

平成30年6月12日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14599

研究課題名（和文）脂肪細胞を分別的に集積させる手法の開発

研究課題名（英文）Genetic approaches for controlling site-specific fat depositions in mammals

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、実験動物「マウス」を用いて、哺乳動物の皮下や腹腔内の特定部位に脂肪を蓄積する機能を持つ遺伝子群の同定と、それらの発現操作による脂肪蓄積統御法の確立を目指すものである。研究期間中に、MSM/Ms系統（MSM）とC57BL/6J（B6）系統から樹立されたコンソミック（染色体置換）系統群を利用して、脂肪蓄積関連表現型を指標とした新たな交配系統の作製、複数の組織試料の収集、遺伝子発現解析や情報解析などを行い、脂肪蓄積の系統差に関与すると考えられる複数の候補遺伝子を確認した。本研究から得られた結果を活用して、哺乳動物の脂肪蓄積の能動的制御に向けた研究が、より容易に進展すると期待している。

研究成果の概要（英文）：In mammals, energy metabolism-related traits including site-specific fat depositions are governed by complex genetic and environmental factors. In this study, we intend to uncover the genetic determinants that control site-specific fat depositions with mouse inter-subspecific consomic strains, B6-ChrNMSM. At first we conducted generating double consomic strains using several consomic strains that have specific features of site-specific fat depositions. We also conducted the analysis of gene expression profiles from fat-deposition related tissues of several designated consomic strains. In this study, we have succeeded generate founder animals of several double consomic strains, and found some candidate genes that are relevant to site-specific fat depositions. We expect that the results of this project would useful for the study of finding important genes for genetically controlling site-specific fat depositions in mammals.

研究分野：哺乳類遺伝学

キーワード：疾患モデル 摂食行動 肥満

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞の過剰な蓄積である肥満症は、メタボリックシンドロームの基盤となる重要な疾患であり、その原因は特に「内臓脂肪型」として表現される腹腔内への脂肪細胞の過剰な蓄積である。現在までに数十種以上の肥満関連遺伝子が報告されている (Albuquerque et al. Mol. Genet. Genomics 2015)。例えば、Wnt の 共同受容体である LRP5 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5) が、いわゆるナシ型、リンゴ型と呼ばれる体型に関連した脂肪蓄積に重要であることが報告されている (Loh et al. Cell Metab. 2015)。しかし、内臓脂肪や皮下脂肪といった大雑把な分類よりもさらに詳細な、例えば臓器の周りや、体内の限られた部位ごとの観察可能な領域に、分別的に起きる脂肪蓄積に関連した遺伝子の同定や、それらの発現制御システムについての知見は不足している。申請者はこれまでに、マウス汎用近交系である C57BL/6J(B6) を遺伝的背景にして、日本産野生マウス由来近交系 MSM/Ms(MSM) の各染色体を丸ごと 1 本ずつ置換して樹立した B6-MSM コンソミック系統パネルを活用して、エネルギー代謝に関連した大規模表現型解析を行った結果から、臓器の周りや、部位ごとに脂肪蓄積を制御する遺伝システムが存在する可能性を示した (Takada et al. Genome Res. 2008)。この体内の任意の特定部位に「脂肪を分別して蓄積する」遺伝的メカニズムを解明し、これを利用して、例えば内臓脂肪に集積する脂肪を皮下に分散させることができれば、メタボリックシンドロームをはじめとした代謝疾患発症リスクを軽減できるなど、基礎医学研究に貢献できると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が提唱する「体内の任意の特定部位に脂肪を分別して蓄積する遺伝的メカニズムが存在する」という仮説を実験動物「マウス」のユニークな交配系などを用いて検証する。特に哺乳動物の皮下や内臓の特定部位への脂肪細胞蓄積を制御する遺伝子群の同定や、それら遺伝子の発現を人為的に操作することで、肥満症に繋がる脂肪蓄積を制御する方法論の確立につなげるための端緒となるデータを得ることを目的とした。なお、本研究開始当時から現在にいたるまで、多くの研究グループが遂行している、体内に分布する脂肪幹細胞の探索や、幹細胞からの脂肪細胞分化のメカニズムの解明を目指すものではない。

3. 研究の方法

本研究では、「モデル動物を用いて体内の任意の特定部位（皮下や内臓など、臓器の周りや、部位ごと）に分別的に生ずる脂肪蓄積を制御する遺伝子群の同定」と「複数の遺伝子改変を利用した脂肪蓄積の遺伝的制御法

の確立」に挑戦するため、以下に示す萌芽的な研究を行う。

1) 脂肪蓄積制御遺伝子とそれらの相互作用を研究するためのダブルコンソミック系統の作製

本研究では、まず脂肪蓄積に特徴のある複数の B6-MSM コンソミック系統を対象にして、臓器の周りや、部位ごとの脂肪蓄積を制御する遺伝子、並びにそれらの相互作用の探索研究を進めるため、脂肪蓄積に関する特徴を指標としたダブルコンソミック系統の作製を行った。ダブルコンソミック系統の作製については、生殖腺周囲の内臓脂肪蓄積量が多い染色体 9 番置換コンソミック系統を軸にして、これを当該脂肪蓄積量の少ない 3 番、11 番および 15 番置換コンソミック系統にそれぞれ交配し、得られた産仔を B6 と MSM のゲノム多型マーカーによるタイピングによりモニタリングしながら系統作製を行った。

2) 脂肪蓄積制御への関与が考えられる候補遺伝子の発現解析

コンソミック系統群から収集した部位別の脂肪蓄積量をはじめとした各種表現型情報を基にして、脂肪蓄積制御の系統間差に関与すると考えられる複数の候補遺伝子を定量 PCR により解析した。解析には主に 10 週令のオス個体を使用した。対象とした組織は肝臓、白色脂肪および褐色脂肪など、生体のエネルギー代謝に重要な機能を持つものである。

3) 発現差を示す遺伝子とそのシス調節配列の多型情報の収集

これまでの解析などにより、脂肪分化などに重要な遺伝子で、コンソミック系統間において発現差があることが示唆されるものについては、発現差の原因シス制御配列候補を探索するため、エンハンサーの指標であるヒストン修飾部位など、遺伝子発現に重要な制御領域多型を ENCODE や国立遺伝学研究所のマウスゲノムデータベース (NIG_MoG; <http://molossinus.nig.ac.jp/msmdb/index.jsp>) など、公共のゲノム多型情報を利用して検索した。

4. 研究成果

1) 脂肪蓄積制御遺伝子とそれらの相互作用を研究するためのダブルコンソミック系統の作製

脂肪蓄積に特徴のある複数の B6-MSM コンソミック系統を対象にしたダブルコンソミック系統の作製については、生殖腺周囲の内臓脂肪蓄積量が多い染色体 9 番置換コンソミック系統を軸にして、これを当該脂肪蓄積量の少ない 3 番、11 番および 15 番置換コンソミック系統を使用し、B6 と MSM のゲノム多型マーカーによる遺伝的モニタリングを導入した親系統の作製を行った。研究期間内に、目的とする 3 種類のダブルコンソミック系統

のうち、2種の親系統が完成した。また、残りの1系統は、繁殖の困難性のため樹立が遅れたが、研究期間内にあと1歩で完成が見込めるところまで進展した(図1)。すなわち、複数の親動物(図中 Founder と記載したカラムの個体)のタイピング結果から、候補とな

		染色体3番					染色体9番					
Founder	Marker (#)	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6
1	B6-Chr3/9 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
2	B6-Chr3/9 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
3	B6-Chr3/9 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
4	B6-Chr3/9 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m

		染色体9番					染色体11番					
Founder	Marker (cM)	4	6	33	40	60	70	0	14	36	94	75
1	B6-Chr9/11 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
2	B6-Chr9/11 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
3	B6-Chr9/11 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
4	B6-Chr9/11 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m

		染色体9番					染色体15番						
Founder	Marker (cM)	4	6	33	40	60	70	0	9	13	22	50	66
1	B6-Chr9/15 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
2	B6-Chr9/15 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
3	B6-Chr9/15 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
4	B6-Chr9/15 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
5	B6-Chr9/15 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
6	B6-Chr9/15 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
7	B6-Chr9/15 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
8	B6-Chr9/15 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
9	B6-Chr9/15 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
10	B6-Chr9/15 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
11	B6-Chr9/15 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
12	B6-Chr9/15 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
13	B6-Chr9/15 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
14	B6-Chr9/15 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m
15	B6-Chr9/15 ^{MSM}	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m

