

令和 5 年 5 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08869

研究課題名（和文）ゲノムコホートから見出した脂肪肝関連分子を標的にした新規治療戦略の開発

研究課題名（英文）Development of therapeutic strategy for NAFLD targeting novel molecules identified through the analysis of genome cohort

研究代表者

岩本 禎彦（Iwamoto, Sadahiko）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10232711

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）：非肥満非アルコール性脂肪肝（non-obese NAFLD）のゲノムワイド関連解析によって新たにノミネートした13番染色体の新規候補遺伝子領域は、NAFLD全体とも関連することを明らかにした。関連する領域は、GPC6遺伝子Intron 6にマップされ、周辺4遺伝子の調節領域として機能している可能性が示唆され、そのうちGPR180遺伝子は肝臓脂肪蓄積とともに血清脂質濃度を制御することがノックアウトマウスによって明らかになった。パスウェイ解析によって、GPR180の欠損はmTORC1シグナルを負に制御し、その結果、SREBP1,2の活性化を抑制していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAFLDの治療は、通常、最大のリスクファクターである肥満に対して体重管理が先ず行われ、それに繋がる食事療法と運動療法が推奨されている。しかし、肥満もインスリン抵抗性もないlean-NAFLDの治療は、その必要性を含め検討不十分であった。本研究は、ゲノムワイド関連解析を用いた探索から、mTORの関わる複雑なシグナル経路のうちmTORC1経路を選択的に調節することによって脂肪肝を軽減させる新たなターゲット分子を提示できたと考えられる。選択性の低いmTORC阻害薬rapamycinに代わる、新たな薬剤開発に向けて、GPR180阻害薬は重要な候補になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Our genome-wide association analysis to explore genetic loci associated with lean NAFLD in the Japanese population suggested a new candidate locus mapped to GPC6 in chr13, which also showed weak association with whole NAFLD. The association signal in GPC6 was suggested to function as a regulatory element for adjacent genes, in which GPR180 was nominated as the most likely locus involved functionally in hepatic lipid levels. Gpr180 knockout mice showed ameliorated hepatic lipid deposition and serum lipid levels. The mTOR signaling pathway was the most plausible pathway for the hepatic lipid accumulation in the results of GSEA analysis of the KO mice. Phosphorylation analysis of the signal proteins also supported the weakened mTORC1 signaling in the Gpr180KO mouse liver. The global inhibitor of mTORC, rapamycin, is ineffective for ectopic lipid accumulation. GPR180 could be a novel therapeutic target for fatty liver and dyslipidemia.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：脂肪肝 ゲノムワイド関連解析 新規関連遺伝子座 mTORC1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) は、メタボリック症候群の肝臓病変として捉えられ、世界的な肥満人口の増加と共に有病率が上昇しており、本邦においても同様の傾向が観察されている。我々の同一施設における横断研究においても、2009~11年での超音波診断(男性の54.6%、女性の21.4%)から2017~18年の診断(男性の57.5%、女性の34.4%)へと有意に増加していた。しかし、メタボリック症候群診断基準を満たす割合はそれぞれ(男性20.3%、女性3.4%)と(男性19.5%、女性3.9%)であり、差を認めず、NAFLDの原因を肥満増加のせいだけにすることはできなかった。また、NAFLDの中には、BMI 25未満でも脂肪肝と診断される、いわゆる lean-NAFLD が男女とも48%程度含まれていた。lean-NAFLD は、アジア人種に多いと報告されており、遺伝的負荷による易罹患性が疑われていた[1]。NAFLD は心血管性疾患の独立したリスク因子であることも、明らかにされ、生活習慣の欧米化に伴い、動脈硬化を基盤とした虚血性心疾患、脳卒中による死亡が死因の第1位を占める我が国においては、NAFLDの臨床的ならびに公衆衛生学的意義を明らかにする重要性が、年々高まっている。NAFLDの病態生理には複数のメカニズムが関わっており、リスクファクターとして明らかになっているのは、肥満(インスリン抵抗性)、性差、薬剤、遺伝素因である。遺伝素因の解明に、ゲノムワイド関連解析が大きく貢献し、オッズ比>2を示すPNPLA3やオッズ比1.3のTM6SF2のミスセンスSNPが明らかにされた。これらのSNPは、肝細胞でのVLDL分泌障害をもたらし、エネルギー過剰摂取によって合成した脂肪滴が細胞質に貯留した結果、脂肪肝が形成される。しかし、私たちがlean-NAFLDのGWASを実施した結果、PNPLA3とTM6SF2との有意な関連は認められず、Chr6, 7, 12, 13に関連を示唆する遺伝子座を見いだした(図1A,B)。

