

GLP-1 受容体シグナルの活性化は Wolfram 症候群モデルマウスにおいて細胞ストレスを軽減し膵β細胞機能を改善する

(Activation of GLP-1 receptor signalling alleviates cellular stresses and improves beta cell function in a mouse model of Wolfram syndrome)

氏名 近藤 学

所属 山口大学大学院医学系研究科 応用医工学系専攻 病態制御内科学分野

平成 31 年 1 月

目次

1. 要旨	1
2. 略語一覧	2
3. 研究の背景	3
4. 目的	5
5. 方法	6
(1) 対象	6
(2) 方法	6
(3) 統計学的解析	8
6. 結果	10
7. 考察	22
8. 結語	24
9. 謝辞	25
10. 参考文献	26

1. 要旨

Wolfram 症候群は *WFS1* 遺伝子の変異によって起こる遺伝性疾患であり、インスリン分泌不全による糖尿病と視神経萎縮を主徴とする。同症候群における膵β細胞機能不全の原因は十分に解明されておらず、特異的治療法は確立されていない。本研究では、*Wfs1* ノックアウトマウスを用いて、Wolfram 症候群における膵β細胞機能不全について解析し、glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 受容体作動薬が同症候群の糖尿病治療に有用であるか、ヒトでの使用結果も加えて検討した。

GLP-1 作動薬であるリラグルチドを 24 週間投与したところ、Wolfram 症候群患者の血糖コントロールは改善し、必要インスリン量が 20%減少した。*Wfs1* ノックアウトマウスにおける膵灌流実験では、グルコース刺激によるインスリン分泌第 1 相とカリウム刺激によるインスリン分泌がそれぞれ 53%、59%低下していた。Total internal reflection fluorescence (TIRF) 顕微鏡による解析でも、*Wfs1* 欠損膵β細胞ではインスリン開口放出の第 1 相が 41%低下していた。GLP-1 作動薬である exendin-4 (Ex-4)を併用した膵灌流実験では、グルコース刺激によるインスリン分泌第 1 相と第 2 相がそれぞれ 3.9 倍、5.6 倍増幅されていた。4 週間にわたって Ex-4 を投与した *Wfs1* ノックアウトマウスでは、膵β細胞量に変化がないにもかかわらず野生型マウスと同程度のインスリン分泌を認め、グルコース負荷後の血糖上昇が抑制された。*Wfs1* 欠損膵β細胞では、Ex-4 投与によって酸化ストレスおよび小胞体ストレス関連マーカーの発現が低下していた。

以上の結果から、GLP-1 受容体作動薬は膵β細胞ストレスを軽減し、膵β細胞機能を改善することで Wolfram 症候群における糖尿病の進行を防ぐ可能性があると考えられる。

2. 略語一覧

AMPK; AMP-activated kinase
ATP6V1a; Vacuolar-type H⁺-ATPase V1A
BafA1; Bafilomycin A1
CPI; CPR index
CPR; C-peptide immunoreactivity
EIF2 α ; Eukaryotic initiation factor 2 α
ER; Endoplasmic reticulum
EX-4; Exendin-4
GLP-1; Glucagon-like peptide-1
GSIS; Glucose-stimulated insulin secretion
KRBH; KRB HEPES
SUIT; Secretory units of islets in transplantation
TIRFM; Total internal reflection fluorescence microscopy
TXNIP; Thioredoxin interacting protein
WT; Wild-type
WFS1; Wolfram syndrome 1 protein

3. 研究の背景

Wolfram 症候群は若年発症の糖尿病、視神経萎縮、尿崩症、難聴などを主徴とする遺伝性疾患である（参考文献 1）。糖尿病が初発徴候となることが多く（参考文献 1,2,3）、患者の膵臓では膵ベータ細胞が選択的に脱落していることが明らかになっている（図 1；参考文献 4）。原因遺伝子である *WFS1* は 100 kDa の蛋白質をコードしており、マウスの膵ベータ細胞を用いた解析によって、同蛋白質は小胞体と分泌顆粒に局在することが解明されている（図 2；参考文献 5,6）。*Wfs1* ノックアウトマウスでは、Ca 代謝異常に伴い小胞体ストレスが亢進しており、結果として膵ベータ細胞機能不全と膵ベータ細胞量の減少が起こると考えられている（参考文献 7-10）。さらに、*WFS1* はインスリン分泌顆粒内の酸性化維持に必要であり、インスリン合成やインスリン分泌顆粒の開口放出に寄与していることが明らかになっている（参考文献 6）現時点で、**Wolfram** 症候群における糖尿病に対してはインスリンを用いた血糖コントロールが主治療として行われているが、膵ベータ細胞機能不全に対する根本的治療の確立が待望されている。

図1 Wolfram症候群患者の膵ランゲルハンス島では膵ベータ細胞が脱落している (Karasik A, 1989)

(A-B)Hematoxylin-Eosin染色 (C-D)インスリン染色(E-F)Hグルカゴン染色
A,C,Eが健常人の膵ランゲルハンス島、B,D,FがWolfram症候群患者の膵ランゲルハンス島

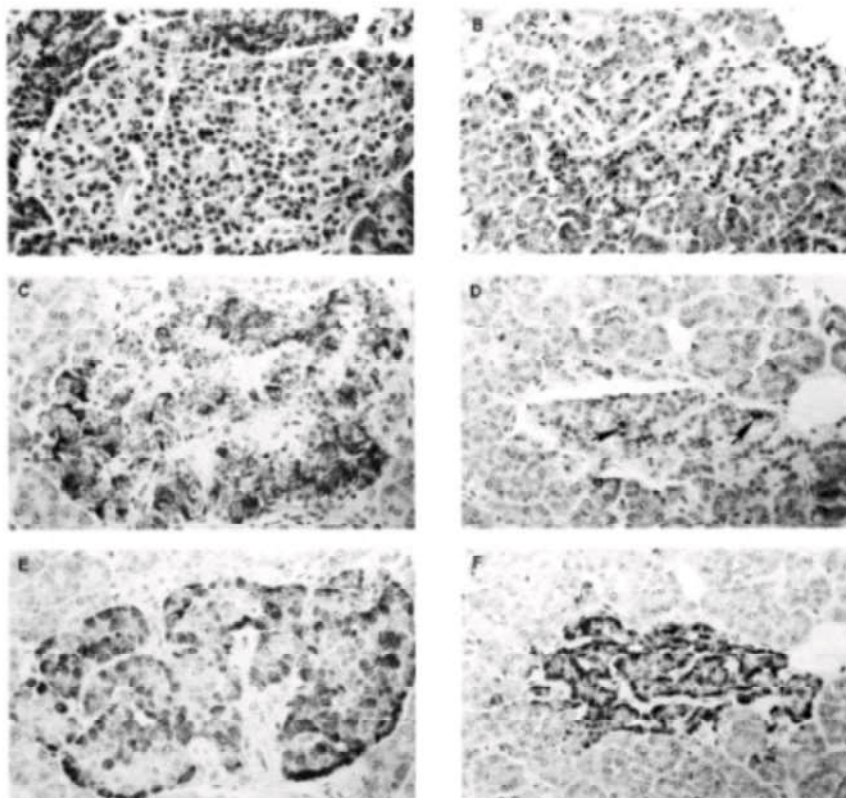
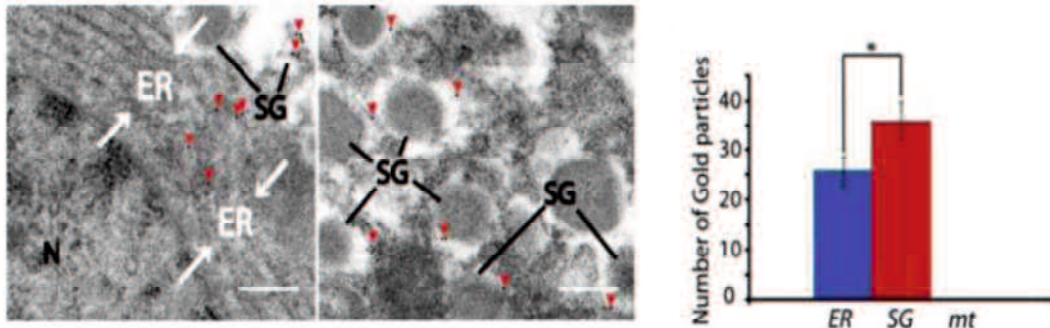


図2 WFS1蛋白質は膵β細胞において小胞体と分泌顆粒に局在する

(Hatanaka M, 2011)

