

## 論文内容の要旨

論文題目 高血圧自然発症ラット(SHR)における肥満関連遺伝子の  
同定

指導教員 藤田敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成17年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 和泉 ・

### 【目的】

メタボリックシンドロームは、心血管疾患のハイリスク病態として近年とくに注目され、その成因的基盤として内臓脂肪蓄積とインスリン抵抗性の亢進が重要であると考えられている。一方で、メタボリックシンドロームは複数の遺伝因子を背景として運動不足や過栄養などの環境因子が加わることにより発症する複合遺伝形質(**complex trait**)の一つとも考えられている。メタボリックシンドロームの遺伝因子を探る目的で様々な研究が行われているが、疫学的研究やインスリン抵抗性に関連する遺伝子研究が多く、内臓脂肪蓄積に関連する遺伝子からのアプローチは稀である。

高血圧自然発症ラット(SHR)は本態性高血圧症のもっともよいモデル動物であると同時に、高インスリン血症と耐糖能異常、高 TG 血症と低 HDL-C 血症、内臓脂肪蓄積、交感神経系亢進等を呈するモデル動物でもある。SHR には遺伝子変異の有無により、多機能型受容体である Cd36 を欠損する SHR/NCrj などの NIH 系 strain と、正常型である SHR/Izm strain などがあり、両 SHR 間ではいくつかの表現型が異なることが報告されている。その中であって、両系統ともほぼ体重が同程度にもかかわらず、副睾丸周囲脂肪組織重量に関しては NCrj の方が有意に軽いことは注目に値する。そこで、本研究において私は、メタボリックシンドロームと内臓脂肪蓄積に関わる遺伝子の解明という観点から SHR 系統間におけるこの内臓脂肪重量の遺伝的差異に着目し、その原因となる遺伝子を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法及び結果】

脂肪組織重量差を示した以前の報告が通常餌飼育下で、副睾丸周囲脂肪組織に限定されていたため、まず、高脂肪食を SHR/NCrj と SHR/Izm (8 週齢雄、各 n=10) に 8 週間負荷し、副睾丸周囲、後腹膜、腸間膜、皮下の各脂肪組織重量を両 SHR 間で比較した。その結果、全ての脂肪組織重量において、NCrj では Izm に比して有意な減少を認めた。

次に、両 SHR 間での各種表現型の違いが Cd36 遺伝子変異の有無に由来するかを調べる目的で、この 2 系統の交配に由来する F2 集団(12 週齢雄、n=144)を用いて連鎖解析を行った。その結果、空腹時の血中脂質値と血糖値における差異は Cd36 遺伝子変異の有無に非常に強く連鎖していたが、副睾丸周囲脂肪組織重量と Cd36 遺伝子変異の有無の間には全く連鎖が認められなかった。これらの結果から、SHR 系統間における(内臓)脂肪蓄積の差異の原因となる遺伝子は

Cd36 遺伝子以外に存在することが示唆された。

そこで、データベース上にあるラットのマイクロサテライトマーカーに関する情報をもとに両 SHR 間で多型性が疑われる約 300 個の遺伝子マーカーに関して電気泳動法や single strand conformation polymorphism(SSCP)法を行い、多型が検出可能な 25 個のマーカーを同定した。そのうち 12 個はラットの 1 番染色体に存在するマーカーであった。そして、F2 群の肝臓からゲノム DNA を抽出し各遺伝子マーカーの遺伝子型と各々の表現型との間の連鎖解析(いわゆる QTL [quantitative trait locus] 解析)を行った。その結果、F2 群において、1 番染色体に存在する D1Wox28 に関する遺伝子型が、体重とは連鎖を認めないものの、親世代と同様に Izm のホモ型となる遺伝子型をもつラットで脂肪組織重量が有意に重いことが確認され、この D1Wox28 周辺に原因となる遺伝子の存在が示唆された。また、この領域は同様に血圧や空腹時血糖値に関する有意な連鎖を認めた。

一方、候補遺伝子の選出のため、両系統(n=4)の副睾丸周囲脂肪組織から RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った結果、両 SHR 系統間で発現量が異なる遺伝子が多数得られた。そして、QTL 解析による位置情報とマイクロアレイ解析による発現情報を統合することにより、最終的に候補遺伝子を 42 個に絞込んだ。

この、42 個の候補遺伝子の cDNA を蛋白質をコードする部分を中心として DNA 塩基配列解析をした結果、唯一、SLC22A18 遺伝子に機能的に意味のある変異を同定した。すなわち、SLC22A18 遺伝子に関して、SHR/Izm ではイントロン 9 の最初の塩基が野生型であるグアニン(G)であるのに対し、SHR/NCrj ではアデニン(A)に置換される点突然変異を認めた。