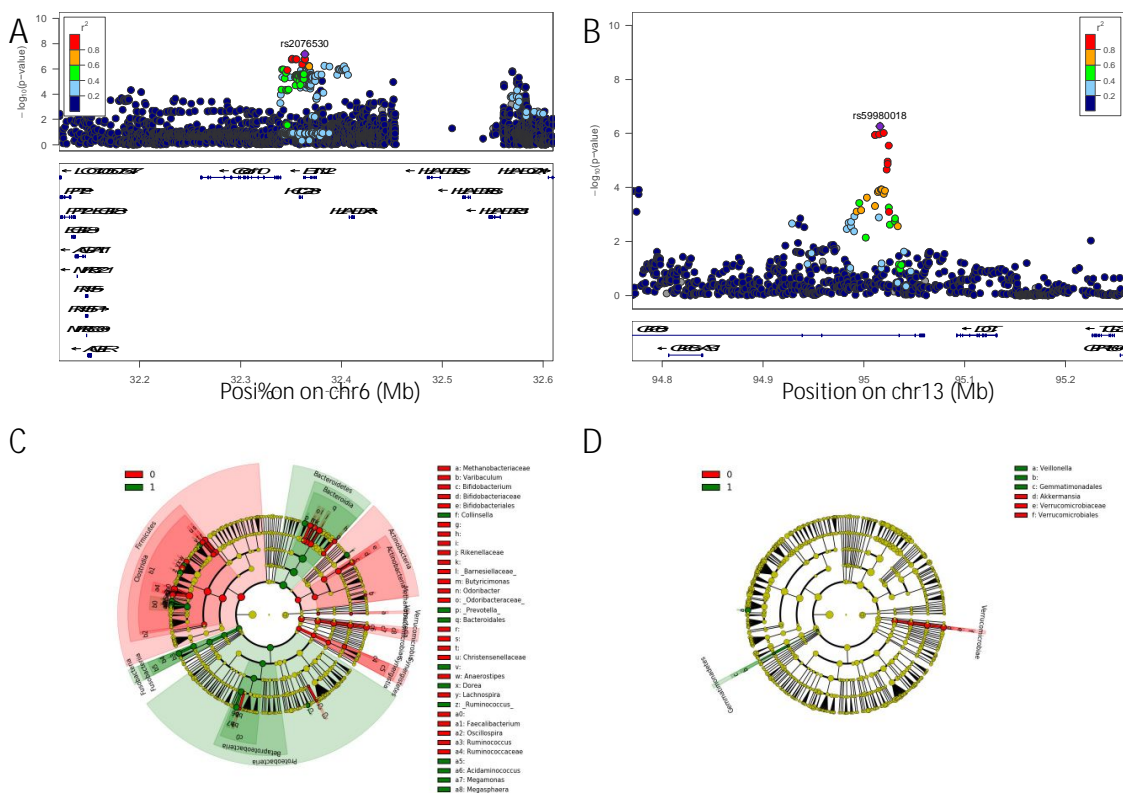


図1. Lean NAFLDのGWAS解析(Chr6, 13のlocus zoom)(A, B)と腸内細菌叢解析(C, D)

