

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 マウスを用いた脂肪肝感受性遺伝子座 *F11sa* の解析：
候補遺伝子の探索とその機能解析

氏名 鈴木 京

論文内容の要旨

NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease) は、肝臓に脂質が過剰に蓄積する単純性脂肪肝から、炎症を伴う NASH (nonalcoholic steatohepatitis) までを含む病態概念である。NAFLD は中心性肥満や 2 型糖尿病、脂質異常症といった生活習慣病と関連が深く、環境要因と複数の遺伝要因から発症する。遺伝的に不均一なヒトを対象とした NAFLD の遺伝要因の解析には制約があるため、近交系統マウスを用いた遺伝解析が威力を発揮する。当研究室では、脂肪肝感受性遺伝子の同定を目的として、高脂肪食の摂取により重篤な脂肪肝を呈する SMXA-5 マウスを用いた遺伝解析を進めてきた。SMXA-5 マウスは、SM/J マウスと A/J マウスから作出された組み換え近交系統群の 1 系統である。この SMXA-5 マウスと親系統の SM/J マウス (脂肪肝抵抗性) との F2 交雑群での QTL 解析により、第 12 番染色体上に脂肪肝感受性遺伝子座 *F11sa* (Fatty Liver 1 in SMXA) を検出した。この *F11sa* 領域 (セントロメア～53.06 Mb) 内には 600 個以上の遺伝子が存在しており、その中からの責任遺伝子の探索は困難であった。そこで本論文では、*F11sa* の責任遺伝子の探索を目的として、コンジェニックマウスを用いた *F11sa* の責任遺伝子存在領域の限局とその領域からの候補遺伝子の選抜 (第 1 章)、ならびに選抜した候補遺伝子のマウス生体内での機能とその発現の制御機構の解析 (第 2 章) を行った。

◆第 1 章 コンジェニック系統を用いた *F11sa* の脂肪肝感受性遺伝子の探索

F11sa (第 12 番染色体のセントロメア～53.06 Mb 領域) の責任遺伝子が存在する領域を効率的に絞り込む目的で、A/J マウスを遺伝的背景として第 12 番染色体を部分的に SM/J の染色体で保有する R2 (セントロメア～29.20 Mb 領域を SM/J アレルで保有) と R3 (29.20～46.75 Mb 領域を SM/J アレルで保有) コンジェニックマウスを作出し、脂肪肝形質を中心とした表現型の解析を行った。

第 1 節では、コンジェニックマウスの背景系統である A/J マウスを用いて、コンジェニックマウスの表現型解析に適した食餌条件の検討を行った。A/J マウスを CE-2（市販飼育繁殖用固型飼料）群、固型高脂肪食群（固型 HFD 群）、粉末高脂肪食群（粉末 HFD 群）の 3 群に分け、7 週間飼育した後に肝臓脂質蓄積量を比較した。固型 HFD 群と粉末 HFD 群の肝臓総脂質含量ならびに肝臓トリグリセリド含量（以下、肝臓 TG 含量）は、CE-2 群と比較して有意な高値を示し、特に固型 HFD 群は粉末 HFD 群よりも肝臓脂質蓄積が顕著であった。このことから、コンジェニックマウスの表現型解析は固型 HFD で 7 週間飼育の条件で行うこととした。

第 2 節では、A/J、A/J-12SM（A/J の第 12 番染色体のみを SM/J の染色体に置換したマウス）、R2、R3 を 7 週間固型 HFD で飼育して、肝臓脂質蓄積量を比較した。肝臓 TG 含量は、A/J と比較して A/J-12SM、R2、R3 のいずれも有意な低値を示したが、2 種のコンジェニックでは A/J-12SM のレベルまでは低下しなかった。このことから、*Fllsa* の責任遺伝子は複数存在しており、R2 と R3 がそれぞれ SM/J アレルで保有している領域に少なくとも 1 つずつ存在することが示唆された（セントロメア～29.20 Mb 領域と 29.20～46.75 Mb 領域）。

第 3 節では、DNA マイクロアレイ解析（肝臓、精巣上体脂肪組織）ならびにエクソーム解析により、上記の領域からの候補遺伝子の探索を行った。第 2 節で表現型解析を行ったマウスの肝臓 TG 含量および肝臓重量が、精巣上体脂肪組織重量と有意な逆相関の関係にあったことから、肝臓だけでなく精巣上体脂肪組織のマイクロアレイ解析も行った。肝臓については、過去に 7 週間 HFD で飼育した A/J と A/J-12SM の肝臓を用いて行ったマイクロアレイデータを再解析した。コンジェニック解析により限局した領域内（セントロメア～46.75 Mb）において 2 群間で 1.68 倍以上あるいは 0.60 倍以下に発現変動した遺伝子を選抜し、さらにコンジェニックマウスにおける遺伝子発現量を測定して、A/J-12SM とコンジェニックマウスが同様の発現パターンを示した遺伝子を *Fllsa* の候補遺伝子として選抜した。解析の結果、肝臓から *Iah1* と *Rrm2*、精巣上体脂肪組織から *Zfp125* と *Nrcam* を選抜した。さらに、過去に行った A/J と SM/J のエクソーム解析データを限局した領域内について再解析した結果、A/J と SM/J との間でアミノ酸置換を伴う塩基変異を有する 48 遺伝子が検出され、特に *Iah1* には 2 か所のアミノ酸置換（A37S、E75G）が存在することが分かった。以上の DNA マイクロアレイ解析ならびにエクソーム解析の結果から総合的に判断して、*Iah1* 遺伝子が最も有力な候補遺伝子であると考えられた。

◆第 2 章 *Fllsa* の候補遺伝子 *Iah1* の機能解析と発現制御機構の解析

第 1 章において選抜した *Iah1* と脂肪肝との関連性を検討する目的で、第 1 節では、全身性 *Iah1* ノックアウトマウス（*Iah1*-KO）を作出し、表現型解析を行った。*Iah1* 野生型マウス（*Iah1*-WT）、ヘテロノックアウトマウス（*Iah1*-Hetero）、および *Iah1*-KO を固型 HFD で 12 週間飼育した結果、*Iah1*-WT と比較して *Iah1*-KO の肝臓総脂質含量ならびに肝臓 TG 含量が有意な高値を示し、*Iah1*-Hetero は *Iah1*-WT と *Iah1*-KO

の中間値を示した。一方で、*Iah1*-WT と *Iah1*-KO の肝臓における既知の脂質代謝関連遺伝子の発現量を比較した結果、2 群間で有意な差は見られなかった。そこで、*Iah1*-WT と *Iah1*-KO の肝臓を用いてマイクロアレイ解析を行い、2 群間で 1.5 倍以上あるいは 0.67 倍以下に発現変動した糖・脂質代謝関連遺伝子を探索した。その結果、*Sik1*、*Onecut1*、*Msr1* が選抜されたが、この 3 遺伝子の肝臓における発現量と肝臓 TG 含量、肝臓総脂質含量との有意な相関は見られなかった。以上の結果から、*Iah1* は *in vivo* において糖・脂質代謝関連遺伝子 (*Sik1*、*Onecut1*、*Msr1*) の発現量を変動させ得るが、この 3 遺伝子の発現変動が肝臓脂質蓄積に与える影響は弱いと推測された。なお、マウス IAH1 のホモログである酵母 *Iah1p* (*IAH1* gene product) がエステラーゼ活性を持つことから、マウス IAH1 のエステラーゼあるいはリパーゼ活性が直接的に肝臓脂質量を調節する可能性が考えられた。

全身性 *Iah1*-KO の解析では、肝臓脂質蓄積に寄与する組織の特定には至らなかった。そこで、第 2 節では、肝臓特異的 *Iah1* ノックアウトマウス (肝臓 *Iah1*-KO) を作出し、表現型解析を行った。肝臓 *Iah1* 野生型マウス (肝臓 *Iah1*-WT) と肝臓 *Iah1*-KO を固型 HFD で 12 週間飼育して肝臓脂質蓄積量を比較した結果、肝臓 *Iah1*-KO が高値を示したものの、有意な差は見られなかった。この結果から、肝臓のみならず肝外組織の *Iah1* も肝臓脂質蓄積に寄与していることが示唆された。肝臓脂質蓄積に寄与する肝臓以外の組織としては、肝臓に次いで *Iah1* 発現量が高く、全身性 *Iah1*-KO において脂質代謝関連遺伝子の発現変動が見られた脂肪組織が候補の 1 つとして考えられた。

我々は、先行研究において、肝臓での *Iah1* 発現量の低い 4 系統 (A/J、AKR、DBA/1、BALB/c) の *Iah1*-5' 上流領域に 119 bp の塩基欠失を同定した。この 119 bp の欠失と *Iah1* の発現低下との関連性を明らかにするために、第 3 節ではまず 15 系統のマウスの *Iah1*-5' 上流領域 (転写開始点を +1 とした時の -860~+14 領域) のシーケンス解析を行った。シーケンス解析の結果、*Iah1* 発現量が低い系統と高い系統との間には *Iah1*-5' 上流領域に 119 bp の欠失だけでなく、422 bp の挿入、ならびに 17 bp の欠失、20 か所の SNPs が存在した。上記の変異と SNPs が *Iah1* の発現を制御する可能性が考えられたため、次に、A/J (変異有・発現低)、SM/J (変異無・発現高)、C57BL/6J (変異無・発現高) の *Iah1*-5' 上流領域のプロモーター活性を比較した。その結果、シーケンス解析により同定した 3 つの変異と全ての SNPs を含む領域 (-860~+14) は *Iah1* プロモーター活性の低下に寄与しないことが明らかとなった。

本研究の結果から、コンジェニック解析により限局した脂肪肝感受性遺伝子座 *Fllsa* 領域内の候補遺伝子 *Iah1* の発現レベルの恒常的な低下が脂肪肝感受性を高めることが示唆され、*Iah1* が *Fllsa* の有力な候補遺伝子であることが示された。今後、*Iah1*-KO マウスでの肝臓脂質蓄積に対する肝臓および肝外組織の関与とそのメカニズム、ならびに *Iah1* の発現制御機構を解明することが、脂肪肝の新たな発症メカニズムの解明に繋がると考えられる。