

研究成果報告書

事業名（補助金名）： 基盤的研究開発育成事業（若手研究補助金）
研究開発テーマ名： 分子遺伝学的アプローチによる動脈硬化症修飾遺伝子の同定とその解析
研究代表者名： 石森 直樹【北海道大学病院循環器科／医員】
共同研究者名： 筒井 裕之【北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学/教授】
藤井 聰【北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学/講師】
大村 計【北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学/大学院生】
外部協力者名： Beverly Paigen【米国ジャクソン研究所/Senior Staff Scientist】

1. 背景・目的

近年、急速な高齢化と食生活の欧米化に伴い、動脈硬化関連疾患が急増している。動脈硬化病変は高脂血症・高血圧症・糖尿病などの危険因子をもとにして、長期間かけて形成される多因子疾患である。現在のところ既知の動脈硬化危険因子をコントロールすることで、発症予防・進展抑制に対して一定の成果（一次/二次予防）を挙げている。しかし、生活習慣の変化などにより動脈硬化関連疾患罹患者数は依然増加傾向であり、血管病治療の新たなターゲットの同定が望まれている。

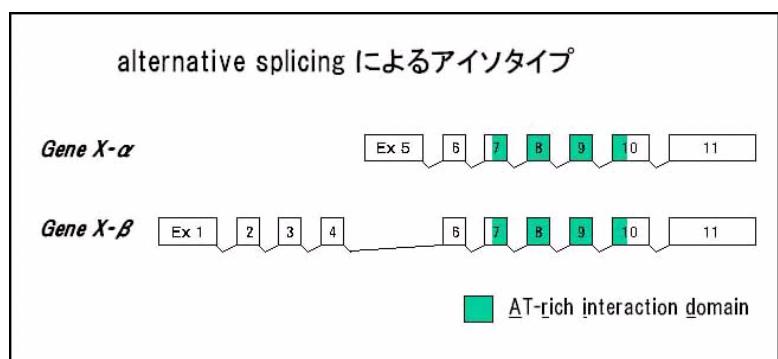
疾患モデル動物を用いた Quantitative Trait Loci (QTL) 解析などの遺伝学的マッピング手法は、多因子疾患を征するための新たな治療ターゲットを見出すのに極めて有用である。我々のこれまでの動脈硬化食投与 ($B6 \times 129S1$) F_2 マウスを用いた QTL 解析より、比較的最近同定された転写因子をコードする Gene X が動脈硬化病巣進展に関与する有力な候補遺伝子 (modifier gene) であることが示唆されている。

本転写因子はイーストからヒトに至るまで広く真核生物に存在が確認され、いくつかの類似蛋白が報告されているが、その発現パターンや生体内での機能についてはほとんど解明されていない。したがって本研究は、2003 年に国際共同チームにより完了された（ヒト・マウス）ゲノム塩基配列解読情報を活用して、分子遺伝学的アプローチにより新たな動脈硬化症修飾遺伝子 (Modifier genes) を同定し、その遺伝子機能を解析することを目的とする。

2. 内容・方法

これまで我々は、動脈硬化発症モデルとして高脂食投与マウスを用いて QTL 解析を行ない、修飾遺伝子を含む領域 (QTL) をゲノム上に複数マッピングした。さらにハプロタイプ解析では、これらの QTL のうち *Ath17* (Chromosome 10, 30-36 cM) に含まれる新たな転写因子をコードする Gene X が、修飾遺伝子として重要であることが示唆された。

これまでの報告によると Gene X には alternative splicing により 2 種類のアイソタイプが存在するとされている。Gene X- α は心血管組織で発現が強く、Gene X- β は生体内に広汎に発現している。そこで我々は、高脂食で一定期間飼育した Diet Induced Obesity (DIO) モデルを用いて Gene X (- α , - β) の遺伝子発現の変化を検討した。まず 2 ヶ月齢雌性 C57BL/6 マウスを用意し、その一部を普通食から高脂食に変更して 2 週間飼育した。また、別の一一群のマウスは普通食を隔日投与としてカロリー制限を行なったものも用意した。普通食投与、高脂食投与、およびカロリー制限マウスより大動脈・肝臓・脂肪組織を回収し、定法に従って RNA の分離、cDNA の合成を行ない、Realtime PCR 法で各組織における Gene X- α ,



