Y. The cross sectional analysis on genetic and clinical features of Japanese patient with Wolfram syndrome. The 3th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes(Abstract 21P), July 22-24, 2011, Beijing, China.
- Ohta Y., Kondo M., Hatanaka M., Tanabe K., Yamamoto M., Nakabayashi H., Tanizawa Y. Pioglitazone induces islet adrenomedullin expression and attenuates beta-cell ER stress. The 3th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes(Abstract 45P), July 22-24, 2011, Beijing, China.
- Ohta Y., Nakabayashi H.,Tanabe K.,Kondo M.,Tanizawa Y. Pioglitazone Prevents ER Stress-induced Beta-cell Death via Adrenomedullin Expression. The 16th Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus, (Abstract 122p) Oct.21-22, 2011, Urayasu, Japan.
- Matsunaga K.,Tanabe K.,Ohta Y.,Okuya S.,Tanizawa Y. The Cross Sectional Analysis on Genetic and Clinical Features of Japanese Patients. The 16thJapan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus, (Abstract 122p) Oct.21-22, 2011, Urayasu, Japan.
- 松井久未子、谷澤幸生 SNARE 結合蛋白 P34 は脂肪細胞における糖輸送を調節する 第53回日本糖尿病学会年次学術集会(平成22年5月27-29日 岡山市)
- 角田宇衣子、檜尾好徳、石垣 泰、安田和基、谷澤幸生、今井 潤、片桐秀樹、岡 芳知 Apaf1-interacting protein(APIP)遺伝子多型と2型糖尿病との相関研究 第53回日本糖尿病学会年次学術集会(平成22年5月27-29日 岡山市)
- 田部勝也、MA Permutt、谷澤幸生 The roles of glycogen synthase kinase-3β in the regulation of β-cell mass in insulin resistant diabetes models 第53回日本糖尿病学会年次

- 学術集会 (平成22年5月27-29日 岡山市)
- 江本政広、福田尚文、谷澤幸生 GLUT4-vesicle fusion: Role of SNARE regulator DOC2b and calcium 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成22年5月27-29日 岡山市)
 - 近藤 学、太田康晴、幡中雅行、田部勝也、谷澤幸生 GLP-1 アナログ Exendin-4 は Wfs1 欠損マウスの耐糖能を改善する 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成22年5月27-29日 岡山市)
 - 太田康晴、近藤 学、幡中雅行、田部勝也、中林容子、谷澤幸生 ピオグリタゾンのもつ膵β細胞の保護作用における膵ラ氏島でのアドレノメデュリンの発現意義 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成22年5月27-29日 岡山市)
 - 田部勝也、太田康晴、奥屋 茂、和田安彦、山田祐一郎、岡 芳知、谷澤幸生 Wolfram 症候群の実態調査 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成22年5月27-29日 岡山市)
 - 奥屋 茂、田部勝也、江本政広、太田康晴、谷澤幸生 新規 Glut 4 結合蛋白 p61 は脂肪細胞の Glut4 エンドサイトーシスに影響を及ぼす 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成22年5月27-29日 岡山市)
 - 谷澤幸生 糖尿病における細胞障害メカニズム: Wolfram 症候群におけるβ細胞障害-ER stress and beyond- 第25回日本糖尿病合併症学会 (平成22年10月22-23日 大津市)
 - 山本将義、太田康晴、薄陽祐、田部勝也、近藤学、幡中雅行、中林容子、谷澤幸生 膵ラ氏島における Arnt の発現には概日リズムが認められる 日本糖尿病学会中国四国地方会第48回総会 (平成22年10月29-30日 松山市)
 - 中林容子、田部勝也、太田康晴、幡中雅行、近藤 学、江本政広、谷澤幸生 セリン・スレオニンキナーゼ GSK-3 は ATF 4 を抑制的に調節する 日本糖尿病学会中国四国地方会第48回総会 (平成22年10月29-30日 松山市)
 - 田部勝也、幡中雅行、太田康晴、谷澤幸生 膵β細胞量調節におけるセリン・スレオニンキナーゼ GSK-3β の役割 日本糖尿病学会中国四国地方会第48回総会 (平成22年10月29-30日 松山市)
 - 太田康晴、近藤 学、幡中雅行、田部勝也、山本将義、中林容子、谷澤幸生 ピオグリタゾンによる膵ラ氏島でのアドレノメデュリンの発現誘導と膵β細胞保護作用 第22回分子糖尿病学シンポジウム (平成22年12月4日 東京)
 - 松井久未子、福田尚文、江本政広、谷澤幸生 SNARE 結合蛋白 p34 は脂肪細胞における糖輸送を調節する 第84回日本内分泌学会学術総会 (平成23年4月21-23日 神戸市)
 - Tanabe K., Tanizawa Y. Roles of Wolfram Syndrome 1 Gene Product (WFS1) on Beta Cell Function and its Adaptation to increased Insulin Demand 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成23年5月19日、20日、21日 札幌市)
 - 松永仁恵、田部勝也、太田康晴、奥屋 茂、和田安彦、山田祐一郎、雨宮 伸、杉原茂孝、岡芳知、谷澤幸生 Wolfram 症候群の実態調査 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成23年5月19日、20日、21日 札幌市)
 - 太田康晴、近藤 学、幡中雅行、田部勝也、中林容子、山本将義、谷澤幸生 ピオグリタゾンによる膵ラ氏島でのアドレノメデュリンの発現誘導と膵β細胞保護作用に関する検討 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成23年5月19日、20日、21日 札幌市) 抄録集
 - 中林容子、田部勝也、太田康晴、幡中雅行、近藤 学、江本政広、谷澤幸生 セリン・スレオニンキナーゼ GSK-3 は ATF4 を抑制的に調節する 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 (平成23年5月19日、20日、21日 札幌市)
 - 高 俊弘、石垣 泰、澤田 正二郎、近藤 敬一、井泉 知仁、宇野 健司、長谷川 豊、山口 賢、金子慶三、突田 壮平、高橋 圭、今井 淳太、山田 哲也、石原 寿光、岡 芳知、片桐 秀樹 動脈硬化発症・進展における WFS1 の役割の検討 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011年5月19日-21日 札幌
 - 薄井 正寛、石原 寿光、鈴木 千登世、山口 賢、石垣 泰、福本 学、森 和俊、岡 芳知、片桐 秀樹 TF6α 欠損マウスを用いた、ATF6α 欠損が耐糖能に与える影響についての検討 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011年5月19日-21日 札幌
 - 丹治 泰裕、山口 賢、薄井 正寛、富永 竜、近藤 敬一、石垣 泰、岡 芳知、片桐 秀樹、石原 寿光 WFS1 遺伝子欠損マウスにおける DPP-4 阻害薬 (vildagliptin) の膵β細胞保護効果の検討 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011年5月19日-21日 札幌
 - 近藤 学、田部勝也、幡中雅行、太田康晴、岡芳知、谷澤幸生 Wfs1 欠損マウスにおけるインスリン分泌動態の解析 第23回分子糖尿病学シンポジウム (平成23年11月26日 熊本市)
 - 和田安彦、古川弘子、松永仁恵、田部勝也、谷澤幸生. Wolfram 症候群の全国頻度調査と患者家族が必要としている社会的支援. 第82回日本衛生学会学術総

