

平成 21 年 4 月 13 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590772
 研究課題名 (和文) 脂肪酸β酸化能を規定する遺伝子多型の特定とその結晶蛋白構造解析
 研究課題名 (英文) Characterization of a single nucleotide polymorphism that determine the capacity of fatty acid beta-oxidation and its 3D-conformation
 研究代表者
 西原 利治 (SAIBARA TOSHIJI)
 高知大学・教育研究部医療学系・准教授
 研究者番号：60145125

研究成果の概要:脂肪酸β酸化の律速段階を制御する遺伝子とその機能性遺伝子多型を特定し、脂肪酸のβ酸化能を in vivo で測定するために必要な手法を開発し、遺伝子多型に応じて肝臓における脂肪酸β酸化能に個体差が生じることも明らかにした。そこで野生型および変異型蛋白質を遺伝子組み換えにより作成した。これに反応する抗体を作成したところ、両者とも Wesaternblot で単一バンドとして検出され、細胞内では2量体として存在することが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：脂肪酸β酸化, 遺伝子多型, リパーゼ, 結晶解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の社会的景

近年の肥満人口の増に伴い、生活習慣病の側面を持つNASH(nonalcoholic steatohepatitis)の増加が著しい。NASHは内臓脂肪型肥満者に多く、インスリン抵抗性が強く、高血圧、2型糖尿病、高脂血症などメタボリックシンドロームに特徴的な異常を合併しやすいなどの臨床像が明らかになるにつれて、報告症例は増加の一途を辿り、今や米国成人の2-5%が罹患する慢性肝疾患である。本邦での成人の罹患率は未だ

1%弱に留まっているが、NASHの発症母地となる肥満者は年率4%、実数にして毎年100万人ずつ増加しており、今後、NASHの疾患概念の浸透と共に症例数の急増が予想される。10年間の経過で、2割の症例が潜行性に肝硬変に進展すると考えられており、本症は肝硬変や肝細胞癌の発生母地であり、本症に伴う肝細胞癌は1995年以前には極めて稀であったが、2004年には肝細胞癌の原因の2%を占めるまでに急増していることから、対策が急がれる。

(2) 研究の学術的背景

慢性関節リウマチやクローン病などの自己

免疫疾患や糖尿病などの代謝性疾患において、疾患感受性や人種的背景という概念が機能的遺伝子多型という遺伝子情報の形で実体化しつつある。多くの研究者は糖尿病、高血圧、脂質異常などに向けられているが、NASHの頻度はこれらの疾患と同等あるいはそれ以上であり、罹患者数が急増している現状、予後の重篤さを考慮すると、本症に対するこの方面からの研究は緊急性を有すると考えられる。

2. 研究の目的

本症は遺伝的背景を基に発症する疾患であり、遺伝的背景の持つ意味は大きい。従って、日本人あるいはアジア人の代謝疾患研究はわれわれ自身が行わなければ、最適の治療法を得ることは困難である。そのため、治療の分子標的となる候補蛋白を明らかにし、創薬を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 肝細胞における脂肪酸のβ酸化律速段階を制御する蛋白の遺伝子多型を特定する
- (2) 肝細胞における脂肪酸のβ酸化能を *in vivo* で測定するシステムを開発する
- (3) 脂肪酸のβ酸化律速段階を制御する蛋白を遺伝子組み換えにより作成する
- (4) 脂肪酸のβ酸化律速段階を制御する蛋白に対する抗体を得る
- (5) 機能解析により、機能的遺伝子多型であることを証明する
- (6) 脂肪酸のβ酸化律速段階を制御する蛋白の結晶解析を行う

