

実態調査に基づいた日本人 Wolfram 症候群
患者の臨床的および遺伝的特徴の解明

松永 仁恵

山口大学大学院医学系研究科 応用医工学系専攻
生体シグナル解析医学領域 病態制御内科学分野

平成27年1月

目次

1.	要旨	1
2.	研究の背景、目的	1
3.	対象と方法	2
4.	結果	5
5.	考察	12
6.	謝辞	15
7.	参考文献	15

1. 要旨

背景：Wolfram 症候群（WFS）は若年発症のインスリン依存性糖尿病と視神経萎縮を主徴とし、これに尿崩症や感音性難聴および多彩な精神神経症を合併する常染色体性劣性遺伝性疾患である。主要な原因遺伝子として *WFS1* 遺伝子が同定されているが、WFS の発症機構や病態は十分には解明されていない。加えて、希少疾患であるが故に、疾患実態も不明である。我々は、全国断面調査に基づき WFS の臨床的および遺伝的特徴の解明を目指した。方法：若年発症の糖尿病と視神経萎縮を最小診断基準とした。同意が得られた症例について詳細な臨床情報の収集と *WFS1* 遺伝子解析を行った。

結果：断面調査において糖尿病と視神経萎縮を合併する症例が 101 例報告された。その内、他の徴候を有する 67 例を解析対象とし、日本における有病率を 710,000 人に 1 人と推定した。30 家系 40 例について詳細な臨床情報の解析と *WFS1* 遺伝子解析を行い得た。糖尿病（平均発症年齢：8.7 歳）を最も早く発症し、次いで視神経萎縮（平均発症年齢：15.8 歳）を発症した。一方、6 例では、視神経萎縮あるいは尿崩症が初発徴候であった。加えて、8 例において、糖尿病に続く徴候として尿崩症や難聴の発症が視神経萎縮に先行した。40 例中、27 例（67.5%）に多彩な *WFS1* 遺伝子変異を同定した。2 例において、単染色体のみに変異を認めた。糖尿病と視神経萎縮の発症年齢において、*WFS1* 遺伝子変異の有無による差を認めなかった。一方、WFS1 蛋白質の構造・機能が明らかに損なわれる欠失、挿入および終止変異を有する症例では、単一アミノ酸置換変異を有する症例に比しより早期に糖尿病と視神経萎縮を発症した。

結語：日本人 WFS において臨床的および遺伝的多様性が認められた。疾患発症年齢において、*WFS1* 遺伝子型・表現型連関が示唆された。

2. 研究の背景、目的

Wolfram 症候群（WFS）は若年発症のインスリン依存性糖尿病と視神経萎縮を主徴とする常染色体性劣性遺伝性疾患である。1938 年に家族性の若年発症の糖尿病と視神経萎縮の合併として初めて報告され [1]、その後、尿崩症や感音性難聴および多彩な精神・神経症状を合併することが明らかにされ、主要な 4 徴候（diabetes insipidus、diabetes mellitus、optic atrophy、deafness）の頭文字をとって DIDMOAD syndrome とも呼ばれる [2]。患者の剖検において膵 B 細胞の選択的な消失が認められる [3]。また、MRI による検討では、脳幹や小脳の著明な萎縮が認められている。これらの知見から、WFS は、膵 B 細胞や神経細胞の変性死に基づく疾患であると考えられてきた。WFS は進行性の疾患であり、多様な臨床徴候を呈する [4]。患者の寿命は一般的に短く、神経精神症状に起因する中枢性呼吸不全、誤嚥あるいは自殺などが死因となる事が多い [5]。治療は対症的なものに限られ、疾患の進行を遅らせる、あるいは寿命の延長につながる治療法は確立されていない。

これまでに、臨床的に WFS と診断される多くの症例から、*WFS1* 遺伝子 (*WFS1*) の機能喪失型変異が同定されている [5,6,7]。加えて、*Wfs1* 遺伝子ノックアウトマウスでも膵 B

細胞が選択的に脱落し、その結果高血糖を来した [8,9,10]。遺伝子産物である WFS1 蛋白質 (WFS1) は小胞体 (ER) 膜に局在する [11]。WFS1 はインスリン分泌 [8,12] やプロセッシング [12]、細胞周期調節 [13,14]、小胞体ストレス応答 [10,15]、cAMP 産生 [16] 等、様々な細胞機能調節に関与する事が報告されている。一方、臨床的に WFS と診断されながら *WFS1* 遺伝子変異が同定されない患者も存在し、本疾患における遺伝的多様性の存在が示唆される。事実、ヨルダンの家系において、第 2 の WFS 遺伝子として *WFS2(CISD2)* 遺伝子が同定されている [17]。

WFS の臨床徴候に関するいくつかの後方視的解析の報告はあるものの、診断基準の相違や異なった視点からの観察により、疾患の自然史や経過に対して共通した理解を得るには至っていない [7,18,19,20,21,22]。さらに、多彩な臨床徴候と WFS1 分子機能の複雑さにより遺伝子型-表現型連関についても十分には解明されていない。

我々は日本人 WFS の疾患実態解明を目的として全国断面調査を行い、若年発症の糖尿病と両側性視神経萎縮を合併する 101 例を収集した。その内、WFS に関連する他の徴候を有する 67 例を解析対象とし、同意が得られた 30 家系 40 例について *WFS1* 遺伝子解析を実施した。これらの解析結果を基に、本学位論文では、日本における WFS の有病率、臨床的および遺伝的特徴と *WFS1* 遺伝子型-表現型連関について考察を加えて報告する。

3. 対象と方法

概説

30 歳未満発症のインスリン依存性糖尿病と両側視神経萎縮の合併を WFS の最小診断基準とした。糖尿病は内科医または小児科医が診断を行い、視神経萎縮の診断は眼科医が行うことを条件とした。その他の合併徴候は主治医または相当する診療分野の専門医が診断を行った。糖尿病・内分泌専門医と小児科医を対象として、過去 15 年間に診断あるいは経験した WFS 症例についてアンケート調査を行った。本調査以前に *WFS1* 遺伝子解析を行った症例では遺伝子検査結果も調査した。さらに同意が得られた患者において、詳細な臨床所見の解析と *WFS1* 遺伝子解析を行った。

倫理審査

本研究は、[疫学研究に関する倫理指針]、[ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針] に従い、山口大学医学部附属病院医薬品等治験・臨床研究等審査委員会の承認のもとに実施した。成人については本人にインフォームドコンセントを行い、患者が 18 歳未満の場合には両親または後見人にインフォームドコンセントを行った。収集した症例は ID 化することで連結不能匿名化した。また、本研究での遺伝子解析において、非血縁正常人ゲノム DNA を対照として用いた。これについては、山口大学医学部附属病院医薬品等治験・臨床研究等審査委員会の承認の下、インフォームドコンセントを行い、同意を得ることができた 20 歳以上 65 歳未満の非血縁健全成人よりゲノム DNA を採取した。

