

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 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：63801
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22500395
 研究課題名(和文) マウス亜種間コンソミック系統パネルを利用した褐色脂肪組織の活性調節機構の解明
 研究課題名(英文) Genetic dissection of brown adipose tissue function using mouse inter-subspecific consomic strains

 研究代表者
 高田豊行(TAKADA TOYOYUKI)
 国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教
 研究者番号：20356257

研究成果の概要(和文)：マウス C57BL/6J(B6)-MSM/Ms(MSM) 系統間の染色体置換により樹立した亜種間コンソミック系統および両親系統を対象にして、高脂肪食付加による褐色脂肪組織の白色脂肪化抵抗性などのデータ収集をおこなった。高脂肪食付加で顕著に体重が増加する系統、あるいは抗肥満を示す系統を見出した。10 週齢時の個体の褐色脂肪の RNA を採取し、これを遺伝子発現に使用した。褐色脂肪組織の蓄積量が増加するコンソミック系統 1 種について、遺伝的背景となっている B6 系統との連鎖解析、サブコンソミック系統の表現型を解析した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I intend to uncover the genetic determinants that control the age-associated changes of energy metabolism-associated brown adipose tissue function by functional genomics with mouse inter-subspecific consomic strains. Using B6-ChrNMSM consomic strain panel and B6-ChrNMSM-derived congenic strains, I conducted systematic phenotype screening of energy metabolism related physiological traits by developing measurements for new parameters of the energy metabolism-related phenotypes such as fat deposition. Currently, I am exploring causative genome difference responsible for high calorie diet-dependent fat-deposition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：マウス、コンソミック系統、褐色脂肪、エネルギー代謝、遺伝子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

我が国では、20 才以上の男性で 30%以上、女性では 20～30%が肥満であるとの調査がある(平成 19 年 国民健康・栄養調査結果の概要について(厚生労働省))。特に、中年以降 40～74 歳でみると、男性の 2 人に 1 人、

女性の 5 人に 1 人が、糖尿病などの基盤となる「メタボリックシンドローム」が強く疑われる者又はその予備群と考えられている。世界的に見ても肥満は増加傾向にあり(OECD Health Data 2009, <http://www.oecd.org/>)、例えば、米国疾病対策センター(CDC)が発

表した 2000 年の全米中の死亡原因は、肥満を意味する「不適切な食生活と運動不足」によるものが 40 万人と全死亡者の 17%を占め、タバコによる死者 (18%) を追い越す勢いであると報告している (Mokdad et al., JAMA 291:1238, 2004)。肥満はこのように生活の質を低下させるのみならず、医療費増大という側面からみても現代医学における深刻な社会問題になっている。肥満の原因は、エネルギー摂取と消費の調節機構の破綻による過剰な脂肪の蓄積にある。脂肪には白色脂肪と褐色脂肪があり、白色脂肪は細胞内に中性脂肪をため込み、主にエネルギーの貯蔵や生物体の物理的保護などの機能を持つほか、最近では各種ホルモンの産生場所としても重要である。一方、褐色脂肪には熱を産生しエネルギー消費量の調節に関与するという非常に重要な役割があるにもかかわらず、げっ歯類とヒト新生児以外では存在せず、したがって、生理的機能も有しないとこれまで考えられてきた。2009 年によくヒト成人についてもその存在が科学的に証明された (Farmer S. R., Nature 458: 839, 2009)。今後は、ヒト成人における肥満の予防に褐色脂肪細胞の活性化が注目されるようになり、モデル動物による褐色脂肪細胞活性化機構の解明がヒト肥満の理解やその治療法開発にブレイクスルーをもたらすと期待される。本研究の申請者は、城石 (国立遺伝学研究所)・米川 ((都) 臨床医学総合研究所)らが C57BL/6 (B6) と MSM/Ms 系統により樹立したマウス亜種間コンソミック系統群の大規模表現型解析を行い、脂肪組織の蓄積量が、複数の染色体にまたがる多数の遺伝子により制御され、さらに脂肪蓄積には、これまでの「皮下・内臓」という大まかな分類では説明できない、より深部の脂肪組織が存在することを明らかにした (Takada et al., Genome Res., 18: 500, 2008)。興味深いことに、これらのデータは、脂肪蓄積量のみならず、熱産生とエネルギー出納に深く関与する褐色脂肪組織の活性化状態も解析できることを示唆した。すなわち、褐色脂肪蓄積量が少ないにもかかわらず、内臓脂肪蓄積も少ない系統 (染色体 13 番テロメア側置換)、逆にその量が多いにもかかわらず内臓脂肪蓄積 (特に腎臓周囲) も多い系統 (染色体 9 番置換) 等が存在し、これらは褐色脂肪組織の機能差によるエネルギー出納の系統間多様性を反映しているものと考えられた。さらに、同一週令の B6、MSM/Ms およびコンソミック系統の褐色脂肪組織の組織学的解析を行ったところ、明らかな褐色脂肪の組織像の系統間差を見出したこの結果は、褐色脂肪組織の量だけではなく活性化を制御する遺伝子因子も複数の染色体にまたがって存在することを明示している。そこで、コントロールした環境下でコ