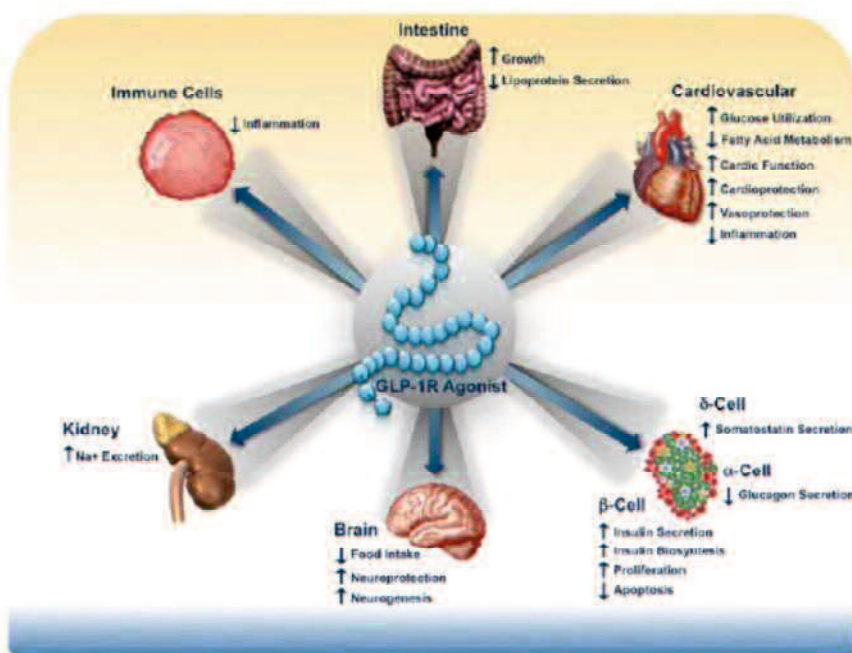
野生型マウスの膵β細胞を金コロイド免疫電顕法で観察。

ER ; 小胞体、SG ; 分泌顆粒、mt ; ミトコンドリア



消化管から分泌されるホルモンのうち、膵β細胞に働きインスリン分泌を促進する作用を持つものはインクレチンと総称されており、**glucagon-like peptide-1 (GLP-1)**はそのひとつである。膵島における GLP-1 の生理的な作用は血糖値依存的なグルコース応答性インスリン分泌促進作用とグルカゴン分泌抑制作用であり、両者によって血糖降下作用を発揮する。GLP-1 は糖尿病治療に応用されており、本邦でもリラグルチドのような1日1回製剤やデュラグルチドのような週1回製剤が GLP-1 受容体作動薬として上市されている。GLP-1 受容体作動薬は内因性 GLP-1 の生理的濃度を超えて血中に存在することから、上記の生理的作用に加えて、中枢神経、心臓、腎臓といった多くの臓器に影響を及ぼすと考えられている。また、げっ歯類でのデータが中心ではあるが、膵β細胞のアポトーシスを抑制し、膵β細胞を増殖させるとの報告もある(図3; 参考文献 11)

図3 GLP-1受容体作動薬の多彩な作用 (Jonathan E. Campbell, 2013)



4. 目的

Wolfram 症候群患者は幼少期に糖尿病を発症するが、膵β細胞不全に対する特異的治療は確立されていない。

本研究の目的は **GLP-1** 受容体作動薬が同症候群の糖尿病治療に有用であるかを検討することである。我々は、インスリン依存状態にある **Wolfram** 症候群の女性において、**GLP-1** 受容体作動薬であるリラグルチドが膵β細胞機能や血糖コントロールにどのような効果をもたらしたかを後方視的に解析した。そのうえで、*Wfs1* ノックアウトマウスを用いて、**WFS1** 欠損によって起こるインスリン分泌障害についてインスリン分泌動態を中心に解析し、**GLP-1** 受容体作動薬がどのような改善効果をもたらすかを観察した。

5. 方法

(1) 対象

インスリン依存状態の糖尿病、視神経萎縮、難聴、尿崩症を認める 25 歳の **Wolfram** 症候群女性を対象に、リラグルチドの効果を後方視的に検証した。女性は 5 歳時に糖尿病と診断され、15 歳からインスリン療法を継続しているが、血糖値の変動が大きく頻回に低血糖を起こしていた。全ての検査データは秋田大学医学部附属病院で測定された。グルカゴン負荷試験における Δ CPR は、 $(1 \text{ mg グルカゴン負荷 6 分後の C-ペプチド値}) - (\text{負荷前 C-ペプチド値})$ である。SUIT インデックスは既報に則って計算した (参考文献 12)。検査データ収集および後方視的なデータ解析については、対象者から文書による同意を得たうえで、秋田大学医学部附属病院 (承認番号 723) および山口大学医学部附属病院 (承認番号 H22-47-2) の倫理委員会によって承認を受けて行われた。

動物実験は、山口大学動物実験委員会の承認を得て (承認番号 25-020)、国立大学法人山口大学における動物使用に関する規則ならびにアメリカ国立衛生研究所のガイドラインに従って行った。C57BL/6J を背景に作製された (参考文献 9) 5 週から 12 週齢の Wfs1 ノックアウトマウスおよび同腹の野生型マウスの雄のみを実験に使用した。マウスは山口大学総合科学実験センター生命科学実験施設において、12 時間の明暗周期のもと自由摂食下で飼育された。

(2) 方法

16 時間の絶食下に置かれた 10 週齢のマウスを用いて、既知の方法で腓灌流実験を行った (参考文献 13)。全身麻酔後、両側腎動脈と上腸間膜動脈を結紮した後に横隔膜下で大動脈を結紮した。大動脈に留置したカテーテルから、灌流液 (4.6%デキストランと 0.25%BSA を加えた KRBH バッファー) を注入し、門脈から回収した。灌流速度は 1 ml/時に設定した。Ex-4 を使用した実験では、16.7 mmol/l グルコース溶液による灌流の 5 分前から 10 nmol/l の Ex-4 を投与した。バフィロマイシン A1 (BafA1) を使用した実験では、16.7 mmol/l グルコース溶液による灌流の 30 分前から、100 nmol/l の BafA1 と 2.8 mmol/l グルコースを含む溶液で灌流した。回収された灌流液中のインスリン濃度は、マウスインスリン測定キット (森永生科学研究所) を用いて ELISA 法で測定した。

Total internal reflection fluorescence (TIRF) 顕微鏡による観察は、10 週齢のマウスを用いて既報に従って行った (参考文献 14)。データ解析には MetaMorph software version 6.1 を使用した。

腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT) では、6 時間の絶食後に 2 g/kg body weight のブドウ糖を腹腔内投与した。Ex-4 の急性効果を確認する実験では、10 週齢のマウスに対して、24 nmol/kg body weight の Ex-4 を IPGTT の 60 分前に腹腔内投与した。Ex-4 の慢性効果を確認する実験では、5 週齢から 4 週間に渡って 24 nmol/kg body weight の Ex-4 を 1 日 2 回腹腔内投与した。Ex-4 最終投与後に 48 時間のウォッシュアウト期間を設け、12 時間の絶食後に IPGTT を施行した。IPGTT ではブドウ糖負荷前と負荷後 2 分・5 分・15 分・30 分・60 分の血

糖値およびインスリン値を測定した。血糖測定には Antsense を、インスリン測定には前述のマウスインスリン測定キットを使用した。

免疫組織化学染色は、4%パラホルムアルデヒドで固定したマウス膵臓のパラフィン切片を用いて行った。使用した抗体は表1の通りである。膵β細胞の定量は既報の通りに行った(参考文献15)。AMP-activated kinase (AMPK)の検出にはTSAキット(Perkin Elmer)を使用した。免疫組織化学染色後の画像は蛍光顕微鏡(Keyence Biozero)を用いて撮影した。

表1 免疫組織化学染色に使用した抗体一覧

Antigen	Species	Source	RRID	Dilution
Insulin	Guinea pig	Dako, Agilent Technologies, Tokyo, Japan	N/A	1:1
Glucagon	Mouse	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	AB_259852	1:2,000
p-eIF2 α (Ser51)	Rabbit	CST, Danvers, MA, USA	AB_2096481	1:100
p-AMPK α (Thr172)	Rabbit	CST, Danvers, MA, USA	AB_331250	1:100
TXNIP	Mouse	MBL, Nagoya, Japan	AB_592934	1:100

Secondary antibodies				
Antigen	Species	Source	RRID	Dilution
Guinea pig	Donkey (FITC-conjugated)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA	AB_2340453	1:200
Guinea pig	Donkey (Cy3-conjugated)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA	AB_2340460	1:500
Mouse	Donkey (Cy3-conjugated)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA	AB_2340813	1:500
Rabbit	Donkey (Cy3-conjugated)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA	AB_2307443	1:500

マウスの膵ランゲルハンス氏島は、既報に従い、総胆管からのコラゲナーゼ注入によって採取した(参考文献6)。採取した膵ランゲルハンス氏島は、単離後24時間の培養を経て実験に使用した。

ウエスタンブロッティング法を使用した実験では、単離された膵ランゲルハンス氏島から抽出した蛋白質を4-20%の濃度勾配ゲルを用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動し、ニトロセルロース膜へブロットした。バンド濃度の解析にはNIH Image J software version 1.51s (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>)を使用した(参考文献16)。使用した抗体は表2の通りである。また、WFS1に対する抗体は既報に従って作製されたものを使用した(参考文献5)。

定量的リアルタイムPCR法を用いた実験にはPowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)を使用した。PicoPure RNA isolation kit (Thermo Fisher Scientific)を用いてRNAを単離し、cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems)を用いてcDNAを作製した。使用したプライマーは表3の通りである。遺伝子発現量はCypaを内部標準遺伝子として用いて $\Delta\Delta C_t$ 法で解析した。

(3) 統計学的解析

各群間の有意差検定については、two-tailed Student's t test もしくは one-way ANOVA を用いて行った。解析には GraphPad Prism software version 7 (GraphPad) を使用した。ANOVA 法における P 値の補正には Bonferroni 法を用いた。P 値<0.05 の場合に有意差ありと判定した。

