

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05532

研究課題名(和文) 遺伝子間相互作用を再現したモデル動物での高脂肪食誘導性脂肪肝発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of high-fat diet-induced fatty liver in mouse model reproducing gene-gene interaction.

研究代表者

小林 美里 (Kobayashi, Misato)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：20456586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝疾患は環境要因と遺伝要因から発症する多因子疾患である。高脂肪食摂取により、重篤な脂肪肝を示すSMXA5マウス(脂肪肝抵抗性のSM/JとA/Jを両親系統とする)の解析から、脂肪肝の候補遺伝子としてlah1(isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog)遺伝子を見出した。この機能解析を進め、遺伝的背景の異なる2系統の全身性lah1欠損マウスの表現型解析から、lah1のin vivoにおける機能を解析したが、肝臓中性脂肪含量の増加は見られなかった。そのため、lah1遺伝子は高脂肪食誘導性脂肪肝の発症には関与しないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

F11saの候補遺伝子として選抜したlah1の機能については酵母以外での報告は存在せず、マウス個体を用いたlah1の機能解析を行なった初めての研究である。多遺伝子で発症する疾患の遺伝子同定の手法としてCRISPR/Cas9システムを利用することにより、動物個体において候補遺伝子とその他の遺伝子群との相互作用を再現することができた。また、肝外組織である脂肪組織において遺伝子発現変動が見られ遺伝子はlah1の直接的な影響ではなく、全身の代謝変化による2次的なものであると考えられ、細胞系での遺伝子の機能解析では得られない変化を動物個体での解析が提示することを示すものである。

研究成果の概要(英文)：NAFLD is one of multiple factorial diseases caused by the interaction between genetic factor and environmental factor. Genetic analysis of high-fat induced fatty liver model SMXA-5 mice, derived from fatty liver-resistant parental strains, revealed that lah1 was a candidate gene for fatty liver. I constructed two lah1 knockout mice (A/J-12SM lah1 KO and B6N-lah1 KO). These lah1 knockout mice did not show the accumulation of triglycerides in liver. This study showed that lah1 gene was not involved in the development of high-fat induced-fatty liver.

研究分野：栄養生化学

キーワード：脂肪肝 遺伝解析 異所性脂肪蓄積

1. 研究開始当初の背景

近年の脂肪肝患者の増加は、各個人の遺伝的素因に栄養状態の変化が加わることで生じる遺伝子-食事因子間の相互作用によるものである。SM/J マウスと A/J マウスの交配から作出された組換え近交系統である SMXA-5 マウスは高脂肪食摂取により脂肪肝と糖尿病を発症する。遺伝子-食事因子間の相互作用および複数の遺伝子-遺伝子相互作用がその発症に関与しており、ヒトの脂肪肝発症メカニズムの解明に適したモデルである。我々は独自の脂肪肝モデル SMXA-5 マウスを用いて第 12 番染色体に A/J マウス由来の脂肪肝感受性遺伝子座(*Fllsa*)を同定し、その責任遺伝子を同定すべく forward genetics の手法で遺伝解析を進めてきた。

(1) 脂肪肝感受性の候補遺伝子 *Iah1* の選抜

脂肪肝感受性の A/J マウスに脂肪肝抵抗性の SM/J マウスの第 12 番染色体を導入置換した Chr.12 コンソミックマウスにおいて肝臓トリグリセリド(TG)含量の有意な低下を認め、*Fllsa* の効果を確認した。そして、肝臓においてこの遺伝子座に存在する *Iah1* 発現が A/J マウスで顕著に低く、コンソミックマウスでは高いことから、候補遺伝子として *Iah1* に注目することとした。

(2) *Iah1* 欠損による脂肪肝の形成における肝外組織の関与

Iah1 遺伝子の機能については酵母以外では過去に報告がなかったことから、ノックアウト(KO)マウスを作製して、*Iah1* 遺伝子の哺乳類における機能解明に初めて取り組んだ。*Iah1* タンパク質は肝臓以外でも発現しており、腎臓で高く、小腸、白色・褐色の脂肪組織、肺などコピキタスに認められることから、肝外組織が脂肪肝の形成に関与する可能性も考えられた。