有病率の推定

診断基準を満たす 101 症例において、2010 年の時点で生存が確認された WFS 患者を抽出し、東京都、大阪府、東北地方における有病率を算出した。本調査における、患者収集の網羅性を確認するため、調査対象期間に報告された日本人 WFS 症例を Pubmed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubme>) 及び医学中央雑誌データベース (<http://login.jamas.or.jp/>) より検索した。その結果、重複症例を除外し、56 例が同定され、そのうち 40 例 (71.4%) は調査対象とした糖尿病専門医あるいは小児科医からの報告であった。この事から、本調査対象ではすべての症例を網羅できていない可能性があり、それぞれの地域での有病率を 0.714 で除算した、それらの平均を有病率とした。

遺伝子解析

変異解析

患者全血単核球から DNA を抽出した。イントロン - エクソン境界を含む *WFS1* 遺伝子全エクソンについて、第 1 エクソンから 113bp 上流の転写調節領域から第 8 エクソン下流の非翻訳領域 51bp までの遺伝子配列を PCR-direct sequence 法により解析した。解析に用いた PCR プライマーを表 1 に示す。PCR 産物の DNA 配列を ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA) により決定し、DNA 配列解析ソフト (GRNETYX, TOKYO, Japan) を用いて *WFS1* 遺伝子配列 (NT_006051.11) と比較した。

これまでに報告のない単一アミノ酸置換変異および単一アミノ酸欠失変異について、疾患発症との関連および出現頻度を調べるため、TaqMan 法 (Biosystem 社) により非血縁正常人ゲノム DNA サンプル 100 検体(200 chromosome)以上を用いて変異のスクリーニングを行った。各変異の検出に用いた DNA プローブを表 2 に示す。変異が同定された検体については、PCR-direct sequence 法によっても解析を行い、変異の一致を確認した。一方、解析が可能であった 10 症例について、ミトコンドリア遺伝子異常による糖尿病を鑑別するため、ミトコンドリア遺伝子欠失および点変異 (m.3243A>G tRNA^{Leu}; OMIM#590050) を PCR-RFLP 法 (SRL, Tokyo) により解析した。さらに、WFS と臨床徴候が類似する Leber 病 (Leber Hereditary Optic Atrophy (LHON); OMIN#535000) に関連するミトコンドリア遺伝子変異 (m.11778G>A) についても同様に解析した。

表 1. *WFS1* 遺伝子解析に用いたプライマー

Exon	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
1	TGGAGTGATTGGCGGCTACA	AGGCCCGAGGAGGACAGTGC
2	CTGTCTCCAGCAGACACTAAGTGCCA	CCCACCCAGCTATCCCTGAACATCC
3	CTGAAGACCCTCATGCCTTG	ACACTTCTCTGTGGGCTGTG
4	TCCGAGAACTCTGGAGGCTGA	CATTACAAGCTGCTCAACCC
5	CGAAAGCCTTCCAGGCAGAG	CTATGGGAAGGTCCTGGCTC
6	CTAGGAACAGTGCGCCAGTT	ATGGAGTCCACAGGAAGGA
7	GCCCATGCTGTTTTCTCTCA	CCGAGGACACATCCTTATGA
8(a)	GCGTGAGATGGGAGCAGTGG	CTGGCGATGGGAAGGAGAA
8(b)	TCCGCACCCTCACCGACCTG	CACACCAGGTAGGGCACAAG
8(c)	CCTGGTCGTCTCAATGTCA	CATAGAACCAGCAGAACAGC
8(d)	CCGTGGCGGTCTGTAGTGTGC	CCCACGGTAATCTCAAACCTT
8(e)	CTGGATGCGCTGCCTCTACG	CATGGCAAGATGCACTGGAAGC

表 2. TaqMan 法で使した DNA プローブ

Mutation	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Probe-VIC	Probe-FAM	n
E809K	GACGTCACCAAGGACATCGT	CTCCAGGATGGTGCTGAACTC	CCAGCAGCGAGTTCA	CAGCAGCAAGTTCA	100
Del193K	TGGTCATGTACTGGAAGCTCAAC	TTGACCTGGCCGACATTCTC	CAAGAAGAAGAAGCAGGTG	CCAAGAAGAAGCAGGTG	100
V248G	AAGAACTACATCGCGCTGGAT	CGCCCTTGGCGTACTTCTTAG	TGATCTCCACAAAGTC	ATCTCCCCAAAGTC	183

MLPA

WFS1 遺伝子座における遺伝子再構成あるいは大規模な欠損の有無について Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法 [23] により解析した。ここでは、解析試薬キット (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) および MRC-Holland 社により設計された *WFS1* 各エクソン内に設定されたプローブ pair を用いた。解析には 200 ng のゲノム DNA を用いた。ゲノム DNA を熱変性した後、DNA 溶液に SALSA MLPA buffer とプローブミックスを添加した。これを 95°C で 1 分間加熱後、60°C で 18 時間加熱することでゲノム DNA とプローブを相補的に結合させた。次に、SALSA Ligase と Ligation buffer を加え、54°C で 15 分加熱した。その結果、同じエクソン内で結合しているプローブ pair がライゲーション反応によりゲノム DNA 相補的に連結される。プローブ内に設定された PCR プライマーを用いて連結したプローブ pair 部分を PCR 法により増幅した。PCR プライマーはあらかじめ発光色素 Fluorescein(FAM)で標識されており、PCR 産物の発光量を正常コントロール検体と対比させることで各エクソンにおけるコピー数の変化を解析した。以下に解析手順を示す。PCR 産物に Hi-Di™ ホルムアミド (Biosystem, Foster City, CA) と 0.4µl の GeneScan™600 LIZ サイズ (Biosystem, Foster City, CA) を加え 85°C で 2 分間変性させた後、これを遠沈処理した。ホルムアミド処理された PCR 産物を ABI 3130XL 遺伝子分析器 (Biosystem, Foster City, CA) により泳動した後、発光量を Genemarker™ ソフトウェア (Biosystem, Foster City, CA) を用いて解析した。

WFS1 遺伝子型-表現型連関の解析

WFS1 遺伝子異常が同定された症例を、以下に定義した変異の分類に従い 3 つの group に分けた。各群における糖尿病と視神経萎縮の発症年齢を比較した。

Group 1: 両方の chromosome に終止変異、フレームシフト変異あるいは複数アミノ酸の挿入または欠失変異を有する。このような変異 *WFS1* では、遺伝子構造が明らかに損なわれるため *WFS1* 機能の廃絶が想定される。

Group 2: 両方の chromosome にミスセンス変異または単一アミノ酸の挿入あるいは欠失変異を有する。これらの変異による *WFS1* 機能障害の程度は、コンセンサスは得られていないものの、経験的に Group 1 における変異に比し軽度と考えられる。