Gene X- β の発現を確認し、高脂食が Gene X の発現に及ぼす影響を検討した。遺伝子発現の内在性コントロールとして 36B4 を用いた。サンプリングの際に、各マウスの体重や内臓重量なども測定し検討した。

3. 結果・成果

高脂食を 2 週間投与した C57BL/6 マウス群 (WD 群) と、普通食を継続投与したマウス群

B6 female (12 wks of age)	CR (n=3)	NCD (n=3)	WD (n=3)
BW (g)	18.9±0.9	20.5±1.0	20.4±0.6
GFP (mg)	316±68	251±47	292±70
PFP (mg)	127±40	119±27	134±28
GFP+PFP (mg)	443±100	370±73	426±97
Liver (mg)	671±64	934±84	965±63
Heart (mg)	100±1	104±3	101±5
BS (mg/dl)	71±13	132±12	139±47

(NCD 群) との間で体重増加に差は認めなかつたが、カロリー制限を行なったマウス群 (CR 群) では両群に比べ体重の増加は少ない傾向にあった (Table 1)。各群間でサンプリング時の性腺周囲脂肪重量 (GFP)、腎周囲脂肪重量 (PFP)、両者を合わせた内臓脂肪重量 (GFP+PFP) に差を認めなかつた。肝重量は CR 群で有意に低下していた。心重量や随時血糖値に各群で差は認めなかつた。

各マウスより採取した性腺周囲脂肪組織をホルマリンで固定した後、パラフィンで包埋し切

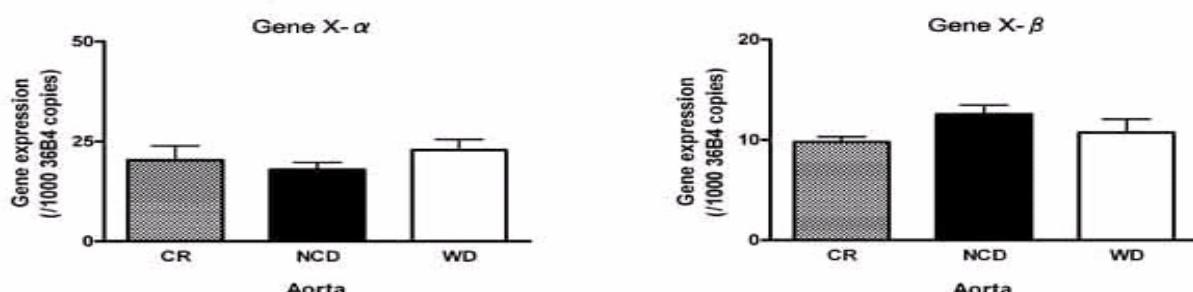
B6 female (12 wks of age)	CR (n=3)	NCD (n=3)	WD (n=3)
Mean Lobule Area ($\mu\text{m}^2/\text{cell}$)	1124±27	853±24	1186±26

片を作製して HE 染色を行つた。画像解析ソフト (Image J) を用いて病理組織学的に性腺周囲脂肪組織の 1 脂肪細胞当たりの平均断面積を算出した (Table 2)。WD 群は NCD 群に比べて有意に大きく、高脂食の投与を開始して 2 週後で既に脂肪細胞の肥大化が始まっていることが示唆された。CR 群でも脂肪細胞の肥大化が認められたが、1 日絶食をしたあとの普通食摂取量に制限を設けなかつたことより、過食となつていたことが推察され、不規則なカロリー摂取による影響が考えられた。

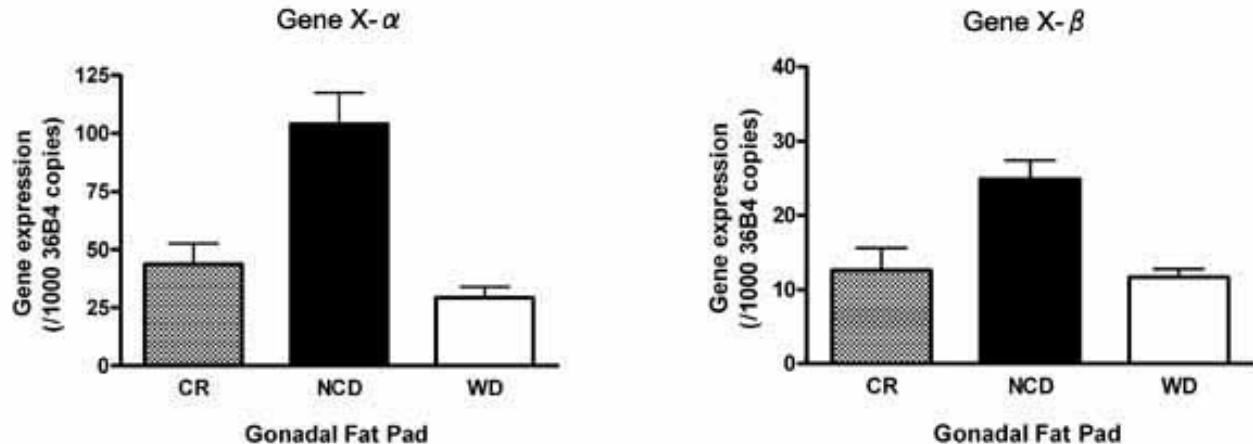
Table 1. Body Weight, Fat Pad Weight, and Liver Weight of B6 Females

Table 2. Mean Gonadal-Fat Lobule Area of B6 Females

12 週齢普通食投与マウス群 (NCD 群) で Gene X の発現を確認したところ、今回解析した臓器の間では Gene X- α , Gene X- β とも、脂肪組織>大動脈>肝臓の順で発現が強く認められた。WD 群の大動脈・肝臓における Gene X- α /Gene X- β 遺伝子発現は、NCD 群と同程度であったが、脂肪組織においては WD 群で遺伝子発現が NCD 群に較べて有意に抑制されていた。

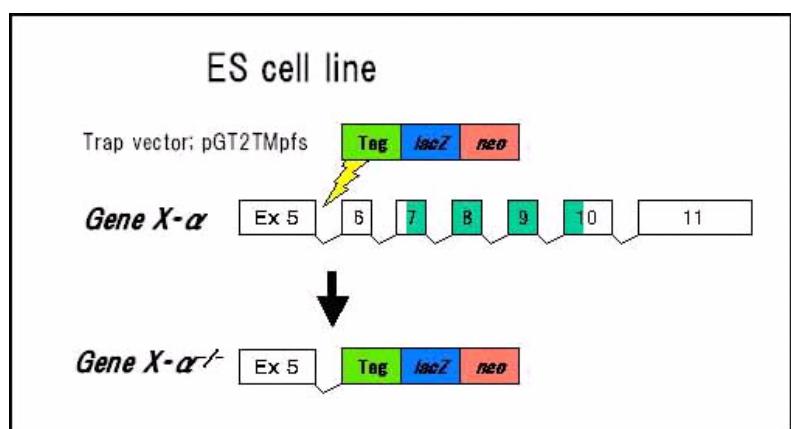


CR 群においても同様に脂肪組織での発現の低下が認められた。脂肪組織重量は変わらないが、細胞レベルで脂肪細胞の肥大化が始まっている早期の段階で、脂肪組織自体において Gene X の発現の変化を認めた。このことより、転写因子をコードする Gene X は、脂肪細胞の分化増殖に深く関与することを示唆する。



近年、急速な生活習慣の変貌により我が国においても肥満が大きな社会問題となっている。動脈硬化進展の基盤としてメタボリックシンドロームという概念が提唱され脚光を浴びている。肥満は最も重要な要素とされているが、メタボリックシンドロームの本態については不明な点が多い。今回の遺伝子発現に関する実験の結果から、Gene X がコードする転写因子は摂取エネルギーに応じて、脂肪細胞でエネルギー代謝に関わる種々の遺伝子の発現を調節し、その結果動脈硬化の進展を規定していることが推察される。しかし現在のところ、生体内におけるこの転写因子の機能についてはほとんど解明されておらず不明である。

そこで我々は、Gene X 発現の欠如した ES 細胞 (129 background) を米国 Bay Genomics より入手して、Gene X 欠損マウスの樹立を進めている。すでに現在まで、ES 細胞を C57BL/6 由来胚盤胞に顕微注入してキメラマウスを樹立し、雄性キメラマウスを雌性 C57BL/6 マウスにバッククロスして N3F1 マウスを得ている。交配・継代に問題は見