4. 研究成果

- (1) 肝細胞における脂肪酸のβ酸化律速段階を制御する蛋白を同定し、その機能的遺伝子多型を特定した。この蛋白質の発現を増強することにより、脂肪酸β酸化能が亢進することを証明できれば、アゴニストの開発等創薬への道が開かれる。
- (2) 肝細胞における脂肪酸のβ酸化能を *in vivo* で測定するシステムを開発した。検討の結果、肥満者には脂肪酸β酸化能の亢進した症例と亢進の認められない症例の2群の存在が明らかになった。β酸化能の低い症例はベザフィブラートに反応して、脂肪酸代謝能が改善されることを明らかにした。
- (3) 脂肪酸のβ酸化律速段階を制御する蛋白の野性型と変異型とを遺伝子組み換えにより作成した。
- (4) この蛋白に対する抗体を作成したところ、野性型と変異型とも Western blot で単一バンドとして検出され、細胞内では2量体として存在することが明らかになった。
- (5) 遺伝子組み換え蛋白は疎水性が強く、正常に活性中心が構築されたか検証することが困難であった。このため水溶性の高い部位を再度検索して、活性中心付近の可溶性部分の

蛋白作成を試みている。

- (6) 脂肪酸の産生に重要な役割を果たす12個の lipase について、その遺伝子多型の検討を行った結果、本邦の NASH 症例の9割の症例が保持する単一の遺伝子多型を見いだした。
- (7) この遺伝子の発現制御について検討し、空腹時に mRNA の発現が増強され、食事摂取により速やかに抑制されることなどを明らかにした。

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 8 件)

- ① Toda K, Okada T, Hayashi Y, Saibara T. Preserved tissue-structure of efferent ductules in aromatase deficient mice. *J Endocrinol* 199:137-146, 2008 査読有り
- ② Enya M, Horikawa Y, Kuroda E, Yonemaru K, Tonooka N, Tomura H, Oda N, Yokoi N, Yamagata K, Shihara N, Iizuka K, Saibara T, Seino S, Takeda J: Mutations in the small heterodimer partner gene increase morbidity risk in Japanese type 2 diabetes patients. *Human Mutat* 29:E271-E277. 2008 査読有り
- ③ Hayashi Y, Toda K, Saibara T, Okamoto S, Osanai M, Enzan H, Lee GH. Expression of fascin-1, an actin-bundling protein, in migrating hepatoblasts during rat liver development. *Cell Tissue Res*. 334:219-226, 2008 査読有り
- ④ Dong H, Wang J, Li C, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Ono M, Akisawa N, Iwasaki S, Saibara T, Onishi S. The phosphatidyl ethanolamine N-methyltransferase gene V175M single nucleotide polymorphism confers the susceptibility to NASH in Japanese population. *J Hepatol* 46:915-920, 2007 査読有り
- ⑤ Kono M, Tatsumi K, Saibara T, Nakamura A, Tanabe N, Takiguchi Y, Kuriyama T. Obstructive sleep apnea syndrome is associated with some components of metabolic syndrome. *Chest* 131:1387-1392, 2007 査読有り
- ⑥ Hirose A, Ono M, Saibara T, Nozaki Y, Masuda K, Yoshioka A, Takahashi M, Akisawa N, Iwasaki S, Oben JA, Onishi S. Angiotensin II type 1 receptor

blocker inhibits fibrosis in rat nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 45:1375-81, 2007 査読有り

- ⑦ Iesato K, Tatsumi K, Saibara T, Nakamura A, Terada J, Tada Y, Sakao S, Tanabe N, Takiguchi Y, Kuriyama T. Decreased lipoprotein lipase in obstructive sleep apnea syndrome. Circ J 71:1293-1298, 2007 査読有り
- ⑧ Iwasaki S, Akisawa N, Saibara T, Onishi S. Fibrate for treatment of primary biliary cirrhosis. Hepatol Res 37(Suppl 3):S515- S517, 2007 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

- ① Kuratani Y, Ichikawa H, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Iwasaki S, Saibara T, Onishi S. Secondary extrahepatic portal obstruction resulted from thrombus in splenic vein aneurysms. 7th Japan Society of Hepatology Single Topic Conference, September 29, 2008, Fukuoka
- ② Hirose A, Ono M, Saibara T, Nozaki Y, Takahashi M, Iwasaki S, Oben JA, Onishi S. Angiotensin II type 1 receptor blocker attenuates the progression of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). European Association for the Study of Liver Disease, April 24, 2008 Milan, Italy
- ③ Ono M, Kubota K, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Iwasaki S, Saibara T, Ogawa Y, Onishi S, Oben JA. Super-paramagnetic iron oxide-MRI: A novel technique in experimental liver studies shows defective Kupffer cell phagocytic function in human non alcoholic fatty liver disease. European Association for the Study of Liver Disease, April 24, 2008 Milan, Italy
- ④ Tokumitsu K, Ogasawara K, Maki M, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Ono M, Iwasaki S, Saibara T, Onishi S. Methionine-choline metabolism is involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. European Association for the Study of Liver Disease, April 24, 2008 Milan, Italy
- ⑤ Saibara T, Yoshioka A, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Ono M, Iwasaki S, Onishi S: The Cog2 gene A2217G single nucleotide polymorphism confers susceptibility to hepatocyte

ballooning in NASH patients. Asia Pacific digestive week 2007, October 16, 2007 Kobe

- ⑥ Saibara T, Yoshioka A, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Ono M, Iwasaki S, Onishi S: The phosphatidylethanolamine N-methyltransferase gene V175M single nucleotide polymorphism confers the susceptibility to NASH in Japanese population, Asia Pacific digestive week 2007, October 16, 2007 Kobe
- ⑦ Saibara T, Ono M, Hirose A, Onishi S: Metabolic syndrome as the pathogenic background for the development of NASH, 17th Asia-Pacific Association for the Study of Liver Disease, March 30, 2007 Kyoto
- ⑧ Ono M, Hirose A, Saibara T, Nozaki Y, Masuda K, Yoshioka A, Takahashi M, Akisawa N, Iwasaki S, Onishi S: Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rats steatohepatitis, 17th Asia-Pacific Association for the Study of Liver Disease, March 30, 2007 Kyoto

[図書] (計 18 件)

- ① 西原利治: 医学書院、C型肝炎のベスト治療, 2009, 110-111 頁
- ② 西原利治: 医学書院、2009 今日の治療指針, 2009, 401-402 頁
- ③ 西原利治: 中外医学社、Annual Review 消化器 2009, 2009, 157-166 頁
- ④ 西原利治: 南江堂、消化器疾患 最新の治療, 2009, 310-312 頁
- ⑤ 西原利治、小野正文: 南山堂、病気と薬パーフェクトBOOK, 2008, 388-390 頁
- ⑥ 西原利治: 日本消化器病学会、第 94 回日本消化器病学会総会ポストグラジュエイトコース, 2008, 97-100 頁
- ⑦ 杜井峰、小笠原光成、植瑞希、廣瀬享、野崎靖子、小野正文、岩崎信二、西原利治、大西三朗: メディカルジャーナル社、酸化ストレスと肝疾患, 2008, 68-70 頁
- ⑧ 西原利治: 医学書院、肝疾患レジデントマニュアル, 2008, 337-345 頁
- ⑨ 西原利治、小野正文: 中外医学社、キーワードでわかるメタボリックシンドローム, 2008, 257-259 頁
- ⑩ 西原利治: 中外医学社、NASH診療best approach, 2008, 全 264 頁
- ⑪ 西原利治: 中外医学社、NASH診療ハンドブック, 2007, 全 165 頁
- ⑫ 西原利治: 中外医学社、Annual Review 消化器 2007, 2007, 152-158 頁

- ⑬ 西原利治: メジテース, 薬剤師のための臨床講座, 2007, 50-52 頁
- ⑭ 西原利治: 永井書店, Dataで読み解く内科疾患, 2007, 361-366 頁
- ⑮ 西原利治, 小野正文, 大西三朗: 先端医療技術研究所, 肝臓病の最新治療, 2007, 302-304 頁
- ⑯ 李春媚, 小笠原光成, 植瑞希, 廣瀬享, 野崎靖子, 高橋昌也, 小野正文, 岩崎信二, 西原利治, 大西三朗: 東洋書店, アルコールと医学生物学, 2007, 209-212 頁
- ⑰ 西原利治, 小野正文, 大西三朗: 医薬ジャーナル社, 肝硬変のマネジメント, 2007, 36-38 頁
- ⑱ 117. 西原利治, 大西三朗: 文光堂, わかりやすい内科学, 2007, 634-638 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西原 利治 (SAIBARA TOSHIJI)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：60145125

(2) 研究分担者

戸田 勝巳 (TODA KATSUMI)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：40197893
高橋 昌也 (TAKAHASHI MASAYA)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：80380335