ンソミック系統に由来するサブコンソミック、コンジェニック系統の褐色脂肪組織の活性についての表現型解析を行い、関連遺伝子群を体系的にゲノム上にマップできると考えた。さらに B6 や MSM/Ms 系統のゲノム情報を利用した高精度連鎖解析や MSM ゲノムの BAC トランスジェネシス等により当該遺伝子群をクローニングする実験の着想に至った。本研究により、褐色脂肪組織のエネルギー出納に関連したゲノム機能の全体像を解明できれば、エネルギーの摂取と消費の調節機構の破綻が原因となる肥満や「メタボリックシンドローム」の病因の本質を理解するために貢献できると考えた。

2. 研究の目的

マウス亜種間コンソミック (染色体置換) 系統やサブコンソミック、コンジェニック系統を対象に、成体における褐色脂肪組織の活性を熱産生・脂肪蓄積などエネルギー代謝の量的形質として計測し、関連形質を制御する遺伝子群を染色体上にマップする。ゲノム多型情報を活用した連鎖解析や BAC トランスジェネシスによる表現型模倣を指標に当該遺伝子群をクローニングし、それらの相互作用を遺伝子ネットワークとして明らかにする。以下に記載する項目を具体的な目的とした。

(1) 褐色脂肪組織の活性検出に適した制御環境下で表現型解析を行う。コンソミック系統の遺伝的背景である B6 系統と差違のある系統について、サブコンソミック・コンジェニック系統作製、B6 系統との連鎖解析等により、関連する量的形質遺伝子群のファインマッピングを実施する。

(2) 褐色脂肪組織を材料に、全ゲノムを対象とした遺伝子発現解析を行う。遺伝子発現動態は B6 と MSM のゲノム情報を利用して統計学的手法に基づき解析し、その活性化に連動して発現が変動する遺伝子群を検出する。

(3) (1) と (2) の実験で検出した候補遺伝子について、BAC トランスジェネシスによる表現型再現により原因遺伝子であることを検証する。さらに、関連遺伝子のノックアウトマウス作製と表現型解析を行う。

(4) 褐色脂肪組織の活性化を制御する遺伝子群の相互作用 (因果関係) について、グラフィカルモデリング等の多変量解析方法により描出し、遺伝制御の全体像をシステムとして理解する。

一連の解析より、本研究で対象としている B6-MSM コンソミック系統は、遺伝的距離の大きな系統間で染色体置換を行っており、他のコンソミック系統と比較して表現型多型や遺伝子多型の検出感度に優れている。この理由により、本研究の成果として、全く新規のエネルギー代謝関連遺伝子群を同定できる可能性がある。本研究により、マウス成体の

熱産生やエネルギー出納にかかわる褐色脂肪組織の活性制御の遺伝システムを理解することができれば、肥満やメタボリックシンドロームなどで問題となっている、リスク体質というものの本質的理解に到達できると期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、B6-MSM/Ms 系統間の染色体置換により樹立したマウス亜種間コンソミック系統を利用して、熱産生やエネルギー出納の制御に働く褐色脂肪組織の活性化に関与する遺伝子群を体系的に探索する。マウス亜種間のゲノム多型情報をフル活用した高精度連鎖解析やBACトランスジェネシスにより関連遺伝子群をクローニングする。最終的には、哺乳動物のエネルギー出納器官としての褐色脂肪組織の活性調節機構の分子基盤を解明する。

4. 研究成果

研究代表者らは、これまでの研究において、B6、MSM およびコンソミック系統の代謝関連形質として、脂肪蓄積、血中の臨床生化学パラメータ（コレステロール、中性脂肪、各種酵素など）についてデータを収集している。また、エネルギー代謝関連形質において重要な脂肪蓄積に関する詳細な表現型解析を実施し B6 系統と顕著な違いを示すコンソミック系統を見出している。さらに、いくつかの系統については、糖負荷試験も実施している。本研究課題実施期間に行った研究により以下の結果を得た。

(1) 褐色脂肪組織の活性検出に適した制御環境下で表現型解析について。

研究代表者らは、これまでの研究結果を活用して、B6 と比較した際に顕著な抗肥満を示す染色体 11 番および脂肪蓄積増加を示す染色体 13 番における連鎖解析を行った。染色体 11 番に関しては、B6 系統とのクロスで作製した 80 匹以上の F2 オス個体に高脂肪餌（507.6kcal/100g、脂肪分 32.0%）を与えて連鎖解析を行い、セントロメアから約 40Mb 付近に高いロッドスコアのピークを得た。現在、この領域を含む複数のコンジュニック系統を作製している。染色体 13 番に関しては、B6 系統とのクロスで作製した 120 匹以上の F2 オス個体に高脂肪餌を与えて連鎖解析を行い、セントロメアから約 110Mb 付近に高いロッドスコアのピークを得た。この領域を含む複数のコンジュニック系統を作製し、責任領域を 2Mb まで狭めることができた。現在、複数の BAC クローンによるトランスジェネシスによる検証を行っている。

(2) 褐色脂肪組織を材料にした、全ゲノム

を対象とした遺伝子発現解析について。

褐色脂肪組織の遺伝子発現解析に関しては、通常餌（346.8kcal/100g、脂肪分 4.6%）で飼育した B6、MSM およびコンソミック 28 系統のメス 152 頭、オス 156 頭、合計 308 頭の 10 週齢における表現型と背部褐色脂肪組織を含む RNA 採取用組織を収集・保管した。全ゲノムを対象とした遺伝子発現解析に関しては、経費の関係で B6 系統およびコンソミック 13T 系統の 2 系統について行った。これは 13T 系統が最も体重増加の激しい系統であるとともに、それに伴って褐色脂肪も顕著に増加するからである。B6 系統およびコンソミック 13T 系統のオス個体の褐色脂肪組織より RNA を収集し、アフィメトリクス社製 GeneChip を使用した遺伝子発現解析をおこない、発現変動遺伝子をプロファイルした。発現変動遺伝子をプロファイルはアジレント・テクノロジー社製、GeneSpring により行った。発現遺伝子の変動の観察について、GeneChip のハイブリダイゼーションの結果は RMA によりプレプロセッシングをおこない、それから得られたデータを系統間で比較した。一連の解析から以下に示す結果が得られた。コンソミック系統の遺伝的背景である B6 系統と比較して 2 倍以上の発現増加が観察されるプローブは 524 種、2 倍以上の発現低下が観察されるプローブは 145 であった。また、4 倍以上の発現増加が観察されるプローブは 195 種、4 倍以上の発現低下が観察されるプローブは 26 種であった。さらに 10 倍以上の発現増加が観察されるプローブは 87 種、10 倍以上の発現低下が観察されるプローブは 5 種であった。これらの遺伝子群の全染色体における分布を調査したが特定の領域で発現の変化が集中するような現象は観察されなかった。次に Gene ontology を利用したクラスタリング(Bonferroni 補正で $p < 0.05$)を行ったところ、B6 系統と比較して発現増加が観察される遺伝子については、Muscle contraction、Muscle development、Mesoderm development、Cell structure、Cell structure and motility、Cell motility、Calcium mediated signaling、Developmental processes、Intracellular signaling cascade など筋肉の発生に関連すると考えられるものが数多く発現上昇していることが観察された。一方、発現低下の観察される遺伝子については、Stress response に係ると考えられるもののみであった。これら遺伝子の相互作用などはインシリコベースで行うことができなかったが、今後はこれを観察するための実験を行い、多因子性の肥満とこれが関与するメタボリックシンドロームを始めとした疾患の発生機序解明につなげていきたい。

