

審査の結果の要旨

氏名 和泉 ・

本研究は高血圧自然発症ラットの各 strain の間に存在する内臓脂肪重量の違いに着目し、SHR における脂肪蓄積に関わる遺伝子の同定を試みたものである。

QTL 解析とマイクロアレイ解析の統合による候補遺伝子の同定、塩基配列解析による遺伝子変異の同定、ゲノム DNA、cDNA、RNA、単離脂肪細胞を用いての候補遺伝子に関する一連の実験を通して以下の結果を得た。

1. 8 週齢雄の両 SHR に高脂肪食を 8 週間負荷し、副睾丸周囲、後腹膜、腸間膜、皮下における脂肪組織重量を比較した。各脂肪組織重量において SHR/NCrj では SHR/Izm に比して脂肪組織重量が低下していた。
2. 副睾丸周囲脂肪組織重量の違いが Cd36 遺伝子変異の有無によるものであるかどうかを調べる目的で、総コレステロール、HDL コレステロール、遊離脂肪酸、空腹時血糖値、副睾丸脂肪組織重量と Cd36 の遺伝子型との間の連鎖を、両 SHR の交配に由来する F2 集団(n=144)において調べた。その結果、血中脂質値と空腹時血糖値における差違は Cd36 遺伝子変異の有無により説明可能であったが、副睾丸周囲脂肪組織重量の差違は Cd36 遺伝子変異とは無関係であった。
3. データー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して約 300 個の遺伝子マーカーを選出し、電気泳動法と SSCP 法により、両 SHR 間で多型性が検出可能な遺伝子マーカーを 25 個同定した。その内の 13 個は 1 番染色体長腕に位置し、これらの遺伝子マーカーと表現型との間で QTL 解析を行い、候補領域を絞り込んだ。そして、この候補領域内に位置し、両 SHR の脂肪細胞においてマイクロアレイ解析上、発現量が異なるかもしくは機能的に候補となりうる遺伝子を絞りこみ計 42 個の候補遺伝子を得た。
4. 42 個の候補遺伝子の cDNA をエクソン部分を中心に塩基配列解析し、Solute Carrier Family 22 Member 18(SLC22A18)遺伝子についてのみ機能的に意味のある変異を同定した。ゲノム DNA の塩基配列解析の結果、SHR/Izm の SLC22A18 遺伝子ではイントロン 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。
5. その変異によって生じる mRNA の異常を調べるために、その上流と下流の

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。増幅した各 cDNA 断片をアガロースゲルより切り出して塩基配列解析を行った結果、SHR/NCrj では SLC22A18 遺伝子のエクソン 9 全体が mRNA から欠失する、いわゆる exon skipping が生じていた。

6. 両 SHR の肝臓、腎臓、脂肪組織より採取した RNA を用いて、northern blot 解析を行った。その結果、約 1.5kb の mRNA が主に肝臓及び腎臓で高発現し、脂肪組織においても同様に発現を認め、SHR/NCrj では SHR/Izm に比して、短縮した mRNA が各臓器で確認された。脂肪組織については脂肪細胞と間質組織に分離後、RNA を採取した結果、主に脂肪細胞で発現することが判明した。

7. マウスの線維芽細胞株である 3T3-L1 細胞を、インスリン+デキサメサゾン+IBMX によって脂肪細胞へ分化誘導し RT-PCR により SLC22A18 の発現をみた。分化誘導前から発現を認めたが、分化誘導に伴い発現の増強が認められた。

8. SHR が WKY から確立される過程での SLC22A18 遺伝子変異の位置づけを調べた。野生型は SHR/Izm 系統のみであり、その他は全て変異型であった。そこで、SHR/NCrj 及び SHR/Izm の交配に由来する F2 集団(n=144)と合わせて、SHR/Izm 及び WKY/Izm の交配に由来する F2 集団(n=151)を用いて、SLC22A18 遺伝子変異と副睾丸周囲脂肪組織重量の間で連鎖解析を行った。どちらの集団についても、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有意な連鎖をしていた。

9. 両 SHR より単離した脂肪細胞を用い、細胞内に取り込まれるクロロキン含量を液体シンチレーションにて測定した。その結果、野生型の SHR/Izm に比べ、変異型の SHR/NCrj では脂肪細胞のクロロキンの取り込みが低下していた。

以上、本論分は SHR における脂肪蓄積に関わる候補遺伝子として、SLC transporter family の一つである SLC22A18 遺伝子を同定した。内臓脂肪蓄積は近年、問題となっている、メタボリックシンドロームの成因の基盤として重要であると考えられているが、内臓脂肪蓄積に関連する研究は稀である。

SLC22A18 遺伝子の生理的機能はほとんど不明であるが、膜輸送に関わることから合成化合物などの外因性基質によってその機能が調節できる可能性もあり、内臓脂肪蓄積やメタボリックシンドロームの新規の治療標的となりうることも考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。