

令和元年5月7日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06865

研究課題名(和文)近縁系統マウスを用いた高中性脂肪・低HDLコレステロール血症の原因遺伝子の同定

研究課題名(英文)Causing gene of dyslipidemia in mouse substrains

研究代表者

小林 美里 (Kobayashi, Misato)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：20456586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：C3H由来のマウスの中に高トリグリセリド血症および低HDLコレステロール(HDL-C)血症を呈するマウス(C3H-S)を見出し、このC3H-Sマウスの脂質異常症の原因遺伝子を探索した。C3H-Sマウスと正常な血中脂質濃度を示すC57BL/6Jマウスとの交配群において、原因遺伝子の存在する染色体領域をマウス第2番染色体上に同定した。この染色体領域をC3H-Sの遺伝子型で保有すると、トリグリセリド値が高値、HDL-Cは低値、リン脂質は低値を示すことを明らかにした。候補遺伝子Aの肝臓、脂肪組織における発現レベルと血中脂質濃度が強く関連することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質異常症には様々なタイプが含まれる。本研究で用いたモデルマウスでは、高トリグリセリド血症、低HDLコレステロール血症を呈する。このいずれも動脈硬化、さらには心血管疾患のリスクを高める因子である。このモデルマウスでの解析から、今回の候補遺伝子Aは血中のトリグリセリド、HDLコレステロールを1つの遺伝子が制御していることを明らかにした。このモデルでの脂質異常症の発症機構を解析することで、ヒトにおける脂質異常症の発症機構の解明、さらには治療のターゲットとしての情報を提供することができると考えている。

研究成果の概要(英文)：I found the dyslipidemia mouse model in one of C3H substrains (C3H-S). C3H-S showed hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol. I searched for a causing gene of dyslipidemia in C3H-S mice. Using F2 intercross mice between C3H-S and control mice (C57BL/6J), I identified that the causing gene existed in mouse chromosome 2. Mice with the C3H-S genotype in this region was higher triglyceride, lower HDL-cholesterol, and lower phospholipids than those in C57BL/6J genotype. The gene expression of candidate gene A was associated with dyslipidemia.

研究分野：栄養生化学

キーワード：脂質異常症 高トリグリセリド血症 低HDLコレステロール モデルマウス 原因遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本人の死因第1位はガン、それに続く第2位は心疾患(心筋梗塞など)で約19万7千人、第4位には脳血管疾患(脳卒中など)で11万4千人である(平成26年人口動態統計 厚生労働省)。この心疾患や脳血管疾患は動脈硬化性疾患であり、脂質異常症や糖尿病、高血圧がその危険因子である。脂質異常症には、高LDL-C(総コレステロール)血症、低HDL-C血症、高中性脂肪(TG)血症が含まれ、いずれも動脈硬化性疾患を引き起こす。また、糖尿病やメタボリックシンドロームで見られる高TG血症かつ低HDL-C血症が、動脈硬化性疾患を招くことが注目されている。

### 2. 研究の目的

我が国の死因の約25%を占める動脈硬化性疾患の発症には、脂質異常症が強く関与する。また、糖尿病やメタボリックシンドローム患者では、高TG血症に加えて低HDL-C血症が見られ、動脈硬化易発状態である。

近交系統C3Hマウスの亜系統であるC3H-Sマウスが高TG血症かつ低HDL-C血症を示すことを見出し、C3H-Sに近縁の亜系統のC3H-Cマウスが正常血中脂質濃度を示すことも見出した。両系統は極めて近縁なことから、C3H-Sの高TG血症は単一遺伝子の変異によると考えられる。本研究では、C3H-Sマウスの高TG血症と低HDL-C血症の両方を支配する原因遺伝子を同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 実験1: 脂質異常症のC3H-Sと正常系統のC3H-CおよびB6マウスでの血中リポタンパク質代謝関連形質の差異について

C3H-Sマウスと正常系統であるC3H-CとB6マウスを一晩絶食させ、オリーブ油を経口投与した。経口からオリーブオイルを投与することにより、消化管から血中へのトリグリセリドの取り込みに差があるのかを検討した。また、C3H-SとC3H-Cとを通常食、高脂肪食(ラード30%含有)で6週齢から8週間飼育して、飼料組成の違いによって、血中脂質濃度が変化するかどうかを検討した。

#### 実験2: C3H-SとC3H-Cとの近縁系統間でのエキソーム解析による原因遺伝子の探索

血中脂質異常を呈するC3H-Sとブリーダーのみが異なる近縁系統のC3H-CのゲノムDNAを抽出し、エキソーム領域のみの配列を解読するエキソーム解析を試みた。このエキソーム解析の結果から、2系統間で異なるSNPの中でアミノ酸置換あるいはストップコドンなどの遺伝子の機能に大きな変化を及ぼす変異を抽出することとした。この変異を有する遺伝子がC3H-Sのみで見られた場合、その遺伝子が脂質異常症の原因遺伝子として同定できると考えた。

#### 実験3: C3H-SとB6との間のF2交雑群における血清脂質濃度の遺伝解析

遺伝解析を行うために用いたF0世代のC3H-Sは、正常対照系統のB6マウスに比べて、血清TGが高値を示し、血清HDL-Cは低値を示した。この2つの系統から、C3H-Sを雌としてB6を雄として交配した(C3H-S×B6)F2、またB6を雌としてC3H-Sを雄として交配した(B6×C3H-S)F2の交雑群を作出して、雄のみを100個体ずつを解析に用いた。そのF2の雄個体の血中TG濃度を測定して、その各交雑群から、高TG個体の15個体、低TG個体の15個体からゲノムDNAを抽出して、血中TG濃度と連鎖する染色体領域を探索した。

また、そこから得られた染色体領域をさらに詳細に解析するために、F2全個体のゲノムDNAを用いて、血中TGおよびHDL-C、総コレステロール(TC)、リン脂質(PL)との関連についても調査した。

#### 実験4: 候補遺伝子の血清脂質レベルとの関連

実験3で限局された候補領域内で候補遺伝子を抽出した。候補遺伝子の肝臓における発現量、酵素活性について検討した。また、F2マウスの高TG個体と低TG個体でのその発現量との関連についても調査した。

### 4. 研究成果

#### 実験1:

C3H-Sの小腸からの脂質吸収能はB6より高く、血清TGクリアランスはC3H-Sで遅延していた。しかし、C3H間の比較ではクリアランスのみが遅延していたことから、B6とC3H-Sとの間の解析では、高TGの単一劣性と推定される原因遺伝子に加えて、別の遺伝子の関与が示唆された。また、C3H-Sは血清VLDL-TG濃度が高値を示すが、肝臓からのVLDL放出量は関与していないことが示された。一方で、リポタンパク質代謝に関与する血中リパーゼ活性は、Hepatic lipase活性のみが低下していたためその要因を検討したが、mRNAレベルではリパーゼ活性を説明できなかった。

C3H-SとC3H-Cマウスについては、通常食で実験開始時の6週齢ですすでに有意な差が観察

され、2週間ごとに血中 TG 濃度を測定したが、2 系統の値は維持されたまま、8 週間で大きな変動は見られなかった。高脂肪食摂取においても C3H-S の血中 TG 濃度は通常食と比べて変化がなかった。このことから、C3H-S の高 TG 血症はすでに 6 週齢から生じており、飼料組成に関わらず生じることが明らかとなった。そこで、以降の実験では通常食の摂取下で行うこととした。

#### 実験 2 :

当初、C3H-S と近縁な正常系統 C3H-C との間でのエキソーム解析によりエキソン上の変異を検出して、その変異を有する遺伝子が有力な原因遺伝子となると想定していた。しかし、実際に C3H-S と正常系統 C3H-C のゲノム DNA を用いて、エキソーム解析を行ったところ、次世代シーケンシングで解読した配列の精度が低かった。次世代シーケンシングでは C3H-S と C3H-C との間でのエキソン上の多型は予想したよりも多く検出され、その多型を確認するためダイレクトシーケンシングを 10 遺伝子について行ったが、いずれも解読精度が低く、偽多型として検出されていることが判明した。そのため、C3H-S と C3H-C との間での近縁系統間での多型・変異に注目した原因遺伝子の同定は困難だと判断した。そこで、遺伝的に遠く遺伝情報が豊富な B6 マウスを用いた遺伝解析を行うことに実験系を変更した。

#### 実験 3 :

C3H-S と B6 マウスから作出した F2 個体の高 TG の選抜個体での原因遺伝子の探索において、第 2 番染色体上の D2Mit226 近傍が検出された。そこで、F2 全個体での解析を行ったところ、この領域を C3H-S のゲノムで保有する場合に、高 TG、低 HDL-C、低 TC、低 PL を示すことが明らかとなった。また、この染色体領域と各形質との相関を見たところ、D2Mit226 の C3H-S 染色体領域は低 HDL-C、低 TC、低 PL 値との間で強い相関が見られ、高 TG 値との相関よりも強いものであることがわかった。また、主成分分析により、F2 マウスの血中の HDL-C、TC、PL の濃度を制御する主たる遺伝子が D2Mit226 近傍に存在することが明らかとなった。

#### 実験 4 :

実験 3 から限局された染色体領域に存在する候補遺伝子 A を選抜し、高 TG・低 TC 血症との関連を検討した。候補遺伝子にコードされるタンパク質 A の活性は、C3H-S では C3H-C と比べて有意に低値を示し、組織の mRNA 発現レベルも低値を示した。

F2 の高 TG 群においてもその活性と mRNA レベルは低値を示した。この脂質異常症の C3H-S が示す候補遺伝子 A の mRNA レベルと活性の低値の要因として、エキソン領域と転写開始点から約 4 kbp 上流の配列を検討した。しかし、この領域に変異は確認されなかった。今後は、mRNA レベルと活性の変動要因を明らかにするため、C3H 間で遺伝子発現制御部位の探索を行う必要がある。

当初は C3H-S の高 TG 血症、低 HDL-C の原因遺伝子を探索したが、マウス第 2 番染色体の D2Mit226 近傍に存在する 1 つの遺伝子 A の発現低下により、低 HDL-C、低 TC、低 PL 血症が起こり、その結果として高 TG 血症が誘導されている可能性が高まった。すなわち、1 つの遺伝子がリポタンパク質代謝の変化を介して、各血中脂質濃度を制御していると考えられた。

本研究の成果は、リポタンパク質代謝を介した脂質異常症の発症のメカニズムの解明に貢献でき、この候補遺伝子が脂質異常症の治療ターゲットとしても期待できるのではなかないと考えている。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

坪内 宏樹、小林 美里、村井 篤嗣、堀尾 文彦

高トリグリセリド血症モデル C3H マウスのリポタンパク質代謝の解析、第 72 回日本栄養・食糧学会大会、2018/5/12

坪内 宏樹、石井 玲佳、石川 明、村井 篤嗣、堀尾 文彦、小林 美里

高トリグリセリド・低 HDL コレステロール血症マウスの遺伝解析による原因遺伝子の探索、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019/3/27

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~anutr/>

## 6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：堀尾文彦

ローマ字氏名：Horio Fumihiko

研究協力者氏名：大野民生

ローマ字氏名：Ohno Tamio

研究協力者氏名：石川 明

ローマ字氏名：Ishikawa Akira

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。