られず、多型マーカーガイドによるスピードコンジェニック法で樹立しているため (Table 3)、N3F1 マウスの遺伝背景は全ゲノムの約 90% が C57BL/6 となっている。本法による N5F1 マウスの遺伝背景はほぼ C57BL/6 と考えてよく、近日中には Gene X 欠損マウスが樹立完了し、種々の心血管疾患モデルマウスを用いて Gene X の詳細な解析を行なう予定である。

Table 3. SSLP Markers to Establish Gene X^{-/-} Mice

Marker	Chr	cM	Marker	Chr	cM	Marker	Chr	cM
D1MIT65	1	8.4	D6MIT86	6	0.5	D12MIT182	12	2
D1MIT236	1	25.7	D6MIT209	6	32.5	D12MIT84	12	11
D1MIT132	1	43.1	D6MIT36	6	46	D12MIT172	12	22
D1MIT495	1	67	D6MIT15	6	74	D12Mit91	12	29
D1MIT159	1	81.6	D7MIT294	7	8	D12MIT194	12	45
D1MIT406	1	101.2	D7MIT82	7	25	D12MIT20	12	58
D1MIT210	1	109	D7MIT300	7	46.5	D13MIT16	13	10
D2MIT312	2	1	D7MIT141	7	72.4	D13MIT13	13	35
D2Mit365	2	17	D8MIT155	8	1	D13MIT213	13	59
D2Mit61	2	34	D8MIT190	8	21	D13MIT35	13	75
D2MIT94	2	48.1	D8MIT248	8	43	D14MIT98	14	3
D2Mit17	2	69	D8MIT56	8	73	D14MIT60	14	15
D2MIT285	2	86	D9MIT250	9	5	D14MIT39	14	30
D2MIT148	2	105	D9MIT129	9	26	D14MIT75	14	54
D3Mit203	3	11.2	D9MIT107	9	40	D15MIT13	15	6.7
D3Mit21	3	19.2	D9MIT350	9	61	D15MIT184	15	25.4
D3MIT137	3	35.2	D9MIT281	9	68	D15MIT107	15	49
D3Mit311	3	45.2	D10Mit28	10	4	D15MIT243	15	56.7
D3Mit318	3	58.8	D10MIT213	10	11	D16MIT131	16	4.3
D3MIT320	3	71.8	D10MIT38	10	26.8	D16MIT4	16	27.3
D3MIT147	3	79.4	D10MIT148	10	29.5	D16MIT189	16	55.2
D4MIT227	4	3.2	D10Mit31	10	36	D16MIT86	16	66
D4MIT196	4	12.1	D10MIT186	10	40	D17MIT143	17	5
D4MIT17	4	31.4	D10MIT42	10	44	D17MIT180	17	29.4
D4MIT308	4	57.4	D10MIT95	10	51	D17MIT123	17	56.7
D4MIT42	4	81	D10MIT35	10	69	D18MIT19	18	2
D5MIT146	5	1	D11MIT78	11	2	D18MIT123	18	31
D5Mit148	5	18	D11MIT86	11	28	D18MIT42	18	45
D5MIT201	5	42	D11MIT285	11	52	D18MIT4	18	57
D5MIT155	5	53	D11MIT333	11	66	D19MIT78	19	5
D5MIT98	5	78	D11MIT48	11	77	D19MIT96	19	15
						D19MIT11	19	41
						D19MIT71	19	54
						DXMIT89	X	3
						DXMIT159	X	17.15
						DXMIT223	X	73.3

4. 今後の展望

今回の実験より、Gene X がコードする転写因子は脂肪組織における遺伝子発現を調節し、最終的に動脈硬化病巣を規定することが推察された。現在、高脂食投与マウスのほか、ApoE 欠損マウス、LDLR 欠損マウス、ob/ob マウスなど、多くのモデルマウスがヒトの心血管代謝病の病態解明に大きく貢献しており、今後これらのマウスとの組み合わせで、本転写因子の生体における機能が急速に解明されることであろう。また、本転写因子により発現が調節されている下流の遺伝子群を同定することは、動脈硬化治療の新たなターゲットの創出へ繋がることが期待される。