

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461357

研究課題名(和文)モデル動物の遺伝解析から同定した脂肪蓄積遺伝子SLC22A18の生理機能の解明

研究課題名(英文) Investigation of the physiological function of Slc22a18, a candidate identified by a genetic analysis on animal models for visceral fat accumulation

研究代表者

後藤田 貴也 (GOTODA, TAKANARI)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：60322062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドローム(MS)の基盤となる内臓脂肪蓄積を引き起こす遺伝素因はほとんど不明である。われわれが以前モデル動物の遺伝解析から見出したSLC22A18を過剰発現するマウスでは内臓脂肪量の増加が認められ、反対にSLC22A18の欠損マウスでは脂肪蓄積の減少を認めた。これらの結果から、SLC22A18が内臓脂肪蓄積に関与することが明確となり、さらに一連の検討によりSLC22A18の有望な内因性基質候補を見出した。SLC22A18はその内臓脂肪調節機能を通じてMSの新たな治療標的分子になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Genetic factors underlying visceral fat accumulation, a principal component of the metabolic syndrome (MS), remain largely unknown. In this study, visceral fat accumulation was accelerated in transgenic mice overexpressing SLC22A18, a candidate gene revealed by our previous genetic studies on animal models. Oppositely, fat volume was decreased in SLC22A18 knockout mice as compared with normal mice. These results indicated that SLC22A18 plays a crucial role in regulating visceral fat accumulation. A series of our experiments have revealed a promising candidate for endogenous substrates transported by SLC22A18. Thus, SLC22A18 could be a novel therapeutic target for metabolic syndrome via its regulatory function upon visceral fat accumulation.

研究分野：代謝内科学

キーワード：メタボリックシンドローム 脂肪蓄積 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

(1)メタボリックシンドロームは、内臓脂肪蓄積を基盤として糖尿病・脂質異常症・高血圧症などの心血管リスク因子が重複した病態であり、動脈硬化性の心疾患や脳血管疾患の重大な原因となる。

日本人では、過栄養の食事や運動不足によって引き起こされる体重増加は、欧米人に比べて内臓脂肪に反映されやすいことが知られている。蓄積した(内臓)脂肪では例えば悪玉サイトカインとして知られる炎症性のサイトカインの産生増加や善玉サイトカインとして知られるアディポネクチンの産生低下などが観察される。脂肪組織で起こる異常が高血圧や脂質異常症、耐糖能異常につながり、さらにこれらの病態が脂肪組織以外の臓器への脂肪の蓄積(異所性脂肪蓄積)をもたらす。内臓脂肪型の肥満に伴う慢性的な臓器障害そして動脈硬化症が引き起こされる。そのため、欧米諸国に比べて高度な肥満自体が深刻な社会問題となっていない日本においても、このような連鎖的な増悪現象を防ぐためには、根底にある内臓脂肪が蓄積される仕組みを理解することが重要となる。

(2)ヒトにおいては遺伝的な背景や環境などが個人で大きく異なるため、様々な素因によって引き起こされるメタボリックシンドロームのような疾患について遺伝素因を同定するには大きな困難が伴う。一方、モデル動物では各個体の遺伝的な背景や外部環境の均一化が可能となる。高血圧自然発症ラット(spontaneously hypertensive rat; SHR)は本態性高血圧症のモデルラットとして知られている。同時にSHRは高インスリン血症及び耐糖能異常、高TG血症と低HDL-C血症、内臓脂肪蓄積、交感神経系の亢進など、メタボリックシンドロームに似た表現型も呈する。われわれは内臓脂肪量に関わる新規分子の同定を目的として、メタボリックシンドロームのモデル動物でもあるSHRの遺伝解析を行い、SLC22A18を見出した。すなわち、遺伝的背景がほぼ同一にもかかわらずSHRの異なる系統間では副睾丸周囲脂肪量(内臓脂肪)が有意に異なることに着目し、これらの系統間では脂肪量を規定する遺伝素因に差異があると考えた。この2系統の交配に由来する世代における連鎖解析などにより、内臓脂肪量の少ないSHR系統ではSlc22a18遺伝子に34アミノ酸を欠失するスプライシング変異を同定した。以上の経緯の結果、内臓脂肪量に連鎖する新規遺伝子として機能未知のトランスポーターであるSLC22A18を同定した。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの発症には、生活習慣の偏りと遺伝素因の関与が知られている。メタボリックシンドロームの基盤にある内臓脂肪量を規定する遺伝素因については不明な点が多い。われわれはSHRの遺伝解析を通じて内臓脂肪蓄積に関わる新規分子と

してSLC22A18を同定した。本研究では、SLC22A18について、脂肪蓄積メカニズムの解明と本トランスポーターの機能調節物質の同定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) SLC22A18 欠損マウスの解析

SLC22A18 欠損マウスの体重及び内臓脂肪量を測定した。通常食あるいは高脂肪食を与え、6週齢から27週齢までの体重を測定した。解剖後内臓脂肪として精巣周囲脂肪量、肝重量、褐色脂肪量を測定した。

SLC22A18 欠損マウスの *in vivo* における代謝測定を行った。18週齢のSLC22A18欠損マウスと対照群として野生型マウスの活動量・酸素消費量・CO₂放出量・呼吸商を通常食飼育下で24hr測定した。

SLC22A18 欠損マウスを *ob/ob* マウスと交配し、レプチン欠損下における体重及び精巣周囲脂肪重量を測定した。ともに *ob/ob* (ホモレプチン欠損) 下で、SLC22A18 ホモ欠損マウスと野生型マウスを通常食を与えて12週齢まで飼育し、体重遷移と摂餌量を測定した。12週齢で解剖後、精巣周囲脂肪及び肝臓の重量を測定した。また必要に応じて脂肪組織よりRNAを採取し、脂肪の分化に関わる遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で測定した。

(2) 脂肪組織特異的な SLC22A18 発現トランスジェニックマウスの解析

aP2 遺伝子のプロモーターを連結した SLC22A18 トランスジェニックマウス(aP2-SLC22A18Tg マウス)について11週齢から24週齢まで普通食与え飼育し体重を測定した。また24週齢時には1日あたりの摂餌量を連続7日間測定後、糖負荷試験で耐糖能を評価した。25週齢時に解剖し、体重及び精巣周囲脂肪重量を測定した。精巣周囲脂肪はHE染色により細胞の大きさを観察した。また必要に応じて脂肪組織よりRNAを採取し、脂肪の分化に関わる遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で測定した。

(3) SLC22A18 のトリグリセリド(TG)合成活性への影響

ラット初代肝細胞に組換えアデノウィルスをを用いて、SLC22A18 を強発現した。14C-Glucose を添加した条件で培養し、脂質抽出後、TGに含まれる放射活性を測定した。

(4) SLC22A18 の基質の探索

キャピラリー電気泳動 質量分析計(CE-MS)による探索

SLC22 ファミリーは一般に荷電をもったイオンを基質とすることから、イオン性物質の解析に適したCE-MS法によるメタボローム解析が望ましいものと考えられた。そこで、10週齢のSLC22A18欠損マウス及び野生型マウスの血清、尿、肝臓抽出物についてCE-MSによるイオン性物質の網羅的な測定を行った。

SLC22A18 欠損マウスのビリルビン濃度の測定

ヒト GWAS の結果(Hum Mol Genet. 2009 Jul 15; 18(14): 2700-2710)から、基質候補の一つとしてビリルビンに注目した。25-27 週齢の SLC22A18 欠損マウスに bilirubin (5 mg/kg)を投与、経時的に採血後、ビリルビン濃度を測定した。

培養細胞を用いた in vitro uptake assay CE-MS の測定において 2 群間で違いが認められた胆汁酸の取り込み実験を行った。さらにトリグリセリドの直接のリソースとなるグルコース及び脂肪酸の取り込み実験を行った。(4)- の経緯から、ビリルビンの取り込み実験系を作るため、蛍光タンパク UnaG のビリルビン応答性を確認した。

4. 研究成果

(1) SLC22A18 欠損マウスの解析

SLC22A18 欠損マウスの体重及び内臓脂肪量を測定した。通常食及び高脂肪食負荷のいずれの条件下でも、野生型マウスと比べて体重と巣周囲脂肪量、肝重量、褐色脂肪量に違いはなかった。

SLC22A18 欠損マウスの in vivo における代謝測定を行った。SLC22A18 欠損マウスは対照群と比べて活動量と酸素消費量が有意に少ないことが分かった。このことから、本マウスは whole body としてはエネルギーを消費しにくい性質をもつ可能性が考えられた。

SLC22A18 欠損マウスを ob/ob マウスと交配し、レプチン欠損下における体重及び精巣周囲脂肪重量を測定したところ、体重と摂餌量には違いがなかった。一方、精巣周囲脂肪重量は有意に SLC22A18 欠損マウスで少なかった。白色脂肪細胞の分化マーカーである PPARgamma や SREBP-1c の mRNA 発現量には違いが認められず、脂肪量が減少した分子メカニズムは今のところ不明であるが、レプチン欠損による肥満マウスモデルでは SLC22A18 は脂肪重量に影響を与えることが明らかとなった。

(2) 脂肪組織特異的な SLC22A18 発現トランスジェニックマウスの解析

aP2-SLC22A18 Tg マウスは摂餌量が少ないのにもかかわらず、体重が若干多い傾向を認めた。Tg マウスは糖負荷試験において有意な耐糖能の悪化が認められた。解剖時では体重に有意な差がなかったが、精巣周囲脂肪重量は Tg マウスで約 2 倍多く、白色脂肪組織の HE 染色の結果より、大型の脂肪細胞が多く認められることから、脂肪量の増加の少なくとも一部は脂肪細胞のサイズの増加によるものと考えられた。Tg マウスにおいても PPARgamma や SREBP-1c の mRNA 発現量には違いが認められず、Tg マウスの脂肪量増加を説明する分子メカニズムは不明である。以上のことから、SLC22A18 によって引き起こされた脂質蓄積は耐糖能障害のリスクとなりうることを示された。

(3) SLC22A18 のトリグリセリド (TG) 合成活性への影響

単離した初代肝細胞では ¹⁴C glucose 由来の TG 合成活性が SLC22A18 の強発現によって有意に亢進しており、以上のことから主として SLC22A18 は TG 源として糖を利用する経路に関与する可能性が示唆された。

(4) SLC22A18 の基質の探索

キャピラリー電気泳動 質量分析計 (CE-MS) による探索

CE-MS の分析の結果、SLC22A18 欠損マウスの肝臓及び血清では taurocholic acid の含量が野生型マウスに比べて多い傾向が認められた。taurocholic acid は胆汁酸の一つである。本物質を SLC22A18 の内因性基質候補の一つとして注目した。

SLC22A18 欠損マウスのビリルビン濃度の測定

SLC22A18 欠損マウスに bilirubin を投与、経時的に採血後、ビリルビン濃度を測定したところ、血中ビリルビン濃度が野生型マウスに比べて有意に高い傾向が認められた。SLC22A18 を介した肝臓へのビリルビンの取り込みが低下したことで、血中のクリアランスが低下した可能性を考え、ビリルビンも SLC22A18 の内因性基質候補の一つとして注目した。