Chr6のlead SNPは*Butyrophilin Like 2 (BTLN2)*遺伝子に位置し、*HLAclassI*と*classII*の間の座位である。HLAタイピングの結果、*HLA-B*54:01*アレルがNAFLDリスクアレルであると示唆される結果が得られた。さらに、このアレル保有者は、*mucinase*を産生し糖質吸収改善に働く可能性が示されている*Akkermansia*属を有意に抑制することを明らかにした(図1C,D)。Chr7のlead SNPは、*Contactin Associated Protein Like 2 (CNTNAP2)*遺伝子イントロン14の*MIR548T*コア配列近傍にマップされていた。Chr12のlead SNPは、1.5Mb以上にわたり21遺伝子を載せる巨大な連鎖不平衡ブロックにマップされ、責任遺伝子を同定するのは困難な状況にあった。Chr13のlead SNPは*Glypican 6 (GPC6)*のイントロン6にマップされ、*Dopachrome Tautomerase (DCT)*、*TDP-Glucose 4,6-Dehydratase (TGDS)*、*G Protein-Coupled Receptor 180 (GPR180)*が近傍に存在した[2]

NAFLDの治療は、通常、最大のリスクファクターである肥満に対する体重減少がまず行わ

れ、それに繋がる食事療法と運動療法が推奨されている。また、薬物療法として、インスリン抵抗性が関わる場合にはチアゾリジン誘導体やビッグアナイド剤などが推奨されている。しかし、肥満もインスリン抵抗性もない **lean-NAFLD** の治療は、その必要性を含め検討不十分である。これを受けて本研究では、**lean-NAFLD** の **GWAS** で、見いだした関連遺伝子が関わるパスウェイを同定し、それを遮断あるいは活性化する方法を探索することとした。

2. 研究の目的

本研究では、**lean-NAFLD** の **GWAS** によって示唆された遺伝子座において、生物学的に機能的な遺伝的バリエーションを同定し、**lead SNP** 周辺遺伝子にどのような影響を与えているかを明らかにしたいと考え、この目的のために以下の到達目標を設定した。

Chr6 の **lead SNP** (あるいはそれに強い連鎖不平衡を持つ **SNP**) は、近傍遺伝子、とりわけ **HLAclassI** と **classII** 遺伝子発現量や関連する **HLA** アレルが存在するかどうか、また、**Chr13** の **lead SNP** 近傍 **4** 遺伝子のうちのどの遺伝子に機能的に関連しているかを明らかにする。

その結果、判明した機能的 **SNP** が生物学的に関連する遺伝子産物について、関わるパスウェイを遮断、あるいは活性化する方法を探索する。

3. 研究の方法

13 番染色体の脂肪肝関連 **SNP** の集団遺伝学的関連の検証：**GWAS** によってノミネートされた **lead SNPs** を、自治医科大学附属病院健診センターにおいて収集した **5,649** サンプルと大規模地域ゲノムバンク **21,000** 人のゲノムの中で脂肪肝の有無のデータが付随した **4077** サンプル、合計 **9,726** サンプルを用い、全 **NAFLD** の **case control study** によって検証した。

データベース検索を用いた機能予測と **Chromosome conformation capture assay (3C-assay)**

A) **ENCODE** ならびに **HiC** データベースを用いた **SNP** 関連ゲノム領域の機能予測：染色体 **13** の関連領域の機能予測を **ENCODE** と **HiC database** の検索によって実施した。

B) **13** 番染色体の脂肪肝関連 **SNP** 周辺の連鎖不平衡ブロックと近傍遺伝子プロモーターとの機能的関連の検証：データベースでの機能予測結果を、**Huh-7** と **HEK293** 細胞から調整した **genomic DNA** を用いて **3C-assay** にて検証した。

マウスを用いた検証実験

A) **AAV** ベクターを用いたノックダウンによる機能遺伝子のスクリーニング：**3C-assay** において機能的関連が疑われた **4** 遺伝子をマウスで発現抑制する **shRNA template** を **pAAV-U6-CMV-hrGFP vector** に挿入し、**AAV8** ノックダウンベクターを作成、マウス尾静脈より投与し、機能的に脂肪肝に関連する遺伝子の絞り込みを行った。

B) ノックアウトマウス作成と機能的検証：スクリーニングによって最も機能的関連が疑われた遺伝子を **CRISPR/Cas9** システムを用いて破壊し、肝臓の脂肪蓄積などを評価した。
パスウェイ解析：ワイルドならびにノックアウトマウス肝臓より **RNA** を抽出し、**RNAseq** 解析によってノックアウトによる機能変化に関連する遺伝子群を明らかにし、それを更に、シグナル分子等の活性化をタンパクレベルで検証した。

