

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 鈴木 京

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

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	堀尾文彦
委員	名古屋大学教授	下村吉治
委員	名古屋大学教授	吉村 崇
委員	名古屋大学准教授	村井篤嗣
委員	名古屋大学講師	小林美里

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) までを含む病態を指す。NAFLD は生活習慣病 (肥満、2 型糖尿病、脂質異常症等) と関連が深く、環境要因と複数の遺伝的要因との相互作用によって発症する多因子疾患である。全世界の成人人口の約 20%が NAFLD に罹患しているという報告もあることから、NAFLD の遺伝的要因を解明することが NAFLD の予防法や治療法を見出す一助となり得ると考えて以下の研究に着手するに至った。

遺伝的に不均一なヒトを対象とした遺伝的要因の解析には様々な制約があるため、本論文で実施した近交系統マウスを用いた遺伝解析は、NAFLD の遺伝的要因の探索において好適である。本論文の先行研究においては、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 マウスの遺伝解析を進めてきた。SMXA-5 マウスは、両親系統である 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 (RI) の 1 系統であり、両親系統のゲノムをモザイク状に保有している。この SMXA-5 と SM/J との F2 交雑群を用いた 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* を A/J アレルで保有すると肝臓脂質蓄積量は増加し、実際に A/J マウスと比較して A/J-12SM マウス (A/J を遺伝的背景として第 12 番染色体のみを SM/J の染色体に置換したマウス) では肝臓脂質蓄積量が減少することを確認した。*F11sa* の責任遺伝子が脂肪肝感受性遺伝子であると考えられたが、*F11sa* 領域内 (セントロメア～53.06 Mb) には 600 個以上の遺伝子が存在しており、全遺伝子を対象とした責任遺伝子の探索は困難であった。そこで本論文では、脂肪肝感受性遺伝子座 *F11sa* の責任遺伝子の候補遺伝子を選抜した後、その候補遺伝子と脂肪肝との関連性を明らかにすることを目的とし、以下のような知見を得た。

第 1 章では、コンジェニック系統 (R2、R3) を用いて *F11sa* の責任遺伝子存在領域の限局を試みた。A/J マウスを遺伝的背景として、第 12 番染色体の *F11sa* 領域を部分的に SM/J アレルで保有するコンジェニックマウス R2 (セントロメア～29.20Mb を SM/J アレルで保有) ならびに R3 (29.20～46.75Mb を SM/J アレルで保有) を確立した。さらに遺伝的背景である A/J マウスを用いて飼育条件の検討を行い、高脂肪食 (以下、HFD) で 7 週間飼育するという条件が、コンジェニックマウスの表現型解析に適していると判断した。その後、7 週間の HFD 摂取条件下で飼育した R2、R3 コンジェニックマウスの肝臓脂質蓄積量を比較し、*F11sa* には複数の責任遺伝子が存在していることを示した。さらに、R2、R3 コンジェニックマウスがそれぞれ SM/J アレルで保有している領域 (R2: セントロメア～29.20Mb、R3: 29.20～46.75Mb) に *F11sa* の責任遺伝子が少なくとも 1 つずつ存在することを示した。上記の結果を受け、本章ではさらに、マイクロアレイ解析ならびにエクソーム解析の結果を駆使して

限局した領域からの候補遺伝子の探索を試みた。*Fllsa* の責任遺伝子の主要な作用組織としては、第一に肝臓が考えられた。そこで、過去に行った 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、限局した領域内において 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た。さらに、肝臓脂質蓄積量を解析した全てのマウス個体 (A/J、A/J-12SM、R2、R3) の肝臓トリグリセリド含量 (以下、肝臓 TG 含量) ならびに肝臓重量が、精巣上体脂肪組織重量と有意な逆相関を示したことを受け、本論文では肝臓に加えて精巣上体脂肪組織のマイクロアレイ解析も実施した。精巣上体脂肪組織のマイクロアレイ解析により、限局した領域内において 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た。肝臓と精巣上体脂肪組織より選抜した遺伝子は、さらに R2、R3 コンジェニックマウスにおいて遺伝子発現量を測定し、A/J と比較して肝臓脂質蓄積量が減少する 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。その結果、肝臓から *Iah1* と *Rrm2*、精巣上体脂肪組織から *Zfp125* と *Nrcam* を候補遺伝子として選抜した。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再解析し、限局した領域内において A/J と SM/J との間で 48 遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が存在していることを明らかにした。特に肝臓のマイクロアレイ解析において選抜された *Iah1* には、A/J と SM/J との間で 2 か所のアミノ酸置換 (S37A、G75E) が存在することを確認した。上記の結果から、*Iah1* が *Fllsa* の有力な候補遺伝子であることが示唆された。*Iah1* (isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog) は、酵母においてエステラーゼ活性を持つことが報告されているため、マウス IAH1 タンパク質もエステラーゼあるいはリパーゼの活性を有することが期待された。さらに、本論文の先行研究により、マウス *Iah1* を Hepa1-6 (マウス肝癌由来細胞株) に安定的に過剰発現させることで脂質代謝関連遺伝子 (*Cd36*、*Srebf1*、*Gpam*、*Dgat2*) の発現量がコントロールと比較して有意に変動することが明らかになっている。ゆえに、マウス *Iah1* が *in vivo* においても肝臓における脂質代謝に関与していると考察した。