(3) 遺伝子間相互作用による脂肪肝形成への可能性(遺伝的背景の重要性)

SMXA-5 の脂肪肝感受性遺伝子座は複数の染色体に存在している。第 12 番染色体に同定した *Fllsa* の他に、統計的に有意な効果をもつ脂肪肝感受性遺伝子座が第 2 番染色体の A/J 由来ゲノムに存在する。*Iah1* は SMXA-5 の遺伝的背景で選抜した脂肪肝候補遺伝子であるが、全身性 KO では C57BL/6N (B6N) マウス背景である。そのため、脂肪肝形成における *Iah1* 遺伝子と他の脂肪肝感受性遺伝子との相互作用が欠如しており、B6N マウス背景での *Iah1* の機能解析では、*Iah1* の脂肪肝に対する影響を過少評価してしまう可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、SMXA-5 の遺伝的背景で *Iah1* を欠損させたマウスを作製し、SMXA-5 マウスの生体内で起こる *Iah1* 遺伝子と他遺伝子との相互作用および遺伝子-食事因子間相互作用を再現し、*Iah1* の脂肪肝形成作用を証明することを目的とした。また、脂肪肝の形成における肝臓と肝外組織での *Iah1* 作用の解析により、臓器連関による脂肪肝発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子間相互作用を再現可能な KO マウスでの脂肪肝形成の証明

SMXA-5 の遺伝的背景を持つ Chr.12 コンソミックマウスにおいて、CRISPR/Cas9 システムにより *Iah1* 遺伝子のゲノム編集を行って、Chr.12 コンソミック-*Iah1*-KO マウス

(12-*Iah1*-KO)を作製した。Chr.12 コンソミックマウスの受精卵にガイド RNA と Cas9 タンパク質を導入して、得られた仔マウスのゲノム DNA 配列を解読する。ターゲット領域でゲノム編集が起こり、かつ RNAi 実験と同様にオフターゲット効果(ターゲット以外の遺伝子配列に対するゲノム編集)がないことを確認できた複数のファウンダーマウスを選抜し、交配により KO マウスを得る。この KO マウス作製の胚移植等については連携研究者である大野博士、宮坂博士(名古屋大学大学院医学系研究科)にご協力いただいた。これにより初めて、SMXA-5 マウスの脂肪肝発症に関わる *Iah1* と他遺伝子群との遺伝子間相互作用を再現した。Chr.12 コンソミックは背景系統の A/J マウスに比べて脂肪肝が抑制される。そこに *Iah1* 遺伝子を KO することで抑制されていた脂肪肝が悪化するのかを検証して、候補遺伝子 *Iah1* が SMXA-5 の高脂肪食誘導性脂肪肝の真の責任遺伝子であるのかを明らかにすることとした。

(2) *Iah1* の肝外組織における機能の解析

方法(1)で作成した 12-*Iah1*-KO の脂肪組織を用いて遺伝子発現変動の網羅的解析を行い、*Iah1* の欠損による肝外組織における影響を検討した。変動のあった遺伝子を脂肪細胞株において *Iah1* 遺伝子を siRNA でノックアウトすることで確認しようと試みた。

4. 研究成果

(1) 遺伝子間相互作用を再現可能な KO マウスでの脂肪肝形成の証明

昨年度に SMXA-5 の遺伝的背景を持つ Chr.12 コンソミックマウスにおいて、CRISPR/Cas9 システムにより *Iah1* 遺伝子のゲノム編集を行って、Chr.12 コンソミック-*Iah1*-KO マウス(12-*Iah1*-KO)を作製した。ゲノム編集によって *Iah1* 遺伝子のエクソ上に塩基の欠失が起こり、それによって早期にストップコドンが生じた 2 つの KO ラインを繁殖させ、実験に用いた。対照系統である Chr.12 コンソミックとこの KO マウスに高脂肪食を摂取させて 12 週間後に体重、脂肪組織重量、肝臓脂肪蓄積、血中脂質濃度を測定した。*Iah1* 遺伝子を KO することでコンソミックマウスに比べて肝臓への脂肪蓄積が増加することを期待した。しかし、作成した 2 つのラインの KO マウスではともに、コンソミックとの間に有意な差が見られなかった。また、体重推移、精巣上体脂肪重量、血中脂質においても KO による影響は見られなかった。