4. 研究成果

脂肪肝関連 **SNP** の集団遺伝学的関連の検証：**lean-NAFLD** の **GWAS** で見いだした **lead SNP** を **9,726** サンプルを用いて検証した結果、**GPC6** 遺伝子 **Intron 6** は脂肪肝全体とも関連することが明らかになった。

データベース検索を用いた機能予測と **3C-assay**：**ENCODE** データベースによって **GPC6** 遺伝子 **Intron 6** に **H3K27 acetylation** や転写因子の **ChIP mark** が認められ、**3C-assay** では、近傍の **5** 遺伝子 **GPC6**, **GPC6-AS2**, **DCT**, **TGDS**, **GPR180** プロモーターとの機能的関連が明らかになった。

ノックダウンによるスクリーニング：近傍 **5** 遺伝子のうち蛋白をコードする **4** 遺伝子をノックダウンした結果、**Gpr180** 発現低下は肝臓内脂質レベルを有意に低下させることが明らかになった。

ノックアウトマウスの表現型：全身 **Gpr180** ノックアウトマウスは、通常食では差を認めなかったが高脂肪食負荷によって、肝臓脂肪レベルや血清脂質に有意な低下が認められた (図 2 A,B)。

パスウェイ解析：ワイルドならびにノックアウトマウス肝臓の **RNAseq** 解析結果を **GSEA** 解析した結果、**cholesterol homeostasis** といくつかのシグナル伝達経路遺伝子群の発現低下が認められた。これを、リン酸化タンパク抗体を用いて検証した結果、**mTORC1** シグナルの活性低下とともに **SREBP1** 発現低下が認められた (図 2 C)。

AAV ベクターを用いたレスキュー実験：**GPR180** をノックアウトマウスに **AAV** ベクターを用いて **GPR180** の発現を回復させた結果、肝臓脂肪レベルや血清脂質の有意な回復とともに、**mTORC1** シグナルの活性と **SREBP1** 発現の上昇を認めた。

これらの研究結果から、染色体 **13** の脂肪肝関連 **SNP** は、**GPR180** の発現変化の結果である

可能性が示唆された。また、**Gpr180**機能喪失は、高脂肪食による肝臓の脂肪蓄積を有意に抑制することだけでなく、血中脂質レベルも低下させること、そのメカニズムは、肝臓での **mTORC** シグナルの抑制から **SREBP** 活性化と転写抑制、引いては脂質合成の抑制へと繋がることによって生じていることが明らかになり、論文として公表した[3]。最近、**GPR180** は褐色脂肪細胞における **TGF** シグナルを減弱させ **UCP** 発現低下から、エネルギー消費低下から肥満がもたらされることが、別のグループによって報告された[4]。我々の結果とは、一部、異なる結果が示されているが、時間・空間的に遺伝子産物の機能が異なる多面性を明らかにした結果とも考えられた。更に、本研究は、**mTOR** の関わる複雑なシグナル経路のうち **mTORC1** 経路を選択的に調節する新たな分子の提示とも考えられる。選択性の低い **mTORC** 阻害薬 **rapamycin** を補完する、新たな薬剤開発のターゲットとしての可能性が示唆された。

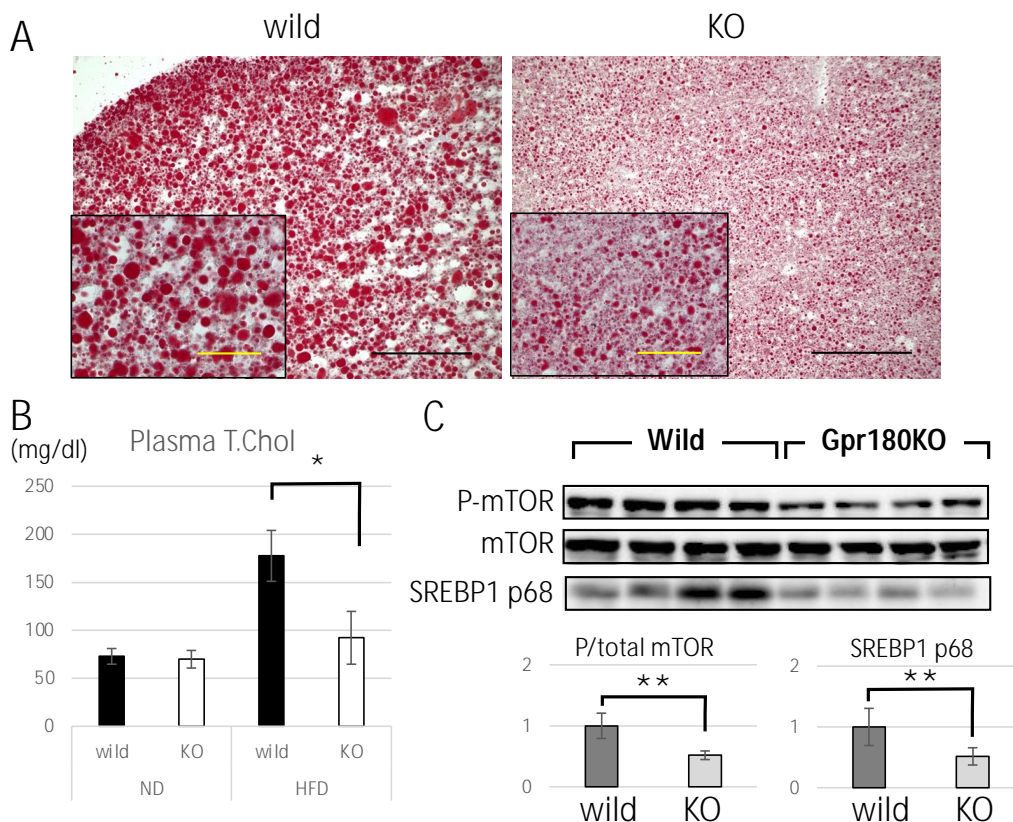


図2 . **GPR180** ノックアウト (**KO**) マウスの表現型解析 . (A) 高脂肪食負荷マウスの肝臓脂肪蓄積 . **KO** マウスでの明らかな脂質蓄積の低下 . (B) 血清コレステロール値 . 高脂肪食負荷 **KO** マウスでの明らかな低下 . (C) 肝臓の **Western blot** 解析 . **KO** マウスでの **mTOR** リン酸化と **SREBP1** 活性化の低下 .

< 引用文献 >

1. Shi Y, Wang Q, Sun Y, Zhao X, Kong Y, Ou X, et al. The Prevalence of Lean/Nonobese Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Gastroenterol.* 2019;00:1.
2. Yoshida K, Yokota K, Kutsuwada Y, Nakayama K, Watanabe K, Matsumoto A, Miyashita H, Khor SS, Tokunaga K, Kawai Y, Nagasaki M, Iwamoto S. Genome-Wide Association Study of Lean Nonalcoholic Fatty Liver Disease Suggests Human Leukocyte Antigen as a Novel Candidate Locus. *Hepatol Commun.* 2020 May 19;4(8):1124-1135.
3. Yoshida K, Yokota K, Watanabe K, Tsuda H, Matsumoto A, Mizukami H, Iwamoto S. Lack of **GPR180** ameliorates hepatic lipid depot via downregulation of **mTORC1** signaling. *Sci Rep.* 2023;13:1843.
4. Balazova L, Balaz M, Horvath A, Horvath A, Moser C, Kovanicova Z, Ghosh A, Ghoshdastider U, Efthymiou V, Kiehlmann E, Sun W, Dong H, Ding L, Amri EZ, Nuutila P, Virtanen KA, Niemi T, Ukropcova B, Ukropec J, Pelczar P, Lamla T, Hamilton B, Neubauer H, Wolfrum C. **GPR180** is a component of **TGF β** signalling that promotes thermogenic adipocyte function and mediates the metabolic effects of the adipocyte-secreted factor **CTHRC1**. *Nat Commun.* 2021 Dec 8;12(1):7144.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Watanabe K, Nakayama K, Ohta S, Matsumoto A, Tsuda H, Iwamoto S.	4. 巻 11
2. 論文標題 ILDR2 stabilization is regulated by its interaction with GRP78.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 8414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-87884-7.	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 -
1. 著者名 Takahashi M, Ozaki N, Nagashima S, Wakabayashi T, Iwamoto S, Ishibashi S.	4. 巻 15
2. 論文標題 Normal plasma apoB48 despite the virtual absence of apoB100 in a compound heterozygote with novel mutations in the MTTP gene.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Lipidol.	6. 最初と最後の頁 569-573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacl.2021.04.013.	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 -
1. 著者名 Watanabe K, Matsumoto A, Tsuda H, Iwamoto S.	4. 巻 12
2. 論文標題 N4BP2L1 interacts with dynactin and contributes to GLUT4 trafficking and glucose uptake in adipocytes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 1958-1966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13623.	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 -
1. 著者名 Kutsuwada Y, Yokota K, Yoshida K, Tsuda H, Watanabe K, Matsumoto A, Iwamoto S.	4. 巻 105
2. 論文標題 Association of HLA-DPB1, NLRP10, OVOL1, and ABCC11 with the axillary microbiome in a Japanese population.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci.	6. 最初と最後の頁 98-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2022.01.003.	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 -