そこで、変異によって mRNA に生ずる異常を調べる目的で、変異の上流と下流のエクソン部分に PCR プライマーを設定し、脂肪組織由来 RNA を用いて逆

転写後に RT-PCR による cDNA 断片の増幅を行った。アガロースゲル電気泳動の結果、SHR/Izm では正常の 740 塩基対の cDNA 断片が得られたのに対し、SHR/NCrj では短縮した断片の増幅が確認された。

次に、各 cDNA 断片をアガロースゲルから切り出し、DNA 塩基配列解析を行った。その結果、SHR/NCrj の SLC22A18 遺伝子ではイントロン 9 のドナープライス部位における GT から AT への点突然変異により、102 塩基からなるエクソン 9 全体が mRNA から欠失する、いわゆる exon skipping が生じていることが確認された。

SLC22A18 遺伝子の発現を直接調べる目的で、<sup>32</sup>P で標識した SLC22A18 cDNA プロブを用いて、northern blot 解析を行い、約 1.5kb の mRNA が主に肝臓と腎臓で高発現していることを確認した。また、脂肪組織においても同様に発現を認め、NCrj では Izm に比して、短縮した mRNA が各臓器で確認された。さらに、脂肪組織をコラゲナーゼ処理し、単離脂肪細胞と間質組織 (vascular stromal fraction) に分離し、別々に RNA を採取して検討した結果、脂肪組織における SLC22A18 遺伝子の発現は間質組織ではなく、主として脂肪細胞に存在することが確認された。

続いて、SLC22A18 遺伝子の発現が脂肪細胞においてその分化とどのように関わるのかを検討した。マウス線維芽細胞である 3T3-L1 細胞を培養し、インスリン+デキサメサゾン+IBMX の 3 者刺激による脂肪細胞への分化誘導によって SLC22A18 遺伝子の発現がどのように変化するかを RT-PCR によって調べた。分化誘導以前から発現を認めたが、分化誘導に伴って SLC22A18 mRNA の発現の増強が認められた。

SHR は Wistar に由来する WKY ラットの中から、高血圧を指標とした選択交配によって確立されている。そこで Wistar ラットから SHR と WKY の各系

統が確立されていく過程における SLC22A18 遺伝子変異の位置づけを調べた。その結果、SHR/Izm 系統以外は全て変異型を有することが判明した。

そこで、SHR/Izm と WKY/Izm との交配に由来する F2 集団(n=151)においても、遺伝子型と副睾丸周囲脂肪組織重量との連鎖を検討した。その結果、SHR/Izm と SHR/NCrj との交配由来の F2 集団で見られた連鎖と同様に、SHR/Izm と WKY/Izm の間でも副睾丸周囲脂肪組織重量及びその体重で補正した値が SLC22A18 遺伝子変異と優性遺伝の形で強く連鎖しており、SLC22A18 遺伝子領域と脂肪組織重量との関連が確認された。

SLC22A18 遺伝子はヒトでは 11 番染色体短腕(11p15.5)に存在し、11 エクソンからなり、10 個の膜貫通部位をもつ約 40kD の蛋白をコードする遺伝子である。約 1.7kb の mRNA が胎児では腎臓、肝臓に高発現し、成人では肝臓、腎臓、心臓に高発現するほか、小腸、胎盤、膵臓、前立腺、脂肪組織などでも発現している。SLC22A18 遺伝子産物の機能は明らかではないが、大腸菌の変異株に SLC22A18 を過剰発現させた実験の結果から、クロロキンやキニジンの取り込みに関与する有機イオントランスポーターとしての機能が報告されている。そこで、SHR/Izm と SHR/NCrj の単離脂肪細胞を用いて、トリチウムで標識されたクロロキンの取り込み実験を行った結果、変異型の SLC22A18 を有する SHR/NCrj 由来の脂肪細胞においてクロロキンの取り込みが低下していることが確認された。

## 【結論】

今回、SHR/NCrj と SHR/Izm の 2 系統間に見られる内臓脂肪蓄積の差異を説明する原因候補遺伝子として SLC22A18 遺伝子とその変異を同定した。SLC22A18 遺伝子産物が個体における脂肪蓄積に関わる機序は不明であるが、

変異を有する SHR では、体重に比較して局所における脂肪重量(とくに内臓脂肪重量)に大きな変化が見られることや、SLC22A18 遺伝子が脂肪細胞で発現し、その発現が 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化誘導に伴って増強することなどから、脂肪細胞の機能に直接的に関わる可能性が考えられる。