Group 3: Group 1 と Group 2 の変異を複合ヘテロ接合体で有する。

統計解析

データの解析には ANOVA 検定を用い、Scheffe-Post-hoc 法により統計学的有意差検定を行った。P<0.05 を有意とした。

4. 結果

臨床的及び遺伝的解析

一般的に、若年発症インスリン依存性糖尿病が WFS の初発徴候となる。そのため、糖尿病および内分泌疾患診療に携わる内科医あるいは小児科医が WFS を診断する機会が多いと推察される。そこで、WFS 症例の実態解明を目的とし、日本糖尿病学会及び日本内分泌学会専門医、小児内分泌学会所属医師、小児慢性特定疾患治療研究事業登録医を対象にアンケートによる断面調査を行った。若年発症糖尿病と視神経萎縮の合併を最小診断基準として 101 例が集計された。これらのうち WFS に関連する他の徴候を有する 67 例を臨床像の解析と WFS1 遺伝子解析を行う対象とした。67 例の全例において、本調査以前にインスリン依存性糖尿病と両側性視神経萎縮が診断されていた。表 3 に集計された 67 例の各徴候の発症頻度を示す。各徴候の発症頻度は尿崩症 37 例 (55%)、難聴 50 例 (75%)、尿路異常 31 例 (46%)、神経・精神症状 46 例 (69%) であった。主要 4 徴候の DIDMOAD を有する症例は 33 例 (49%) で、6 徴候すべてを有する症例は 22 例 (33%) であった。

表 3. 日本人 Wolfram 症候群 67 例における主要徴候の合併率

	Prevalence
Diabetes mellitus	67 (100%)
Optic atrophy	67 (100%)
Diabetes insipidus	37 (55%)
Hearing impairment	50 (75%)
Renal tract abnormalities	31 (46%)
Neuropsychiatric illness	46 (69%)

同意を得ることができた 30 家系 40 例について、詳細な臨床情報の収集と WFS1 遺伝子解析を行った。このうち、10 例についてミトコンドリア遺伝子異常による糖尿病と Leber 病を鑑別するために、ミトコンドリア遺伝子解析を行った。いずれの症例においてもミトコンドリア遺伝子欠損およびそれぞれの疾患に関連するミトコンドリア点変異(m.3242G>A, m.11778G>A)は検出されなかった。各症例の臨床情報と WFS1 遺伝子変異の有無を表 4 にまとめた。糖尿病をもっとも早期に発症し、平均発症年齢は 8.7 歳 (9 ヶ月-30 歳) であった。続いて視神経萎縮を発症しており、平均発症年齢は 15.8 歳 (3-40 歳) であった。他の徴候の平均発症年齢は以下のとおりであった。尿崩症：17.2 歳 (3-47 歳)、難聴：16.4 歳 (9 ヶ月-58 歳)、尿路異常：平均 20.2 歳 (生後-47 歳)、神経・精神症状：24.4 歳 (3-53 歳)。34 例において糖尿病が初発徴候であった。一方、6 例においては視神経萎縮 (W13、W14、W17a、W27a、W27b) や尿崩症 (W7a) が初発徴候であった。また、8 例において

は、糖尿病に続く徴候として、尿崩症 (W5、W7a、W7b) や難聴 (W6d、W7a、W7b、W8、W21、W26、W27a)、精神徴候 (W7a、W7b) が視神経萎縮に先行した。7 例において種々の神経学的症状を認め、そのうち W4、W26、W27a では発症後早期から症状の出現を認めた。17 例において種々の精神症状を認めた。W7 の兄弟例では、WFS との合併がこれまでに報告されていない注意欠陥多動性障害 (attention deficit hyperactivity disorder; ADHD) を糖尿病の発症とほぼ同時期に診断されている。MRI 検査では、14 例において小脳及び脳幹の形態学的異常を認めた。そのうち 5 例では調査時点において精神・神経症状を認めなかった。

18 家系 27 例 (67.5%) において、*WFS1* 遺伝子異常が同定された。そのうち、8 家系 (W1、W3、W4、W6、W7、W9、W17、W18) が血族婚であった。12 例は本調査以前に *WFS1* 遺伝子変異が同定された [6,24,25]。W19 と W20 ではヘテロ接合体性に変異が同定された。一方、変異が同定されなかった症例も 10 家系 11 例 (27.5%) 存在し、このうち 1 例 (W26) は血族婚家系であった。*WFS1* 遺伝子異常を伴わない群では尿崩症と尿路異常の合併頻度が低い傾向にあったが (表 4)、WFS を特徴づける糖尿病と視神経萎縮の発症年齢において、*WFS1* 遺伝子異常の有無による差を認めなかった。(糖尿病 ; 8.1 ± 7.3 vs 11.6 ± 8.6 , $p=0.27$, 視神経萎縮 ; 14.5 ± 10.5 vs 18 ± 11.8 , $p=0.43$) (表 5)

WFS1 遺伝子変異

同定された *WFS1* 遺伝子変異とそれによるアミノ酸配列変化を表 6 に示す。このうち 16 変異がこれまでに報告のないものであった (Table 中に太字で示す)。また、遺伝子解析により同定された *WFS1* の一塩基多型を表 7 に示す。同定された変異はミスセンス変異、ナンセンス変異、挿入・欠失変異など多岐にわたり、変異の集積部位や創始者効果を示唆する共通の変異は存在しなかった。同定された変異の大部分は *WFS1* 蛋白の膜貫通領域と小胞体内腔の COOH 端をコードするエクソン 8 に存在しており、4 変異が *WFS1* 蛋白の NH₂ 端の細胞質側をコードするエクソン 5 またはエクソン 7 に存在した (図 1)。

同定された単アミノ酸置換変異による *WFS1* 蛋白機能障害の有無について *In silico* シミュレーション解析を行った。解析には *PolyPhen*[26](<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) および、*SIFT*[27](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html) を用いて解析した。少なくとも、いずれかのプログラムにおいて、N188S を除くすべての変異により *WFS1* 蛋白機能が障害されることを確認した (表 8)。

W19 および W20 ではヘテロ接合体性に変異を同定した。W19 で同定された 1228del(C) ; del409fs/ter440 は、血族婚家系の W4 ではホモ接合体として同定された。W19 と W4 に血縁関係を認めなかった。また、W19 に同胞はなく、両親に Wolfram 症候群を疑う徴候を認めなかった。一方、W20 で同定された 2524G>A ; E809K はこれまでに報告がなく、非血縁正常人検体のスクリーニングにおいても同定されなかった。さらに、*In silico* 解析では、E809K による *WFS1* 蛋白機能障害が示された。(表 8) しかしながら、家系内に同胞はなく、

父親のみが生存しており遺伝子解析を行い得たが、同様の変異は同定されず、WFSに関連する臨床徴候も認めなかった。

臨床的に WFS と診断されながら *WFS1* 遺伝子変異を認めなかった症例のうち 7 例 (W19、W20、W21、W22、W23、W24、W25) において、*WFS1* 遺伝子座における大規模な欠損や再構成を MLPA 法により解析したが、同定されなかった(図 2)さらに、これらの症例では *WFS2* 遺伝子変異も同定されなかった。

WFS1 遺伝子の遺伝子型-表現型連関

変異により想定される WFS1 蛋白機能への影響に基づき、*WFS1* 遺伝子異常が同定された症例 (表 6) を 3 群に分類した (方法を参照)。各群における糖尿病と視神経萎縮の発症年齢を比較した (図 3A、B)。両方の chromosome に遺伝子構造を明らかに破壊する欠失、挿入および終止変異を有する症例(Group1)では、単一アミノ酸置換変異または単一アミノ酸欠失変異(Group2)に比し糖尿病と視神経萎縮をより早期に発症した (糖尿病; 4.4 ± 1.9 歳 (Group1) vs 13.4 ± 9.9 歳 (Group2), $p=0.008$, 視神経萎縮; 9.6 ± 6.9 歳 (Group1) vs 22.5 ± 12.4 歳 (Group2)), $p=0.014$) (図 3A、3B)。Group1 と Group2 の変異を複合ヘテロ接合体で有する症例(Group3)では、両徴候の発症は Group1 に比し遅く、Group2 よりも早い傾向にあった。一方、Group1 では両徴候の発症年齢および疾患進展は比較的均一であったのに対して、Group2 および Group3 では早期に発症するものから成人になって発症するものまで疾患進展における多様性を認めた (図 3C)。

P724L ホモ接合体変異を有する兄弟例 (W17;Group2) では、糖尿病と視神経萎縮の発症年齢が明らかに遅く、尿崩症の合併もない [6]。K193del をホモ接合体で有する W12(Group2) ではさらに軽症な表現型を呈していた (表 4)。加えて、K193del との複合ヘテロ接合体を有する姉妹例(W10;Group3)では一方の chromosome に遺伝子構造を大きく損なう変異が存在しているにも関わらず、糖尿病の発症年齢が遅く、尿崩症や難聴の合併を認めなかった。

推定有病率

2010 年の時点で生存が確認された症例は、東京都 8 人、大阪府 12 人、東北地方 10 人であった。網羅性の不完全さを前提とし、生存者数を東京都 11.2 人、大阪府 16.8 人、東北地方 14 人と推定した (方法を参照)。それぞれの地域における調査時人口は、東京都 13,159,388 人、大阪府 8,865,245 人、東北地方 9,335,636 人であった。以上より、3 地域における平均有病率を 71 万人に 1 人 (100 万人に 1.415 人) と推定した。

表 4. *WFS1* 遺伝子検査を施行した日本人 Wolfram 症候群における各徴候の発症年齢

No.	Family	Sex	FH of WFS	WFS1 mutation	DM	OA	DI	D	Renal	Neuro	Psychiatric
1	W1	M	✗	Y	3	4	-	6	-	-	-
2	W2	F	N	Y	9	32	32	41	41	+	N/A
3	W3	M	✗	Y	6	11	47	19	47	-	-
4	W4	M	✗	Y	4	12	-	-	-	12(Dysarthria, clumsiness)	-
5	W5	F	N	Y	7	10	7	17	20	43(Brain atrophy, Dizziness)	Attempted suicide, Self injury
6	W6a	M	✗	Y	5	9	12	12	11	26(Brain atrophy)	-
7	W6b	M	✗	Y	3	7	19	10	10	24(Brain atrophy)	Depression
8	W6c	F	✗	Y	4	6	11	7	7	18(Brain atrophy)	Depression
9	W6d	F	✗	Y	5	7	8	5	5	15(Brain atrophy)	-
10	W7a	M	✗	Y	5	9	4	5	N/A	N/A	5(ADHD)
11	W7b	M	✗	Y	3	10	3	3	N/A	N/A	3(ADHD)
12	W8	M	N	Y	3	7	-	5	0	-	-
13	W9a	M	✗	Y	3	5	+	+	+	16(Brain atrophy)	Depression
14	W9b	M	✗	Y	1.5	5	+	+	+	16(Brain atrophy)	Depression
15	W9c	M	✗	Y	5	+	N/A	+	N/A	N/A	N/A
16	W10a	F	Y	Y	17	18	-	-	-	N/A	Mental retardation
17	W10b	F	Y	Y	10	22	-	+	-	38(Brain atrophy)	Depression
18	W11	F	N	Y	4	9	+	9	+	-	-
19	W12	M	N	Y	27	35	-	58	42	53(Brain atrophy)	-
20	W13	F	N	Y	13	10	-	-	-	-	-
21	W14	F	N	Y	10	5	-	-	-	29(Brain atrophy)	-
22	W15	F	N	Y	3	+	7	8	7	N/A	N/A
23	W16	F	N	Y	7	18	-	-	27	30(Brain atrophy)	-
24	W17a	F	✗	Y	23	14	-	-	+	27(Brain atrophy, Nystagmus)	Mental retardation
25	W17b	F	✗	Y	27	<29	-	-	25	29(Brain atrophy, Nystagmus)	Mental retardation
26	W17c	F	✗	Y	10	<30	-	-	+	30(Brain atrophy, Nystagmus)	Mental retardation
27	W18	M	✗	Y	1	<39	39	N/A	N/A	N/A	N/A
28	W19	M	N	Y*	3	26	-	-	-	-	-
29	W20	F	N	Y*	2	14	-	<41	-	N/A	Mental retardation
30	W21	M	N	N	30	40	-	0	-	-	-
31	W22	F	N	N	11	12	-	-	-	-	Mental retardation
32	W23	F	N	N	10	21	-	-	-	-	<22(Depression, Self injury)
33	W24	F	N	N	+	+	N/A	+	N/A	N/A	N/A
34	W25	F	N	N	<22	<22	<22	N/A	N/A	N/A	N/A
35	W26	M	✗	N	0(9M)	7	-	0(9M)	-	Spastic paraplegia	Mental retardation
36	W27a	M	Y	N	3	<3	-	<3	-	Nystagmus	Mental retardation
37	W27b	M	Y	N	7	<7	-	<11	-	-	-
38	W28	F	N	N	10	<27	-	-	-	-	-
39	W29	F	N	N	10	<29	-	-	-	-	-
40	W30	F	N	N	12	12	-	+	-	-	-

M,男性; F,女性; DM,糖尿病; OA,視神経萎縮; D,難聴; DI,尿崩症; 数字は発症年齢を示す; +,発症/発症年齢不明; -,未発症, Y;Yes, N; No, N/A;該当なし, Y+;血族婚あり, Y;単染色体のみに *WFS1* 遺伝子変異を認める

表 5. *WFS1* 遺伝子変異の有無による糖尿病と視神経萎縮の発症年齢

	WFS1 mutation(+) (n=27)	WFS1 mutation(-) (n=11)	<i>P</i>
Age at onset of DM	8.1±7.3	11.6±8.6	0.27
Age at onset of OA	14.5±10.5	18±11.8	0.43

