

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591325

研究課題名（和文） 脂質代謝を規定する遺伝子探求：小児期疾患と成人期コーホートの体系的スクリーニング

研究課題名（英文） Systematic screening for the genes regulating lipid metabolism: cohorts of childhood and adulthood

研究代表者

井原 健二 (IHARA KENJI)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：80294932

研究成果の概要（和文）：我々は成長ホルモン分泌不全性低身長（GHD）患児において、JAK-STAT 経路の分子群、特に STAT5A/B 遺伝子多型と血清総コレステロール値との相関を統計的に解析した。NICB に登録されている STAT5A/B 遺伝子の SNP より HapMap プロジェクトのホームページ上で 5 カ所の tag SNP (STAT5A g. 4992C>A, g. 18132A>G, STAT5B g. -41175A>G, g. -9945C>T, g. 8164G>T) を選択し TaqMan 法にて各 SNP の遺伝子型を決定した。その結果、GHD 患児においては GH 治療前・開始後の血清総コレステロール値と各々の遺伝子多型とに有意な相関 ($p < 0.05$) を認めた。一方、一般成人集団においても部分的には同様の傾向を認めたが有意差は証明されなかった。次に STAT5 遺伝子のプロモーター領域に存在する遺伝子多型の転写能に影響を及ぼす可能性を推定し、ルシフェラーゼレポーターアッセイによる機能解析を行った。pGL4.10 ベクターに STAT5B 遺伝子の上流約 2Kb のプロモーター領域をクローニングし、同部位に存在する唯一の SNP である rs4029774(-44816T>C) の T 多型（野生型）もしくは C 多型を持つ 2 種類のベクターを作成した。各ベクターを各種細胞株にトランスフェクションしルシフェラーゼアッセイで発現量を比較した結果、各ベクターの遺伝子発現量に有意な差を認めた。次にコンピューターソフトを用いこの多型を含む領域に結合する可能性の転写因子を検索すると、-44816A では 9 種類の転写因子が選択されるのに対して、-44816G では 1 種類のみであった。以上より -44816A/G 多型による STAT5B 遺伝子の発現の違いが STAT5B 分子ならびにその下流の遺伝子の発現量に影響を及ぼし、さらにこれらの遺伝子産物が直接的または間接的に LDL 受容体やコレステロール合成酵素、PPAR- γ 等の脂肪細胞分化に影響する転写因子群の発現に影響を与えると推定された。以上の結果より STAT5B 遺伝子のプロモーター領域に存在する多型が遺伝子機能に関与しており、小児 GHD 児における血清コレステロール値を規定する遺伝的背景因子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

BACKGROUND AND AIMS:

GH plays a significant role in the lipid metabolism. In this study, we focused on the JAK2 - signal transducer and activator of the transcription 5 (STAT5) pathway, which transmit the signals from the GH receptor, and selected the *STAT5A/B* gene as a candidate for the regulation of lipid metabolism in GH deficiency (GHD).

DESIGN AND PARTICIPANTS:

The study population comprised 83 children with idiopathic GHD. The serum total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and the non-HDL cholesterol (non-HDL-C) levels were monitored before and at 3, 6, 9 and 12 months after starting GH treatment. The height, weight, body mass index, and serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) level were also measured before and 12 months after starting the GH treatment. For the genetic analysis of the *STAT5A/B* gene, five tag SNPs were selected using the tag SNP picker programme on the homepage of the HapMap project. The evaluation of promoter activity of the -44816A/G SNP in the *STAT5B* gene was performed by a luciferase assay *in vitro*.

RESULTS:

The TC and non-HDL-C levels were gradually decreased during the GH treatment. Five tag SNPs (rs4029774, rs6503691, rs9900213, rs16967637 and rs2272087) were picked up for the *STAT5A/B* gene, and the genetic study demonstrated that the paediatric GHD patients who were heterozygotes or homozygotes of minor alleles of the analysed SNPs in the same block of the *STAT5B* gene showed significantly higher serum TC or non-HDL-C levels both before and after GH treatment for 12 months. Most of the SNPs also demonstrated significant differences among genotypes in the decreases in serum TC or non-HDL-C levels during the 12 months of GH treatment. A luciferase assay showed that the -44816A/G SNP (rs4029774) in the *STAT5B* gene functionally affected the expression level *in vitro*.

