

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09867

研究課題名(和文) 脂肪蓄積関連遺伝子産物SLC22A18の機能調節分子の探索

研究課題名(英文) A search for molecules that regulate the function of Slc22a18, an orphan transporter associated genetically with 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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームの主因である内臓脂肪蓄積に関連する分子として見出したSLC22A18はトランスポーターの一種であり、発現系を用いた取込み実験やメタボローム解析を駆使してその内因性基質となる物質を探索した。遺伝子改変動物や培養細胞における実験結果を踏まえるとビリルビンがもっとも有力な基質候補物質と考えられたが、SLC22A18単独の発現系を用いた取込み・排出実験の結果は必ずしもその仮説に合致せず、生体においてSLC22A18が正常に働くためには他の分子の存在が必要である可能性も考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、メタボリックシンドロームの成因的基盤である内臓脂肪蓄積に関連する分子であるSLC22A18の機能を調節する分子の同定にある。今回の結果は、ビリルビンの関与を強く示唆するものであったが、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。

研究成果の概要(英文)：We have previously identified SLC22A18 as a key molecule related to visceral fat accumulation, a major underlying cause of the Metabolic Syndrome. In the current study, we searched for physiological intrinsic substrates for SLC22A18 as a possible transporter by integration of the results of both uptake experiments with overexpressing cells and metabolome analyses. According to the results obtained with both genetically engineered animals and cultured cells, bilirubin was thought to be the strongest candidate substrate, but the overall results with overexpression of SLC22A18 alone did not support this hypothesis, indicating other possibilities such as possible involvement of another molecule required for normal function of SLC22A18 in vivo.

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 内臓脂肪蓄積 トランスポーター SLC ビリルビン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) メタボリックシンドロームは、内臓脂肪蓄積を成因的基盤として血糖・脂質・血圧の異常など心血管リスク因子が重複する病態であり、動脈硬化性の心疾患や脳血管疾患の原因となる。過栄養や運動不足により引き起こされる体重増加は、日本人では欧米人に比べて内臓脂肪蓄積に反映されやすいことが知られており、蓄積した(内臓)脂肪では炎症性のサイトカインの産生増加や善玉サイトカインであるアディポネクチンの産生低下などが生じる。そして、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へと連鎖する。そのため、欧米諸国に比べて高度な肥満が深刻な社会問題となっていないわが国においても、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蓄積の成因を解明することが重要となる。

(2) 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動物として知られているが、同時に高インスリン血症や耐糖能異常、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を呈する。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SHRの遺伝解析を行い、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ている。

(3) 次に、われわれはSlc22a18欠損マウスを作製し、同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く、ob/obマウスとの交配下では精巣周囲脂肪重量が有意に減少することを見出し、さらに、脂肪組織特異的なSlc22a18発現トランスジェニックマウスでは精巣周囲脂肪細胞の大きさが増大し脂肪重量が増加することを確認している。

(4) また一方、SLCトランスポーターファミリーに属するSLC22A18の内因性の基質候補物質の探索に向けた予備的検討を行い、ビリルビンを基質候補物質の一つとして同定している。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの基盤で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、その遺伝子改変マウスの解析を通じてSLC22A18が内臓脂肪蓄積に関与することを明らかにした。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を最終目的として、本研究においてはSLC22A18の機能調節物質の同定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) アデノウイルス発現系を用いたビリルビンのin vitro取込み測定系による実験

(UnaG発現アデノウイルス, HA-tagged UnaG発現アデノウイルス): ニホンウナギ由来の蛍光タンパクUnaG(Cell. 2013 Jun 20; 153:1602-11)のコーディング領域をpENTR4にクローニングし、HA-tagged UnaG発現ベクターをpcDNA3にて作製後、HA-tag及びUnaGのコーディング領域をpENTR4にサブクローニングした。相同組換えによりpENTR4よりpAd/CMVに乗せ換えた。

(doxycycline誘導性Slc22a18発現アデノウイルス): ラットSlc22a18のコーディング領域をpTETOnにクローニングし、Tet-On 3GトランスアクチベーターとそのpolyA signal、テトラサイクリン応答因子配列下に連結したラットSlc22a18とそのpolyA signal、これらすべてを含む領域をpENTR4にクローニング後、相同組み換えによりpAd/PLに乗せ換えた。これらのアデノウイルスベクター(pAd/CMV, pAd/PL)は293A細胞にトランスフェクションし組換えアデノウイルスを作製した。大量産生したウイルスは塩化セシウムによる密度勾配遠心法で精