数字は平均±標準偏差を示す

表 6. 同定された *WFS1* 遺伝子変異

Family	Mutation group	Exon	Nucleotide change	Amino acid change	Type of mutation
W1	1	7	796C>T	Q266X	Nonsense
W2	1	8	1032-1033ins9	Ins344AFF	In-frame Insertion
W3	1	8	1109-1110ins5	Ins371fs/ter443	Frameshift
W4	1	8	1228del(C)	Del409fs/ter440	Frameshift
W5	1	8	1401-1403del(GCT), 1525-1539del15	L468X, Del509VYLLY	Nonsense+In-frame deletion
W6a	1	8	1515-1530del15	Del508YVYLL	In-frame deletion
W6b	1	8	1515-1530del15	Del508YVYLL	In-frame deletion
W6c	1	8	1515-1530del15	Del508YVYLL	In-frame deletion
W6d	1	8	1515-1530del15	Del508YVYLL	In-frame deletion
W7a	1	8	1956C>A	Y652X	Nonsense
W7b	1	8	1956C>A	Y652X	Nonsense
W8	1	8	2484ins(GA), 2510G>A	Ins828fs/ter862, W837X	Frameshift+Nonsense
W9a	1	8	2642del(TC)	Del882fs/ter937	Frameshift
W9b	1	8	2642del(TC)	Del882fs/ter937	Frameshift
W9c	1	8	2642del(TC)	Del882fs/ter937	Frameshift
W10a	3	5, 8	577-579del(AAG), 1949-1950del(AT)	Del193K Del650fs/ter710	Deletion+Frameshift
W10b	3	5, 8	577-579del(AAG), 1949-1950del(AT)	Del193K Del650fs/ter710	Deletion+Frameshift
W11	3	5, 8	563A>G, 1359del(C)	N188S, Del453fs/ter475	Missense+Frameshift
W12	2	5	577-579del(AAG)	Del193K	Deletion
W13	2	7, 8	743T>G, 2020G>A	V248G , G674R	Missense+Missense
W14	2	8	908T>C, 1254ins(TCT)	L303P, Ins419L	Missense+In-frame Insertion
W15	2	8	1280T>A	I427N	Missense
W16	2	8	1295T>G, 1552A>G	L432R, M518V	Missense+Missense
W17a	2	8	2171C>T	P724L	Missense
W17b	2	8	2171C>T	P724L	Missense
W17c	2	8	2171C>T	P724L	Missense
W18	2	8	2207G>A	G736D	Missense
W19	N/A	8	1228del(C)	Del409fs/ter440(hetero)	Frameshift
W20	N/A	8	2425G>A	E809K(hetero)	Missense

新に同定された変異を太字で示す

表 7. 同定した *WFS1* の一塩基多型

Exon	Nucleotide change	Aminoacid change
8	1234G>C	V412L
8	1367G>A	R456H
8	1726G>A	G576S
8	1832G>A	R611H
8	2158A>G	I720V
8	2369C>T	S790L
8	2469C>T	I823I
8	2596G>A	D866N

表 8. 同定された単アミノ酸置換変異による *WFS1* 蛋白機能障害の有無

Programs	PolyPhen-2	SIFT
	HumVar Score Prediction	Score Prediction
p.N188S	0.166 Benign	0.55 Tolerated
p.V248G	0.975 Probably damaging	0 Damaging
p.L303P	0.998 Probably damaging	0 Damaging
p.I427N	0.809 Possibly damaging	0 Damaging
p.L432R	0.999 Probably damaging	0 Damaging
p.M518V	0.526 Possibly damaging	0.18 Tolerated
p.G674R	0.999 Probably damaging	0.03 Damaging
p.P724L	1 Probably damaging	0 Damaging
p.G736D	1 Probably damaging	0 Damaging
p.E809K	0.934 Probably damaging	0 Damaging

同定された単アミノ酸置換変異による *WFS1* 蛋白機能障害の有無についてウェブツールの Polymorphism Phenotype2 (Polyphen-2) および Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) を用いて解析した。障害性の判定について、Polyphen-2 および SIFT それぞれによる判定に準じた。

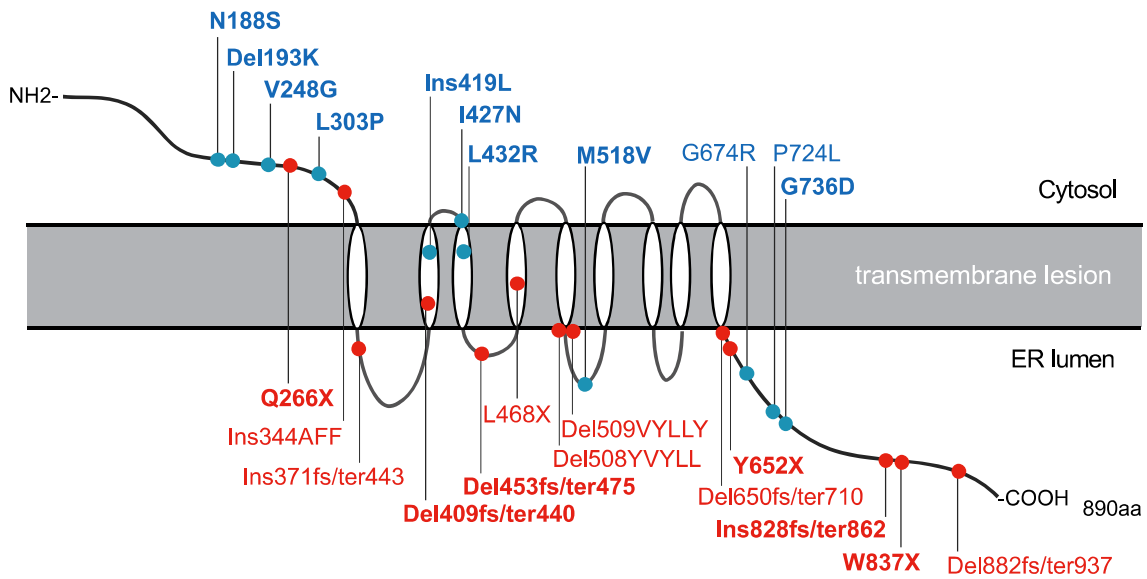


図 1. WFS1 蛋白における同定変異の相対位置

WFS1 蛋白における *WFS1* 変異の相対位置を示す. 変異は変異の種類により色分けし, 完全に WFS1 蛋白の機能を失うと考えられる変異を赤, 一部 WFS1 蛋白の機能を失うと考えられる変異を青で示す. 新に同定された変異を太字で示す.