CONCLUSION:

These results indicate that *STAT5B* may therefore play a role in regulating the cholesterol metabolism in children with GHD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：脂質代謝、遺伝子多型、成長ホルモン、内分泌

1. 研究開始当初の背景

成長ホルモン（GH）分泌不全症患者は健常人に比較し体脂肪率が高く、GH治療によって低下するとともに血中脂質も低下することから、患者の将来的な動脈硬化などの生活習慣病の予防のために適正なGH治療を続けることの重要性が指摘されている。私たちの研究室ではGH治療による体組成ならびに血清脂質の変化を、様々な臨床検査データとともに詳細に解析し報告してきた(Kohno H et al, J Pediatr 1995; Kuromaru R et al, J Clin Endocrinol Metab 1998; Kuromaru R et al, Clin Endocrinol 2002)。またGHの治療効果の個人差に、遺伝因子が関与していることが推定されていたが、最近我々は、成長ホルモンによる血中脂質代謝の変化に関する遺伝的背景因子の研究を行い、GH受容体遺伝子 Leu544Ile 多型が成長ホルモンによる血中コレステロール値を規定する遺伝的背景因子であることを明らかにした(Ihara K, et al, Clin Endocrinol 2007)。

2. 研究の目的

GH受容体以降のシグナル伝達にかかわるさ

まざまな因子が、その治療反応の多様性を規定している可能性が推定される。そこで、GH受容体以降のシグナル伝達経路の中で主経路である JAK-STAT 経路に着目し、JAK-STAT 経路ならびに、その抑制分子の SOCS・CIS 分子を構成する遺伝子群に関して、GH治療前から治療経過中の臨床パラメーターの変化（身長、体重、体脂肪率、血清脂質濃度ならびに IGF-1 などのホルモン値、およびそれらの変化率）との相関を検討する。そして見出された結果に関して、小児のGH治療による反応性の予測という臨床的な意義のみならず、より普遍的な脂質代謝を規定する遺伝的背景因子を明らかにする目的で、福岡県久山町の一般成人集団とした解析を行う。明らかになった遺伝子に関して、遺伝子多型と連鎖不平衡にある、真の原因の機能 SNP の存在に関しても特定を目指す。

3. 研究の方法

(1) GH治療による臨床パラメーターの変化

GH分泌不全性低身長症にて精査ならびに加療を受けた患者について、GH治療前・治療開始後3ヶ月毎の1年間の身長SD値、血清

脂質(総コレステロール、HDL コレステロール)、IGF-1 値および体脂肪率の値を収集整理し統計学的に検討した。

(2) JAK-STAT 経路を構成する遺伝子群の遺伝子多型解析

GH が GH 受容体に結合した以降の細胞内シグナル伝達に関与する遺伝子を選択しそれら遺伝子の遺伝子多型について GH 治療による脂質変化に関して検討した。特に JAK-STAT 経路の分子群とその抑制分子の SOCS ならびに CIS 分子ファミリーの遺伝子群に関して、J-SNP として登録されている遺伝子多型の中から、各々の遺伝子のハプロタイプを構成するための tag SNPs を SNP browser software 3.5 を用いて選択後、TaqMan 法にて各 SNP の遺伝子型を決定した。

(3) 久山町の成人データを用いた脂質関連の遺伝子多型の解析

GH 分泌不全性低身長症において明らかとなった遺伝子多型について、久山町の成人(コーホート研究登録者)に関して遺伝子多型の同定と臨床パラメーターとの統合を行った。

(4) 真の機能的遺伝子多型の探求

小児 GH 分泌不全性低身長症患者において意義の認められた遺伝子多型に関してこれら SNP と連鎖不平衡にあり近傍に位置する、真の原因の機能 SNP の存在に関して特定を目指し検討した。Hapmap_JPT+CHB のデータを基にさらに近傍の多型を含めて網羅的に解析を行った。

(5) 遺伝子多型の機能解析

機能的遺伝子多型の候補について遺伝子転写能の違いを培養細胞株を用いた *in vitro* の実験により明らかにした。

4. 研究成果

(1) STAT5 遺伝子多型と GH 治療反応性の関連解析

GH は GH 受容体から JAK-STAT 経路を介してシグナルが伝達される。その中でも JAK2-STAT5 を介した経路が重要であることから、STAT5 遺伝子が GHD における GH 治療反応性に関与する遺伝子であるかどうかを検討した。GH 不全性低身長患児において、STAT5A/B 遺伝子多型と血清総コレステロール値との相関を統計学的に解析した。NICB に登録されている STAT5A/B 遺伝子の SNP より HapMap プロジェクトのホームページ上で 5 カ所の tag SNP (STAT5A g.4992C>A, g.18132A > G, STAT5B g.-41175A > G, g.-9945C>T, g.8164G>T) を選択し TaqMan 法にて各 SNP の遺伝子型を決定した。その

結果、GH 不全性低身長患児においては GH 治療前・開始後の血清総コレステロール値と各々の遺伝子多型とに有意な相関 ($p < 0.05$) を認めた。

(2) SOCS2, CIS 遺伝子多型と GH 治療反応性の関連解析

SOCS/CIS ファミリーは GH-GHR 系の抑制的制御に関与する分子群であり、中でも SOCS2, CIS は GHR をユビキチン化して分解を促進することにより GH の働きを抑制する。これらの遺伝子の多型が成長や GH 感受性に影響を及ぼす可能性がある。まず HapMap にて SOCS2, CIS 遺伝子を検索したところ、SOCS2 および CIS 遺伝子はそれぞれ大きな 1 つの LD ブロックを形成していた。次に各遺伝子の tag SNP を検索し日本人において高い minor allele 頻度を持つ SNP を SOCS2 上と CIS 上より各 1 箇所、計 2 箇所の SNP を選択した。治療前の height SDS を genotype 毎に分類し 3 群を比較したが、有意な差は認められなかった。またいずれの SNP おいても身長 SD 値の有意な差は見られなかった。脂質と多型に関して、初診時の総コレステロール値、3, 6, 9, 12 ヶ月後のコレステロール値の変化も各アリルに分けて解析を行ったが有意差を認めなかった。以上より SOCS2 および CIS は GH 治療感受性および脂質代謝に関与する可能性は低いと考えられた。

(3) 成人集団における解析

久山町住民の 3290 名に対して STAT5A 及び STAT5B の rs2272087, rs6503691, rs9900213 の SNP 解析を行った。久山町の成人集団において、性・年齢調整コレステロール値または男女別の年齢調整コレステロール値を各遺伝子型別に検討したが、遺伝子型の群間、遺伝子型別のトレンド検定ともに有意な結果が得られなかった。したがって今回解析した成人集団においては STAT5A 及び STAT5B の 3 箇所の SNP はコレステロール値に関連しないと結論された。

(4) STAT5 遺伝子多型の機能解析

STAT5 遺伝子のプロモーター領域に存在する遺伝子多型の転写能に影響を及ぼす可能性を推定し、ルシフェラーゼレポーターアッセイによる機能解析を行った。pGL4.10 ベクターに STAT5B 遺伝子の上流約 2Kb のプロモーター領域をクローニングし、同部位に存在する唯一の SNP である rs4029774(-44816T>C) の T 多型(野生型)もしくは C 多型を持つ 2 種類のベクターを作成した。各ベクターを各種細胞株(HeLa 細胞、HEK293 細胞、U937、HepG2) にトランスフェクションしルシフェラーゼアッセイで発現量を比較した。各ベク

ターの遺伝子発現量に有意な差 (p=0.021~0.043) を認めた。

(5) STAT5B 遺伝子多型の転写因子結合部位の推定

STAT5B 遺伝子の発現に重要であるプロモーター領域に存在する SNP 部位を含む部位に結合する転写因子を TFSEARCH データベース (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH>) を用いて SNP(rs4029774) を含む領域に結合する可能性のある 75 以上のスコアを持つ転写因子を検索すると、-44816A では 9 種類の転写因子が選択されるのに対して、-44816G では 1 種類のみであった。この結果、T 多型では多くの転写因子の結合部位となる可能性が示されたが、C 多型では転写因子の結合能が低く、STAT5B の発現量に違いを生ずる可能性が推定された。

(6) 結果と考察

GH 作用には IGF-1 を介する作用のほかに GH の直接作用もあると考えられている。今回我々の実験で、STAT5B 遺伝子プロモーター領域に存在する SNP 部位の塩基の違いによって遺伝子発現に有意な差を認めた。STAT5B 遺伝子のプロモーター領域に存在する多型が遺伝子機能に関与しており、小児 GH 不全性低身長症児における血清コレステロール値を規定する遺伝的背景因子であることが示唆された。一般成人集団では同様の傾向を部分的に認めたが、明らかな有意差を認めなかった。GH 不全性低身長症児と一般成人集団で結果に差を認めた要因としては、GH 分泌不全では脂質代謝効率が低下し総コレステロール値が高値となることから、遺伝的背景因子が顕在化した可能性が推定された。

今後、このような遺伝的背景因子の検討は、高コレステロール血症のリスクの予知や、予防・治療法の選択などの臨床応用に向けた展開に発展する可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Sugihara S, Ihara K, 他 37 名:
HLA-Class II and Class I Genotypes among Japanese Children with Type 1A Diabetes and Their Families. *Pediatr Diabetes* 13(1):33-44, 2012.
10.1111/j.1399-5448.2011.00833.x.
- ② Hikino S, Ohga S T, Kinjo T, Kusuda T, Ochiai M, Inoue H, Honjo S, Ihara K,

Ohshima K, Hara T: Tracheal aspirate gene expression of preterm newborns developing bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Int.* 54(2):208-14, 2012. doi: 10.1111/j.1442-200X.2011.03510.x

- ③ Yamamura K, Ihara K, Ikeda K, Nagata H, Mizuno Y, Hara T: Histo-blood group gene polymorphisms as potential genetic modifiers of the development of coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease. *Int J Immunogenet* 39(2):119-25, 2012.
10.1111/j.1744-313X.2011.01065.x.
- ④ Makimura M, Ihara K, Kojima-Ishii K, Nozaki T, Ohkubo K, Kohno H, Kishimoto J, Hara T: The signal transducer and activator of transcription 5B gene polymorphism contributes to the cholesterol metabolism in Japanese children with growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol.* 74(5):611-7, 2011.
10.1111/j.1365-2265.2011.03980.x.
- ⑤ Kinjo T, Ohga S, Ochiai M, Honjo S, Tanaka T, Takahata Y, Ihara K, Hara T: Serum chemokine levels and developmental outcome in preterm infants. *Early Hum Dev* 87(6):439-43, 2011
- ⑥ Niihori T, Ihara K, 他 22 名 HRAS mutants identified in Costello syndrome patients can induce cellular senescence:possible implications for the pathogenesis of Costello syndrome. *Hum Genet* 56(10):707-15, 2011.
10.1038/jhg.2011.85.
- ⑦ Ihara K, Abe K, Hayakawa K, Makimura M, Kojima-Ishii K, Hara T: Biotin deficiency in a glycogen storage disease type 1b girl fed only with GSD formula. *Pediatr Dermatol.* 28(3):339-41, 2011.
10.1111/j.1525-1470.2011.01238.x.
- ⑧ Kusuda T, Hikino S, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Tokunaga S, Ihara K, Hata Y, Hara T: Genetic contribution of vascular endothelial growth factor pathway to the severity of retinopathy of prematurity. *J Perinatol.* 31(4):246-50, 2011.
- ⑨ Numata S, Koda Y, Ihara K, Sawada T, Okano Y, Matsuura T, Endo F, Yoo HW,

Arranz JA, Rubio V, Wermuth B, Ah Mew N, Tuchman M, Pinner JR, Kirk EP, Yoshino M: Mutant alleles associated with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in male patients have recurrently arisen and have been retained in some populations. *J Hum Genet.* 55:18-22, 2010.

- ⑩ Ishizaki Y, Yukaya N, Kusuhara K, Kira R, Torisu H, Ihara K, Sakai Y, Sanefuji M, Pipo-Deveza JR, Silao CL, Sanchez BC, Lukban MB, Salonga AM, Hara T: PD1 as a common candidate susceptibility gene of subacute sclerosing panencephalitis. *Hum Genet.* 127(4):411-9, 2010.
- ⑪ Numata S, Koda Y, Ihara K, Sawada T, Okano Y, Matsuura T, Endo F, Yoo HW, Arranz JA, Rubio V, Wermuth B, Ah Mew N, Tuchman M, Pinner JR, Kirk EP, Yoshino M: Mutant alleles associated with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in male patients have recurrently arisen and have been retained in some populations. *J Hum Genet.* 55:18-22, 2010.
- ⑫ Inuo M, Ihara K, Matsuo T, Kohno H, Hara T: Association study between B- and T-lymphocyte attenuator gene and type 1 diabetes mellitus or systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Int J Immunogenet.* 36(1):65-8, 2009.
- ⑬ Inuo M, Ihara K, Matsuo T, Kohno H, Hara T: Association study between B- and T-lymphocyte attenuator gene and type 1 diabetes mellitus or systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Int J Immunogenet.* 36(1):65-8, 2009.
- ⑭ Yamaguchi K, Ikeda K, Ihara K, Takada H, Kusuhara K, Hara T: Lack of association between E148Q MEFV variant and Kawasaki disease. *Hum Immunol.* 70(6):468-71, 2009.

[学会発表] (計 16 件)

- ① Ihara K, Makimura M, Kohno H, Hara T. Growth hormone receptor and STAT5B genes contribute to lipid metabolism in the children with growth hormone deficiency. The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research. April

30-May 3, 2011, Denver, USA.