会、2012年3月24～26日、京都

H. 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）

- 片桐 秀樹 河北新報 動脈硬化の発症
特定タンパク質が関与 東北大グループ解明
2011年8月2日
- 片桐 秀樹 日経産業新聞 動脈硬化の発症
に關係 たんぱく質を特定 東北大マウス実
験 2011年8月2日

- 片桐 秀樹 Yahoo!JAPAN ニュース、
asahi.com（時事通信社） 動脈硬化の新たな
仕組み解明＝予防・治療法開発に期待—東北
大 2011年8月2日
- 和田安彦、古川弘子、谷澤幸生. ウォルフラ
ム症候群の患者さんへ、もしくは未だ診断さ
れていない方へ—同じ病気を持つ人々の結
集に向けて. In: SSK 盲ろう者の専門誌 コ
ミュニカ No. 43. 東京：社会福祉法人 全
国盲ろう者協会；2011. p 63-66.

研究奨励分野 研究対象 疾患概要

【疾患名】	Wolfram症候群（ウォルフラム症候群）
【患者数】	150から200人と推定される。
【概要】	<p>若年発症の糖尿病が初発症状となり、次いで視神経萎縮により視力障害を来す。この2つの特徴的な症候の合併により診断される。常染色体劣性遺伝性疾患。</p> <p>糖尿病と視神経萎縮に加えて内分泌代謝系、精神神経系を広範に障害し、尿崩症、難聴、尿路異常、多彩な神経・精神症状などを合併する。主要徴候を英語で現したときの頭文字を取ってDIDMOAD症候群と呼ばれることもある。</p>
【原因の解明】	<p>原因遺伝子 <i>WFS1</i> が1998年に同定され、遺伝子診断が可能になった。日本人の患者では約60%にこの遺伝子に変異が同定されている。<i>WFS1</i> 遺伝子にコードされる蛋白、WFS1蛋白 (wolframin) は主に細胞内小器官である小胞体に存在し、この蛋白を欠損する細胞は小胞体ストレスに脆弱であることが示されている。また、インスリンを分泌する膵臓のβ細胞では小胞体に加えてインスリン分泌顆粒にも存在していることが最近明らかになっている。しかしながらこの蛋白の機能や、症候の発症メカニズムについては依然不明な点が多い。</p> <p><i>WFS1</i> 遺伝子に変異が同定できないWolfram症候群患者も存在し、多様性がある。最近、WFS2としてCISD2遺伝子が同定されたがヨルダン以外の患者での報告はない。</p>
【主な症状】	<p>典型例では10歳前後に発症するインスリン依存性の糖尿病が初発症状となる。やや遅れて視神経萎縮による視力障害が発症し、失明に至りうる。この2つの徴候の合併によりウォルフラム症候群の診断がなされている。</p> <p>その他、中枢性尿崩症、聴力障害(感音性難聴)や尿路異常(水腎症、尿管の拡大)、神経症状(脳幹・小脳失調、けいれん)、精神症状(抑鬱、双極性障害など)を種々の組み合わせで合併し、これらの症候に伴う多彩な症状を呈する。</p> <p>症候は一般に進行性であるが、症例あるいは病期により、一部の症候のみを呈する場合がある。</p>
【主な合併症】	<p>主な症状の欄に記したように多彩な症候を合併する。</p> <p>尿路異常に伴う腎不全や、加えての神経症状を誘因とする種々の感染症などが生命予後を決定しうる。自殺もまれではない。</p>
【主な治療法】	<p>糖尿病に対してはインスリン療法、尿崩症に対してはデスモプレシンの投与が行われる。その他、必要な対症療法、支持療法が行われる。根本的な治療は確立されていない。</p>
【研究班】	Wolfram 症候群の実態調査に基づく早期診断法の確立と診療指針作成のための研究班

Wolfram 症候群 診断基準 (案)

厚生労働科学研究(難治性疾患克服研究事業)「Wolfram 症候群の実態調査に基づく早期診断法の確立と診療指針作成のための研究」班

必須項目

1. 糖尿病(通常、インスリン依存状態に至る)
2. 視神経萎縮

参考項目

1. 感音性難聴
2. 中枢性尿崩症
3. 尿路異常(水腎症、尿管の拡大、無力性膀胱など)
4. 神経症状(脳幹・小脳失調、ミオクローヌスなど)
5. 精神症状(うつ、情動障害など)

診断

必須項目 1 及び 2 の合併をもって診断する。糖尿病は 10 代までに発症することが多い。参考項目にあげた徴候を種々の組み合わせで合併する。

注)

- 抗 GAD 抗体は陰性
- 糖尿病は通常インスリン依存状態に至るが、インスリン分泌は完全には廃絶しないことがある。
- 参考項目を含む主要徴候(Diabetes Insipidus(尿崩症), Diabetes Mellitus(糖尿病), Optic Atrophy(視神経萎縮), Deafness(難聴))の頭文字を取って、DIDMOAD 症候群とも呼ばれる。

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tominaga R, Yamaguchi S, Satake C, Usui M, Tanji Y, Kondo K, Katagiri H, Oka Y , Ishihara H.	The JNK pathway modulates expression and phosphorylation of the translational suppressor 4E-BP1 in MIN6 pancreatic b cells under oxidative stress conditions.	Cell Biochemistry & Function	28(5)	387-93	2010
Hosaka M, Mimura A, Asayama K, Ohkubo T, Hayashi K, Kikuya M, Sato M, Hashimoto T, Kanno A, Hara A, Obara T, Metoki H, Inoue R, Hoshi H, Satoh H, Oka Y , Imai Y.	Relationship of dysregulation of glucose metabolism with white-coat hypertension: the Ohasama study.	Hypertension Research	33	937-43	2010
Suzuki T, Imai J, Yamada T, Ishigaki Y, Kaneko K, Uno K, Hasegawa Y, Ishihara H, Oka Y , Katagiri H.	Interleukin-6 enhances glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic β -cells: potential involvement of the PLC-IP3 dependent pathway.	Diabetes	60(2)	537-47	2010
Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyama A, Ono H, Fujishiro M, Horike N, Yoneda M, Ohno H, Tsuchiya Y, Kamata H, Tahara H, Isobe T, Nishimura F, Katagiri H, Oka Y , Fukushima T, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T, Asano T.	Pin1 associates with and induces translocation of CRTC2 to the cytosol, thereby suppressing cAMP-responsive element transcriptional activity.	J Biol Chem	285(43)	33018-27	2010
Eshak ES, Iso H, Date C, Kikuchi S, Watanabe Y, Wada Y , Wakai K, Tamakoshi A; JACC Study Group.	Dietary fiber intake is associated with reduced risk of mortality from cardiovascular disease among Japanese men and women.	J Nutr.	140	1445-53	2010
Inoue Y, Wada Y , Motohashi Y, Koizumi A.	I History of blood transfusion before 1990 is associated with increased risk for cancer mortality independently of liver disease: a prospective long-term follow-up study.	Environ Health Prev Med.	15	180-187	2010
Levy-Marchal C, Arslanian S, Cutfield W, Sinaiko A, Druetl C, Marcovecchio ML, Chiarelli F, on behalf of ESPE-LWPES-ISPAD-APPES-APEG-SLEP-JSPE and the Insulin Resistance in Children Consensus Conference Group (Amemiya S as a representative of JSPE):	Insulin Resistance in Children: Consensus, Perspective and Future Directions Metab	J Clin Endocrinol Metab	95(12)	5189-5198	2010
Okada T, Ohzeki T, Nakagawa Y, Sugihara S , et al.	Impact of leptin and leptin-receptor gene polymorphisms on serum lipids in Japanese obese children	Acta Paediatrica	99	1213-1217	2010
Hatanaka M, Tanabe K, Yanai A, Ohta Y, Kondo M, Akiyama M, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y .	Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product localizes to secretory granules and determines granule acidification in pancreatic β -cells.	Hum Mol Genet.	20	1274-84	2011
Tanabe K, Liu Y, Hasan SD, Martinez SC, Cras-Méneur C, Welling CM, Bernal-Mizrachi E, Tanizawa Y , Rhodes CJ, Zmuda E, Hai T, Abumrad NA, Permutt MA.	Glucose and Fatty Acids Synergize to Promote B-Cell Apoptosis through Activation of Glycogen Synthase Kinase 3 β Independent of JNK Activation.	PLoS ONE	6	e18146	2011
Tanimura A, Yujiri T, Tanaka Y, Tanaka M, Mitani N, Nakamura Y, Ariyoshi K, Tanizawa Y	Activation of the unfolded protein response in primary acute myeloid leukemia cells	Int J Hematol	94	300-302	2011

Narita T, Goto T, Suganuma Y, Hosoba M, Morii T, Sato T, Fujita H, Miura T, Shimotomai T, <u>Yamada Y</u> , Kakei M	Efficacy and safety of patient-directed titration of once-daily pre-dinner premixed biphasic insulin aspart 70/30 injection in Japanese type 2 diabetic patients with oral antidiabetic drug failure: STEP-AKITA study.	J Diabetes Invest	2(1)	63-70	2011
Ogawa E, Hosokawa M, Harada N, Yamane S, Hamasaki A, Toyoda K, Fujimoto S, Fujita Y, Fukuda K, Tsukiyama K, <u>Yamada Y</u> , Seino Y, Inagaki N	The effect of gastric inhibitory polypeptide on intestinal glucose absorption and intestinal motility in mice.	Biochem Biophys Res Commun	404(1)	115-120	2011
Kawasaki Y, Harashima S, Sasaki M, Mukai E, Nakamura Y, Harada N, Toyoda K, Hamasaki A, Yamane S, Yamada C, <u>Yamada Y</u> , Seino Y, Inagaki N	Exendin-4 Protects Pancreatic Beta Cells from the Cytotoxic Effect of Rapamycin by Inhibiting JNK and p38 Phosphorylation.	Horm Metab Res	42(5)	311-317	2011
Mineharu Y, Koizumi A, <u>Wada Y</u> , Iso H, Watanabe Y, Date C, Yamamoto A, Kikuchi S, Inaba Y, Toyoshima H, Kondo T, Tamakoshi A	Coffee, green tea, black tea and oolong tea consumption and risk of mortality from cardiovascular disease in Japanese men and women.	J Epidemiol Community Health.	65	230-40	2011
Onoyama I, Suzuki A, Matsumoto A, Tomita K, <u>Katagiri H</u> , Oike Y, Nakayama K, Nakayama KI.	Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver.	J Clin Invest	121(1)	342-354	2011
Ohno H, Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyama A, Ono H, Fujishiro M, Otani Y, Okubo H, Yoneda M, Fukushima T, Kamata H, Nishimura F, Kurihara H, <u>Katagiri H</u> , Oka Y, Asano T.	4F2hc stabilizes GLUT1 protein and increases glucose transport activity.	Am J Physiol Cell Physiol	300(5)	C1047-54	2011
Kudo H, Emi M, Ishigaki Y, Tsunoda U, Hinokio Y, Ishii M, Sato H, Yamada T, <u>Katagiri H</u> , <u>Oka Y</u> .	Frequent loss of genome gap region in 4p16.3 subtelomere in early-onset type 2 diabetes mellitus.	Exp Diabetes Res		498460	2011
Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyama A, Zhang J, Ono H, Fujishiro M, Kikuchi T, Fukushima T, Yoneda M, Ohno H, Horike N, Kanna M, Tsuchiya Y, Kamata H, Nishimura F, Isobe T, Ogihara T, <u>Katagiri H</u> , <u>Oka Y</u> , Takahashi S, Kurihara H, Uchida T, Asano T.	Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 associates with insulin receptor substrate-1 and enhances insulin actions and adipogenesis.	J Biol Chem	286(23)	20812-22	2011
Sugita S, Kamei Y, Akaike F, Suganami T, Kanai S, Hattori M, Manabe Y, Fujii N, Takai-Igarashi T, Tadaishi M, Oka J, Aburatani H, Yamada T, <u>Katagiri H</u> , Kakehi S, Tamura Y, Kubo H, Nishida K, Miura S, Ezaki O, Ogawa Y.	Increased systemic glucose tolerance with increased muscle glucose uptake in transgenic mice overexpressing RXR γ in skeletal muscle.	PLoS One	6(5)	e20467	2011
Gao J, Ishigaki Y, Yamada T, Kondo K, Yamaguchi S, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Sawada S, Ishihara H, Oyadomari S, Mori M, <u>Oka Y</u> , <u>Katagiri H</u>	Involvement of Endoplasmic Stress Protein C/EBP Homologous Protein in Arteriosclerosis Acceleration With Augmented Biological Stress Responses.	Circulation	124(7)	830-9	2011
Uno K, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Matsusue K, Yamazaki T, <u>Oka Y</u> , <u>Katagiri H</u> .	Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- γ -fat-specific protein 27 pathway contributes to obesity-related hypertension via afferent vagal signals.	Eur Heart J		In Press	2011

Toshihiro M, <u>Katagiri H</u> , Kataoka K, Fukushima A, Segawa T, Fujiwara T, Hikichi I, Takebe N, Satoh J.	Recurrent hypoglycemia during pregnancies in a woman with multiple autoantibodies including anti-insulin receptor antibody and anti-platelet antibody, whose serum lowered murine blood glucose levels and phosphorylated insulin receptor of CHO-IR cells.	Endocr J	58(12)	1037-43	2011
Fujita H, Sakamoto T, Komatsu K, Fujishima H, Morii T, Narita T, Takahashi T, <u>Yamada Y</u> .	Reduction of circulating superoxide dismutase activity in type 2 diabetic patients with microalbuminuria and its modulation by telmisartan therapy.	Hypertens Res	34(12)	1302-8	2011
Ehab S. Eshak, Hiroyasu Iso, Chigusa Date, Kazumasa Yamagishi, Shogo Kikuchi, Yoshiyuki Watanabe, <u>Yasuhiko Wada</u> , Akiko Tamakoshi, and JACC Study Group.	Rice Intake Is Associated with Reduced Risk of Mortality from Cardiovascular Disease in Japanese Men but Not Women.	J. Nutr.	141	595-602	2011
Akio Koizumi, Kouji H. Harada, Tamon Niisoe, Ayumu Adachi, Yukiko Fujii, Toshiaki Hitomi, Hatasu Kobayashi, <u>Yasuhiko Wada</u> , Takao Watanabe and Hirohiko Ishikawa.	Preliminary assessment of ecological exposure of adult residents in Fukushima prefecture to radioactive cesium through ingestion and inhalation.	Environ. Health Prev. Med.	Online First, Nov. 9		2011
Hasegawa Y, Saito T, Ogihara T, Ishigaki Y, Yamada T, Imai J, Uno K, Gao J, Kaneko K, Shimosawa T, Asano T, Fujita T, <u>Oka Y, Katagiri H</u> .	Blockade of the NF- κ B Pathway in the Endothelium Prevents Insulin Resistance and Prolongs Lifespans.	Circulation	125(9)	1122-1133	2012
Usui M, Yamaguchi S, Tanji Y, Tominaga R, Ishigaki Y, Fukumoto M, <u>Katagiri H</u> , Mori K, <u>Oka Y</u> , Ishihara H.	Atf6 α -null mice are glucose intolerant due to pancreatic β -cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance.	Metabolism		In Press	2012
Fujita H, Fujishima H, Morii T, Sakamoto T, Komatsu K, Hosoba M, Narita T, Takahashi K, Takahashi T, <u>Yamada Y</u> .	Modulation of renal superoxide dismutase by telmisartan therapy in C57BL/6-Ins2(Akita) diabetic mice.	Hypertens Res	35(2)	213-20	2012
Narita T, Yokoyama H, Yamashita R, Sato T, Hosoba M, Morii T, Fujita H, Tsukiyama K, <u>Yamada Y</u> .	Comparisons of the effects of 12-week administration of miglitol and voglibose on the responses of plasma incretins after a mixed meal in Japanese type 2 diabetic patients.	Diabetes Obes Metab	14(3)	283-7	2012
Sugihara S, Ogata T, Kawamura T, Urakami T, Takemoto K, Kikuchi N, Takubo N, Tsubouchi K, Horikawa R, Kobayashi K, Kasahara Y, Kikuchi T, Koike A, Mochizuki T, Minamitani K, Takaya R, Mochizuki H, Nishii A, Yokota I, Kizaki Z, Mori T, Shimura N, Mukai T, Matsuura N, Fujisawa T, Ihara K, Kosaka K, Kizu R, Takahashi T, Matsuo S, Hanaki K, Igarashi Y, Sasaki G, Soneda S, Teno S, Kanzaki S, Saji H, Tokunaga K, <u>Amemiya S</u>	HLA-class II and class I genotypes among Japanese children with Type 1A diabetes and their families.	Pediatr Diabetes	13(1)	33-44	2012
<u>Sugihara S</u> , Ogata T, Kawamura T, et al.	HLA-Class II and Class I Genotypes among Japanese Children with Type 1A Diabetes and Their Families.	Pediatric Diabetes	13	33-44	2012
雨宮 伸	糖尿病の子どもと学校教育	教育と医学	685(7)	658-667	2010

太田康晴、 <u>谷澤幸生</u>	膝β細胞死	臨床検査	54	1040-1047	2010
<u>谷澤幸生</u>	糖尿病の遺伝子診断・治療と生命倫理	糖尿病ナビゲータ 第2版(編集 門脇 孝)		324-325	2010
<u>中尾雄三</u>	抗アクアポリン 4抗体陽性視神経炎について教えてください	あたらしい眼科臨時増刊号2010	27	237-239	2010
<u>中尾雄三</u>	眼から見たMSとNMO	Brain Medical	22	359-364	2010
<u>中尾雄三</u>	神経疾患と眼	日本医師会雑誌	139	1658-1661	2010
<u>中尾雄三</u>	視神経炎と抗アクアポリン4抗体	日本の眼科	81	725-726	2010
和田安彦、古川弘子、 <u>谷澤幸生</u>	ウォルフラム症候群の患者さんへ、もしくは未だ診断されていない方へ - 同じ病気を持つ人々の結集に向けて.	SSK 盲ろう者の専門誌 コミュニカ	No. 43	63-66	2011
<u>雨宮 伸</u> (責任編集者)	小児・思春期糖尿病管理の手引き(改訂第3版) コンセンサス・ガイドライン、日本糖尿病学会・日本小児内分泌学会編				南江堂、2011
<u>雨宮 伸</u>	ライフステージに応じた糖尿病治療; 子どもが注意すべきこと。	からだの科学	269	114-118	2011
<u>和田安彦</u> 、小泉昭夫.	遺伝疫学. In: 塩谷隆信, 編. 遺伝性出血性末梢血管拡張症(HHT)の診療マニュアル.	東京: 中外医学社		11-16	2011
<u>雨宮 伸</u>	小児・思春期糖尿病における日本人の特性と今後課題	日児誌	115(1)	13-19	2011
<u>雨宮 伸</u>	小児におけるインスリン抵抗性: コンセンサス、展望および将来の方向性 (翻訳)	日児誌	115(1)	20-32	2011
松永仁恵、 <u>谷澤幸生</u>	Wolfram症候群	月刊糖尿病	3	50-57	2011
<u>杉原茂孝</u>	「小児保健の現状と課題、提言」糖尿病からみて	小児保健研究	70	41-45	2011
<u>杉原茂孝</u>	小児・ヤング1型糖尿病、特集1型糖尿病の臨床: エビデンスに基づいた診断と治療	月刊糖尿病	3	1783-1786	2011
松岡尚史, <u>杉原茂孝</u>	1型糖尿病と運動療法. 特集年代別・疾患別にみた小児のスポーツ医学	臨床スポーツ医学	28	191-195	2011
小林靖幸, <u>杉原茂孝</u> , 田中葉子, 他	小児生活習慣病検診における食後採血での基準値の検討.	日本小児科学会雑誌	115	1255-1264	2011
<u>中尾雄三</u>	眼が赤い	あたらしい眼科	28	1513	2011
<u>中尾雄三</u>	うっ血乳頭・脳静脈洞血栓症	眼科診療クオリファイ	9	131-133	2011
<u>中尾雄三</u>	虚血性視神経症	今日の治療指針	2011	1259-1260	2011
<u>谷澤幸生</u>	糖尿病性ケトアシドーシス	今日の治療指針2011		643-644	2011
松原 淳、 <u>谷澤幸生</u>	インスリン製剤の種類と特性	最新インスリン療法		23-31	2011
<u>杉原茂孝</u>	2型糖尿病—ライフサイクルからみたその発症予防 特集小児糖尿病最近の知見	小児科	53	295-301	2012
立川恵美子, <u>杉原茂孝</u>	2型糖尿病の子どもの治療の進歩 特集小児における糖尿病看護	小児看護	35	170-176	2012
<u>中尾雄三</u>	視神経管骨折	専門医のための眼窩診療クオリファイ	10	239-242	2012
<u>中尾雄三</u>	眼精疲労	今日の治療指針	2012	1215-1216	2012
福岡勇樹、成田琢磨、小川正樹、佐藤朗、寺田幸弘、松田亜希奈、保泉学、梅津香織、佐藤雄大、石川素子、細葉美穂子、森井幸、藤田浩樹、 <u>山田祐一郎</u>	妊娠後期に尿崩症が顕在化した糖尿病合併妊娠の1例	糖尿病	in press		

The JNK pathway modulates expression and phosphorylation of 4E-BP1 in MIN6 pancreatic β -cells under oxidative stress conditions

Ryu Tominaga¹, Suguru Yamaguchi^{1,2}, Chihiro Satake¹, Masahiro Usui¹, Yasuhiro Tanji¹, Keiichi Kondo¹, Hideki Katagiri³, Yoshitomo Oka^{1*} and Hisamitsu Ishihara^{1,4}

¹Division of Molecular Metabolism and Diabetes, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Miyagi, Japan

²Institute for International Advanced Research and Education, Tohoku University, Sendai, Miyagi, Japan

³Division of Advanced Therapeutics for Metabolic Diseases, Center for Translational and Advanced Animal Research, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

⁴Division of Diabetes and Metabolism, Nihon University School of Medicine, Itabashi, Tokyo, Japan

Stress-mediated apoptosis may play a crucial role in loss of pancreatic β -cell mass, contributing to the development of diabetes. We have recently identified that translational control involving the translational suppressor eIF4E binding protein-1 (4E-BP1) which is important for β -cell survival under endoplasmic reticulum (ER) stress. The *Eif4ebp1* gene, encoding 4E-BP1, is a direct target of a transcription factor activating transcription factor-4 (ATF4), a master regulator of gene expression in stress responses. In the current study, we investigated 4E-BP1 expression in mouse insulinoma line 6 (MIN6) cells treated with arsenite, an inducer of oxidative stress which is another contributor of β -cell loss. We found that arsenite-induced 4E-BP1 expression level was lower than that induced by thapsigargin, an ER stress inducer, although ATF4 was similarly induced by these agents. The ratio of the dephosphorylated form of 4E-BP1, which has the highest activity, to phosphorylated forms was, however, greater in MIN6 cells treated with arsenite as compared to that in thapsigargin-treated cells. Arsenite-induced 4E-BP1 mRNA and protein expressions were augmented by simultaneous treatment with a c-Jun N-terminal kinase (JNK) specific inhibitor, SP600125. The agent also suppressed the level of the dephosphorylated form of 4E-BP1 in arsenite-treated MIN6 cells. Thus, JNK activated by oxidative stress is involved in the modulation of 4E-BP1 expression and phosphorylation in MIN6 cells, which may contribute to fine tuning of translational control under stress conditions. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS — oxidative stress; ER stress; 4E-BP1; JNK; pancreatic β -cells

ABBREVIATIONS — **ATF4**, activating transcription factor-4; **ATF6**, activating transcription factor-6; **CHOP**, C/EBP-homologous protein; **eIF2 α** , eukaryotic initiation factor-2 α ; **eIF4E**, eukaryotic initiation factor 4E; **ER**, endoplasmic reticulum; **GRP78**, glucose-regulated protein 78kDa; **IRE1**, inositol requiring enzyme-1; **ISR**, integrated stress response; **JNK**, c-Jun N-terminal kinase; **MIN6**, mouse insulinoma line 6; **mTOR**, mammalian target of rapamycin; **PERK**, PKR (double-stranded-RNA-dependent protein kinase)-like endoplasmic reticulum kinase; **PI3K**, phosphoinositide 3-kinase; **4E-BP1**, eIF4E binding protein-1;

INTRODUCTION

Decreased pancreatic β -cell mass is a common feature in subjects with type 2 diabetes mellitus.^{1,2} Stress-mediated apoptosis is considered as one of the causes of β -cell loss. Pancreatic β -cells are vulnerable to a variety of stress conditions: continuous and abundant production of insulin renders β -cells vulnerable to Endoplasmic reticulum (ER) stress.³ Low levels of expression of anti-oxidant proteins

make this cell types prone to oxidative stress-mediated cell damage.⁴ Furthermore, β -cells have been documented to be more sensitive to hypoxic conditions.⁵

ER stress is triggered when the amount of unfolded and misfolded proteins exceeds the folding capacity of the ER. To cope with this stress, cells activate intracellular signaling pathways, termed the unfolded protein response (UPR).⁶ Transducers of the UPR include three ER transmembrane proteins: PKR (double-stranded-RNA-dependent protein kinase)-like ER kinase (PERK), inositol requiring enzyme-1 (IRE1), and activating transcription factor-6 (ATF6). These ER stress sensor proteins initiate three arms of UPR to maintain ER homeostasis. The first step against ER stress is to prevent the accumulation of newly

* Correspondence to: Y. Oka, Division of Molecular Metabolism and Diabetes, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8575, Japan. Tel: +81 22 717 7611, Fax: +81 22 717 7612. E-mail: oka-y@mail.tains.tohoku.ac.jp

Received 29 September 2009

Revised 23 February 2010

Accepted 29 March 2010

synthesized protein. Activation of PERK phosphorylates the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α), which inhibits protein synthesis and hence decreases the protein load on the ER. Phosphorylation of eIF2 α is also induced by a variety of stress stimuli. Depending on the nature of the stress stimuli, eIF2 α can be phosphorylated by four different eIF2 α kinases: PKR which is stimulated by viral infection, general control non-derepressible-2 (GCN2) activated by amino acid starvation, PERK stimulated by disrupted ER homeostasis and heme-regulated inhibitor (HRI) activated by iron deficiency.⁷ Global attenuation of protein biosynthesis then paradoxically increases expressions of several proteins including the transcription factor activating transcription factor-4 (ATF4).⁸ This eIF2 α phosphorylation-dependent, stress-inducible pathway has been referred to as the integrated stress response (ISR).^{8,9}

We have recently shown that the *Eif4ebp1* gene, encoding eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1 (4E-BP1), a translational suppressor, is a direct target of the transcription factor ATF4, and demonstrated that translational control mediated by 4E-BP1 induction plays an important role in maintaining β -cell homeostasis under ER stress conditions.¹⁰ 4E-BP1 protein is present in three forms with different phosphorylation states. The non-phosphorylated α form is the most active in terms of eIF4E binding and the hyperphosphorylated γ form is inactive with the β form being intermediated. Thus, 4E-BP1 activity can be modulated by its phosphorylation and dephosphorylation. Since oxidative stress, which also activates the ISR, is another important contributor of β -cell loss during development of type 2 diabetes mellitus,^{4,11} we examined expression of 4E-BP1 in mouse insulinoma MIN6 cells treated with arsenite, an inducer of oxidative stress.^{12,13} We found that ISR induced by oxidative stress increased 4E-BP1 expression while the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway activated by the stress condition suppressed it. Furthermore, oxidative stress caused dephosphorylation of 4E-BP1 and hence its activation in a JNK-dependent manner. These modulations of 4E-BP1 expression and phosphorylation may contribute to fine tuning of translational control under stress conditions.

MATERIALS AND METHODS

MIN6 cell culture cell viability assay

MIN6 cells were cultured in DMEM supplemented with 15% fetal calf serum (FCS) and 450 mg ml⁻¹ glucose. Cells were seeded at 1 or 4 \times 10⁵ cells per well in 24-multiwell plates. Two days later, cells were treated with thapsigargin (0.5 μ M) or arsenite (15 μ M). Cell viability was determined with a cell proliferation assay kit (Promega).

Western blotting

Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and probed with primary antibodies purchased from the following companies: anti-4E-BP1 (Cell Signaling), anti-ATF4 (Santa Cruz),

anti-CHOP (Santa Cruz), anti-actin (Sigma), anti-phospho-eIF2 α (Cell Signaling), anti-XBP1 (Santa Cruz), anti-KDEL (Stressgen), anti-phospho-JNK (Cell Signaling), anti-total-JNK (Cell Signaling), anti-total-c-Jun (Cell Signaling), anti-phospho-c-Jun (Cell Signaling), anti-total-S6 ribosomal protein (Cell Signaling), and anti-phospho-S6 ribosomal protein (Cell Signaling). Western blot experiments were performed at least three times.

Quantitative real-time RT-PCR

Total ribonucleic acid (RNA) was extracted from MIN6 cells using ISOGEN (Nippon Gene). For real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis, complementary DNA was synthesized by reverse transcription (RT) using the oligo d(T)₁₆ primer and subjected to polymerase chain reaction (PCR) amplification with gene-specific primers using a SYBR Green 1 kit (Roche). Data are presented as relative values to GAPDH mRNA. The specific primers for 4E-BP1 were 5'-GGGGACTACAGCACCCTCC-3' and 5'-ATCGCTGGTAGGGGCTAGTGA-3'.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM. Differences between groups were assessed by Student's *t* test. *p* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

We examined expression of ATF4, master regulator of stress signaling pathways governing the ISR, in MIN6 cells treated with thapsigargin and arsenite. We used 0.5 μ M thapsigargin for induction of ER stress and 15 μ M arsenite for oxidative stress, since these concentrations of agents induced ATF4 over the range of time course, although cell death was evident after 16 h in MIN6 cells treated with arsenite. Time course of ATF4 induction was different between thapsigargin and arsenite: arsenite induced expression of ATF4 more rapidly (Figure 1A). ATF4 expression was highest at 8 h for thapsigargin and 6 h for arsenite after initiation of the drug exposure. ATF4 expression clearly declined at 24 h, for thapsigargin, and 12 h, arsenite, after treatment with these agents. Thus, we examined effects of these agents at 0, 8 and 24 h for thapsigargin and 0, 6, and 12 h for arsenite in the following experiments.

Phosphorylation of eIF2 α , the initial event in the ISR signaling, was comparable between MIN6 cells treated with thapsigargin and arsenite (Figure 1B). As expected, C/EBP-homologous protein (CHOP), one of the transcriptional targets of ATF4 was similarly induced with thapsigargin and arsenite in MIN6 cells, at time points when two agents caused similar induction of ATF4. However, expression of 4E-BP1 protein, another target of ATF4, was much less in MIN6 cells treated with arsenite (Figure 1B). We also used 30 or 60 μ M arsenite and found that 4E-BP1 induction was not increased or even diminished (data not shown). We also