

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461333

研究課題名(和文) 脂肪萎縮症の新規原因遺伝子の同定と脂肪細胞分化・増殖メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of new causative genes for lipodystrophy and elucidation of adipocyte differentiation/proliferation mechanism

研究代表者

日下部 徹 (KUSAKABE, Toru)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60452356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：先天性全身性脂肪萎縮症3例、部分性脂肪萎縮症3例の計6例の脂肪萎縮症について、遺伝子解析を行った。先天性全身性脂肪萎縮症の1例において、AGPAT2遺伝子に新たな複合型ヘテロ接合体変異を同定した。臨床所見では、BSCL2遺伝子による先天性全身性脂肪萎縮症とは異なる表現型(脂肪萎縮の程度、合併症の重症度)が観察された。エクソーム解析を行った症例では、脂質代謝に関わる遺伝子の多型が多く同定された。今後、親族を含めた遺伝子解析の追加、iPS細胞を用いた機能解析により、脂肪萎縮症の新規原因遺伝子が同定され、脂肪細胞分化・増殖のメカニズムの詳細が明らかにできる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Gene analyses were performed in 6 patients with lipodystrophy (3 patients with generalized lipodystrophy and 3 patients with partial lipodystrophy). In one case of congenital generalized lipodystrophy, a new compound heterozygous mutation was identified in the AGPAT2 gene. In the clinical findings, the phenotype of the lipodystrophic patients due to the AGPAT2 gene mutation was different from that of the lipodystrophic patients due to the BSCL2 gene mutation in terms of the severity of lipodystrophy and its complications. Exosome analyses revealed many polymorphisms of genes involved in lipid metabolism. In the future, additional genetic analyses including relatives and functional analyses using their iPS cells will identify new causative genes for lipodystrophy and the mechanism of adipocyte differentiation/proliferation may become clear.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脂肪萎縮症 エクソーム解析 脂肪細胞分化 脂肪細胞機能 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

脂肪萎縮症は、脂肪組織の病的な萎縮、欠如を臨床的特徴とする疾患の総称である。萎縮する脂肪組織の程度や部位により、全身の脂肪組織が欠如する全身性脂肪萎縮症と、特定の領域に限局して脂肪組織が消失する部分性脂肪萎縮症に大別される(図1)。また、脂肪萎縮症の病因として、先天性・家族性は遺伝子異常、後天性は自己免疫異常、ウイルス感染、薬剤があるが、不明な点も多く未だ脂肪萎縮そのものを治療することは出来ない。

図1 脂肪萎縮症の臨床分類

外観	全身性脂肪萎縮症		部分性脂肪萎縮症	
	先天性	後天性	家族性	後天性
主要な原因	遺伝子異常	自己免疫異常 ウイルス感染	遺伝子異常	自己免疫異常 薬剤

近年、脂肪萎縮症の原因遺伝子が相次いで報告されているが(図2)、原因遺伝子が特定されていない症例も多い。

図2 脂肪萎縮症の原因遺伝子

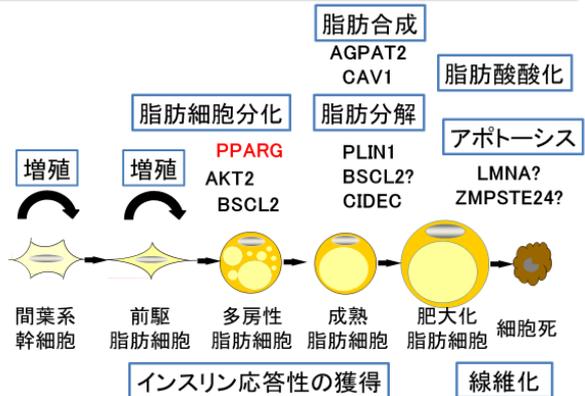
脂肪萎縮のタイプ	原因遺伝子	文献
全身性 (常染色体劣性遺伝)	AGPAT2	Nat Genet 2002
	BSCL2 (seipin)	Nat Genet 2001
	CAV1	J Clin Endocrinol Metab 2008
	PTRF	J Clin Invest 2009
部分性 (常染色体優性遺伝)	LMNA	Hum Mol Genet 2000
	PPARG	J Clin Endocrinol Metab 2002
	AKT2	Science 2004
	ZMPSTE24	Hum Mol Genet 2003
	CIDEA	EMBO Mol Med 2009
	PLIN1 (Perilipin)	N Engl J Med 2011