さらに、以前作出した C57BL/6 マウスの遺伝的背景で全身性に *Iah1* を KO したマウスにおいても、12 週間の高脂肪食摂取による *Iah1* の脂肪肝への効果を確認するために、追加実験を行った。以前の実験では、高脂肪食摂取による体重の個体差が大きく、脂肪肝の程度にも影響がみられていた。そこで、追加実験では個体数を増やして実験を行い、高脂肪食の摂取において、体重が十分に増加しない成長不良の個体については除外して解析を行った。その結果、C57BL/6 の *Iah1*-KO マウスの体重、脂肪組織重量、肝臓脂質、血中脂質においても、*Iah1* 欠損による影響がないことを確認した。

そのため、一般的な遺伝子改変系統である B6N-*Iah1* 全身性欠損マウスと SMXA-5 マウスの生体内で起こる *Iah1* 遺伝子と他遺伝子との相互作用および遺伝子-食事因子間相互作用を再現した 12-*Iah1*-KO マウスにおいても、脂肪肝が起こらないことを明らかにした。すなわち、*Iah1* 遺伝子は高脂肪食誘導性脂肪肝の発症には関与しないことが示された。

(2) *Iah1* の肝外組織における機能の解析

Iah1 は腎臓、肝臓、脂肪組織などで発現がみられることから、肝臓以外の組織にお

いても *Iah1* が脂質代謝に関与している可能性も考えられた。そこで、異所性脂肪蓄積 (脂肪肝) に影響を与える精巣上体脂肪組織の DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、アディポカインである *Sfrp4* (*Secreted frizzled-related protein4*) の mRNA レベルが A/J-12SM *Iah1* KO マウスで有意に減少し、*Metrn1* (*Meteorin-like protein*) は減少傾向を示した。KO マウスの解析から *Iah1* は白色脂肪組織においてアディポカインを変化させることを明らかにした。

次に、マウス脂肪細胞株 3T3-L1 を用いて脂肪細胞での *Iah1* の機能を探索した。3T3-L1 細胞において *Iah1* をノックダウンしたが、アディポカイン (*Sfrp4*, *Mertrn1*) の mRNA は変化しなかった。*in vivo* でみられたアディポカインの変動は、脂肪細胞の *Iah1* 欠損によって直接的に引き起こされたのではなく、全身の代謝が変化したことによる二次的な作用の結果である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masuya Tomomi, Suzuki Miyako, Tsujimura Junko, Kanamori Shinsaku, Miyasaka Yuki, Ohno Tamio, Murai Atsushi, Horio Fumihiko, Kobayashi Misato	4. 巻 15
2. 論文標題 Ablation of Iah1, a candidate gene for diet-induced fatty liver, does not affect liver lipid accumulation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0233087
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0233087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 舩屋智美, 田村友紀, 宮坂勇輝, 大野民生, 村井篤嗣, 堀尾文彦, 小林美里
2. 発表標題 脂肪肝候補遺伝子Iah1のA/J-12SM背景におけるノックアウトマウスの解析
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林美里, 金森深作, 鈴木京, 舩屋智美, 大野民生, 村井篤嗣, 堀尾文彦
2. 発表標題 脂肪肝感受性候補遺伝子Iah1の全身性と肝臓特異的欠損マウスの解析
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	堀尾 文彦 (Horio Fumihiko) (20165591)	名古屋大学・生命農学研究科・教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	村井 篤嗣 (Murai Atsushi) (10313975)	名古屋大学・生命農学研究科・准教授 (13901)	
連携研究者	大野 民生 (Ohno Tamio) (90293620)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	
連携研究者	宮坂 勇輝 (Miyasaka Yuki) (30778098)	名古屋大学・医学系研究科・助教 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関