培養細胞を用いた in vitro uptake assay CE-MS による測定において欠損マウスと野生型マウスの試料の 2 群間で違いが認められた taurocholate の取り込み実験を行った。[³H]taurocholate を COS7 細胞に添加すると、既知の胆汁酸トランスポーターである NTCP の強発現下では強い取り込み活性が認められたのに対し、SLC22A18 の強発現では対照群と違いはなかった。さらにグルコースとして [³H]2-DG、脂肪酸として [³H]oleate の取り込み実験を行ったが、SLC22A18 の発現量と取り込み活性に関連は認められなかった。の結果から、ビリルビンの取り込み実験を試みた。実験系を作るため、UnaG のビリルビン応答性を確認した。H2.35 細胞に組換えアデノウィルスを用いて UnaG を発現させ、ビリルビンを培地中に添加したところ、蛍光強度が濃度依存的に増加した。このことから UnaG-ビリルビン複合体の蛍光強度として細胞内ビリルビン濃度を定性的に評価できると考えた。そこで UnaG の発現下で H2.35 細胞にビリルビンを添加すると、SLC22A18 の強発現によって蛍光強度が増加した。以上のことから、培養細胞においてもビリルビンが SLC22A18 の有望な基質候補であることが確かめられた。

(5) 得られた成果と展望

本研究において、SLC22A18 に変異を持つ SHR で認められた内臓脂肪量の変動が KO や Tg マウスにおいても再現され、内臓脂肪蓄積に関与することが明らかとなった。さらに、一連の検討より、SLC22A18 の有望な基質候補を見出すことができた。本研究をさらに発展させることにより、内臓脂肪が蓄積するメカニズムの解明が進み、SLC22A18 を標的分子としたメタボリックシンドロームの有効な治療法

の開発につながることを期待される。

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 3件)

Takeuchi Y, Yahagi N, Aita Y, Murayama Y, Sawada Y, Piao X, Toya N, Oya Y, Shikama A, Takarada A, Masuda Y, Nishi M, Kubota M, Izumida Y, Yamamoto T, Sekiya M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Urayama O, Kawakami Y, Iizuka Y, Gotoda T, Itaka K, Kataoka K, Nagai R, Kadowaki T, Yamada N, Lu Y, Jain MK, Shimano H: KLF15 enables rapid switching between lipogenesis and gluconeogenesis during fasting. Cell Rep, 査読有、16(9):2373-2386, 2016

DOI: 10.1016/j.celrep.2016.07.069

Gotoda T: Another paradox regarding adiponectin revisited. J Atheroscler Thromb, 査読無、23(3):292-294, 2015

DOI: 10.5551/jat.ED031

Gotoda T: From association to function in the Post-GWAS era. J Atheroscler Thromb, 査読無、22(5):442-444, 2014

DOI: 10.5551/jat.ED017

〔学会発表〕(計 5件)

山本隆史、飯塚陽子、藤田敏郎、後藤田貴也：メタボリックシンドローム関連遺伝子 KAT-1 (kynurenine aminotransferase-1) の糖代謝に及ぼす影響。第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会，東京，2016 年 7 月 14 日

山本隆史，後藤田貴也：SHR の遺伝解析により同定された内臓脂肪蓄積関連遺伝子 Slc22a18 の生理的機能の解析 .BMB2015(第 88 回日本生化学会)，神戸，2015 年 12 月 1 日

山本隆史，飯塚陽子，藤田敏郎，後藤田貴也：SHR の遺伝解析により同定された内臓脂肪蓄積関連遺伝子 Slc22a18 の生理的機能の解析。第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会，仙台，2015 年 7 月 9 日

山本隆史，代田翠，飯塚陽子，藤田敏郎，後藤田貴也：SHR の遺伝解析により同定された内臓脂肪蓄積関連遺伝子 SLC22A18 の生理的機能の解析。第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会，下関，2015 年 5 月 21 日

後藤田貴也、山本隆史：高血圧自然発症ラット (SHR) の遺伝解析により同定された内臓脂肪蓄積関連遺伝子 Slc22a18 の発現調節機構および肝脂肪蓄積への関与の解明。第 87 回日本生化学会，京都，2014 年 10 月 17 日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤田 貴也 (GOTODA, Takanari)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：60322062

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()