脂肪萎縮症患者では、脂肪組織から分泌されるレプチンは減少し、低レプチン血症により著しい過食が認められる。この時生じる余剰エネルギーは、脂肪組織へ蓄積されず、非脂肪組織(肝臓、骨格筋、膵臓など)に脂質として蓄積される。これらは異所性脂肪蓄積と呼ばれ、インスリン抵抗性、インスリン分泌不全を招くことから、脂肪毒性(lipotoxicity)という概念が提唱されている。これらのことから、脂肪組織の代謝恒常性維持における重要性は明らかであり、脂肪細胞の適切な分化、増殖、機能の獲得は、糖尿病、肥満症の治療となり得る。

既に申請者らは、わが国で初めて先天性全身性脂肪萎縮症の原因遺伝子として BSCL2 (SEIPIN) 遺伝子異常を報告した(Kusakabe T et al., J Clin Endocrinol Metab 89:2360, 2004)。その後も症例数を増やし、現在まで

に約 20 名の先天性全身性脂肪萎縮症の遺伝子解析を行ってきた。その中には、既知原因遺伝子に変異を有さず、BSCL2 遺伝子異常症患者とは明らかに異なる表現型を呈している症例があり、他の原因遺伝子が存在する可能性がある。

図3 脂肪萎縮症原因遺伝子の脂肪細胞における機能



これまでに報告されている脂肪萎縮症の原因遺伝子は、全て脂肪細胞分化、増殖、機能に関わる遺伝子である(図3)。特に家族性部分性脂肪萎縮症の原因遺伝子である PPARG は、脂肪細胞分化に必須の転写因子であり、PPARG を活性化させるチアゾリジン誘導体は、脂肪細胞の分化増殖を促進させ、アディポネクチン産生促進を含め脂肪細胞機能改善作用を有し、有用な糖尿病治療薬となっている。

本研究で脂肪萎縮症の新規原因遺伝子が同定され、脂肪細胞分化・増殖のメカニズムの詳細が明らかとなれば、糖尿病・肥満症の新たな創薬ターゲットが見いだされる可能性が高い。

2. 研究の目的

申請者らは、医師主導治験、高度医療評価制度(第3項先進医療)に基づく臨床試験を通じて、希少疾患である脂肪萎縮症患者を多く診療してきた。また NPO 法人「脂肪萎縮症・脂肪萎縮性糖尿病センター」における活動を通じて、さらに症例を蓄積している。

本研究では、申請者らが有する脂肪萎縮症コホートから未知の脂肪萎縮症原因遺伝子を同定し、その機能解析により、脂肪萎縮症の根本治療のみならず、糖尿病・肥満症の新規創薬ターゲットの同定を目指す。

3. 研究の方法

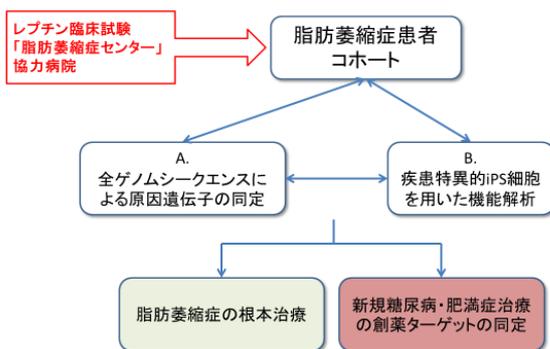
脂肪萎縮症は数 100 万人に 1 人とも言われる希少難病である。

申請者らは、これまで行ってきたレプチン臨床試験、NPO 法人「脂肪萎縮症・脂肪萎縮性糖尿病センター」における活動、協力病院を通じて、希少疾患である脂肪萎縮症患者の多数のコホートを診療し、その臨床成績を蓄積している。また次世代シーケンサーの開発など、近年の遺伝子解析の進歩は目覚ま

しい。さらに、疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究は、他の動物種との違いを考慮する必要がないこと、iPS 細胞の多能性を利用してヒトでは採取困難な細胞も作り出し解析できること、個々の患者の病態を細胞レベルで再現できること（責任遺伝子が不明であっても解析可能）、モデルの確立が迅速に行えること（月単位）など多くの利点を有している。

