

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	Wolfram症候群の原因遺伝子であるWFS1遺伝子の変異解析
Title(English)	
著者(和文)	徳間啓
Author(English)	Hiraku Tokuma
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12515号, 授与年月日:2023年9月22日, 学位の種別:課程博士, 審査員:糸 昭苑,白木 伸明,田口 英樹,田川 陽一,相澤 康則
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12515号, Conferred date:2023/9/22, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	徳間啓	
論文審査 審査員		氏名	職名	氏名	職名
	主査	桑 昭苑	教授	相澤 康則	准教授
	審査員	白木 伸明	准教授		
		田口 英樹	教授		
田川 陽一		准教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「Wolfram 症候群の原因遺伝子である *WFS1* 遺伝子の変異解析」と題し、六章より構成されている。

第一章「背景と目的」では、本研究の背景として、糖尿病の分類、遺伝子変異を起因とする糖尿病の種類を紹介し、その中の Wolfram 症候群の位置づけ、Wolfram 症候群に着目するきっかけを述べている。そして、Wolfram 症候群は、希少疾患であること、*WFS1* 遺伝子変異を原因として膵β細胞が機能不全となり、糖尿病を発症すること、*WFS1* 遺伝子変異の種類によって糖尿病の発症時期が異なることについて述べている。また、様々な治療が試みられているがいまだ根本的な治療法が存在しない、という問題点を挙げ、それに対して、変異型 *WFS1* タンパク質の性状をタンパク質の安定性とインスリン分泌の両方から比較することで新たな創薬標的を同定するという本研究の目的を述べている。

第二章「実験方法」では、本論文で使用した実験手法を述べている。

第三章「*WFS1* KO iOE iPS 細胞の樹立と解析」では、ヒト iPS 細胞の内在性の *WFS1* 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムによって破壊した後に、セーフハーバー部位に Doxycycline 添加により *WFS1* を発現するカセットを挿入した *WFS1* KO iOE iPS 細胞 (*WFS1* KnockOut inducible OverExpression iPS 細胞) を樹立している。そして、適切な液性因子を添加した培養液で連続的に培地交換をすることで、ヒト iPS 細胞から膵β細胞への分化を試みているが、*WFS1* KO iOE iPS 細胞は Doxycycline の有無に関わらず、その途中の段階である内分泌前駆細胞の時点で分化できなかつたと結論付けている。原因として、樹立における問題点、分化段階における *WFS1* 遺伝子の必要性について考察している。

第四章「変異型 *WFS1* タンパク質の安定性の解析」では、様々な蛍光リガンドで特定の時間に産出されたタンパク質をラベリングできる HaloTag システムを用いて変異型 *WFS1* タンパク質の安定性を、マウス膵β細胞株 (MIN6 細胞)・ヒト胎児腎由来細胞株 (HEK293T 細胞)・アフリカミドリザル腎由来細胞株 (COS7 細胞) にて解析している。その結果、MIN6 細胞では C 末端側のアミノ酸が欠損した変異型 *WFS1* タンパク質の発現量が野生型のものと比較して、著しく少ないことを見出している。その原因として MIN6 細胞では C 末端側のアミノ酸が欠損した変異型 *WFS1* タンパク質はユビキチン・プロテアソーム系によって速やかに分解されることをプロテアソーム阻害剤と Pulse-chase 実験を用いて見出している。また、その際に MIN6 細胞では内在性の *WFS1* タンパク質は影響を受けていないこと、そして、その分解様式は HEK293T 細胞や COS7 細胞とは異なっており、変異型 *WFS1* タンパク質の安定性は膵β細胞で特異的な制御がなされていると結論付けている。

第五章「*WFS1* がインスリン分泌に与える影響に関する解析」では shRNA を用い MIN6 細胞において *Wfs1* 遺伝子の発現を抑制した細胞株を樹立している (*Wfs1* KD MIN6 細胞)。この細胞は先行報告と同様に小胞体ストレスに対する感受性が高いことを確認している。そして、グルコース濃度に応じたインスリン分泌能を解析したところ、高濃度グルコース下のインスリン分泌能が低下しており、この作用は *WFS1* 野生型の強制発現により回復したことを確認している。また、*Wfs1* KD MIN6 株ではカリウムチャネル阻害剤であるトルブタミドによりインスリン分泌を強制的に促すと *Wfs1* KD MIN6 細胞では正常な MIN6 細胞に比べ、インスリン分泌が低下しており、この現象は野生型 *WFS1* の強制発現により回復するが、C 末端側のアミノ酸が欠損した変異型 *WFS1* タンパク質では回復しないことを確認している。そして、野生型 *WFS1* タンパク質は先行報告と同様に小胞体に局在することに加え、細胞膜付近にも局在していることを確認している。以上の結果から、*WFS1* はカリウムチャネルの閉口、脱分極、カルシウムチャネルの開閉とそれに伴うインスリン分泌という細胞膜近傍で起こる現象に関わると結論付けている。

第六章「結語」では、本研究の要点を概説し、本研究成果の意義と今後の展望について述べている。

以上を要するに、本論文は糖尿病を伴う Wolfram 症候群の原因遺伝子 *WFS1* の変異に対して、タンパク質の安定性とインスリン分泌の両方から解析し、変異型 *WFS1* タンパク質のプロテアソームによる分解の結果、インスリン分泌能が低下することを明らかにした。これらの知見は、Wolfram 症候群に対する創薬標的を提案し、治療薬の開発に資するものであり、理学的貢献するところが大きい。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。