- ② Yamamura K, Ihara K, Nagata H, Ikeda K, Hara T: Histo-blood group gene polymorphisms as potential genetic modifiers of the development of coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease. The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research. April 30-May 3, 2011. Denver, USA.
- ③ 井原健二、牧村美佳、石井加奈子、大久保一宏、野崎高史、原寿郎、河野斉. 成長ホルモン分泌不全における脂質代謝に関与する遺伝的背景因子の解析: GH受容体遺伝子とシグナル伝達経路を中心に. 第114回日本小児科学会, 2011. 8. 12-14, 東京.
- ④ 石井加奈子、井原健二、牧村美佳、野崎高史、大久保一宏、原 寿. SGA性低身長に対するGH治療による代謝内分泌学的影響の検討. 第114回日本小児科学会. 2011. 8. 12-14, 東京.
- ⑤ Ihara K, et al. Biotin deficiency in a glycogen storage disease type 1b girl fed only with glycogen storage disease-related formula. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. March 7-10, 2010, Fukuoka.
- ⑥ Ihara K. Recent advances in genetic susceptibility to type 1 diabetes in children. International Symposium on Pediatric Endocrinology: Official Satellite Symposium of The 14th International Congress of Endocrinology. March 31st - April 1st, 2010, Tokyo.
- ⑦ Makimura M, Ihara K et al. STAT5B gene polymorphisms contribute to the serum total cholesterol levels in Japanese children with growth hormone deficiency. The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research. April 15-18, 2010, Taipei, Taiwan.
- ⑧ Ihara K, et al. Biotin deficiency in a glycogen storage disease type 1b girl fed only with glycogen storage disease-related formula. The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research, April 15-18, 2010, Taipei, Taiwan.
- ⑨ Ihara K. Growth hormone receptor and STAT5B genes contribute to lipid

metabolism in the children with growth hormone deficiency. The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial and Medicine. December 15-18, 2010, Fukuoka.

- ⑩ 牧村美佳、井原健二ほか7名。
JAK2-STAT5 経路にかかわる遺伝子群は日本人小児GHD児における血清コレステロール値を規定する遺伝的背景因子である。第113回日本小児科学会。2010.4.23-25, 盛岡。
- ⑪ 牧村美佳、井原健二ほか6名。ATF6 遺伝子 Met67Val 多型は小児 GHD 患児の non HDL コレステロール値に関与する。第44回日本小児内分泌学会学術集会 2010.10.7-9, 大阪。
- ⑫ 石井加奈子、井原健二ほか6名。SGA 性低身長に対する GH 治療による代謝内分泌学的影響の検討。第44回日本小児内分泌学会学術集会。2010.10.7-9, 大阪。
- ⑬ 牧村美佳、井原健二ほか7名。
JAK2-STAT5 経路にかかわる遺伝子群は日本人小児GHD児における血清コレステロール値を規定する遺伝的背景因子である。第43回日本小児内分泌学会。2009年10月1-3日, 宇都宮。
- ⑭ 井原健二。成長ホルモン治療反応性を規定する遺伝子の探求～脂質代謝系を中心に。第23回日本脂質代謝研究会, 2009年12月4-5日, 福岡。
- ⑮ 井原健二ほか4名。新生児期ガラクトース血症で発見される先天性シトリン欠損症と先天性門脈大循環短絡症の血漿アミノ酸の比較。第51回日本先天代謝異常学会。2009年11月5-7日, 東京。
- ⑯ 牧村美佳、井原健二ほか5名。
JAK2-STAT5 経路にかかわる遺伝子群は日本人小児GHD児における血清コレステロール値を規定する遺伝的背景因子である。第23回日本小児脂質研究会。2009年12月4-5日, 福岡。

〔図書〕(計3件)

- ① 井原健二。Cushing 症候群。今日の小児治療指針 第15版(分担)、医学書院, 2012
- ② 井原健二。糖原病。小児科診療ガイド(分担)、中山書院, 2012。
- ③ 井原健二。乳幼児の栄養に関する介入は、将来の2型糖尿病に対するリスクを軽減するか。EBM 小児疾患の治療 2011-2012(分担), 中外医学社, 2011。

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)
- 〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井原 健二 (IHARA KENJI)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号: 80294932

(2) 研究分担者

石井 加奈子 (ISHII KANAKO)
九州大学・大学病院・特任講師
研究者番号: 90400332

(3) 連携研究者

なし