本研究では、図 4 に示すように、申請者らが有する脂肪萎縮症患者コホートを対象に、A.原因遺伝子不明の脂肪萎縮症患者を対象とした全ゲノムシーケンス、B.疾患特異的 iPS 細胞を用いた機能解析を行い、脂肪萎縮症の根本治療、糖尿病・肥満症の新規創薬ターゲットの同定を目指す。

図 4 研究のフレームワーク



#### 4. 研究成果

##### (1) 対象患者

先天性全身性脂肪萎縮症 3 例、部分性脂肪萎縮症 3 例の計 6 例について、既知原因遺伝子の解析、必要に応じて全ゲノムシーケンス（エクソーム解析）を行った（表 1）。遺伝子解析は、京都大学倫理委員会の承認を得て、患者に対して十分な説明を行い、同意を得たうえで行った。

##### (表 1)

	型	性別	Exome 解析
1	先天性・全身性	女性	本人、父、母
2	先天性・全身性	男性	本人、父、母
3	先天性・全身性	男性	本人
4	部分性	女性	本人、父、姉
5	部分性	女性	-
6	部分性	女性	-

##### (2) 遺伝子解析結果

症例 1 は、先天性全身性脂肪萎縮症の女性。エクソーム解析（本人と両親のトリオ解析）を行った。皮膚組織を採取して疾患特異的 iPS 細胞を作製した。本例では、AGPAT2 遺伝子に新たな複合型ヘテロ接合体変異が認められた。MRI を用いて脂肪組織分布を詳細に検討したところ、全身の皮下脂肪組織、内臓脂肪組織の萎縮が認められた。BSCL2 遺伝子変異症例とは異なり、眼窩や足底部の脂肪組織は保たれていた。また、BSCL2 遺

子変異症例の多くは小学校入学前から糖尿病を発症していたが、本症例は 14 歳時に糖尿病を指摘された。以上のことから、AGPAT2 遺伝子変異症例の重症度は、BSCL2 遺伝子変異症例と比較して軽症である可能性が考えられた。本症例にレプチン補充治療を行ったところ、BSCL2 遺伝子変異症例と同様に良好な代謝改善効果が得られた。

症例 2 は、先天性全身性脂肪萎縮症の男性。エクソーム解析（本人と両親のトリオ解析）を行った。症例 3 は、先天性全身性脂肪萎縮症の男性。エクソーム解析を行った（本人のみの解析）。また症例 4 は、部分性脂肪萎縮症（Barraquer-Simons 症候群）の女性。エクソーム解析（本人と父親、姉の解析）を行った。これらの症例では、既知の原因遺伝子に病的変異を認めなかった。エクソーム解析により多くの遺伝子多型を同定したが、原因遺伝子を特定することは出来なかった。しかしながら、脂質代謝に関わる遺伝子の多型も多く同定されており、今後、親族を含めた遺伝子解析の追加による遺伝子の絞り込み、iPS 細胞を用いた機能解析により、脂肪萎縮症の新たな原因遺伝子が同定される可能性がある。

症例 5、症例 6 は、NPO 法人「脂肪萎縮症・脂肪萎縮性糖尿病センター」を通じて紹介された部分性脂肪萎縮症の 2 家系である。これらは、上半身はむしろ肥満しているものの、臀部から下肢の限局した皮下脂肪組織の萎縮が観察され、ほぼ共通した脂肪組織の分布パターンを有していた。これまでに報告されている部分性脂肪萎縮症の原因遺伝子である LMNA 遺伝子、PPARG 遺伝子について遺伝子解析を行ったが、病的変異は認められず、新たな原因遺伝子による部分性脂肪萎縮症の一群である可能性が考えられた。

##### (3) 先天性全身性脂肪萎縮症原因遺伝子 BSCL2 の機能解析

BSCL2 遺伝子変異患者の iPS 細胞を用いた解析

BSCL2 遺伝子に変異を有する 2 症例（R275X と E189X）について、皮膚線維芽細胞より iPS 細胞を作製した（Metabolism、2016）。脂肪細胞へ分化誘導したところ、健常者と比較してこれらの iPS 細胞由来の脂肪細胞では、脂肪蓄積の低下が観察された。これはヒト脂肪萎縮症の脂肪細胞と同様の表現型であり、これらの iPS 細胞を用いることで BSCL2 の詳細な機能解析が可能になると考えられた。