本研究では、GeneChip を使用した遺伝子発

現解析以外にも、褐色脂肪組織で高発現し、エネルギー代謝に関わると考えられている Ucp1 (脱共役蛋白質) および Cidea (Cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A) については、B6 および MSM、さらにはコンソミック系統 28 種、合計 30 系統より収集した複数個体の RNA 試料より定量 RT-PCR による遺伝子発現定量解析を行うことができた。Ucp1 および Cidea とも、その発現に系統特異性が観察された。現在、脂肪蓄積に特徴のあるコンソミック系統について、褐色脂肪組織の Ucp1 および Cidea の遺伝子発現量と脂肪蓄積量との関連を解析している。

(3) (1) と (2) の実験で検出した候補遺伝子の BAC トランスジェネシスによる表現型再現について。

肥満を呈するコンソミック系統である B6-Chr13TMSM について、染色体 13 番遠位側の脂肪蓄積制御に関与する可能性のある遺伝子を含むゲノム領域を含む 3 種類の BAC クローンを B6 に導入し、2 種類の BAC クローンについては Tg ラインを得た。現在、これを B6-Chr13TMSM 系統と交配し、表現型の解析を行っている。

今後は、エネルギー代謝関連形質の表現型に注目して遺伝子探索を進めている B6-Chr11MSM および B6-Chr13TMSM について、褐色脂肪組織の遺伝子発現解析の結果やそれらを利用したインシリコ解析を一層進め、脂肪蓄積量などについて関連するパスウェイや遺伝子の検索などを行う。また、インシリコで確認できた発現変動や関連する遺伝子の相互作用、さらには全コンソミック系統で解析した褐色脂肪組織の Ucp1 および Cidea の遺伝子発現量と脂肪蓄積量の関係について、可能であれば遺伝解析を行う。また、コンソミック系統および両親系統の B6 および MSM を対象にして、褐色脂肪組織の活性状態を検出するための実験を継続しておこない、褐色脂肪組織の活性状態の遺伝的制御と多因子性の肥満およびこれが関与するメタリックシンドロームを始めとした疾患との関連性の解明につなげていきたい。

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 8 件)

① Takada, T., Ebata, T., Noguchi, H., Keane, T., Adams, D., Narita, T., Shin-I, T., Fujisawa, H., Toyoda, A., Abe, K., Obata, Y., Sakaki, Y., Moriwaki, K., Fujiyama, A., Kohara, Y., Shiroishi, T.

The ancestor of extant Japanese fancy mice contributed to the mosaic genomes of classical inbred strains. *Genome Res.*, in press. [査読有り]

② Nadeau, J. H., Forejt, J., Takada, T., Shiroishi, T. (2012). Chromosome substitution strains: gene discovery, functional analysis, and systems studies. *Mammalian genome* 23 (9-10): 693-705. [査読有り]

③ Takada, T., Shiroishi, T. (2012). Complex quantitative traits cracked by the mouse inter-subspecific consomic strains. *Experimental animals*, 61(4), 375-88. [査読有り]

④ Spiezio, S. H., Takada, T., Shiroishi, T., & Nadeau, J. H. (2012). Genetic divergence and the genetic architecture of complex traits in chromosome substitution strains of mice. *BMC genetics*, 13(1), 38. [査読有り]