製後、透析により塩化セシウムを除いた後、使用時まで-80 に保管した。

(H2.35 細胞におけるビリルビンの取り込み実験): H2.35 細胞を 12 well plate に 8×10^4 cells/well で播種し、2 日後に UnaG 発現アデノウイルスと doxycycline 誘導性 Slc22a18 発現アデノウイルスを感染させた。翌日、アルブミン(final conc 50 μ M)及びビリルビン(final conc 0, 0.17, 1.7 あるいは 17 μ M)を DMEM 培地 (FBS なし, 1% Penicillin-Streptomycin solution) に添加し、37 で遮光して 1 時間以上インキュベーションしてから、元の培地と交換した。このとき Slc22a18 誘導群については 1 μ g/mL になるよう培地中に doxycycline を添加した。24 時間経過したのち、細胞を PBS(-)で洗浄、0.5% Nonidet P-40 を加え 10 分間室温で振とうした。ライセートは 15000 rpm 4 10 分で遠心分離し、上清を蛍光強度の測定 (ex 485 nm, em 535) 及びタンパク濃度の測定(BCA 法)に供した。

(UnaG 発現量の確認): H2.35 細胞 (7.5×10^6 cells/cm dish) に HA-tagged UnaG 発現アデノウイルスと doxycycline 誘導性 Slc22a18 発現アデノウイルスを感染させた。翌日、doxycycline を 1 μ g/mL になるように培地中に添加、24 時間培養後、細胞を回収しタンパクを抽出した。タンパク液は SDS-PAGE (10% ゲル)で分離後、抗 HA 抗体及び抗 Slc22a18 抗体でウェスタンブロットを行った。

(細胞内ビリルビン濃度の測定 シカリキッドを用いた測定方法): H2.35 細胞に doxycycline 誘導性 Slc22a18 発現アデノウイルスを感染させ、その翌日アルブミン(final conc 50 μ M)およびビリルビン(final conc 17 μ M)を DMEM 培地 (10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin solution) に添加し、37 で遮光して 1 時間以上インキュベーションしてから、元の培地と交換した。この時、Slc22a18 誘導群については 1 μ g/mL になるよう培地中に doxycycline を添加した。24 時間経過後、細胞を PBS(-)で洗浄してから水に溶解し、-80 で凍結保存した。ビリルビンの抽出は極力遮光して以下処理で行った。ガラス管に細胞溶解液 (0.4 mL) にクロロホルム:メタノール(2:1)液 (1.5 mL) を加えボルテックスし、室温で 1 時間インキュベーションした。クロロホルム(0.5 mL)を加えてボルテックス後、水(0.5 mL)を加えてボルテックスし、3000 rpm 10 分室温で遠心分離した。有機層を回収し、遮光下でガラス管に窒素を吹き付けながら 60 で溶媒を揮発させた。脂質のペレットに 0.2N NaOH を加え溶解後、等量の 0.2N HCl を加えて中性化した。サンプル中のビリルビン濃度の測定はシカリキッド T-BIL を用いた。細胞溶解液中の DNA 濃度の測定はゲノム DNA を抽出後、Quant-iT dsDNA Assay Kit を用いて行った。細胞溶解液中のタンパク濃度の測定は BCA 法で行った。タンパクはウェスタンブロットによる Slc22a18 の共発現の確認にも用いた。

(2) アフリカツメガエル Oocyte を用いたビリルビンの in vitro 取込み測定系による実験

ラット Slc22a18 およびヒト OATP-C (ビリルビンを基質とする既知のトランスポーター) の cRNA は、これらの cDNA を含むプラスミド (それぞれ pcDNA3.2 及び pcDNA3.1(+)) を直鎖状にした後、鋳型として T7 RNA ポリメラーゼを用いた in vitro 転写により得た。cRNA (25 ~ 50 ng) あるいは精製水を卵母細胞に注入し、18 でインキュベーションした。2 ~ 3 日の培養後、RI 標識のビリルビンの取込み及び排出実験を行った。取込み実験では cRNA あるいは精製水を注入した oocyte についてビリルビンを含む buffer で 60 分インキュベーションし、取込まれたビリルビンのカウントを測定した。排出実験では cRNA あるいは精製水を注入した oocyte にビリルビンを注入後、15 分ないし 60 分インキュベーションし、排出されたクロロキンおよび oocyte 内に残っているビリルビンのカウントを測定した。卵母細胞におけるラット Slc22a18 のタンパク発現は、cRNA の注入後、3 日間培養し抽出したタンパクサンプルを抗 Slc22a18 抗体によるウェスタンブロットにて確認した。

(3) ビリルビン以外の Slc22a18 の生理的内因性基質の探索

メタボローム解析は Human Metabolome Technologies 社に依頼して行った。普通食下で飼育した 9 週齢の雄の野生型マウス及び Slc22a18 ホモ欠損マウス各 3 匹について 4 時間絶食ののち解剖し、肝臓を採取し直ちに液体窒素にて凍結した。また同週齢の野生型 C57BL/6J 雄マウスについて Slc22a18 発現抑制アデノウイルスあるいは doxycycline 誘導性 Slc22a18 発現アデノウイルスを接種後 6 日目に解剖、肝臓を採取し直ちに液体窒素にて凍結した(各群 2 匹)。Slc22a18 の誘導は解剖の 24 時間前より doxycycline (1mg/mL) の飲水投与により行った。採取した検体は -80 °C にて保管後、解析に供した。

(4) 基質候補物質としてのクロロキンに関する検討

ラット Slc22a18 及び Flag-tagged PfCRTDd2(クロロキンの既知のトランスポーター)の cRNA はこれらの cDNA を含むプラスミド(それぞれ pcDNA3.2 及び pcDNA3.1(+))を直鎖状にした後、鋳型として T7 RNA ポリメラーゼを用いた in vitro 転写により得た。cRNA (25~50 ng) あるいは精製水を卵母細胞に注入し、18 時間でインキュベーションした。2~3 日の培養後、RI 標識のクロロキンの取込み及び排出実験を行った。取込み実験では cRNA あるいは精製水を注入した oocyte についてクロロキンを含む buffer で 60 分インキュベーションし、取り込まれたクロロキンのカウントを測定した。排出実験では cRNA あるいは精製水を注入した oocyte にクロロキンを注入後、60 分インキュベーションし、排出されたクロロキンおよび oocyte 内に残っているクロロキンのカウントを測定した。

4. 研究成果

(1) アデノウイルス発現系を用いたビリルビンの in vitro 取込み測定系による実験結果

ヒト GWAS の結果(Hum Mol Genet. 2009 Jul 15; 18(14): 2700-2710)から SLC22A18 の基質候補の一つとしてビリルビンに注目し、すでに予備的実験において Slc22a18 欠損マウスにビリルビンを経静脈的に投与しビリルビンの血中クリアランスの低下を確認したため、本研究では最初にビリルビンの取込み実験系の構築と評価を行った。ビリルビンと特異的に結合し蛍光を発する蛋白(UnaG)がすでに知られているため、細胞内の UnaG-ビリルビン複合体の蛍光強度の測定により in vitro におけるビリルビン取込みの間接的な評価が可能と考えた。まず、UnaG 発現アデノウイルスを H2.35 細胞に発現させ、その細胞溶解液の蛍光強度が培地添加ビリルビン依存的に増加することを確認した。次に、doxycycline 誘導性の Slc22a18 発現アデノウイルスを作製し H2.35 細胞に UnaG と共発現させたところ、生理的な濃度のビリルビン存在下において Slc22a18 発現群で蛍光強度が増加することを確認した。また H2.35 細胞において Slc22a18 発現誘導の有無下で UnaG 発現量の変動をウェスタンブロットで評価した結果、Slc22a18 発現誘導は UnaG タンパク量自体には影響を与えないことを確認した。また、doxycycline 誘導性の Slc22a18 発現アデノウイルスを H2.35 細胞に発現させビリルビン存在下で培養したところ、Slc22a18 発現群では、UnaG を利用する方法とは異なる測定方法でも DNA 量やタンパク量で補正後の細胞内ビリルビン含量が増加することを確認した。

以上の結果より、間接的ではあるが、Slc22a18 が in vitro において細胞内へのビリルビンの取り込みを増加させることが示唆された。

(2) アフリカツメガエル oocyte を用いたビリルビンの in vitro 取込み測定系による実験結果

アフリカツメガエル卵母細胞(oocyte)を用いた Slc22a18 の強発現系を構築し、トリチウム標識したビリルビンの取り込みを評価した。まず、Slc22a18 cRNA を作製し oocyte に注入後ウェスタンブロットにより Slc22a18 の強発現を確認した。また、ビリルビンを基質とする OATP-C

の強発現群に対してトリチウム標識ビリルビンを添加し、放射線量の上昇を確認した。次に、Slc22a18 の強発現下でトリチウム標識ビリルビンを培養液に加えて oocyte 中の放射線量を測定したが、予想に反して有意な放射線量の上昇を認めず、Slc22a18 単独発現下でビリルビンが直接の基質となる可能性は低いことが示唆された。さらに、Slc22a18 を発現させた oocyte 内にトリチウム標識ビリルビンを注入してビリルビンの排出実験も行ったが、培地中に排出あるいは細胞内に残存する放射線量にも対照と差がなく、Slc22a18 は排出経路においてもビリルビンを基質とする可能性が低いことが示唆された。

(3) ビリルビン以外のSlc22a18の生理的内因性基質の探索

SLC トランスポーターはイオン性物質を基質とすることが多いため、その網羅的検出に優れた CE-TOFMS 法によるメタボローム解析を行った。まず、一次解析として、普通食で飼育した 9 週齢のオスの野生型マウスと Slc22a18 欠損マウス、および一過性の Slc22a18 発現誘導モデルマウスと発現抑制モデルマウスの計 4 群のマウスの肝臓について解析を行ったところ、89 物質（陽イオン物質 50、陰イオン物質 39）が同定された。また、Slc22a18 欠損および野生型マウス各 3 匹の肝臓抽出物のメタボローム解析を行った二次解析では、統計学的に有意であったものは 3 化合物（アルギニン、Gly-Leu、IMP）のみであった。これらの化合物は欠損マウス/野生型マウス比が 0.7、0.8、1.3 と変化量が小さく、また、一次解析における結果と一致した挙動を示すものは認められなかった。また、欠損マウス/野生型マウス比が最小(0.12)、最大(2.4)の化合物として cholic acid および isethionic acid を認めたが、これら化合物は群内におけるばらつきが大きく統計学的な有意差は認められなかった。

(4) 基質候補物質としてのクロロキンに関する検討

既報の実験結果によりSlc22a18の基質候補物質としてクロロキンが報告されている。そこで、oocyteを用いてわれわれが確立したSlc22a18の強発現系を利用して、クロロキンの取り込みと排出実験を行ったが、既報の結果とは異なり、Slc22a18の発現はクロロキンの取り込みと排出のいずれにも影響を与えないという結果が得られた。

(5) 今後の展望

SLC22A18がトランスポーターであることと、遺伝子改変動物および培養細胞における一連の実験結果を踏まえると、SLC22A18の基質候補物質であるビリルビンやクロロキンが直接の基質である可能性は低いという本研究の結果は想定外であった。しかし一方で、SLC22A18が正常に働くためには他の分子の存在が必要である可能性も考えられ、培養細胞やoocyteにおいてSLC22A18を単独で強発現させた場合に機能が保持されているのか否かの検証が今後必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Takanashi M, Kimura T, Li C, Tanaka M, Matsuhashi A, Yoshida H, Noda A, Xu P, Takase S, Okazaki S, Iizuka Y, Kumagai H, Ikeda Y, Gotoda T, Takahashi M, Yagyu H, Ishibashi S, Yamauchi T, Kadowaki T, Liang G, Okazaki H | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Critical Role of SREBP-1c Large-VLDL Pathway in Environment-Induced Hypertriglyceridemia of Apo AV Deficiency. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Arterioscler Thromb Vasc Biol | 6. 最初と最後の頁 373-386 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/ATVBAHA.118.311931 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Takashi Yamamoto, Takanari Gotoda | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 Polygenic Architecture of Common Severe Hypertriglyceridemia | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 J Atheroscler Thromb | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.ED133 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 山本隆史、飯塚陽子、藤田敏郎、後藤田貴也 |
| 2. 発表標題 キヌレン酸代謝系が糖代謝制御に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第55回日本臨床分子医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 山本隆史、飯塚陽子、藤田敏郎、後藤田貴也 |
| 2. 発表標題 キヌレン酸代謝系介入による糖代謝制御に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山本隆史, 飯塚陽子, 藤田敏郎, 後藤田貴也 |
| 2. 発表標題 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 |
| 3. 学会等名 第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takashi Yamamoto, Takanari Gotoda |
| 2. 発表標題 Genetic intervention in kynurenine pathway alters glucose metabolism in mice. |
| 3. 学会等名 The 79th Scientific Sessions, American Diabetes Association (ADA) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 後藤田貴也 |
| 2. 発表標題 栄養・代謝とエイジング |
| 3. 学会等名 第14回日本アンチエイジング歯科学会学術大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------|---|--------------------------------|----|
| 研究 分担 者 | 山本 隆史 (YAMAMOTO TAKASHI) (00572033) | 杏林大学・医学部・助教 (32610) | |