1. 著者名 Yoshida K, Yokota K, Kutsuwada Y, Nakayama K, Watanabe K, Matsumoto A, Miyashita H, Khor SS, Tokunaga K, Kawai Y, Nagasaki M, Iwamoto S.	4. 巻 19
2. 論文標題 Genome-Wide Association Study of Lean Nonalcoholic Fatty Liver Disease Suggests Human Leukocyte Antigen as a Novel Candidate Locus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatol Commun.	6. 最初と最後の頁 1124-1135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1529. eCollection 2020 Aug.	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 -

1. 著者名 Yoshida K, Yokota K, Watanabe K, Tsuda H, Matsumoto A, Mizukami H, Iwamoto S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Lack of GPR180 ameliorates hepatic lipid depot via downregulation of mTORC1 signaling.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29135-5.	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 -

1. 著者名 Watanabe K, Matsumoto A, Tsuda H, Iwamoto S.	4. 巻 12
2. 論文標題 KBTBD11, encoding a novel PPAR target gene, is involved in NFATc1 proteolysis by interacting with HSC70 and HSP60.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 20273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24929-5	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 -

1. 著者名 Matsumoto A, Tsuda H, Furui S, Kawada-Nagashima M, Anzai T, Seki M, Watanabe K, Muramatsu K, Osaka H, Iwamoto S, Nishino I, Yamagata T.	4. 巻 10
2. 論文標題 A case of congenital fiber-type disproportion syndrome presenting dilated cardiomyopathy with ACTA1 mutation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Genet Genomic Med.	6. 最初と最後の頁 e2008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mgg3.2008. Epub 2022 Jun 27.	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 -

1. 著者名 Inaba Y, Iwamoto S, Nakayama K.	4. 巻 41
2. 論文標題 Genome-wide DNA methylation status of Mongolians exhibits signs of cellular stress response related to their nomadic lifestyle.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Physiol Anthropol.	6. 最初と最後の頁 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40101-022-00305-0	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 -

1. 著者名 Niwa S, Kawabata T, Shoji K, Ogata H, Kagawa Y, Nakayama K, Yanagisawa Y, Iwamoto S, Tatsuta N, Asato K, Arima T, Yaegashi N, Nakai K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Investigation of Maternal Diet and FADS1 Polymorphism Associated with Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Compositions in Human Milk.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrients.	6. 最初と最後の頁 2160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu14102160.	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 1件)

1. 発表者名 岩本禎彦
2. 発表標題 ジャボニカアレイを用いた非アルコール性脂肪性肝疾患関連遺伝要因の探索
3. 学会等名 日本人類遺伝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuha Yokota, Ken Yoshida, Kazuhisa Watanabe, Ayumi Matsumoto, Sadahiko Iwamoto.
2. 発表標題 TRIB1 KNOCKOUT IN PANCREATIC -CELLS DOWNREGULATED THE HYPERGLYCEMIA INDUCED CELL PROLIFERATION.
3. 学会等名 International Web Symposium/ Pseudokinases and Tribbles-from Molecules to Therapy. (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------