BSCL2 遺伝子ノックアウトラットの解析

申請者らは新たに BSCL2 遺伝子ノックアウトラットを作成した（Hum Mol Genet、2015）。電子顕微鏡を用いて、BSCL2 遺伝子ノックアウトラットの残存脂肪組織の形態観察、SVF の脂肪細胞分化誘導実験を行い、さらに脂質の蓄積状態、脂肪細胞分化関連遺

伝子の発現を検討したところ、BSCL2 遺伝子をノックアウトすることにより脂肪細胞へ分化はするものの、最終的な脂肪蓄積に障害があることが示唆された。

#### 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6件)

Iwanishi M, Ebihara K, Kusakabe T, Washiyama M, Ito-Kobayashi J, Nakamura F, Togawa T, Ozamoto Y, Hagiwara A, Nakao K, Primary intestinal follicular lymphoma and premature atherosclerosis in a Japanese diabetic patient with atypical familial partial lipodystrophy, Intern Med、査読有、53、2014、851-858

Ebihara C, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Mashimo T, Tomita T, Zhao M, Gumbilal VM, Kusakabe T, Yamamoto Y, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Hosoda K, Serikawa T, Nakao K, Seipin is necessary for normal brain development and spermatogenesis in addition to adipogenesis, Hum Mol Genet、査読有、24:2015、4238-4249、DOI: 10.1093/hmg/ddv156

Mori E, Fujikura J, Noguchi M, Nakao K, Matsubara M, Sone M, Taura D, Kusakabe T, Ebihara K, Tanaka T, Hosoda K, Takahashi K, Asaka I, Inagaki N, Nakao K, Impaired adipogenic capacity in induced pluripotent stem cells from lipodystrophic patients with BSCL2 mutations, Metabolism、査読有、65:2016、543-556、DOI: 10.1016/j.metabol.2015.12.015

日下部徹、海老原健、脂肪萎縮症、黒色表皮腫に対するレプチン補充療法、皮膚アレルギーフロンティア(メディカルレビュー社) 査読無、13巻、2015、2015-3

日下部徹、野口倫生、巖西真規、中尾一和、日本人の脂肪萎縮糖尿病の成因、BIO Clinica(北隆館) 査読無、32巻、2016、50-52  
日下部徹、中尾一和、脂肪萎縮症、最新医学(最新医学社) 査読無、71巻、2016、85-92

[学会発表](計6件)

Toru Kusakabe, Efficacy of leptin therapy in diabetes: lessons from lipodystrophy. The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014. (9/10-9/12、京都、招待口演)

Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Daisuke Aotani, Megumi Aizawa-Abe, Sachiko Kataoka-Yamamoto, Takeru Sakai, Chihiro Ebihara, Junji Fujikura, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao. Effect of leptin-replacement therapy on acanthosis

nigricans in congenital generalized lipodystrophy. Lipodystrophy in 2014: Leptin and Beyond. (10/17-10/19、ミシガン大学、ポスター)

古御門恵子、日下部徹、富田努、森栄作、大野洋一、辻秀美、幣憲一郎、長嶋一昭、稲垣暢也。レプチン治療中の先天性全身性脂肪萎縮症において栄養療法介入が奏功した一例。第20回日本病態栄養学会年次学術集会(2017/1/13-1/15、京都)

日下部徹、田中智洋、宮澤崇、青谷大介、野口倫生、阿部恵、海老原健、中尾一和。AGPAT2 遺伝子変異による脂肪萎縮症~我が国における先天性全身性脂肪萎縮症の遺伝子解析。第37回日本肥満学会(2016/10/7-10/8、東京)

野口倫生、日下部徹、泉諒大、中尾一和。セイピンノックアウトラットにおける脂肪萎縮の病態解明。第37回日本肥満学会(2016/10/7-10/8、東京)

森栄作、藤倉純二、中尾一泰、野口倫生、日下部徹、海老原健、田中智之、浅香勲、細田公則、稲垣暢也、中尾一和。BSCL2 遺伝子異常を有する先天性全身性脂肪萎縮症患者からの疾患特異的iPS細胞樹立と解析。第59回日本糖尿病学会年次学術集会(2016/5/19-5/21、京都)

[図書](計0件)

なし

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

なし

○取得状況(計0件)

なし

[その他]

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

日下部 徹 (KUSAKABE Toru)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 60452356

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし