

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患政策研究事業)

ホルモン受容機構異常に関する調査研究

分担研究報告書

Wolfram 症候群の検討(実態調査に基づく早期診断法の確立と治療指針作成)

研究分担者 谷澤 幸生 山口大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨:現在の診断基準を用いて Wolfram 症候群と診断される患者のうち、WFS1 遺伝子変異が検出される患者は約7割に止まる。糖尿病と視神経萎縮を発症した小児兄弟例では、臨床的に典型例と考えられたが、WFS1 遺伝子変異が同定されなかった。他方、一方の対立遺伝子にのみ変異を認め、優性遺伝の可能性が否定できない家系も存在する。小児期に糖尿病を発症し、40年後に視神経萎縮を診断され WFS1 遺伝子に変異が同定された例も確認され、このよう症例では早期診断が困難と考えられた。また、診断基準を満たすものの糖尿病と視神経萎縮の他に非典型徴候を示す症例も存在する。その具体例として、免疫不全、低身長等の Wolfram 症候群には通常見られない特異な症候を合併する症例を解析し、WFS1 以外の遺伝子異常(NBAS 遺伝子変異)を同定した。このような事例も考慮し、WFS1 遺伝子異常症とそれ以外の原因による Wolfram 症候群・類縁疾患を適切に診断するために除外基準を追加した診断基準と亜分類についての検討を進めるとともに遺伝子診断法の改良による検証を引き続き行っている。また、剖検臓の免疫組織学的解析を行い、Wolfram 症候群患者では膵島構造とともに膵島内細胞量は維持されるものの内分泌細胞の形質を失うことが明らかとなり膵内分泌機能の廃絶が糖尿病の病態の本質であることが推察された。一方、すでにインスリン依存状態となっている典型成人例1例での GLP-1 受容体作動薬の臨床効果を解析し、糖尿病に対する効果は限定的であったものの中枢神経に対する保護効果が示唆された。

#### A. 研究目的

我が国における Wolfram 症候群の実態を解明し、日本における疫学調査と海外を含めた文献調査により、診断基準の妥当性を検証する。Wolfram 症候群(WFS)には遺伝的多様性が存在し、臨床的には典型例であっても WFS1 遺伝子異常に寄らない症例も存在する。また、本疾患は一般には常染色体劣性遺伝であるが、海外から優性遺伝する例や、WFS1 遺伝子異常を持つが、典型的症候のうち糖尿病を欠くなど、「不全型」が報告されている。しかしながら、その実態や disease entity は定まっていない。そのため、日本で行った全国疫学調査結果を見直し、

新たに登録される非定型例や不全型を含む患者で同意が得られたものに対する遺伝診断、国内外での文献検索により、非定型例や不全型を含め、WFS1 遺伝子異常症とそれ以外の原因による Wolfram 症候群を適切に診断できる診断基準、亜分類を作成することも合わせて目的とした。また、Wolfram 症候群の主要徴候である糖尿病の病態をより明確にし、将来の治療法開発の基礎とするため、Wolfram 症候群患者および非糖尿病患者剖検臓の組織学的解析および典型例1例における GLP-1 受容体作動薬の臨床効果の解析を行った。

## B. 研究方法

平成 22-23 年度厚生労働省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治療指針作成のための研究」により調査および遺伝子解析の依頼などにより蓄積された疫学調査結果の再分析、追跡が可能な症例のフォローアップを行い臨床情報のアップデートを行った。新たに依頼された症例の臨床記録および遺伝子検査結果を解析した。剖検臓の病理組織学的検討は、通常の HE 染色に加えて、膵ホルモン(インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ポリペプチド)、クロモグラニン A および WFS1 蛋白質に対する抗体を用いて免疫組織染色を行った。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号)に従い、山口大学医学部・医学部附属病院の倫理審査委員会において審査・承認を受けて研究を行った。研究対象者に対して、必要な人権擁護上の配慮、研究方法による不利益、危険性の排除を行い、説明と同意(インフォームド・コンセント)を得て研究を実施した。

## C. 研究結果

研究期間内に新たに解析を行った 6 家系を加え、これまでに臨床的に Wolfram 症候群と診断された 39 家系 50 人の解析を行っている。本症の典型例では 15 歳未満で糖尿病を、やや遅れて視神経萎縮を発症し、その後中枢性尿崩症、難聴そして精神神経変性徴候を合併していく。しかし、発症年齢、臨床徴候の組み合わせや経過に多様性が見

られ、さらに WFS1 遺伝子変異が同定される症例は約 7 割にとどまることから遺伝的にも多様性が存在する。研究期間内に診断した 6 家系で典型例は 1 家系(1 例)にとどまる。WFS1 遺伝子に Gly674Arg と Gln14Arg の複合ヘテロ変異が同定された 50 歳の女性では、8 歳で糖尿病を発症し、約 40 年後に視神経萎縮を診断され、加えて急激な小脳失調の進展も認めている。このような症例では、若年での糖尿病発症のみでは、遺伝子検査を行われる可能性は少なく、診断が遅れる。一方、6 歳と 7 歳の男児兄弟例では糖尿病と視神経萎縮の合併により診断され、その後中枢性尿崩症を発症しており臨床的には定型例と考えられたが、WFS1 遺伝子異常を認めなかった。

海外では WFS1 遺伝子の変異が dominant な形質を与え、優性遺伝している例が報告され Wolfram-like syndrome と称されている。これまでに我々が解析した症例でも一方の対立遺伝子の変異が同定された症例が 3 例存在し、家族歴がないことから、優性形質を与える変異の孤発例である可能性があるが、エクソン以外の解析範囲外に変異が存在する可能性は完全には否定できない。一方、新たに遺伝子診断を行なった症例では、20 歳で糖尿病を発症し、遅れて視神経萎縮を診断された 48 歳の男性で同定された Arg653Cys ヘテロ変異が糖尿病を発症している父親でも同定され、変異の優性形質として糖尿病を発症した可能性がある。また、糖尿病学会の単一遺伝子糖尿病調査研究班との連携より WFS1 遺伝子変異の優性効果が否定できない若年発症糖尿病の 4 家系を同定した。

糖尿病と視神経萎縮の他に非典型徴候を示す症例の解析を行なった。小児期発症の

糖尿病と視神経萎縮により本症が考えられた 26 歳女性では、無ガンマグロブリン血症、低身長および Pelger-Huët 異常を伴う好中球分葉異常を合併しており、WFS1 遺伝子異常を認めなかった。この症例で認める低身長、視神経萎縮および Pelger-Huët 異常は劣性遺伝性疾患である Short stature with Optic nerve atrophy and Pelger-Huët anomaly (SOPH) syndrome に合致しており、さらに本患者では小児急性肝不全のサブグループである Infantile Liver Failure Syndrome 2 (ILFS2) で合併頻度が高い無ガンマグロブリン血症と小児期の発熱誘発性肝不全のエピソードも認めたため、SOPH 症候群と ILFS2 共通の原因遺伝子である神経芽細胞腫増幅配列 (NBAS) 遺伝子の解析を行なった。片側アリの Exon43 に 25bp(+15~+39) 欠失と欠失部位への 2 塩基挿入、さらに intron 内配列 23bp の重複挿入(-28~-6) が同定され、結果的にフレームシフトによる Exon43 の機能的欠失が推定された。加えて、Exon45 において SOPH 症候群で同定されている変異と同じ部位に 1914 番目のアルギニン(R) がロイシン(L)に変化を生じる点変異が同定され、複合ヘテロ変異による NBAS 遺伝子異常症と診断した。NBAS 蛋白は 2371 個のアミノ酸より構成され、その分子機能はゴルジ体から小胞体への小胞輸送に関わることが想定されている。そのため NBAS 遺伝子異常症でも Wolfram 症候群と同様に病態形成への小胞体機能異常の関連が推察される。NBAS 機能不全と糖尿病発症との関連について、非糖尿病成人膵組織における NBAS 蛋白の局在を解析した。膵組織において NBAS 蛋白は膵島内クロモグラニン A 陽性内分泌細胞特異的な局在を示し、NBAS 機能不全と膵島機能障害の関連性が推察され

た。

インスリン分泌能がわずかに残存する典型例の 26 歳女性症例 (WFS1 遺伝子診断済み) でインスリン治療に GLP-1 受容体作動薬を併用し、その臨床効果を解析した。併用開始より 6 ヶ月間の観察において内因性インスリン分泌が増加し、併用前に比しインスリン投与量が 20%減量された。さらに、併用により低血糖発作が減少、患者 QOL 改善に寄与することが見込まれたが、投薬開始後 6 ヶ月までに観察された内因性インスリン分泌増強効果はその後持続せず、投与開始 1 年後において血清 C ペプチドレベルは投与開始前と同等であり、その後上昇を認めなかった。しかし、C ペプチドは依然として検出可能であり、内因性インスリン分泌能保持に GLP-1 が寄与している可能性も考えられる。一方、脳 MRI より GLP-1 開始前に比し小脳脳幹萎縮の進行を認めず、これまでに明らかな神経学的症状の出現も認めない。このことから GLP-1 受容体作動薬が中枢神経変性の進行を抑制し患者 QOL 維持に寄与できる可能性がある。GLP-1 受容体作動薬の使用は倫理審査会の審査・承認後、患者より同意取得を得て行なわれている。

典型的な臨床症状を有する Wolfram 症候群の 2 症例 (内、1 症例は遺伝子診断済み) から得た剖検膵の解析より、本質的に  $\beta$  細胞に限らず膵内分泌細胞が分化異常をきたし分化転換していることが示された。さらに、非糖尿病患者剖検膵の膵島ではクロモグラニン A 陽性内分泌細胞の大部分に WFS1 蛋白質発現を認め、各膵ホルモンと WFS1 蛋白質の共染色よりインスリン陽性細胞のみならず、グルカゴン陽性細胞およびソマトスタチン陽性細胞にも WFS1 蛋白質が発現していることを明らかにした。すなわち、WFS1 蛋

白質が膵内分泌細胞の分化維持に重要であり、Wolfram 症候群における糖尿病の病態の本質が膵内分泌の廃絶であることが推察された。

#### D. 考察

Wolfram 症候群には遺伝的多様性が存在し、現行の診断基準では診断が遅れる症例や、本研究で同定した小児兄弟例のように臨床的に典型例であっても WFS1 遺伝子異常によらない症例が存在する。また、新たに解析した 1 家系で WFS1 遺伝子変異の優性な形質として糖尿病を発症している可能性が考えられる。他方、それ以前に遺伝子診断を行なった一方の対立遺伝子の変異が同定された 3 例では、家族歴がないことから、優性形質を与える変異の孤発例である可能性もあるが、先述の WFS1 遺伝子異常を認めなかった兄弟例を含めエクソン以外の解析範囲外に変異が存在する可能性も否定できないため、このことを含め WFS1 遺伝子以外の原因の同定を目的に全ゲノム解析やエクソーム解析を行う必要がある。

非定型例を含め、WFS1 遺伝子異常症、それ以外の原因による Wolfram 症候群を適切に診断できる診断基準、亜分類は現時点では無く、症例ごとに検討を要する。その具体例として今回 NBAS 遺伝子異常症の症例を解析する機会を得た。この症例では Wolfram 症候群の診断基準を満たすものの非定型な臨床徴候を複数認めたため鑑別ができ NBAS 遺伝子異常の診断に至った。一方、NBAS 遺伝子異常症での糖尿病合併の報告はあるものの合併頻度は不明であり、病態に関する報告もない。NBAS 蛋白質はゴルジ体から小胞体への小胞輸送制御に重要な分子であることが明らかにされており、小

胞体機能維持に関わることが想定される。さらに膵組織では膵内分泌細胞への局在が示されたことから糖尿病の分子病態における NBAS 遺伝子異常症と Wolfram 症候群の共通性が推察される。

剖検膵の解析より膵内分泌組織の病態に関する多くの知見を得た。従来想定されてきた小胞体ストレス亢進による膵  $\beta$  細胞アポトーシス増強に加えて膵内分泌細胞の分化転換を伴う細胞分化異常が病態形成に重要であることが明らかになった。このことは病態がすでに進行した患者において GLP-1 受容体作動薬が糖尿病に対して限定的な効果しか示せなかったことを説明する可能性があり、膵内分泌機能が十分残存する時期に開始すればより明らかな臨床効果が得られる可能性も考えられる。一方、中枢神経に対する GLP-1 受容体作動薬の保護効果の可能性が示唆され、今後、さらなる長期投与による保護効果を明らかにすることで、本剤による補助療法の開発につながる可能性がある。

現時点における我が国での診断基準の改定の必要ないと考えられる。しかし、疾患の多様性を考慮し、診断の感度および特異度を上げるための診断基準の精緻化が求められる。さらに、非定型例を含め、WFS1 遺伝子異常症とそれ以外の原因による Wolfram 症候群を適切に診断するためには遺伝子診断方法の改良とともにさらなる症例の蓄積とその詳細な分子遺伝学的、臨床的研究を行い、診断基準を見直していく必要がある。

#### E. 結論

日本では糖尿病、視神経萎縮の発症（診断）を 30 歳未満とする診断基準の改定は現時点では必要ないと考える。しかし、今後、疾患亜分類などに伴い改定が必要となる可

能性がある。広義の WFS1 遺伝子異常症の実態を含め、今後明らかにすべき点が依然として多い。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Amo-Shiinoki K, Tanabe K, Hoshii Y, Matsui H, Harano R, Fukuda T, Bouchi R, Takagi T, Hatanaka M, Takeda K, Okuya S, Nishimura W, Kudo A, Tanaka S, Tanabe M, Akashi T, Yamada T, Ogawa Y, Ikeda E, Nagano H, Tanizawa Y. Islet cell dedifferentiation is a pathologic mechanism of longstanding progression of type 2 diabetes. *JCI Insight* 6(1): e143791, 2021
- 2) Tanabe K, Nishimura S, Sugahara K, Yamashita H and Tanizawa Y. A patient with sudden hearing loss induced by propylthiouracil. *Heliyon* 7(2) e06196, 2021
- 3) Fukuda T, Bouchi R, Takeuchi T, Amo-Shiinoki K, Kudo A, Tanaka S, Tanabe M, Akashi T, Hirayama K, Odamaki T, Igarashi M, Kimura I, Tanabe K, Tanizawa Y, Yamada T, and Ogawa Y. Importance of Intestinal Environment and Cellular-Plasticity of Islets in the Development of Post-Pancreatectomy Diabetes. *Diabetes Care* 44(4): 1002-1011, 2021
- 4) Kurimoto J, Takagi H, Miyata T, Hodai Y, Kawaguchi Y, Hagiwara D, Suga H, Kobayashi T, Sugiyama M, Onoue T, Ito Y, Iwama S, Banno R, Tanabe K, Tanizawa Y and Arima H. Deficiency of WFS1 leads to the impairment of AVP secretion under dehydration in male mice. *Pituitary* 2021 in press
- 5) Matsumura T, Ohta Y, Taguchi A, Hiroshige S, Kajimura Y, Fukuda N, Yamamoto K, Nakabayashi H, Fujimoto R, Yanai A, Shinoda K, Watanabe K, Mizukami Y, Kanki K, Shiota G, Tanizawa Y. Liver-specific dysregulation of clock-controlled output signal impairs energy metabolism in liver and muscle. *Biochem Biophys Res Commun*.534:415-421, 2021
- 6) Suetomi R, Ohta Y, Akiyama M, Matsumura T, Taguchi A, Yamamoto K, Kamatani T, Tanizawa Y. Adrenomedullin has a cytoprotective role against endoplasmic reticulum stress for pancreatic  $\beta$ -cells in autocrine and paracrine manners. *J Diabetes Investig.* 11(4):823–833, 2020.
- 7) Kaku K, Araki E, Tanizawa Y, Ross Agner B, Nishida T, Ranthe M, Inagaki N. Superior efficacy with a fixed-ratio combination of insulin degludec and liraglutide (IDegLira) compared with insulin degludec and liraglutide in insulin-naïve Japanese patients with type 2 diabetes in a phase 3, open-label, randomized trial. *Diabetes Obes Metab.* 21(12):2674-2683.2019
- 8) Nakashima N, Noda M, Ueki K, Koga T, Hayashi M, Yamazaki K, Nakagami T, Ohara M, Gochi A, Matsumura Y, Kimura M, Ohe K, Kang D, Toya Y, Yamagata K, Yokote K, Ikeda S, Mitsutake N, Yamamoto R, Tanizawa Y. Recommended configuration for

- personal health records by standardized data item sets for diabetes mellitus and associated chronic diseases: A report from Collaborative Initiative by six Japanese Associations. *J Diabetes Investig*. 10(3):868-875. 2019
- 9) Araki E, Yamashita S, Arai H, Yokote K, Satoh J, Inoguchi T, Nakamura J, Maegawa H, Yoshioka N, Tanizawa Y, Watada H, Suganami H, Ishibashi S. Efficacy and safety of pemafibrate in people with type 2 diabetes and elevated triglyceride levels: 52-week data from the PROVIDE study. *Diabetes Obes Metab*. 2019, 21(7):1737-1744.
- 10) Nomiya R, Emoto M, Fukuda N, Matsui K, Kondo M, Sakane A, Sasaki T, Tanizawa Y. Protein kinase C  $\delta$  facilitates insulin-induced glucose transport by phosphorylation of soluble NSF attachment protein receptor regulator (SNARE) double C2 domain protein  $\beta$ . *Journal of diabetes investigation*. 10(3): 591-601.2019
- 11) Kondo M, Tanabe K, Amo-Shiinoki K, Hatanaka M, Morii T, Takahashi H, Seino S, Yamada Y, Tanizawa Y. Activation of GLP-1 receptor signaling alleviates cellular stresses and improve beta cell function in a mouse mode of Wolfram syndrome. *Diabetologia* 61(10); 2189-2201, 2018
- 12) Hirukawa H, Hashiramoto M, Tanizawa Y, Kaku K. Pioglitazone and Sulfonylurea Remission from Type 2 Diabetes Mellitus and Anti-Atherosclerosis in Japan (PREVENT-J) study group. Remission of hyperglycemia after withdrawal of oral antidiabetic drugs in Japanese patients with early-stage type 2 diabetes. *Journal of diabetes investigation* 2018, 9 (5) 1119-1127.
- 13) Araki E, Yamashita S, Arai H, Yokote K, Satoh J, Inoguchi T, Nakamura J, Maegawa H, Yoshioka N, Tanizawa Y, Watada H, Suganami H, Ishibashi S. Effects of Pemafibrate, a Novel Selective PPAR $\alpha$  Modulator, on Lipid and Glucose Metabolism in Patients With Type 2 Diabetes and Hypertriglyceridemia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *Diabetes care* 2018, 41(3) 538-546
- 14) 椎木幾久子, 田部勝也, 谷澤幸生 ウォルフラム症候群について 医学出版社 月間糖尿病 47-54. 2020
- 15) 田部勝也 膵 $\beta$ 細胞脱分化と糖尿病 糖尿病 61(2) 39-41,2018
2. 学会発表
- 1) Amo-Shiinoki K, Tanabe K, Bouchi R, Nishimura W, Ogawa Y, Tanizawa Y. Islet beta-Cell Dedifferentiation Is Involved in Progression of Type 2 Diabetes. 80th American Diabetes Association Scientific Sessions. Chicago, IL, USA, June 12-16, 2020.
- 2) Bouchi R, Fukuda T, Takeuchi T, Amo-Shiinoki K, Tanabe K, Tanizawa Y, Yamada T and Ogawa Y. Importance of Intestinal Environment and Cellular Plasticity of Beta Cells in the Development of Post-Pancreatectomy

- Diabetes. 80th American Diabetes Association Scientific Sessions. Chicago, IL, USA, June 12-16, 2020.
- 3) Tanizawa Y, Tanabe K, Amo-Shinoki K. Metabolic dysregulation by cellular stress is implicated in the dedifferentiation and dysfunction of pancreatic beta cells. 55th EASD Annual Meeting (Posters 452). Barcelona, Spain, Sep 16-20, 2019.
  - 4) Tanabe K. Diabetes and beta cell plasticity; Lessons from Wolfram syndrome. 12th Asia Islet Biology and Incretin Research Association (AIBIS) meeting. Seoul, South Korea, Aug 1-3, 2019.
  - 5) Tanabe K, Amo-Shinoki K, Kondo M, Hatanaka M, Masatani M, Tanizawa Y. Activation of GLP-1 receptor signalling prevents beta cell dedifferentiation in a mouse model of Wolfram syndrome through modulating Txnip expression. 79th American Diabetes Association Scientific Sessions. San Francisco, CA, USA, June 7-11, 2019.
  - 6) Amo-Shiinoki K, Tanabe K, Hatanaka M, Tanizawa Y. Metabolic insufficiency caused by cellular stresses is implicated to  $\beta$  cell dedifferentiation in the mouse model of Wolfram Syndrome. 54th European Society for the Study of Diabetes Annual Meeting. Berlin, Germany, Oct 1-4, 2018.
  - 7) Amo-Shiinoki K, Tanabe K, Hatanaka M, Tanizawa Y. Metabolic insufficiency caused by cellular stresses is implicated to  $\beta$  cell dedifferentiation in the mouse model of Wolfram Syndrome. 78th American Diabetes Association Scientific Sessions. Orlando, FL, USA, June 22-26, 2018.
  - 8) 椎木幾久子, 田部勝也, 幡中雅行, 奥屋茂, 福田達也, 竹内崇人, 坊内良太郎, 山田哲也, 小川佳宏, 谷澤幸生 膵 $\beta$ 細胞脱分化は2型糖尿病の病態進展に関連する 第63回日本糖尿病学会年次学術集会 Web開催 2020年10月5-16日
  - 9) 田部勝也, 椎木幾久子, 幡中雅行, 谷澤幸生 膵 $\beta$ 細胞脱分化は2型糖尿病の病態進展に関連する 第63回日本内分泌学会学術集会 Web開催 2020年6月4-6日
  - 10) 谷澤幸生, 田部勝也, 椎木幾久子, 松永仁恵 Wolfram症候群 UP TO DATE 第62回日本糖尿病学会年次学術集会 仙台 2019年5月23-25日
  - 11) 谷澤幸生, 太田康晴, 田部勝也, 田口昭彦, 椎木幾久子, 秋山優, 幡中雅行 WFS1 and  $\beta$ -cell function 第62回日本糖尿病学会年次学術集会 仙台 2019年5月23-25日
  - 12) 田部勝也, 椎木幾久子, 幡中雅行, 西村涉, 増谷弘, 谷澤幸生 Pancreatic  $\beta$ -cell plasticity as a mechanism of  $\beta$ -cell failure caused by Wfs1 deficiency 第62回日本糖尿病学会年次学術集会 仙台 2019年5月23-25日
  - 13) 椎木幾久子, 田部勝也, 西村涉, 幡中雅行, 佐藤吉彦, 駒津光久, 増谷弘, 谷澤幸生 Wolfram症候群をモデルとした細胞内ストレスによる膵 $\beta$ 細胞可塑性制御の解明 第62回日本糖尿病学会年次学術集会 仙台 2019年5月

23-25 日

- 14) 谷澤幸生 糖尿病克服への体質医学の  
挑戦- $\beta$ 細胞不全をめぐって- 第 69 回  
日本体質医学会総会(令和元年 8 月 31  
日 海峡メッセ下関)
- 15) 椎木幾久子、田部勝也、佐藤吉彦、駒  
津光久、谷澤幸生 膵 $\beta$ 細胞脱分化は  
糖尿病患者の膵 $\beta$ 細胞不全に関連す  
る 第 69 回日本体質医学会総会(令和  
元年 9 月 1 日 海峡メッセ下関)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3.その他

特記事項なし