第 2 章では、初めに、*Fllsa* の候補遺伝子である *Iah1* の脂肪肝への効果を検討する目的で、全身性 *Iah1* ノックアウトマウスの表現型解析を行った。12 週間の HFD 摂取条件下では、*Iah1* を全身で欠損したマウス (以下、*Iah1*-KO) は、野生型マウス (以下、*Iah1*-WT) と比較して肝臓脂質蓄積量が有意な高値を示した。この知見は、マウス *Iah1* が肝臓への脂質蓄積に関与していることを示唆するものである。*in vitro* においてマウス肝細胞株に *Iah1* を過剰発現させると脂質代謝関連遺伝子の発現量が変動したことから、*in vivo* においても肝臓において脂質代謝関連遺伝子の発現量が変化していると予想した。そこで、*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が、2 群間で有意な差は見られなかった。さらに、

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脂質含量との間に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及ぼす影響は弱いと推察した。さらに、酵母 *Iah1p* がエステラーゼ活性を持つという報告から、マウス IAH1 がエステラーゼ活性あるいはリパーゼ活性を介して、肝臓への脂質蓄積を直接的にコントロールしている可能性があると考えた。

続いて、肝臓脂質蓄積に寄与する組織を特定する目的で、肝臓特異的 *Iah1* ノックアウトマウス (肝臓 *Iah1*-KO) の表現型解析を行った。まだ十分な個体数は解析できていないものの、肝臓 *Iah1* 野生型マウス (肝臓 *Iah1*-WT) と肝臓 *Iah1*-KO を 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 が高値を示したが、有意な差は見られなかった。この結果から、肝臓で発現している *Iah1* 単独ではなく、他組織の *Iah1* も肝臓脂質蓄積に寄与する可能性が示された。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を確認した脂肪組織を候補の 1 つと考えた。

本論文の先行研究により、肝臓における *Iah1* 発現量が低い 4 系統 (A/J、AKR、DBA/1、BALB/c) の *Iah1*-5' 上流領域に 119 bp の塩基欠失が存在することが明らかになっている。そこで次に、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べく、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) のシーケンス解析と、A/J、SM/J、C57BL/6J の *Iah1*-5' 上流領域のプロモーター活性を測定した。シーケンス解析の結果、*Iah1* 発現が低い 4 系統の *Iah1*-5' 上流領域には 119 bp の欠失だけでなく、422 bp の挿入、ならびに 17 bp の欠失が保存されていることを示した。さらに、*Iah1* 発現量が低い系統と、*Iah1* 発現量が高い系統との間には 20 か所の SNPs が存在することも明らかにした。さらに、A/J (変異有・*Iah1* 発現低)、SM/J (変異無・*Iah1* 発現高)、C57BL/6J (変異無・*Iah1* 発現高) の 119 bp の欠失と複数の SNPs を含む領域 (-314 ~ +14)、ならびに 3 つの変異と全ての SNPs を含む領域 (-860 ~ +14) のプロモーター活性を比較した結果、今回の実験系においては、全ての変異と SNPs が *Iah1* プロモーター活性の低下に寄与しないことが示唆された。

以上のように、本論文においては、マウス第 12 番染色体上の高脂肪食誘発性脂肪肝の感受性遺伝子座 *Fllsa* の責任遺伝子の存在領域を限局し、肝臓および脂肪組織の解析結果から *Iah1* を有力な候補遺伝子として選抜した。そして、*Iah1*-KO マウスでは肝臓脂質蓄積が起こることを明らかにし、*Iah1* が脂肪肝に関わることを初めて示し

た。これらの知見は食事性脂肪肝の新たな発症機構の発見に繋がり、栄養学的意義の高いものである。従って、当審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認め、合格と判定した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	鈴木 京
試験担当者	堀尾文彦、下村吉治、吉村 崇、村井篤嗣、小林美里			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成29年2月7日学位審査委員会において、主論文の内容を中心としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、合格と判定した。</p>				