図1 ダブルコンソミック系統のマーカ情報と親個体の遺伝子型

る染色体について、約 20cM の間隔で設置したマーカーの遺伝子型は、目的とする MSM の遺伝子型になっていることを確認し、計画したダブルコンソミック系統が、致死やこれに準じた致命的な表現型を示さず、本研究が目的とする脂肪蓄積をはじめとした表現型収集に利用できることを確認した。染色体9番および11番を置換したダブルコンソミック系統については、もう1歩で完成できるところまで来ているので、本研究をきっかけとして樹立した系統として、今後の完成を目指した作製を継続して行っている。なお、図1には各ダブルコンソミック系統の作製に使用したマーカーの遺伝的距離(cM)および数について示しているが、樹立した系統ごとに、解析個体を生産するための親個体については、高精度なDNAの高速 Genotyping 解析が可能なアジェナバイオサイエンス社の MassARRAY (マスアレイ) システムを利用して、さらに詳細な遺伝子型を確認する。

2) 脂肪蓄積制御の関与が考えられる候補遺伝子の発現解析。

これまでに収集したコンソミック系統群の部位別の脂肪蓄積量をはじめとした各種表現型情報や、遺伝子発現解析の結果から得られた情報を組み合わせて、複数の遺伝子改変を行うための候補遺伝子の探索を行った。

例として脂肪蓄積に特徴のある複数コンソミック系統の肝臓を用いて、エネルギー代謝に重要な遺伝子の定量PCR法による発現解析の結果を図2および図3に示す。なお、実験は遺伝子1種類について2種類のプライマーセットを用いて解析を行った。また、コントロールとしてコンソミック系統の遺伝的

背景となっている B6 も解析に用いた。各遺伝子の発現量は、B2m; beta-2-microglobulin を内在性コントロールとして測定した。図2の候補遺伝子1は胆汁酸の合成に関わる機能

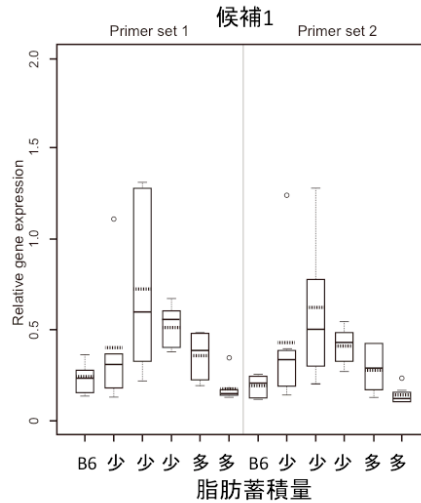


図2 脂肪蓄積に特徴的な複数コンソミック系統における候補遺伝子1の発現動態

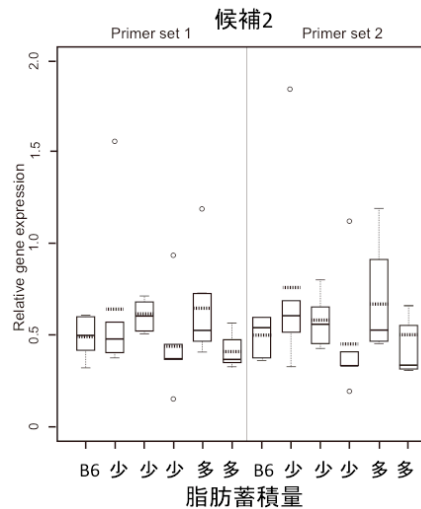


図3 脂肪蓄積に特徴的な複数コンソミック系統における候補遺伝子2の発現動態

を持つタンパク質をコードするが、脂肪蓄積量の少ない系統では発現量が高く、脂肪蓄積量の高い系統では低い傾向があった。特に、内臓脂肪の中でも腎周囲の蓄積量が少ない系統ではいっそう発現量が高くなっていることから、今後はこの発現動態をコントロールすることで部位別の内臓脂肪蓄積量もコントロールできる可能性が示唆された。図3の候補遺伝子2はグリセロール合成に関わる機能を持つタンパク質をコードするが、脂肪蓄積量の多い系統では発現量が高く、脂肪蓄積量の低い系統では低い傾向があった。この遺伝子は候補遺伝子1とは逆に、内臓脂肪の中でも異所的な蓄積量が多い系統で発現量が高くなっていることから、この発現動態を低下させることで異所的な内臓脂肪蓄積量を低下させうる可能性があることを示唆した。

3) 発現差を示す遺伝子とそのシス調節配列の多型情報の収集

図2および3で示した遺伝子など、脂肪蓄積制御の系統間差に関与すると考えられる複数の候補遺伝子について、同定可能なすべての遺伝子のアミノ酸置換などの情報を B6 と MSM のゲノム多型データベースである NIG_MoG

(<http://molossinus.nig.ac.jp/msmdb/index.jsp>) や、エピゲノム情報などを搭載している ENCODE 等のパブリックデータベースを参照してリスト化した。これらの情報は、分別した脂肪蓄積と相関を示す複数の遺伝子の基盤情報として、今後の研究を進展させるために活用する。本研究では上記の結果以外にも、NGS 解析等による解析に使用するための組織の収集と保管も進めた。

本研究により、1本の染色体を置換したコンソミック系統に加えて、2本の MSM の染色体と B6 の遺伝的背景の相互作用を観察できる複数のダブルコンソミック系統の樹立に目処がたった。これらを利活用した解析により、異なる染色体の MSM アレルの相互作用も考慮して、脂肪蓄積の詳細な解析を行うことが可能になった。本研究ではダブルコンソミック系統を使用し、大規模な表現型解析を行うまでには至らなかったものの、申請者は当該テーマに対する継続した研究を行っており、今後厳密な脂肪蓄積量の変化や血液パラメータを確認する予定である。また、解析対象となっている 3、9、11 および 15 番染色体コンソミック系統との表現型の差についても、別のパラメータの測定も視野に入れて解析することを予定している。

以上、2年間の研究期間では、残念ながら特定部位の脂肪蓄積の制御に関わる因子や、具体的なメカニズムの同定までは研究を進めることができなかった。しかし、特定部位の脂肪蓄積の制御に関わる候補因子群や、本研究で樹立した複数のコンソミック系統由来の解析系統群を活用して、今後は体内の局所的な脂肪蓄積制御に関わる遺伝システムの解明が、より容易に進めることができるものと期待している。

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 2 件)

1) Kawano S, Fujisawa H, Takada T, Shiroishi T. Sparse principal component regression for generalized linear models. Computational Statistics & Data Analysis 124, 180-196, 2018.

2) Simecek P, Forejt J, Williams RW, Shiroishi T, Takada T, Lu L, Johnson TE,

Bennett B, Deschepper CF, Scott-Boyer MP, Pardo-Manuel de Villena F, Churchill GA. High-Resolution Maps of Mouse Reference Populations. G3 (Bethesda) 7, 3427-3434, 2017.

[学会発表] (計 4 件)

1) 高田豊行、近藤伸二、矢坂 拓、阿部貴志、清澤秀孔、鈴木 穰、豊田 敦、藤山秋佐夫、城石俊彦、エネルギー代謝表現型の亜種間差に関わる遺伝子発現動態の探索、日本遺伝学会 第 88 回大会、2016 年 9 月 7-10 日、三島

2) 高田豊行、福多賢太郎、野口英樹、豊田敦、山崎由紀子、藤山秋佐夫、城石俊彦、マウス野生由来系統群「ミシマバッテリー」のゲノム解読と 体質関連遺伝子探索への利用、第 63 回日本実験動物学会総会、2016 年 5 月 18-20 日、川崎

3) 高田豊行、城石俊彦、日本産野生由来マウス系統 MSM/Ms を用いた多因子肥満症の遺伝解析、第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2017 年 2 月 10-11 日、横浜

4) 高田豊行、ミシマバッテリーを利用した体質関連遺伝子探索、モロシヌス研究会 2017 年 6 月 23-24、熊本

[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]

なし

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