表2 ウェスタンブロッティング法に使用した抗体一覧

Antigen	Species	Source	RRID	Dilution
TXNIP	Mouse	MBL, Nagoya, Japan	AB_592934	1:2,000
p-AMPK α (Thr172)	Rabbit	CST, Danvers, MA, USA	AB_331250	1:1,000
AMPK α	Rabbit	CST, Danvers, MA, USA	AB_10841287	1:1,000
WFS1	Rabbit	Originally raised	N/A	1:1,000
α -tubulin	Mouse	CST, Danvers, MA, USA	AB_1904178	1:4,000
Syntaxin-1A	Rabbit	CST, Danvers, MA, USA	N/A	1:1,000
Rab27A	Sheep	R&D systems, Minneapolis, MN, USA	N/A	1:1,000
SNAP25	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	AB_11150318	1:1,000
VAMP2	Rabbit	Abcam, Tokyo, Japan	AB_2212462	1:1,000
ATP6V1A	Rabbit	Abcam, Tokyo, Japan	N/A	1:1,000
GAPDH	Mouse	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	AB_1078991	1:5,000

Secondary antibodies				
Antigen	Species	Source	RRID	Dilution
Mouse	Goat (peroxidase-conjugated)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA	AB_10015289	1:5,000
Rabbit	Donkey (peroxidase-conjugated)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA	AB_10015282	1:5,000
Sheep	Donkey (peroxidase-conjugated)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA	AB_2340710	1:5,000

表3 定量的リアルタイムPCR法に用いたプライマー一覧

Gene	Forward	Reverse
cyclophilin A	TGTGCCAGGGTGGTGACTTTAC	TGGGAACCGTTTGTGTTTGG
Nrf2	TTCTTTCAGCAGCATCCTCTCCAC	ACAGCCTTCAATAGTCCCGTCCAG
Catalase	ATGAAGCAGTGGAAGGAGCAGC	CTGTCAAAGTGTGCCATCTCGTC
Sod1	GCAGGACCTCATTTTAATCCTC	ATTGCCCAGGTCTCCAACATG
Hmox1	GTGATGGAGCGTCCACAGC	TTGGTGGCCTCCTTCAAGG
CHOP	CCACCACACCTGAAACGAGAA	AGGTGAAAGGCAGGGACTCA
Bip	TTCAGCCAATTATCAGCAAACCTCT	TTTTCTGATGTATCCTATTCACCAGT
spliced XBP1	CTGAGTCCGAATCAGGTGCAG	GTCCATGGGAAGATGTTCTGG
ATF4	GGACAGATTGGATGTTGGAGA	AGAGGGGCAAAAAGATCACAT
Insulin2	GTCAAGCAGCACCTTTGTGG	TCTGAAGGTCACCTGCTCCC
Pdx1	ACCATGAACAGTGAGGAGCA	TCCTCTTGTTTTCTCGGGT
UCP2	CAGATGTGGTAAAGGTCCGCTTC	AGAAGTGAAGTGGCAAGGGAGG
TXNIP	TATGTACGCCCTGAGTTCC	GCTCACTGCACGTTGTTGTT
ATF5	AGGTGTATAAGGCCCGAAGC	AGTGTGACGCTGGAGACAGA
ChREBP	GCTTATGTTGGCAATGCTGA	GGCGGTAATTGGTGAAGAAA

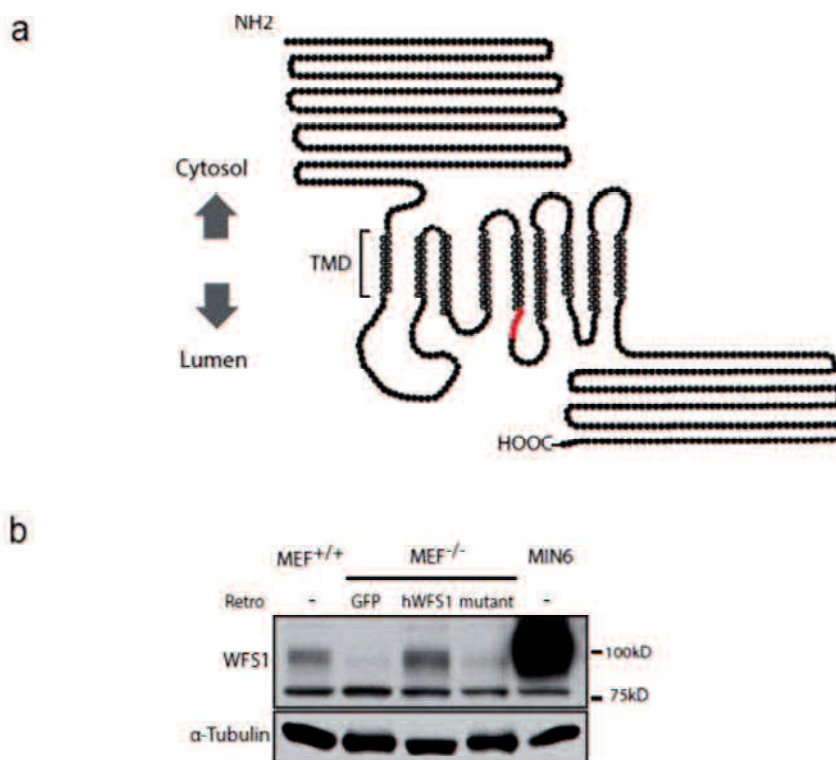
6. 結果

(1) インスリン依存状態にある Wolfram 症候群女性において、リラグルチド治療は膵β細胞機能を部分的に回復させ、血糖コントロールを改善した

対象となった Wolfram 症候群女性はインスリン依存状態にあり、精神神経症状以外の Wolfram 症候群の主要徴候を呈していた。膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間に 5 アミノ酸欠損を生じるインフレーム欠失変異を有しており(図 4a)、この *WFS1* 遺伝子変異によって WFS1 蛋白質の発現低下および機能障害が起こっていると考えられた(図 4b)。

図4 Wolfram症候群女性におけるWFS1遺伝子変異の解析

(a) 想定されるWFS1蛋白質の構造と同女性のアミノ酸欠損部位(赤色部分) (b) *Wfs1* をノックアウトしたMEFに正常*WFS1*遺伝子と変異遺伝子をそれぞれ強制発現させ、ウエスタンブロット法で解析した。GFPを強制発現させたものをネガティブコントロールとして用いた。ポジティブコントロールとして野生型のMEFおよびMIN6細胞から抽出した蛋白質をそれぞれ左端、右端に示す。



体重は 52.6 kg で肥満はなく、基礎インスリンとして 22 単位、追加インスリンとして 18 単位の 1 日合計 40 単位を自己注射しており、治療開始時の HbA1c は 7.6%であった(表 4)。空腹時血清 CPR(C peptide reactivity)は 0.077 nmol/l と非常に低く、CPI (C peptide index)と SUIT(Secretory units of islets in transplantation)

表4 代謝関連項目の変化

Variable	Time after GLP-1 therapy (weeks)			
	0	8	16	24
Body weight (kg)	52.6	51.4	52.2	52.7
HbA _{1c} (mmol/mol)	60	57	52	54
HbA _{1c} (%)	7.6	7.4	6.9	7.1
Fasting plasma glucose (mmol/l)	12.4	7.7	9	7.3
Total insulin (U)	40	34	32	32
Bolus insulin (U)	18	16	15	15
Basal insulin (U)	22	18	17	17

index はそれぞれ 0.65 nmol/mmol、2.13 であった(表 5)。インスリン分泌予備能の指標となる ΔCPR、蓄尿 CPR はそれぞれ 0.08 nmol/l、2.16 nmol/24 h であった(表 5)。

リラグルチド開始後、空腹時血糖値は 7.3 から 9 mmol/l で推移した。HbA1c 値は 7.6%から 6.9%へ徐々に低下し、低血糖頻度は減少した(表 4)。体重は一時的に 1.2 kg 減少したが、その後治療開始時と同等になった。血糖コントロールの改善にともなってインスリン注射量は調整され、最終的に治療開始時と比べて必要インスリン量は 20%減少した。リラグルチド投与から 48 時間後に空腹時血清 CPR を測定したところ、空腹時血糖値が低下しているにもかかわらず、CPR 値は治療開始時よりも上昇していた(表 5)。リラグルチド開始 4 週後の時点で、開始時と比較して SUIT index と CPI はそれぞれ 3.6 倍、2.6 倍に増加しており、両者の増加は 16 週後まで維持された(表 5)。これらの結果から、長期間に渡ってインスリン療法と必要としている Wolfram 症候群患者において、GLP-1 受容体作動薬は膵β細胞機能に好影響を及ぼし、血糖コントロールを改善

表5 残存膵β細胞機能の変化

Variable	Time after GLP-1 therapy (weeks)		
	0	4	16
Fasting CPR (nmol/l)	0.077	0.13	0.11
ΔCPR(nmol/l)	0.08	n/a	n/a
Urinary CPR (nmol/24 h)	2.16	n/a	n/a
CPI (nmol/mmol)	0.65	1.69	1.22
SUIT index	2.13	7.75	4.8

