

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790909

研究課題名(和文)新規脂肪蓄積関連遺伝子SLC22A18の生理的機能の解明

研究課題名(英文)Physiological analysis of SLC22A18 gene associated with visceral fat accumulation

研究代表者

山本 隆史(Yamamoto, Takashi)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00572033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題においては、機能未知のトランスポーターSLC22A18の内蔵脂肪や肝臓の中性脂肪蓄積における役割を解明するため、SLC22A18遺伝子改変マウスの解析とSLC22A18の内因性基質の探索を行った。動物実験によって、SLC22A18は白色脂肪組織重量や肝臓の脂質含量を正に制御していることが分かった。またSLC22A18の内因性基質の候補物質としてビリルビンを見出すことができた。以上のことから、SLC22A18の新しい生理機能が明らかとなり、本分子を標的とした代謝性疾患治療の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, to investigate the physiological functions of SLC22A18, an orphan transporter, in visceral fat accumulation and hepatic lipid accumulation, we analyzed SLC22A18-genetically modified mice and screened the endogenous substrate of SLC22A18. Animal experiments revealed that SLC22A18 positively regulates fat accumulation and triglyceride accumulation in liver. We found bilirubin as a candidate of SLC22A18 substrates. These results indicate the novel function of SLC22A18 and suggest the possibility of SLC22A18 as a therapeutic target of metabolic disorder.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：メタボリックシンドローム 連鎖解析 内臓脂肪 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪蓄積を基盤とし糖尿病・脂質異常症・高血圧が複数重複した病態であり、心疾患や脳血管疾患に至る致命的な動脈硬化症のリスク因子である。

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が、それらがどのように内臓脂肪蓄積を引き起こすのか、その詳しい分子メカニズムは不明であり、成因の解明と治療法の開発は重要な医学的課題である。

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高血圧自然発症ラット(SHR)の遺伝解析を行い、機能未知のトランスポーターであるSLC22A18 遺伝子を見出した。すなわち、遺伝的背景がほぼ同一にもかかわらずSHRのIzmとNCrj系統間では脂肪量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F2世代における連鎖解析とマイクロアレイ解析による網羅的なスクリーニングの結果、内臓脂肪量の少ないSHR/NCrj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。SLC22A18 はヒト・げっ歯類を問わず存在する、機能及び基質未知のトランスポーターであり、脂肪蓄積との関連を示唆する報告は皆無である。

本研究課題では、脂肪蓄積メカニズムにおける役割に焦点を絞って、SLC22A18

の生理的機能の解明を行い、SLC22A18 の新規治療標的分子としての可能性を検討し臨床応用に展開するための基盤研究を行う。

2. 研究の目的

上記の背景より、SLC22A18 は脂肪細胞や肝細胞においてTG蓄積に深くかかわることが示唆される。そこで本研究課題ではSLC22A18 の脂肪量・TG蓄積制御メカニズムにおける役割を解明し、SLC22A18 を標的とした新たな治療法の開発のための基盤研究を行う。

3. 研究の方法

SLC22A18 ノックアウトマウス及びSLC22A18 トランスジェニックマウスの作出と解析

SLC22A18 ノックアウトマウスと脂肪組織特異的発現性(aP2)トランスジェニックマウスを作出し、抗SLC22A18 抗体を用いたWBにより、タンパクレベルでノックアウトマウスでのSLC22A18 の発現消失、トランスジェニックマウスでの強発現を確認する。これらの遺伝子改変マウスの体重・内臓脂肪量・組織内(特に肝臓)TG量を測定すると共に、脂肪を含む各組織の脂質代謝にかかわる遺伝子発現をReal Time PCR法で測定する。

組み換えアデノウィルスを用いたin vivoにおけるSLC22A18 の機能解析
肝臓特異的にSLC22A18 発現アデノウィルスまたはSLC22A18を標的としたshRNAアデノウィルスを感染させ、体重・内臓脂肪量・肝TG量を測定すると共に、肝臓の脂質代謝

にかかわる遺伝子発現を Real Time PCR 法で測定する。

3T3-L1 細胞を用いた SLC22A18 の機能解析

SLC22A18 発現アデノウイルスと SLC22A18 を標的とした shRNA アデノウイルスを 3T3-L1 細胞に感染させる。その後分化誘導を行い、Oil Red O 染色によるトリグリセリド蓄積の評価、採取した RNA より分化関連遺伝子の発現量を Real Time PCR 法で測定する。またプロモーター解析により脂肪分化に伴う SLC22A18 mRNA の発現誘導を制御する分子メカニズムを解明する。

SLC22A18 基質候補物質の探索

SLC22A18 トランスポーターファミリーは主にイオン性物質を基質とする。そこでノックアウトマウス及び野生型マウスの組織サンプル(血液、肝臓抽出液、尿)を用いた CE-MS 解析を行い、両群間で変化が大きい分子の同定を行う。解析は Human Metabolome Technologies 社に依頼する。次に、SLC22A18 の強発現細胞株を用いて、メタボローム解析や文献よりピックアップした基質候補物質の取り込み実験を行い SLC22A18 の基質となりうるか評価する。

4. 研究成果

肥満モデルである ob/ob マウスと SLC22A18 ノックアウトマウスの掛け合わせを行ったところ、12 週齢では精巢脂肪重量が対照群に比べて KO マウスでは有意に低下が認められた。反対に、脂肪組織特異的な aP2 SLC22A18 トランスジェニックマウスでは 25 週齢では精巢脂肪重量が対照群の約 2 倍に増加しており、糖負荷試験の結

果より、耐糖能の悪化も認められた。マウス肝臓ではアデノウイルスを用いた過剰発現により著明な脂肪肝が惹起された。反対にノックダウンによりマウスの食餌誘発性の脂肪肝が改善し、脂質合成系遺伝子群の発現が低下していた。一方、SLC22A18 の発現は 3T3-L1 細胞の成熟脂肪細胞への分化に伴い増加し、ノックダウン実験では著明な脂肪分化の抑制と脂肪蓄積の減少が認められ、PPAR γ , C/EBP α といった脂肪細胞への分化誘導を制御する転写因子の発現が低下していた。レポーターアッセイの結果、SLC22A18 プロモーター活性は脂肪細胞分化制御因子の一つである C/EBP β で強く亢進することが分かった。ゲルシフトアッセイにより SLC22A18 プロモーター上に物理的に C/EBP β が結合する領域があることが分かった。SLC22A18 の内因性基質を同定するため、SLC22A18KO マウスの肝臓や血液を用いたメタボローム解析や文献より基質候補物質をピックアップし、SLC22A18 強発現細胞を用いてその取り込み実験を行った。その結果、検討した物質(クロロキン、グルコース、オレイン酸、胆汁酸)いずれも in vitro において SLC22A18 の強発現細胞への有意な取り込みが認められなかった。一方、ヒトの SLC22A18 遺伝子領域の SNP と血中ビリルビン濃度との関連の報告があることから、SLC22A18KO マウスを調べたところ、ビリルビンの血中濃度が野生型マウスに比べて有意に高く、血中からのクリアランス低下も認められた。

【結語】SLC22A18 は白色脂肪量や脂肪細胞の分化を正に制御すること、肝臓における TG 蓄積を促進する働きがあることが見出

された。SLC22A18 の内因性基質が不明なためこの詳細な分子メカニズムは不明であるが、ビリルビンは強力な抗酸化物質であり、動物実験において抗肥満作用の報告もあることから、この物質が SLC22A18 の基質候補物質のひとつと考えられた。今後メカニズムの解明する手掛かりを得ることができた。本研究によって、SLC22A18 が内臓脂肪型肥満や脂肪肝などの治療に資する新規の分子標的としての可能性が示唆された。

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 1 件)

Biochem Biophys Res Commun. 2013 Nov 1;440(4):521-6. A novel link between Slc22a18 and fat accumulation revealed by a mutation in the spontaneously hypertensive rat.

Yamamoto T, Izumi-Yamamoto K, Iizuka Y, Shirota M, Nagase M, Fujita T, Gotoda T.

[学会発表](計 1 件)

日本動脈硬化学会年次学術集会 (2012 年度)
Identification of SLC22A18 as a regulator of fat accumulation in the liver

Takashi Yamamoto, Midori Shirota, Yoko Iizuka, Toshiro Fujita, Takanari Gotoda

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山本隆史

研究者番号 : 00572033

(2)研究分担者 なし