⑤ Yonekawa, H., Takada, T., Shitara, H., Taya, C., Matsushima, Y., Matsuoka, K., Kikkawa, Y.: Mouse models for atopic dermatitis developed in Japan. *Atopic Dermatitis - Disease Etiology and Clinical Management*, ed, Jorge Esparza-Gordillo, 21-38, 2012, InTech, ISBN 978-953-308-67-5. [査読有り]

⑥ 高田豊行. マウス表現型関連データベースの紹介, 疾患モデルマウス表現型解析指南 (編集, 山村研一, 若菜茂晴) 中山書店 pp. 360-372, 2011. [査読無し]

⑦ 高田豊行. 肥満の遺伝学 - ありふれた病気の遺伝的素因解明に向けて. *遺伝* 65: 5-6, 2011. [査読無し]

⑧ Matsushima Y., Kikkawa Y., Takada T., Matsuoka K., Seki Y., Yoshida H., Minegishi Y., Karasuyama H. and Yonekawa H.: An Atopic Dermatitis-Like Skin Disease with Hyper-IgE-Emia Develops in Mice Carrying a Spontaneous Recessive Point Mutation in the *Traf3ip2* (*Act1/CIKS*) Gene. *The Journal of Immunology*, 185: 2340-2349, 2010. [査読有り]

[学会発表] (計 9 件)

① Takada, T., Ebata, T., Noguchi, H., Keane, K., Wong, K., Adams, D., Narita, T.,

Shin-I, T., Fujisawa, H., Toyoda, A., Abe, K., Obata, Y., Sakaki, Y., Moriwaki, K., Fujiyama, A., Kohara, Y. and Shiroishi, T. Ancestry of extant Japanese fancy mice contributed to the mosaic genomes of classical inbred strains. 26th International Mammalian Genome Conference, 2012, 10.21-24, Florida, USA.

②高田豊行, 三田晃彦, 米川博通, 森脇和郎, 城石俊彦. 日本産野生由来マウス系統 MSM/Ms を用いた加齢性脂肪蓄積の機能ゲノム解析. 第 59 回日本実験動物学会総会, 2012, 5.24-26, 別府.

③Takada, T. Functional genomics powered by mouse inter-subspecific genome diversity. Mouse Genetics Symposium, Seoul National University, 2011, 10.27, Seoul, Korea.

④高田豊行, 三田晃彦, 森脇和郎, 米川博通, 城石俊彦. 日本産野生由来マウス系統 MSM/Ms を用いた加齢性エネルギー代謝の機能ゲノム解析. 日本遺伝学会第 83 回大会, 2011, 9.20-22, 京都.

⑤高田豊行. MSM/Ms 系統を基盤にしたマウス機能ゲノム学データベースの構築, 日本実験動物学会総会・ワークショップ「国内実験動物データベースの現状と展望」第 58 回日本実験動物学会総会, 2011, 5.25-27, 東京.

⑥ Takada, T., Mita, A., Wakana, S., Moriwaki, K., Yonekawa, H., Shiroishi, T. Age-associated change of energy metabolism are genetically dissected by mouse inter-subspecific consomic strains. 23th International Mammalian Genome Conference, 2010. 10.17-21, Crete, Greece.

⑦高田豊行. マウス亜種間の表現型多様性とゲノム多型性に基づいた機能ゲノム学のためのデータベース, 日本遺伝学会第 82 回大会・ワークショップ「モデル動物における表現型解析の標準化と情報統合」2010, 9.20-22, 札幌.

⑧高田豊行. 多因子形質解析とその実験モデルマウスの開発 第 57 回日本実験動物学会総会、2010, 5.12-14, 京都. 「受賞講演」

⑨高田豊行, 三田晃彦, 森脇和郎, 米川博通, 城石俊彦: マウス亜種間コンソミック系統群による加齢性エネルギー代謝表現型の遺伝解析. 第 57 回日本実験動物学会総会、2010, 5.12-14, 京都.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田豊行 (TAKADA TOYOYUKI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号: 20356257

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし