

論文の内容の要旨

論文題目 高血圧自然発症ラット (SHR) における
インスリン抵抗性遺伝子の探索

指導教官 木村 哲教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 飯塚 陽子

高血圧自然発症ラット (Spontaneously Hypertensive Rat: SHR) は、高血圧を指標とした選択交配の繰り返しにより確立された本態性高血圧症の最も良いモデル動物である。SHR はまた、高インスリン血症と耐糖能異常、脂質代謝異常や、内臓脂肪蓄積等を呈する、いわゆるインスリン抵抗性症候群の良いモデル動物でもある。SHR における高血圧を含むこれらの異常は、複数の遺伝因子と環境因子の相互作用によって生じる複合遺伝形質 (complex trait) と考えられるが、その原因遺伝子はまだ明らかではない。

SHR におけるインスリン抵抗性原因遺伝子の染色体上での局在は、いわゆる QTL (quantitative trait locus) 解析によって同定されつつある。QTL 解析によりすでに、SHR の脂肪細胞におけるインスリン抵抗性原因遺伝子座位が、ラットの4番および12番染色体上に存在することが明らかにされており、

特に 4 番染色体の当該領域には、SHR の高血圧や、高中性脂肪血症等の QTL も集簇することより、この領域に SHR におけるインスリン抵抗性症候群の主要な原因遺伝子（群）の存在が想定されている。

本研究で私は、SHR におけるインスリン抵抗性の原因遺伝子を探索する目的で、cDNA subtraction 法と gene chip microarray 法を用い、SHR とその遺伝的コントロールである Wistar Kyoto (WKY) ラットとの間で脂肪細胞における mRNA の発現比較を行った。Charles River 社より購入した SHR/NCrj と WKY/NCrj の脂肪細胞の cDNA subtraction 解析により、発現に差のある 500 個以上の独立した cDNA クローンが得られ、その中の 72 個において二倍以上の発現レベルの違いが見られ、6 個のクローンに構造上の大きな違いが見られた。DNA sequencing 解析の結果、6 個クローンのうち、2 個が Cd36 遺伝子の一部を含むことが判明した。

リンケージマッピングと radiation hybrid マッピングにより、4 番染色体の当該領域に同定されたラット Cd36 遺伝子 (*Cd36*) は、northern-blot 解析では、米国 NIH 由来の SHR (SHR/NCrj) にのみ mRNA の長さの変化と発現量の減少が見られたが、日本で開発・保存されているオリジナルの SHR (SHR/Izm) にはそのような違いは認められなかった。cDNA の sequencing 解析の結果、SHR/NCrj の cDNA には多様な変異が存在し、これはゲノムのイントロン 14 の splice-acceptor site に存在する 8 塩基欠失による mRNA の alternative splicing が原因と考えられたが、オリジナルの SHR/Izm にはこのような変異は見られなかった。また、SHR に遺伝的な多様性が存在することを考慮し、SHR の各 strain について解析を行った結果、米国 NIH 由来の SHR strain にのみ異常が見られ、日本のオリジナル SHR/Izm の全 strain においては、このような異常が認められないことを確認した。さらに、*Cd36* 近傍のマイクロサテライトマーカーの解析により、NIH 由来の SHR に見られる *Cd36* 変異は、米国 NIH での飼育中に新たに生じた *de novo* 変異であることを明らかにした。一方、元々の 4 番染色体 QTL の同定に用いられた

phenotype である脂肪細胞でのインスリン刺激によるグルコースの取込みとカテコールアミン刺激による NEFA の産生について調べた結果、*Cd36* 欠損のある SHR/NCrj と欠損のない SHR/Izm とでは、有意差は認められなかった。このことより、*Cd36* 変異はこれらの QTL とは関係のないことが示唆され、また一方、WKY に比べて両方の SHR strain ではグルコースの取り込みと NEFA の産生量が有意に減少していたことより、*Cd36* の近傍に別個の原因遺伝子が存在する可能性が考えられた。次いで、*in vivo* での phenotype の比較により、*Cd36* 欠損のある SHR/NCrj は、欠損のない SHR/Izm に比較して、空腹時血糖値、中性脂肪値、および白色脂肪組織重量がいずれも有意に低く、空腹時インスリン値も低い傾向が見られ、一方、逆に空腹時遊離脂肪酸値は有意に高いことが判明した。さらに、経静脈的糖負荷試験 (IVGTT) の結果では、*Cd36* 欠損のない SHR/Izm に比べて、欠損のある SHR/NCrj では、グルコース応答性インスリン分泌の改善が認められた。しかし、両 SHR strain での膵臓のインスリン含量、islet batch incubation 法によるグルコース刺激前後のインスリン分泌反応には有意差は見られなかった。ラットの膵 islet で *Cd36* mRNA が発現していることは、ラット *Cd36* cDNA をプローブとした northern-blot 解析により確認された。これらのことより、長鎖脂肪酸の取り込みにも働く *Cd36* を欠損する SHR/NCrj に見られるインスリン分泌の改善が、いわゆる lipotoxicity の軽減によってもたらされている可能性が考えられた。長鎖脂肪酸存在下で培養した islet 中の中性脂肪含量の測定によりこの可能性を検討したが、両方の SHR 間には有意差は見られず、それを支持する結果は得られなかった。最後に、*Cd36* の異常が SHR に与える影響について、欠損のある SHR/NCrj と欠損のない SHR/Izm 由来の F2 を作製して、分子遺伝学的手法を用いて解析した。その結果、*Cd36* 変異は SHR において、空腹時血糖値の減少、コレステロール値の減少および遊離脂肪酸値の増加と有意な連鎖を示すことを明らかにした。以上の結果を総合して、*Cd36* の異常が SHR におけるインスリン抵抗性発現の主要な原因ではないとの結論に

至った。

ところで、SHR では WKY に比して、腎臓、脳、延髄をはじめ各組織で kynurenine aminotransferase 1 (KAT-1) の酵素活性が有意に低下していることが Kapoor らによって報告されている。その酵素反応産物である kynurenic acid の含量が SHR の脳や脊髄で有意に低下していること、また免疫組織染色で KAT-1 は延髄の腹外側野などの血圧調節領域に多量に存在していることなどより、KAT-1 が SHR の高血圧原因候補遺伝子の一つとして注目されている。そこで、KAT-1 の染色体上での局在を radiation hybrid マッピング法により決定したところ、KAT-1 はラット 3 番染色体の近位端側、マイクロサテライトマーカー *D3Rat54* の近傍に位置することが判明した。そして、cDNA sequencing 解析の結果、SHR では、種の違いを超えて保存されている KAT-1 の 61 番目のアミノ酸であるグルタミン酸 (GAG) がグリシン (GGG) に置換する Glu61Gly ミスセンス変異を同定した。複数の交配集団における解析では、KAT-1 の Glu61Gly 変異は、血圧の上昇、体重の減少、および脂肪細胞でのインスリン刺激によるグルコース取り込みとカテコールアミン刺激による NEFA 産生量の低下とそれぞれ有意な連鎖を示すことを明らかにした。すなわち、Glu61Gly 変異は、SHR における高血圧を含むインスリン抵抗性症候群様の異常を説明する有力な候補の一つとしてさらなる解析が必要である。