することが示唆された。

(2) *Wfs1* ノックアウトマウスではグルコースおよびカリウム刺激によるインスリン分泌が低下している

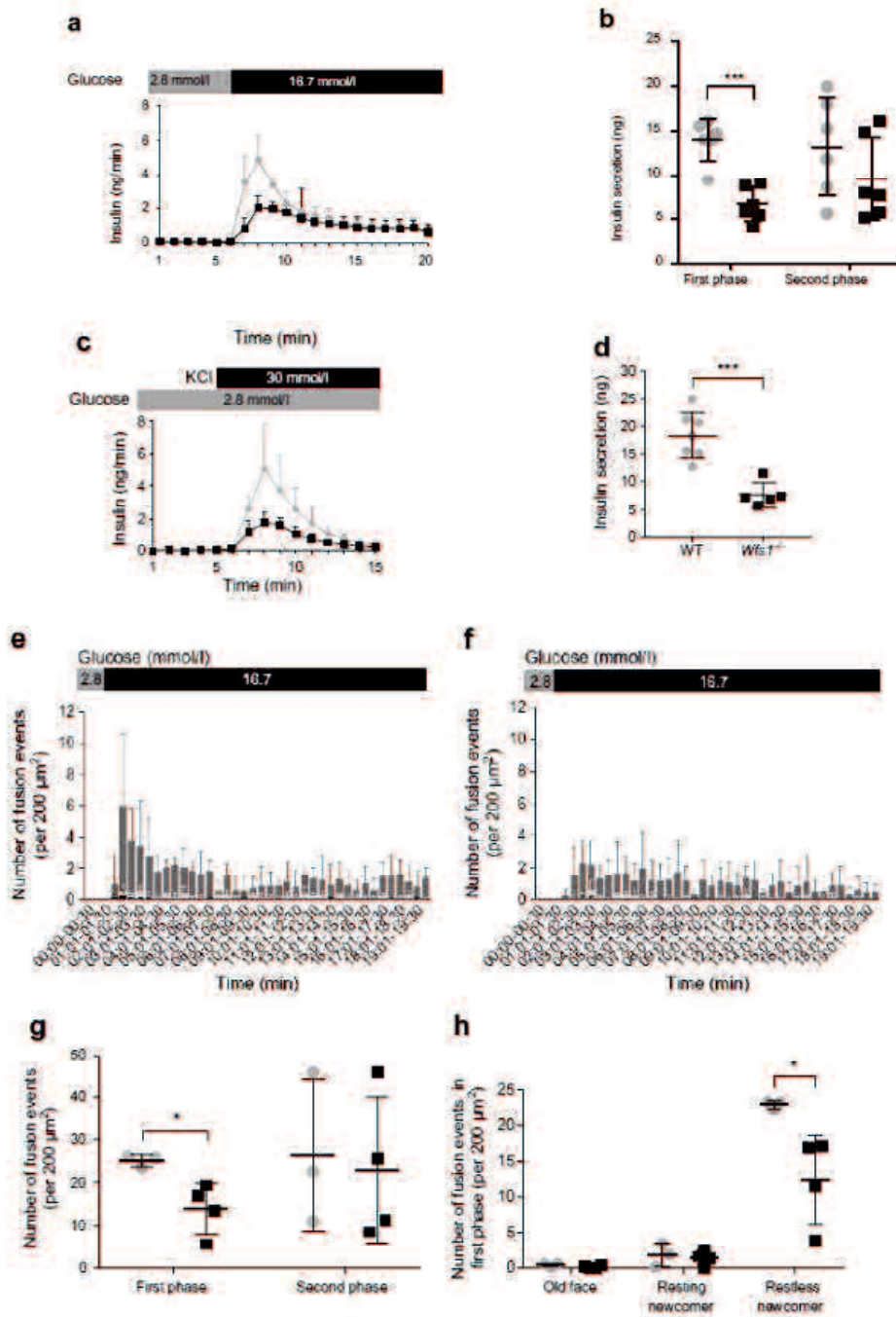
Wolfram 症候群女性において GLP-1 受容体作動薬が血糖降下作用を示したことにより、発症初期の段階で GLP-1 受容体作動薬を用いることで、同症候群における膵ベータ細胞機能低下を防ぎ、糖尿病の進行を遅らせるのではないかと考えられた。膵ベータ細胞における WFS1 蛋白質の機能をさらに解析するため、空腹時および随時血糖値がまだ上昇していない 10 週齢の *Wfs1* ノックアウトマウスを用いて、膵還流法によってインスリン分泌動態を解析した。野生型マウスでは 16.7 mmol/l のグルコース刺激によって著しくインスリン分泌が上昇したが、*Wfs1* ノックアウトマウスでは明らかにインスリン分泌が減弱していた。*Wfs1* ノックアウトマウスのインスリン分泌第 1 相（グルコース刺激 6~10 分後）は野生型マウスと比較して 53%減弱していた(図 5a)。一方で、インスリン分泌第 2 相（グルコース刺激 11~20 分後）は野生型マウスと同程度であり(図 5b)、WFS1 蛋白質がグルコース刺激後早期のインスリン分泌に必要であることが示された。これを支持するように、*Wfs1* ノックアウトマウスでは、30 nmol/l KCl 投与 10 分後のインスリン分泌が野生型マウスと比べて 59%減弱していた(図 5c, d)。

次に、我々は TIRF 顕微鏡を用いてインスリン分泌顆粒動態を解析した。既報に基づき、インスリン分泌顆粒の開口放出パターンは(1) old face (2) restless newcomer (3) resting newcomer の 3 種類に分類した (参考文献 14)。グルコース刺激によるインスリン分泌顆粒の開口放出は主に restless newcomer によって構成されていた。グルコース刺激後早期に認められた開口放出は *Wfs1* ノックアウトマウスから採取した膵ベータ細胞において著明に減少していたが(図 5e, f)、インスリン分泌第 1 相では野生型と比較して 41%減少していたのに対して、インスリン分泌第 2 相においては野生型との差を認めなかった(図 5g)。また、開口放出のパターン別に解析すると、restless newcomer の減少が主因であることが判明した(図 5h)。

図5 *Wfs1*欠損によるインスリン分泌障害

(a) 膵還流法による高濃度グルコース刺激に対するインスリン分泌動態の解析。*Wfs1* ノックアウトマウスを黒四角、野生型マウスを灰色丸で示す。(b)インスリン分泌第1相 (6-10分) と第2相 (11-20分) の比較。(c)KCl刺激に対するインスリン分泌。*Wfs1* ノックアウトマウスを黒四角、野生型マウスを灰色丸で示す。(d)KCl刺激後インスリン分泌の比較。それぞれ6回の実験データからグラフを作成し、平均値±SDで示す。

(e-h) TIRF顕微鏡による10週齢マウスにおけるインスリン分泌顆粒動態の解析。(e)野生型マウス、(f) *Wfs1*ノックアウトマウスからそれぞれ採取した膵ベータ細胞を16.7 mmol/lのグルコースで刺激し、細胞表面面積200 mm²あたりの膜融合数を30秒ごとに計測した。Old faceを黒、Restless newcomerを濃い灰色、Resting newcomerを薄い灰色で示す。(g)インスリン分泌第1相 (0:00-0:30から05:01-05:30) と第2相 (05:30-06:00から15:01-15:30) の膜融合数の比較。*Wfs1*ノックアウトマウス(n=4)を黒四角、野生型マウス(n=3)を灰色丸で示す。(h)インスリン分泌顆粒開口放出のパターンごとに比較した膜融合数。*Wfs1*ノックアウトマウスを黒四角、野生型マウスを灰色丸で示す。平均値±SD。*p < 0.05, ***p < 0.001 (un-paired Student's t test)



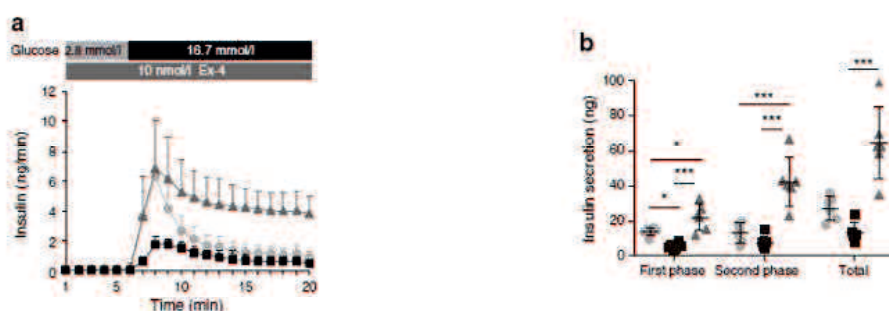
(3) GLP-1 受容体の活性化は *Wfs1* ノックアウトマウスのインスリン分泌を増幅する

さらに、*Wfs1* ノックアウトマウスにおける GLP-1 受容体作動薬 Ex-4 のインスリン分泌増幅効果を膝還流法で検討した。生理食塩水単独による還流と比較して、Ex-4 は *Wfs1* ノックアウトマウスのインスリン分泌第 1・2 相をそれぞれ 3.9 倍、5.6 倍に増幅させた(図 6a)。Ex-4 によって増幅されたインスリン分泌は、生理食塩水のみで還流された野生型マウスにおけるインスリン分泌第 1・2 相のそれぞれ 1.6 倍、3.2 倍に達していた(図 6b)。

また、WFS1 蛋白質は vacuolar-type H⁺-ATPase V1A (ATP6V1a)蛋白質の安定化に寄与すると報告されており(参考文献 17)、*Wfs1* ノックアウトマウスから単離した膝ランゲルハンス氏島では、野生型マウスの膝ランゲルハンス氏島と比較して、V-ATPase を構成するサブユニットの一つである ATP6V1a 蛋白質の発現が 44%低下していた(図 7)。インスリン分泌顆粒内の酸性化は V-ATPase によって維持されていることから、*Wfs1* 欠損膝ベータ細胞における顆粒内酸性化障害は V-ATPase の機能不全に起因している可能性があると考えられた。顆粒内酸性化障害がインスリン分泌に及ぼす影響を調べるため、V-ATPase 阻害剤であるバフィロマイシン A1(Baf A1)処理後に行った膝還流実験では、グルコース応答性インスリン分泌が高度に障害されていた(図 6c, d)。重要なことに、Baf A1 処理後であっても Ex-4 はグルコース応答性インスリン分泌を増幅させており、インスリン分泌第 1・2 相がそれぞれ 4.8 倍、22.4 倍に増加していた(図 6f)。

図6 *Wfs1* 欠損および酸性化障害に起因するインスリン分泌障害に対する Ex-4 の効果

(a) 10 mmol/l Ex-4 添加によるインスリン分泌動態の変化。野生型マウス+生理食塩水を薄灰色丸、*Wfs1* ノックアウトマウス+生理食塩水を黒四角、*Wfs1* ノックアウトマウス+10 mmol/l Ex-4 を濃灰色三角で示す。各群とも n=6。 (b) インスリン分泌第 1 相 (6-10 分) と第 2 相 (11-20 分) の比較。野生型マウス+生理食塩水を薄灰色丸、*Wfs1* ノックアウトマウス+生理食塩水を黒四角、*Wfs1* ノックアウトマウス+10 mmol/l Ex-4 を濃灰色三角で示す。平均値±SD。*p < 0.05, ***p < 0.001 (ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.) (c) 100 nmol/l BafA1 処理によるインスリン分泌動態の変化。コントロール群 (n=5) を薄灰色丸、BafA1 処理群 (n=4) を黒四角で示す。 (d) インスリン分泌第 1 相 (6-10 分) と第 2 相 (11-20 分) の比較。コントロール群 (n=5) を薄灰色丸、BafA1 処理群 (n=4) を黒四角で示す。**p < 0.01 (unpaired Student's t test) (e) 100 nmol/l BafA1 処理後に 10 mmol/l Ex-4 を添加して膝還流した際のインスリン分泌動態。BafA1+生理食塩水 (n=5) を黒四角、BafA1+10 mmol/l Ex-4 (n=5) を濃灰色三角で示す。 (f) インスリン分泌第 1 相 (6-10 分) と第 2 相 (11-20 分) の比較。BafA1+生理食塩水 (n=5) を黒四角、BafA1+10 mmol/l Ex-4 (n=5) を濃灰色三角で示す。**p < 0.01 (unpaired Student's t test)



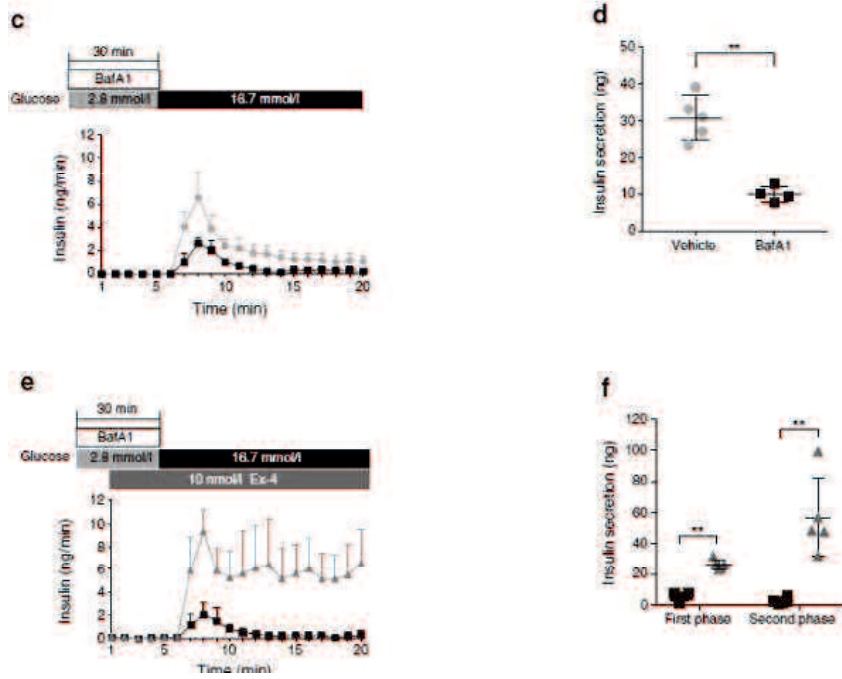
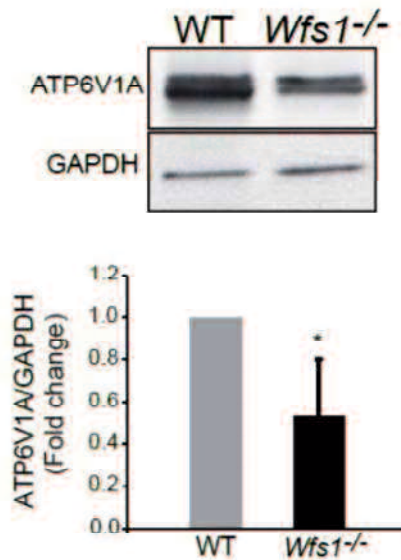


図7 *Wfs1*ノックアウトマウスの膵ランゲルハンス氏島ではATP6V1a蛋白質の発現が低下している

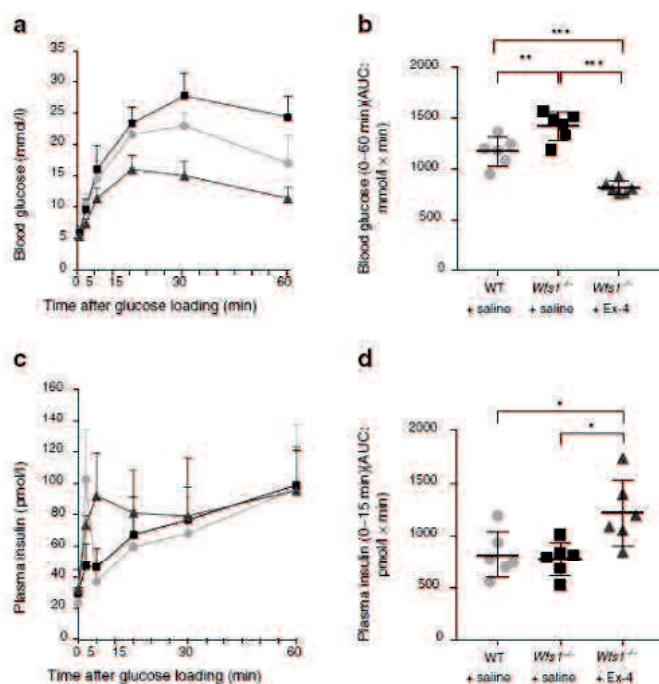
10週齢の野生型マウスおよび*Wfs1*ノックアウトマウスから膵ランゲルハンス氏島を採取しウエスタンブロッティング法で蛋白質発現量を解析した。各群ともに5回の実験データからグラフを作成し、平均値±SDで示す。* $p < 0.05$



次に、我々はマウス個体における GLP-1 受容体活性化の急性効果について検討した。10 週齢の *Wfs1* ノックアウトマウスでは、随時血糖値は上昇していないが、腹腔内グルコース負荷試験では耐糖能異常を認めた(図 8a)。Ex-4 を投与することで、*Wfs1* ノックアウトマウスにおけるグルコース負荷後の血糖上昇は野生型マウスよりも抑制された(図 8a,b)。また、*Wfs1* ノックアウトマウスではグルコース負荷後のインスリン初期分泌が減弱していたが(図 8c)、Ex-4 によってグルコース負荷 15 分後までのインスリン分泌が大幅に増加した(図 8d)。

図8 *Wfs1*ノックアウトマウスの耐糖能とグルコース応答性インスリン分泌に対するEx-4の急性効果

(a-d) グルコース負荷60分前に24 nmol/kg body weightの Ex-4を腹腔内投与しIPGTTを施行。
 (a) グルコース負荷後の血糖値。(b) グルコース負荷後血糖値 (0-60分間)のAUC。(c)グルコース負荷後のインスリン値。(d)グルコース負荷後インスリン値 (0-15分間)のAUC。野生型マウス+生理食塩水を薄灰色丸、*Wfs1*ノックアウトマウス+生理食塩水を黒四角、*Wfs1*ノックアウトマウス+10 mmol/l Ex-4を濃灰色で示す。各群ともにn=6。*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001(ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.)



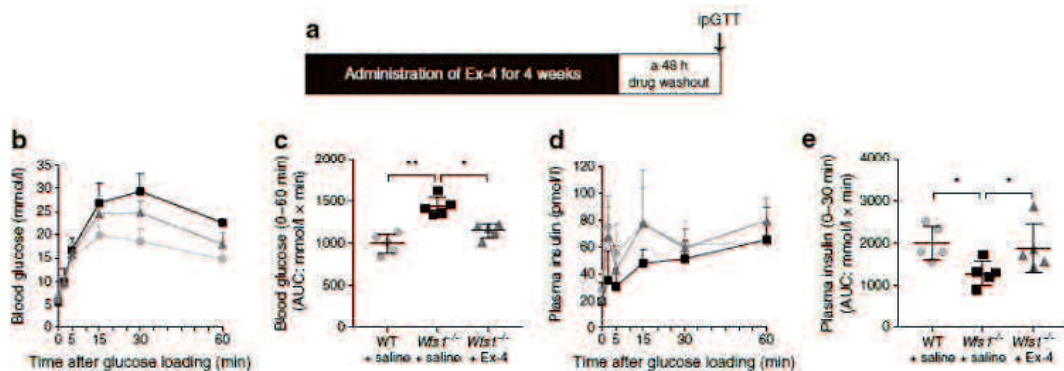
(4) GLP-1 受容体の長期的な活性化によって *Wfs1* ノックアウトマウスの膵ベータ細胞機能が修復される

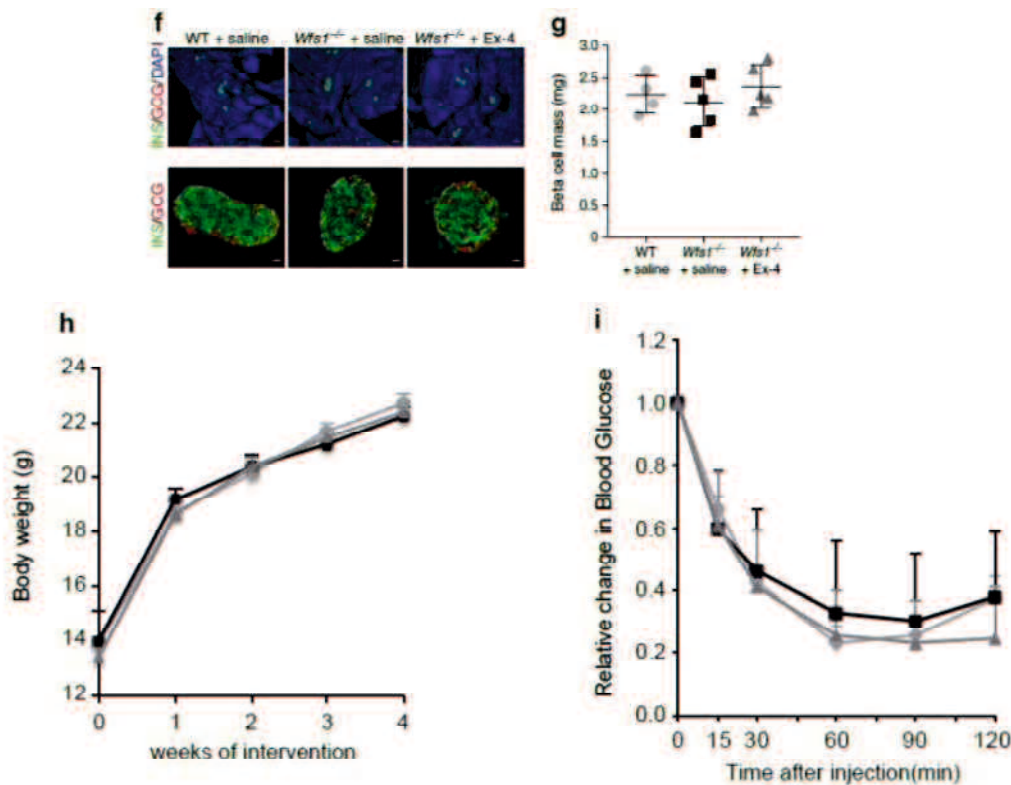
さらに、長期的な GLP-1 受容体活性化が膵ベータ細胞機能及ぼす影響を調べるため、5 週齢の *Wfs1* ノックアウトマウスに Ex-4 を 4 週間投与した(図 9a)。Ex-4 最終投与から 48 時間のウォッシュアウト期間を設けて行った腹腔内グルコース負荷試験では、*Wfs1* ノックアウトマウスにおけるグルコース負荷後の血糖上昇が抑制された(図 9b, c)。重要なことに、Ex-4 を投与した *Wfs1* ノックアウトマウスでは野生型マウスと同等のインスリン分泌を認め、野生型マウスと同様にグルコース負荷後 2 分と 15 分でインスリン分泌は頂値を示していた(図 9d)。

コントロール群 (生理食塩水を 4 週間投与した *Wfs1* ノックアウトマウス) と比較して、インスリン分泌量の AUC(area under the curve)は 1.39 倍に増加していた(図 9e)。一方で、Ex-4 投与は膵ベータ細胞量(図 9f, g)や体重(図 9h)、インスリン感受性(図 9i)については変化させなかった。したがって、長期的な GLP-1 受容体活性化によって得られた耐糖能の改善は膵ベータ細胞機能の回復によってもたらされたと推測された。

図9 *Wfs1*ノックアウトマウスの耐糖能とグルコース応答性インスリン分泌、膵ベータ細胞量に対するEx-4の慢性効果

(a) 実験概要。5週齢のマウスに24 nmol/kg body weightの Ex-4を4週間腹腔内投与。48時間のウォッシュアウト期間後にIPGTTを施行。各群ともにn=8 (b) グルコース負荷後の血糖値。(c) グルコース負荷後血糖値 (0-60分間)のAUC。(d) グルコース負荷後のインスリン値。(e) グルコース負荷後インスリン値 (0-30分間)のAUC。(f) 膵切片を抗インスリン抗体、抗グルカゴン抗体を用いて免疫組織化学染色法で解析。(g) 全膵臓面積および膵ランゲルハンス島面積をImage Jを用いて測定し、以下の計算式で膵ベータ細胞量を計算した。膵ベータ細胞量 = (膵ランゲルハンス島面積 / 全膵臓面積) × 膵重量。各群ともn=5。野生型マウス + 生理食塩水を薄灰色丸、*Wfs1*ノックアウトマウス + 生理食塩水を黒四角、*Wfs1*ノックアウトマウス + 10 mmol/l Ex-4を濃灰色で示す。*p < 0.05, **p < 0.01 (ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.)





(5) Exendin-4 は *Wfs1* 欠損に起因する膵ベータ細胞ストレスを軽減する

これらの結果から、Ex-4 は、インスリン分泌増幅作用のみならず、膵ベータ細胞機能不全を引き起こす根本的な異常を軽減することで膵ベータ細胞機能を回復させていると推測された。Ex-4 が膵ベータ細胞ストレスに及ぼす影響を解析するため、EIF2 α のリン酸化について免疫組織化学染色法で評価した。野生型マウスと比較して、*Wfs1* ノックアウトマウスの膵臓では EIF2 α のリン酸化が亢進しており(図 10a)、特に腺房細胞よりも膵ランゲルハンス氏島でその現象は顕著であった。Ex-4 投与によって膵ランゲルハンス氏島における EIF2 α のリン酸化は減弱した一方で腺房細胞は影響を受けていなかった。同時に、*Wfs1* 欠損膵ベータ細胞で低下していたインスリンの蛍光強度が部分的に回復していた。引き続き、膵ランゲルハンス氏島におけるストレス応答を Ex-4 が直接調整している可能性を検討したところ、*Wfs1* ノックアウトマウスから採取した膵ランゲルハンス氏島において、*Nrf2* (*Nfe2l2*)、*Sod1*、*Hmox1*、*Txnrd1* といったストレス応答に関与する遺伝子群の発現が亢進していた(図 10b)。Cat、*Sod1*、*Txnrd1* では明らかでなかったものの、Ex-4 は *Wfs1* 欠損膵ランゲルハンス氏島における酸化ストレスを全般的に軽減していた。さらに、小胞体ストレス応答に関与する遺伝子群の発現も *Wfs1* 欠損膵ランゲルハンス氏島において亢進していたが、Ex-4 は *Chop* (*Ddit3*)、*spliced Xbp1* (*sXbp1*) の発現を顕著に低下させた(図 10c)。また、Ex-4 は *Ins2*、*Pdx1* といった膵ベータ細胞機能に関与する遺伝子群の発現を回復させた(図 10d)。以上の結果から、GLP-1 受容体の活性化は、*Wfs1* 欠損によって引き起こされる酸化ストレスや小胞体ストレスを調整し、膵ベータ細胞機能の改善に寄与することが示唆された。

(6) Exendin-4 は *Wfs1* 欠損膵β細胞において AMPK のリン酸化と TXNIP の発現を調節している

AMPK 活性化を介した小胞体ストレス軽減によって、種々のストレス下にある細胞機能が回復しうる事が報告されている (参考文献 18-20)。免疫組織化学染色法による評価では、AMPK の酵素活性に必須である AMPK のリン酸化 (p-AMPK) は、*Wfs1* 欠損によって減少し、Ex-4 によって部分的に回復していた (図 10e)。単離した膵ランゲルハンス氏島を用いてウエスタンブロッティング法で解析したところ、野生型マウスと比較して、*Wfs1* 欠損マウスでは p-AMPK/総 AMPK (total-AMPK) 比が 30%減少していた。Ex-4 は、total-AMPK の発現に影響することなく、野生型マウス、*Wfs1* ノックアウトマウスの両方でリン酸化 AMPK の割合 (p-AMPK/total-AMPK) をそれぞれ 46、37%増加させた (図 10g)。チオレドキシシン相互作用蛋白質 (TXNIP) は AMPK の下流に存在する標的分子の一つであり (参考文献 21, 22)、酸化ストレスや小胞体ストレスによって誘導され、膵β細胞機能不全において重要な役割をはたしていると報告されている (参考文献 23)。*Wfs1* 欠損膵β細胞では TXNIP の核内蓄積を認め、TXNIP が活性化されている事が示唆されるが (参考文献 24)、免疫組織化学染色法で解析したところ、この現象は Ex-4 によって抑制されていた (図 10f)。ウエスタンブロッティング法による解析で、*Wfs1* 欠損膵β細胞における TXNIP は野生型と比較して 3.3 倍増加していたが、Ex-4 は p-AMPK を増加させるとともに、TXNIP を著しく減少させていた (図 10g)。膵β細胞株において、AMPK の活性化は TXNIP の転写を減少させることが報告されている (参考文献 21)。*Txnip* の主要な転写メディエーターである *Atf5*、*Chrebp (Mlxipl)* などの遺伝子発現は変化していなかったが、*Txnip* 自身の遺伝子発現は Ex-4 によって減少した (図 10h)。以上の結果から、*Wfs1* 欠損膵β細胞における TXNIP 増加と p-AMPK 減少の関連が示唆され、GLP-1 受容体作動薬はその細胞ストレス軽減作用によって治療応用できる可能性が示された (図 11)。

図10 Ex-4は膵β細胞ストレスを軽減し、p-AMPKが減少しTXNIPが増加した状態を回復させる

(a) 膵切片を抗p-EIF2 α 抗体、抗インスリン抗体を用いて免疫組織化学染色法で解析。白矢印は腺房細胞、白線は膵ランゲルハンス島の境界を示す。(b-d) 10週齢の*Wfs1*ノックアウトマウスおよび野生型マウスから膵ランゲルハンス島を採取し、生理食塩水もしくは10 nmol/lのEx-4で24時間処理した後に定量的リアルタイムPCR法で酸化ストレスに関連する遺伝子発現を解析した。(b) 酸化ストレス関連遺伝子の発現。(c) 小胞体ストレス関連遺伝子の発現。(d) 膵β細胞機能関連遺伝子の発現。膵切片を、(e) 抗p-AMPK抗体、(f) 抗TXNIP抗体を用いて免疫組織化学染色法で解析。(g) 10-12週齢の*Wfs1*ノックアウトマウスおよび野生型マウスから膵ランゲルハンス島を採取し、生理食塩水もしくは10 nmol/lのEx-4で24時間処理した後にウェスタンブロッティング法で解析。p-AMPKおよびTXNIPの発現量は、それぞれtotal AMPK、 α -tubulinを用いて補正した。(h) *Txnip*、*Atf5*、*Chrebp*の発現量を定量的リアルタイムPCR法で解析。定量的データは少なくとも3回の実験から算出し、平均値±標準偏差で示す。野生型マウス+生理食塩水を白、*Wfs1*ノックアウトマウス+生理食塩水を濃灰色、*Wfs1*ノックアウトマウス+10 nmol/l Ex-4を薄灰色で示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.)

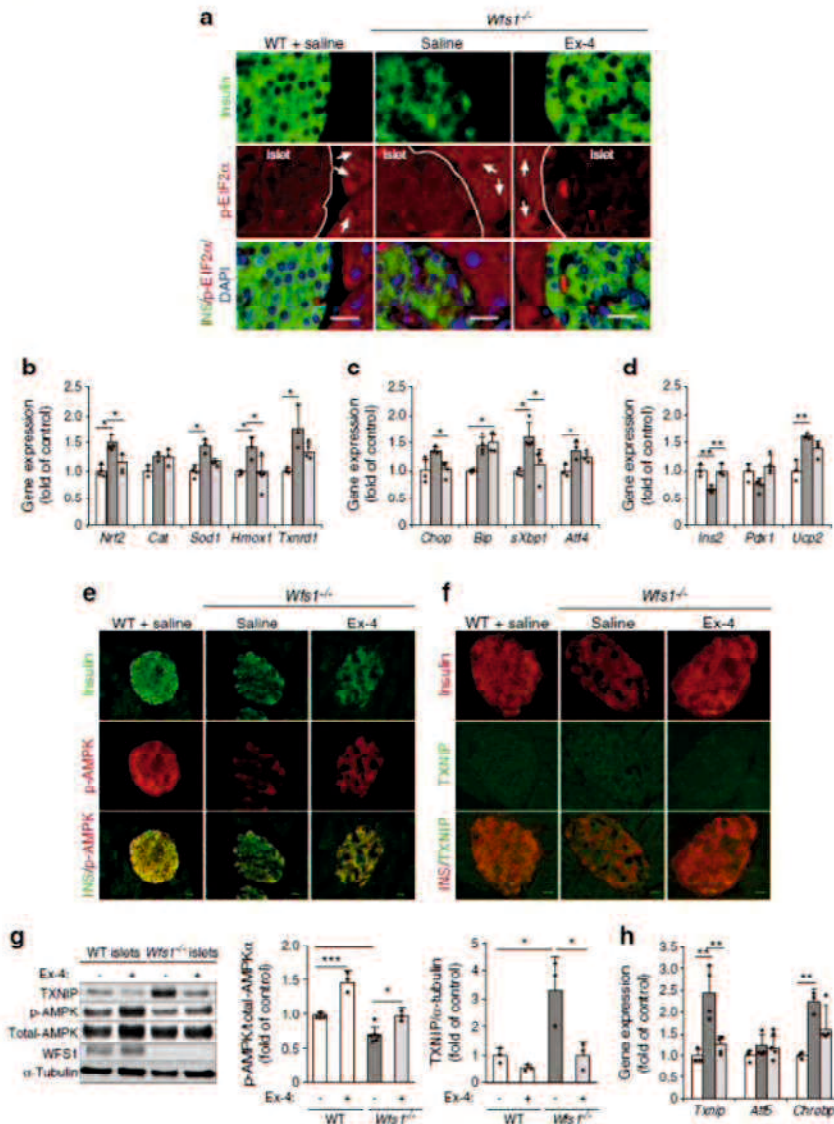
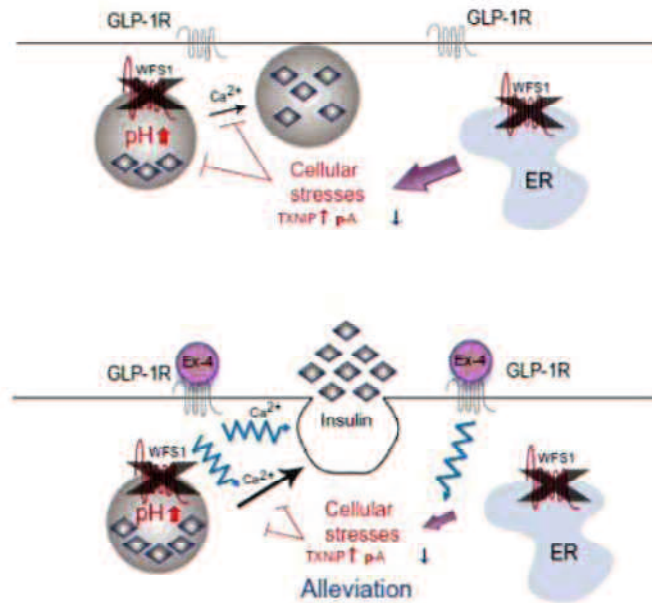


図11 *Wfs1*欠損膵β細胞におけるEx-4効果の仮説モデル

小胞体およびインスリン分泌顆粒におけるWFS1蛋白質欠損は膵β細胞ストレスと分泌顆粒内の酸性化障害を引き起こし、その結果としてグルコース応答性インスリン分泌の障害と進行性の膵β細胞減少が起こる。Ex-4はインスリン分泌経路への作用や細胞ストレスを軽減することで*Wfs1*欠損に起因する膵β細胞機能異常を改善する可能性がある。



7. 考察

Wolfram 症候群では膵ベータ細胞量の減少とともに糖尿病が進行するが、若い週齢の *Wfs1* 欠損マウスは、膵ベータ細胞量が維持されているにもかかわらずグルコース応答性インスリン分泌が低下していた。小胞体ストレスや酸化ストレスの亢進は膵ベータ細胞量の減少や、機能不全を引き起こすことが知られているが、本研究では、耐糖能が著しく損なわれていない若い週齢の *Wfs1* 欠損マウスを用いて、*Wfs1* 欠損が膵ベータ細胞機能にどのような変調をきたし、GLP-1 受容体作動薬が *Wfs1* 欠損膵ベータ細胞にどのような効果を及ぼすのかという点について検討した。

我々のデータから、WFS1 は細胞膜の脱分極によって惹起されるインスリン初期分泌に必要であり、Ex-4 の単回投与は *Wfs1* ノックアウトマウスのグルコース応答性インスリン分泌を増幅させ、血糖値を低下させることが明らかになった。WFS1 欠損は Ca 代謝や顆粒内酸性化障害を引き起こし、インスリン分泌顆粒のドッキングと膜融合の過程に影響を及ぼすことが示唆されている（参考文献 25-27）。GLP-1 受容体作動薬は細胞内 Ca 濃度を上昇させ、Ca シグナルを調整することが知られており、同薬が *Wfs1* ノックアウトマウスにおいて有効であった理由の一つとして考えられる。さらに、我々は、WFS1 欠損によって起こる顆粒内酸性化障害を模して、薬理的に V-ATPase 阻害した状況下（参考文献 6）であっても、Ex-4 がインスリン分泌障害を回復させることを示した。しかしながら、WFS1 がインスリン分泌経路や GLP-1 受容体シグナルにおいてどのような役割を果たしているのかは未だ明らかになっておらず、さらなる研究が必要である。

Ex-4 の継続投与は膵ベータ細胞量を増加させるのではなく、既に存在する膵ベータ細胞の機能を改善することによって *Wfs1* ノックアウトマウスのグルコース応答性インスリン分泌を回復させたと考えられる。我々は、*Wfs1* 欠損膵ベータ細胞や *Wfs1* ノックアウトマウスから単離した膵ランゲルハンス氏島において、Ex-4 がストレス関連分子を減少させ、インスリン産生を増加させることを示した。Ex-4 は小胞体ストレス応答を調整し、小胞体ストレスに関連する細胞死から膵ベータ細胞を回避させると報告されているが（参考文献 28）、我々のデータはこの既報を支持するものであると考えられる。しかしながら、*Wfs1* 欠損によって細胞ストレスが増加するにもかかわらず、正常耐糖能が維持されている *Wfs1* ノックアウトマウスではアポトーシスに至る細胞の割合は有意に増加していなかった（未発表データ）。したがって、*Wfs1* 欠損膵ベータ細胞は、細胞生存能や分化能に関与する未知の機序によって持続的な細胞ストレスに適応していると推測している（参考文献 29）。Ex-4 が TXNIP を減少させ、p-AMPK を部分的に回復させることで抗ストレス作用を発揮したことは、Ex-4 が *Wfs1* 欠損に起因する細胞ストレスを軽減したことを少なくとも部分的に説明しうるものである（参考文献 18, 23）。Ex-4 が TXNIP と p-AMPK に関与することは明らかであるが、GLP-1 受容体作動薬が直接これらの分子に作用しているのか、それとも、細胞ストレスを緩和した結果として間接的に両者に影響を及ぼしているのかを解明するにはさらなる研究が必要である。

インスリン依存状態にある Wolfram 症候群女性において、リラグルチドは膵ベータ細胞機能を変調し、インスリン必要量を減らすとともに血糖コントロー

ルを改善した。このような効果が少なくとも6ヶ月間の観察期間において続いたという事実は、GLP-1受容体作動薬がWolfram症候群において有効な治療薬となりうる可能性を示している。しかしながら、リラグルチドによって改善したとはいえ、この女性において残存している膵ベータ細胞機能はとても限られていると考えられる。さらに、膵ベータ細胞機能はリラグルチド投与開始後4週間をピークに16週後の時点では減少していた。したがって、GLP-1受容体作動薬は一時的に膵ベータ細胞機能に影響を及ぼすに過ぎないのかもしれない。また、今回の観察研究でグルカゴン値は測定されていないが、血糖コントロールの改善という点に関しては、膵ベータ細胞への効果よりも胃排泄能の低下や膵アルファ細胞への効果が寄与していると推測される。一方で、内因性のGLP-1分泌がWFS1欠損によって影響を受けるのか否かという点については明らかにされていない。Wolfram症候群におけるGLP-1関連薬の重要性や有効性を解明するためには、この点についてもさらなる研究が必要である。

Ex-4が酸化ストレスや小胞体ストレスを緩和するという発見は、糖尿病治療における同薬の作用機序を理解するということからさらには、Wolfram症候群の予後規定因子として重要な神経変性の治療を考慮するうえで重要である。GLP-1受容体作動薬の神経保護効果は様々な動物実験において証明されており、酸化ストレスや小胞体ストレスがその病因に関与していると考えられるパーキンソン病やアルツハイマー病を対象とした臨床試験も開始されている（参考文献30）。Ex-4が、細胞ストレスを軽減し、*Wfs1*欠損膵ベータ細胞の機能を改善させたという結果から、GLP-1受容体作動薬がWolfram症候群患者の糖尿病および神経変性の進行を遅らせる一つの方法となりうることが示唆される。さらに、近年の研究から、小胞体に局在するリアノジン受容体に作用するダントロレンがWolfram症候群の治療に有効である可能性が示されている（参考文献31, 32）。将来的には、GLP-1受容体作動薬とダントロレンの併用療法がさらなる治療効果をあげるかを検証することも必要であろう。

8. 結語

現時点では **Wolfram** 症候群の進行を遅らせる有効な治療法は存在せず、今回の実験結果および観察研究結果は臨床的に重要な意味を持つものである。すなわち、本研究から得られた情報は、**Wolfram** 症候群の自然経過や予後に対する **GLP-1** 受容体作動薬の効果を評価する臨床研究を計画するにあたって示唆に富むものである。ただし、小児患者に対する **GLP-1** 受容体作動薬投与に関しては、同薬の多彩な効果を考えると、慎重に検討する必要があるだろう。

9. 謝辞

本研究を行なうにあたり、御指導いただきました山口大学大学院医学系研究科病態制御内科学分野の谷澤幸生 教授に深く感謝いたします。また、研究方法に関して直接御指導いただいた山口大学大学院医学系研究科 病態制御内科学分野の田部勝也 講師、幡中雅行 前助教、山口大学医学部医学科 分子代謝制御学講座の椎木 幾久子 助教、神戸大学大学院医学研究科 生理学・細胞生物学講座 細胞生理学分野 分子代謝医学部門の清野 進 特命教授、高橋晴美 特命講師に深く感謝申し上げます。さらに、**Wolfram** 症候群女性のデータを御供与いただいた秋田大学内分泌・代謝・老年内科学の山田 祐一郎 教授、森井 宰 講師に深く感謝いたします。

10. 参考文献

本論文は、著者執筆の関連論文

「Activation of GLP-1 receptor signalling alleviates cellular stresses and improves beta cell function in a mouse model of Wolfram syndrome」

著者 : Manabu Kondo, Katsuya Tanabe, Kikuko Amo-Shiinoki, Masayuki Hatanaka, Tsukasa Morii, Harumi Takahashi, Susumu Seino, Yuichiro Yamada and Yukio Tanizawa

Diabetologia Vol.61 No.10 P:2189-2201, Jul 2018

のデータを引用している。

1. Barrett TG, Bundey SE, Macleod AF (1995) Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* 346:1458–1463
2. Marshall BA, Permutt MA, Paciorowski AR et al (2013) Phenotypic characteristics of early Wolfram syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 8:64
3. Matsunaga K, Tanabe K, Inoue H et al (2014) Wolfram syndrome in the Japanese population: molecular analysis of WFS1 gene and characterization of clinical features. *PLoS One* 9:e106906
4. 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
5. Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y et al (2001) WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Mol Genet* 10:477–484
6. Hatanaka M, Tanabe K, Yanai A 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
7. Cagalinec M, Liiv M, Hodurova Z et al (2016) Role of mitochondrial dynamics in neuronal development: mechanism for Wolfram syndrome. *PLoS Biol* 14:e1002511
8. Ishihara H, Takeda S, Tamura A 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. Takei D, Ishihara H, Yamaguchi S, Yamada et al (2006) WFS1 protein modulates the free Ca(2+) concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 580:5635–5640
10. Fonseca SG, Ishigaki S, Osowski CM et al (2010) Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* 120:744–755

11. Campbell JE, Drucker DJ. (2013) Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab* 17:819-837
12. Yamada, Y., Fukuda, K., Fujimoto, S., Hosokawa, M., Tsukiyama, K., Nagashima, K., Fukushima, M., Suzuki, H., Toyoda, K., Sassa, M. et al. (2006) SUIT, secretory units of islets in transplantation: An index for therapeutic management of islet transplanted patients and its application to type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 74:222-226.
13. Miki T, Minami K, Shinozaki H et al (2005) Distinct effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagonlike peptide-1 on insulin secretion and gut motility. *Diabetes* 54:1056–1063
14. Shibasaki T, Takahashi H, Miki T et al (2007) Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19333–19338
15. Tanabe K, Liu Z, Patel S et al (2008) Genetic deficiency of glycogen synthase kinase-3 β corrects diabetes in mouse models of insulin resistance. *PLoS Biol* 6:e37
16. Girish V, Vijayalakshmi A (2004) Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer* 41:47
17. Gharanei S, Zatyka M, Astuti D et al (2013) Vacuolar-type H⁺-ATPase V1A subunit is a molecular partner of Wolfram syndrome1 (WFS1) protein, which regulates its expression and stability. *Hum Mol Genet* 22:203–217
18. Matsuda T, Takahashi H, Mieda Y et al (2015) Regulation of pancreatic beta cell mass by cross-interaction between CCAATenhancer binding protein beta induced by endoplasmic reticulum stress and AMP-activated protein kinase activity. *PLoS One* 10:e0130757
19. Nyblom HK, Sargsyan E, Bergsten P (2008) AMP-activated protein kinase agonist dose dependently improves function and reduces apoptosis in glucotoxic beta-cells without changing triglyceride levels. *J Mol Endocrinol* 41:187–194
20. Steinberg GR, Kemp BE (2009) AMPK in health and disease. *Physiol Rev* 89:1025–1078
21. Shaked M, Ketzinel-Gilad M, Cerasi E, Kaiser N, Leibowitz G (2011) AMP-activated protein kinase (AMPK) mediates nutrient regulation of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) in pancreatic beta-cells. *PLoS One* 6:e28804
22. Wu N, Zheng B, Shaywitz A et al (2013) AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Mol Cell* 49:1167–1175
23. Shalev A (2014) Minireview: Thioredoxin-interacting protein: regulation and function in the pancreatic beta-cell. *Mol Endocrinol* 28:1211–1220
24. Saxena G, Chen J, Shalev A (2010) Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem* 285:3997–4005
25. Deriy LV, Gomez EA, Jacobson DA et al (2009) The granular chloride channel ClC-3 is permissive for insulin secretion. *Cell Metab* 10:316–323

26. Li DQ, Jing X, Salehi A et al (2009) Suppression of sulfonylurea and glucose induced insulin secretion in vitro and in vivo in mice lacking the chloride transport protein CIC-3. *Cell Metab* 10:309–315
27. Verhage M, Sorensen JB (2008) Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic* 9:1414–1424
28. Yusta B, Baggio LL, Estall JL et al (2006) GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab* 4:391–406
29. Dor Y, Glaser B (2013) beta-cell dedifferentiation and type 2 diabetes. *N Engl J Med* 368:572–573
30. Muscogiuri G, DeFronzo RA, Gastaldelli A, Holst JJ (2017) Glucagon-like peptide 1 and the central/peripheral nervous system: crosstalk in diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 28:88–103
31. Lu S, Kanekura K, Hara T et al (2014) A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E5292–E5301
32. Urano F (2016) Wolfram Syndrome: diagnosis, management, and treatment. *Curr Diab Rep* 16:6