

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08467

研究課題名(和文) 難治性脂質異常症の病態解明と治療法開発:ゲノム編集による in vivoアプローチ

研究課題名(英文) Molecular mechanisms and therapeutic targets of severe hypertriglyceridemia

研究代表者

高瀬 暁 (Takase, Satoru)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80508094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：自験例および追加症例の hypoapoC-II は、全ゲノム解析、breakpoint 解析、高密度 SNP タイピング解析等から、創始者ハプロタイプを持つ同一の構造変異 (APOC4 ex1- APOC2 ex1 の tandem duplication) と示され、BAC clone 由来の minigene reporter assay 系を構築した。6kb の tandem duplication のうち、proximal promoter を含む構造変異が critical と推定され、種を超えて再現されるか検討し、培養肝細胞での検証を経てのモデルマウス樹立を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

著明な高中性脂肪血症は頻回に急性膵炎を合併するため、社会生活が著しく妨げられる。従来の内服加療のみでは有効な改善は得難く、毎日の極めて厳しい食事制限が必須となるため生涯に渡り QOL 低下が甚だしい。hypoapoC-II モデルマウス構築により詳細な病態解明、急性膵炎発症機序解明、更には新規治療法の開発に帰着できれば、患者 QOL の向上が望める。また、本疾患構造変異による転写減少のメカニズムを解明できれば、他疾患の解釈にも応用できる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Previously we reported a case of hypoapoC-II with severe hypertriglyceridemia without any mutation in the coding region of the APOC2 gene. Whole genome sequencing revealed a rearrangement around the APOC2 gene. Southern blot hybridization analysis, array CGH analysis, and breakpoint analysis supported the result. Because same results were also shown in another case and a founder haplotype was detected by SNP genotyping of these patients, we proposed that the “hypoapoC-II” was derived from a structural abnormality around APOC2 gene. It is supposed partial tandem duplication of APOC2 gene including proximal promoter region may cause transcriptional defects of the gene.

研究分野：糖尿病学、脂質代謝学

キーワード：hypertriglyceridemia APOC2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景:

当研究室はこれまで、無 $\beta$ リポ蛋白血症、原発性高カイロミクロン(CM)血症などの原発性脂質異常症希少疾患の遺伝子変異を多く同定してきた。これらの病態は合併症を含め未解明の部分も多く残され、最適な治療法の確立は現在も重要な課題である。

無 $\beta$ リポ蛋白血症は、主に脂溶性ビタミン欠乏に起因する合併症予防的に大量ビタミン補充が必要とされるが、至適投与量・開始時期・期間の明確な指標は無い。高CM血症は高中性脂肪(TG)血症に起因する頻回の急性膵炎のため社会生活に支障をきたすが、膵炎発症のメカニズムは明らかでなく、厳しい食事制限以外に有効な根本的治療法はない。

apoC-IIはTG水解を担うリポ蛋白リパーゼ(LPL)の補因子であり、欠損により高CM血症を招く。apoC-IIは極少量のみでLPLを活性化可能と*in vitro*実験等で示された経緯から、完全欠損に限り著明高CM血症を呈するとされてきた。

一方、*Apoc2*ノックアウトマウスは胎生致死につき、同疾患のモデルマウス解析は不可能であり、*in vivo*での詳細な病態解析には至っていない。

その中で我々は、正常構造のapoC-IIが極少量残存し*APOC2*蛋白翻訳領域に変異を認めない高CM血症(hypoapoC-II)を見出した(Takase S. *J Atheroscler Thromb.* 2013)。全ゲノム解析により*APOC2*遺伝子上流域に約6kbのpartial tandem duplicationが見出され、血縁関係にない別症例において全く同じ構造変異が指摘されたこと、高密度SNPタイピング(SNP array解析)により同領域を含むFounder Haplotypeが示されたことから、共通祖先をもつと示された(Takase S et al. *AHA Scientific Sessions*, 2016)。更に、Founder Haplotypeが0.78Mbと比較的短いため創始者は数世代前よりも遙か以前に存在したと推定され、同変異が本邦に散在しhypoapoC-II保因者(ヘテロ接合体)が本邦に多く潜在する可能性が示唆され、本邦における同疾患の重要性が示唆された。

*Apoc2*ノックアウトマウスは胎生致死であるが、完全欠損ではないhypoapoC-IIはモデルマウスを樹立できる可能性が考えられた。同疾患のモデルマウスが樹立できれば、hypoapoC-II発症メカニズム、並びに著明高TG血症と急性膵炎を含めた合併症の病態解明、および新規治療法の開発に役立つと考えられた。

### 2. 研究の目的:

本研究は、原発性脂質異常症のうち難治性の高CM血症にfocusし、その疾患モデルマウスを樹立することにより、病態解明と有効な治療法開発のための*in vivo*解析を行うことを目的とした。

自験例で認めたhypoapoC-II構造変異のcritical領域は何処か?発症メカニズムは?どの程度のapoC-II低下を招くのか?完全欠損ではないapoC-II低下が実際に高CM血症をきたすのか?急性膵炎を合併する条件とは?最適な治療法は?hypoapoC-IIモデルマウスの樹立と*in vivo*病態解析を目指した。

### 3. 研究の方法:

ヒト 19 番染色体 Bacterial artificial chromosome (BAC) clone から Red / ET Recombination System を用いて *APOE-APOC1-APOC1P1-APOC4-APOC2* gene cluster を cloning した (*APOC1P1* は pseudogene)。同様に、マウス 7 番染色体 BAC clone から *Apoe-Apoc1-Apoc4-Apoc2* gene cluster を cloning した。*APOC2* 並びに *Apoc2* stop codon 手前に NanoLuc reporter gene を連結させた minigene assay 系を用いた培養肝細胞での reporter assay を試みたが、cloning vector size が大きいことによる transfection 効率の不安定性を考慮し、*APOC4*~*APOC2*、並びに *Apoc4*~*Apoc2* を PCR out し、*APOC4* 上流に duplication 領域を細断し cloning した minigene assay 系に変更した promoter 解析を試みた。

#### 4 . 研究成果 :

6kb の tandem duplication のうち、proximal promoter を含む構造変異が critical と推定され、特定の構造変異による転写翻訳低下が種を超えて再現されるか検討している。当初の想定以上に reporter assay 系の構築に時間を要し、期限内には終了できなかった。今後は培養肝細胞にゲノム編集を施し critical 領域のみを挿入し、*APOC2* 発現低下が再現されるか確認する。その上で hypoapoc-II モデルマウスの樹立を目指し、上述の問いに答えるべく研究を継続して行く。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 高瀬 暁 石浦浩之 田中督記 高梨幹生 蔵野信 岡崎佐智子 木村武史 李驍驍 飯塚陽子 岡島史宜 吉田博 澤野文夫 原真純 大須賀淳一 島野仁 辻省次 石橋俊 門脇孝 岡崎啓明
2. 発表標題 著明高TG血症患者におけるhypoapoC-II構造変異
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高瀬 暁 石浦浩之 田中督記 高梨幹生 蔵野信 岡崎佐智子 木村武史 飯塚陽子 岡島史宜 吉田博 原真純 塚本和久 辻省次 門脇孝 岡崎啓明
2. 発表標題 著明高 G血症の原因遺伝子:APOC2構造変異の探索
3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------