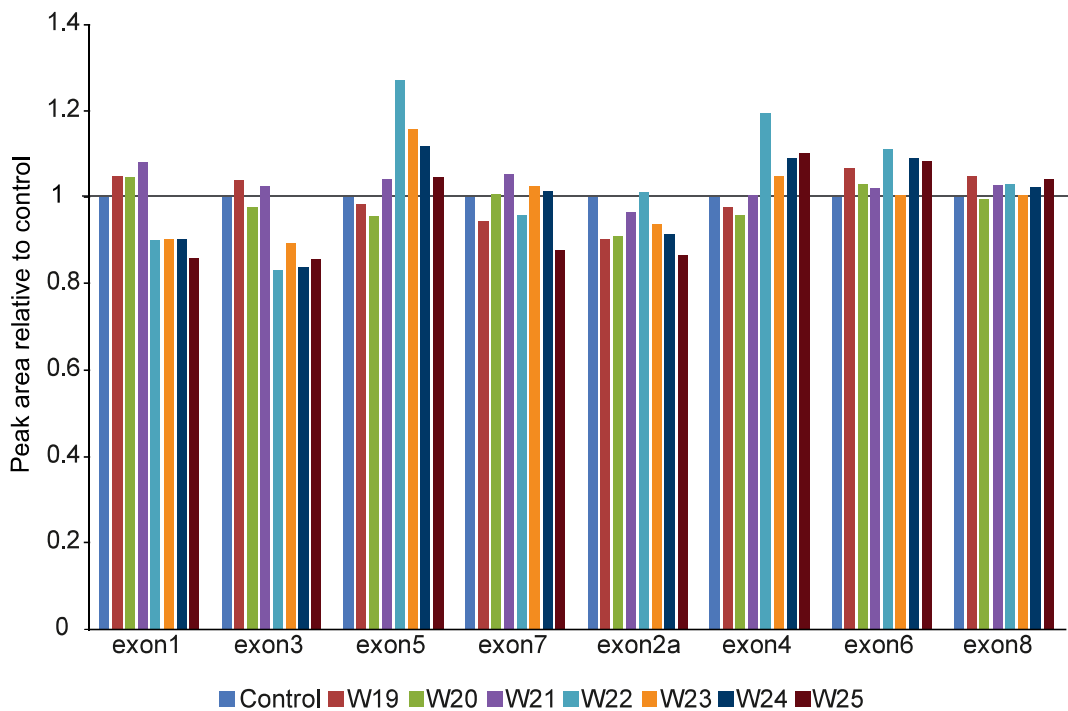


図 2. MLPA 法による欠失解析

各エクソンの対する PCR 産物の発行頂値を正常コントロール検体と対比させることで各エクソンにおけるコピー数の変化を解析した. 正常コントロールを 1 とし, 症例毎に相対量としてグラフ化した.

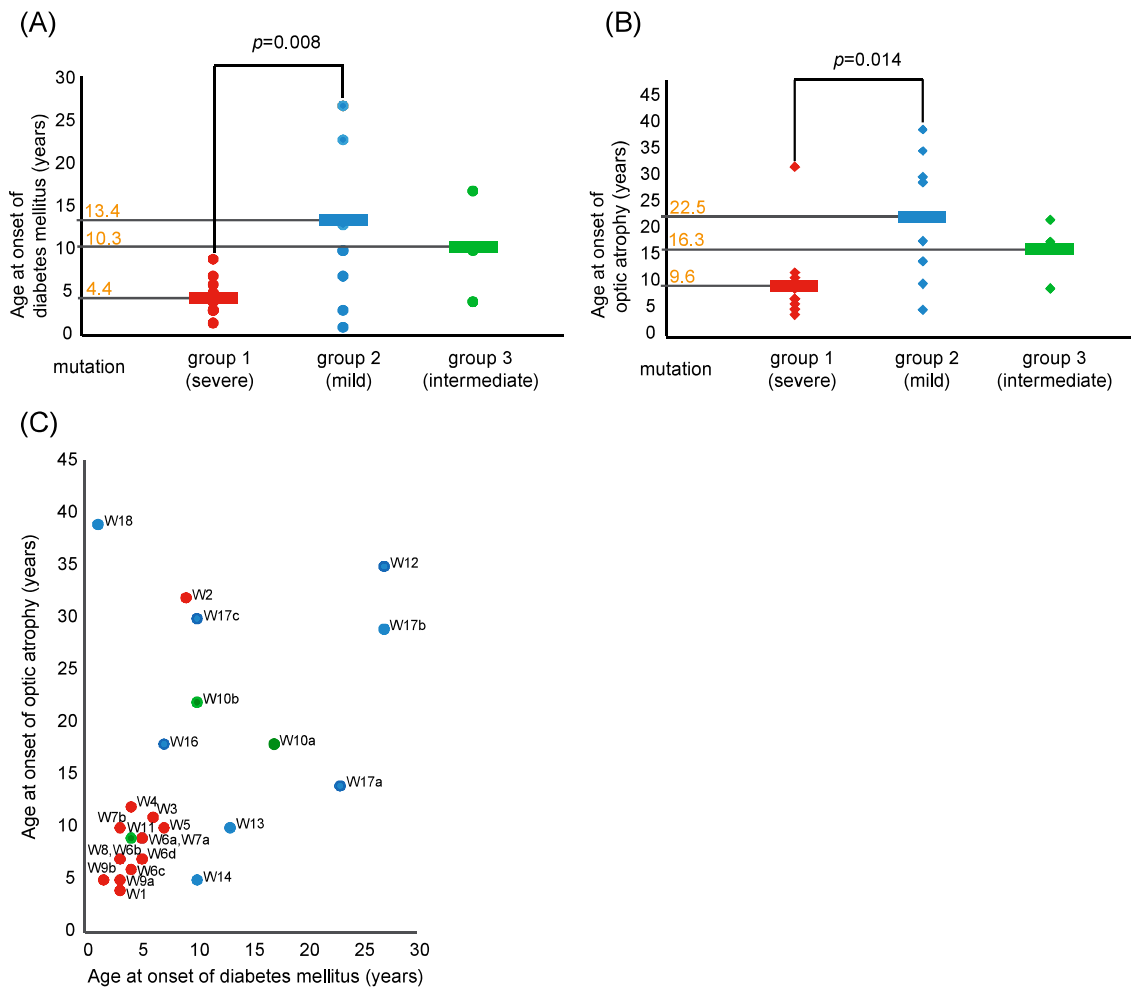


図 3. *WFS1* 変異における遺伝子型-表現型連関

糖尿病 (A) と視神経萎縮 (B) の発症年齢を縦軸に, 各 group を横軸に示す. Group1 (n=15) は赤, group2 (n=9) は青, group3 (n=3) は緑で示す. Group1 と group2 において, 糖尿病の発症年齢は 4.4 ± 1.9 vs 13.4 ± 9.9 歳, $P=0.008$, 視神経萎縮の発症年齢は 9.6 ± 6.9 歳 vs 22.5 ± 12.4 歳, $P=0.014$, と有意差を認めた. 数値は平均 \pm 標準偏差を示す.

(C)各 group の間の個々の症例について, 縦軸に視神経萎縮の発症年齢, 横軸に糖尿病の発症年齢をプロットした. Group1 を赤, group2 を青, group3 を緑で示す.

5. 考察

WFS には希少性に加えて臨床的および遺伝的多様性が存在し, これらが疾患自然史や分子遺伝学的視点からの理解を困難にしてきた. 本研究により, 以下の知見を得ることができた. 1) WFS は日本においても非常に稀な疾患であり, 有病率は 71 万人に 1 人と推定された. 2) 疾患進展および臨床徴候の発症順序に多様性がある. 3) 若年発症の糖尿病と両側視神経萎縮の合併を最小の診断基準とした場合, 約 70% の症例において *WFS1* 遺伝子異常が同定された. 4) 糖尿病と視神経萎縮の発症年齢における遺伝子型-表現型連関が存在する.

これらの知見は WFS の臨床的特徴や遺伝的性質に対し新たな洞察を加えるとともに、診断や治療法の開発にも役立つ可能性がある。

日本における WFS の有病率はイギリスのものに近似した（日本 1/710,000 vs イギリス 1/770,000）[2]。また、主要 4 徴候を有する DIDMOAD 症例の割合は、本研究と同様の診断基準を用いたこれまでの報告と同等であった（49% vs 53%（イギリス）、58%（レバノン））[2, 18]。日本人 WFS においても糖尿病を最も早く発症し、次いで視神経萎縮を発症した。しかしながら、6 例（W7a、W13、W14、W17a、W27a、W27b）では視神経萎縮あるいは尿崩症が初発徴候であった。さらに、糖尿病の次に尿崩症や難聴、精神神経症状が視神経萎縮に先行して出現する症例も 8 例（W5、W6d、W7a、W7b、W8、W21、W26、W27a）存在した。したがって、限られた症例数での解析ではあるが、WFS の経過において主要徴候が出現する順序を区別することは困難と考えられる。このような観察にくわえ、これまでの報告 [5] などからも、WFS 患者が多様な臨床経過を呈することが推察される。そのため、WFS の診断は糖尿病と視神経萎縮の合併により行われているが、主要 4 徴候と精神神経症状のうち 2 徴候以上を認める場合には WFS を疑い、診療にあたる事は临床上、重要である。

早期診断により臨床徴候への早期介入が可能となるため、患者 QOL の向上が期待できる。インスリン依存性糖尿病と視神経萎縮が WFS の初発徴候となる場合が多い。そのため、これらの徴候の診療に携わる糖尿病専門医、小児科医を含めた内分泌専門医および眼科医が WFS を疑うあるいは、診断を行う機会が多いと考えられる。また、学校検診における視力障害や難聴、尿路異常の発見から診断に至る可能性も考えられる。一方、WFS は進行性の経過をたどるため、診断が遅れると患者 QOL の低下は避けられない。Marshall らは [28]、色覚異常と嗅覚障害が早期より出現する特異性の高い症状であることを報告しており、これらの徴候は比較的容易に外来でスクリーニングできるため、早期診断に有用かもしれない。今後、これらの感覚器症状の特異性と診断における有用性を確立するためには、より多くのコホートにおける検討が必要である。一方、家系内に発端者がいる場合には、尿崩症、難聴、視力障害、精神神経症状等の臨床徴候を複数合併していれば、糖尿病の発症に関わらず *WFS1* 遺伝子検査を行うことで早期診断が可能となる。

WFS1 が日本人 WFS の主要な原因遺伝子であった。一方、WFS には遺伝的多様性が存在するため、*WFS1* 以外の遺伝子異常により発症する可能性がある。

本研究でおこなった *WFS1* 遺伝子解析は、エクソン-イントロン境界部と第 1 エクソンより -113bp 上流までを含むが、プロモーター領域や他の転写調節領域における変異の有無は解析されていない。実際に、*WFS1* 遺伝子変異がヘテロ接合性に同定された症例（表 6；W19、W20）では、*WFS1* と疾患発症との関連を明らかにすることが困難であった。一方、*WFS1* 遺伝子座における大規模な再構成や欠失により遺伝子機能を喪失する可能性もある。この点について、変異が同定されなかった 7 症例（表 4；W19、W20、W21、W22、W23、W24、W25）を対象に MLPA 法を用いて解析したが、いずれのエクソンについてもコピー

数の減少を認めなかった(図 2)

糖尿病と視神経萎縮の発症年齢において *WFS1* 遺伝子変異の有無による差を認めなかった (表 5)。現時点では、変異の有無が経過や予後に及ぼす影響や、*WFS1* 遺伝子異常による *WFS* とそれによらない *WFS* が本質的に異なった疾患なのかということとは不明であり、解明するためには長期観察に基づくコホート研究が必要である。

本研究において、多彩な *WFS1* 遺伝子変異が同定された(表 6)。したがって、変異による *WFS1* 機能障害も種々の程度であることが推察される。一方、疾患進展と *WFS1* における表現型-遺伝子型連関が存在した (図 3A, 3B)。このことに関連し、糖尿病と視神経萎縮の発症年齢を個々の症例で比較した場合、*WFS1* 蛋白機能がほぼ廃絶する変異を有する症例 (Group1) では発症年齢や進展速度が比較的同等であったのに対し、単一アミノ酸の置換や欠失を有する症例 (Group2) では様々であった (図 3C)。Group2 の中には、他の症例に比し糖尿病と視神経萎縮の発症が明らかに遅く、尿崩症の合併がないなど軽症な表現型を呈した例が存在した。(表 4 ; W12, W17a, W17b, W17c) このような観察から、単一アミノ酸変化を来す変異においても *WFS1* 蛋白機能障害の程度は様々であると推察できる。このことは *WFS1* 遺伝子変異と *WFS1* 機能障害を考える上で重要である。*WFS* には既知のドメイン構造は存在せず、また、*WFS1* 分子機能やそれに関する細胞内局在あるいは *WFS1* 発現調節に対する変異の影響を正確に予測できる方法も確立されていない。しかしながら、徴候の重症度や進展速度から変異による *WFS1* 機能障害の程度を推定することで、変異により破壊される未知の機能ドメインの発見およびそれに基づいた *WFS1* 分子機能の解明につながる可能性がある。

インスリン依存性糖尿病は *WFS* を特徴づける徴候である。したがって、*WFS* ではインスリンを産生する膵 β 細胞が最も障害されやすい組織の 1 つとして考えられる。そのため、発症メカニズムに関する多くの研究が膵 β 細胞に焦点をあてており、*Wfs1* 欠損マウスにおけるインスリン分泌障害や進行性の膵 β 細胞量減少が明らかにされている [8,9,12,29]。一方、*WFS1* が 2 型糖尿病の疾患感受性遺伝子であることが複数の報告において示されている [30,31,32,33]。*WFS1* 遺伝子多型のうち、本研究でも同定された rs734312(H611R) は 2 型糖尿病発症に対して抑制的に作用する SNP であることが報告されている [30,32]。以上より、*WFS1* が、 β 細胞機能維持に重要な役割をもつことに疑いはなく、*WFS1* 遺伝子多型が 2 型糖尿病の病態形成に深く関与している可能性が示唆される。したがって、*WFS1* 機能の解明を通して、2 型糖尿病の発症機構の解明につながっていく事が期待される。

WFS に関する観察研究について報告した。本研究では、既報との比較において最大規模の症例数について解析を行い得た。本研究で得られた知見が、*WFS* の自然史や臨床徴候に新たな洞察を加えるとともに遺伝的性質への理解を一層深めた。さらに今後、本研究が *WFS* の成因と病態の解明にくわえ、究極的には治療法開発と患者の QOL 向上に寄与することが望まれる。

6. 謝辞

本稿を終えるにあたり、細部にわたりご指導下さいました谷澤幸生教授、田部勝也先生に深く感謝致します。また、本研究にあたり、ご協力頂きました「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」班の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

7. 参考文献

1. Wolfram DJ, Wagener H (1938) Diabetes mellitus and simple optic atrophy among sibilings. A report of four cases. *Proc Mayo Clin* 13: 715-718.
2. Barrett TG, Bunday SE, Macleod AF (1995) Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* 346: 1458-1463.
3. Karasik A, O'Hara C, Srikanta S et al. (1989) Genetically programmed selective islet beta cell loss in diabetic subjects with Wolfram's syndrome. *Diabetes care* 12:135-138,
4. Minton JA, Rainbow LA, Ricketts C, Barrett TG (2003) Wolfram syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 4: 53-59.
5. de Heredia ML, Cleries R, Nunes V (2013) Genotypic classification of patients with Wolfram syndrome: insights into the natural history of the disease and correlation with phenotype. *Genet Med* 15: 497-506.
6. Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, et al. (1998) A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet* 20: 143-148.
7. d'Annunzio G, Minuto N, D'Amato E, de Toni T, Lombardo F, et al. (2008) Wolfram syndrome (diabetes insipidus, diabetes, optic atrophy, and deafness): clinical and genetic study. *Diabetes Care* 31: 1743-1745.
8. Ishihara H, Takeda S, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, et al. (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: 1159-1170.
9. Riggs AC, Bernal-Mizrachi E, Ohsugi M, Wasson J, Fatrai S, et al. (2005) Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia* 48: 2313-2321.
10. Akiyama M, Hatanaka M, Ohta Y, Ueda K, Yanai A, et al. (2009) Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell

- apoptosis in Wfs1 knockout mice. *Diabetologia* 52: 653-663.
11. Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y et al. (2001) WFS1 (Wolfram syndrome1) gene product predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Mol Genet.*10(5):477-484,
 12. Hatanaka M, Tanabe K, Yanai A, Ohta Y, Kondo M, et al. (2011) Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product localizes to secretory granules and determines granule acidification in pancreatic beta-cells. *Hum Mol Genet* 20: 1274-1284.
 13. Yamada T, Ishihara H, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, et al. (2006) WFS1-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers the apoptotic pathway specifically in pancreatic beta-cells. *Hum Mol Genet* 15: 1600-1609.
 14. Gharanei S, Zatyka M, Astuti D, Fenton J, Sik A, et al. (2013) Vacuolar-type H⁺-ATPase V1A subunit is a molecular partner of Wolfram syndrome 1 (WFS1) protein, which regulates its expression and stability. *Hum Mol Genet* 22: 203-217.
 15. Fonseca SG, Ishigaki S, Osowski CM, Lu S, Lipson KL, et al. (2010) Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* 120: 744-755.
 16. Fonseca SG, Urano F, Weir GC, Gromada J, Burcin M (2012) Wolfram syndrome 1 and adenylyl cyclase 8 interact at the plasma membrane to regulate insulin production and secretion. *Nat Cell Biol* 14: 1105-1112.
 17. Amr S, Heisey C, Zhang M, Xia XJ, Shows KH, et al. (2007) A homozygous mutation in a novel zinc-finger protein, ERIS, is responsible for Wolfram syndrome 2. *Am J Hum Genet* 81: 673-683.
 18. Medlej R, Wasson J, Baz P, Azar S, Salti I, et al. (2004) Diabetes mellitus and optic atrophy: a study of Wolfram syndrome in the Lebanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 1656-1661.
 19. Giuliano F, Bannwarth S, Monnot S, Cano A, Chabrol B, et al. (2005) Wolfram syndrome in French population: characterization of novel mutations and polymorphisms in the WFS1 gene. *Hum Mutat* 25: 99-100.
 20. Cano A, Rouzier C, Monnot S, Chabrol B, Conrath J, et al. (2007) Identification of novel mutations in WFS1 and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *Am J Med Genet A* 143A: 1605-1612.
 21. Chaussenot A, Bannwarth S, Rouzier C, Vialettes B, Mkadem SA, et al. (2011)

- Neurologic features and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *Ann Neurol* 69: 501-508.
22. Rohayem J, Ehlers C, Wiedemann B, Holl R, Oexle K, et al. (2011) Diabetes and neurodegeneration in Wolfram syndrome: a multicenter study of phenotype and genotype. *Diabetes Care* 34: 1503-1510.
 23. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, et al. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30: e57.
 24. Inukai K, Awata T, Inoue K, Kurihara S, Nakashima Y, et al. (2005) Identification of a novel WFS1 mutation (AFF344-345ins) in Japanese patients with Wolfram syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 69: 136-141.
 25. Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Taniguchi S, Umetsu M, et al. (2006) A novel mutation of WFS1 gene in a Japanese man of Wolfram syndrome with positive diabetes-related antibodies. *Diabetes Res Clin Pract* 73: 215-217.
 26. Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7:248-249.
 27. Kumar P¹, Henikoff S, Ng PC.(2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 4(7):1073-81.
 28. Marshall BA, Permutt MA, Paciorkowski AR, Hoekel J, Karzon R, et al. (2013) Phenotypic characteristics of early Wolfram syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 8: 64.
 29. Yamaguchi S, Ishihara H, Tamura A, Yamada T, Takahashi R, et al. (2004) Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 250-256.
 30. Sandhu MS, Weedon MN, Fawcett KA, Wasson J, Debenham SL, et al. (2007) Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 39: 951-953.
 31. Florez JC, Jablonski KA, McAteer J, Sandhu MS, Wareham NJ, et al. (2008) Testing of diabetes-associated WFS1 polymorphisms in the Diabetes Prevention Program. *Diabetologia* 51: 451-457.
 32. Franks PW, Rolandsson O, Debenham SL, Fawcett KA, Payne F, et al. (2008) Replication of the association between variants in WFS1 and risk of type 2 diabetes in European populations. *Diabetologia* 51: 458-463.
 33. Wasson J, Permutt MA (2008) Candidate gene studies reveal that the WFS1 gene

joins the expanding list of novel type 2 diabetes genes. *Diabetologia* 51: 391-393.