

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11555

研究課題名(和文)特発性TGCV発症におけるATGL遺伝子領域のエピゲノム変化の解析

研究課題名(英文) Analysis of the epigenetic modification of ATGL gene in idiopathic TGCV pathogenesis

研究代表者

原 康洋 (Hara, Yasuhiro)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：70568617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ATGL遺伝子に欠損がない特発性中性脂肪蓄積心筋血管症(TGCV)でもATGL発現が減少するという仮説を前提に特発性TGCVにおけるATGL遺伝子領域のエピゲノム研究を目的としていたが、その後、特発性TGCVではATGLタンパク量に変化がなく活性が減少していることが判明し方針を変更することとなった。

そこで特発性TGCVに関するエピジェネティック研究のために(1)蛍光脂肪酸プローブのTGCV患者白血球を用いた長鎖脂肪酸代謝測定への有効性の検証(2)特発性TGCVの24検体のATGLに既知SNP7個を同定(3)既存のATGL欠損のプロテオーム解析の再解析による新たな候補の同定、を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1) 蛍光標識長鎖脂肪酸アナログAlexa680-BMPPがTGCV患者白血球を用いて長鎖脂肪酸代謝を見るプローブとして有効であると判断できた。(2) 特発性TGCVの24検体のATGLエクソンにおいてトータル7個のSNPsが見つかったが、これらはいずれも日本人のATGLのSNPとして既知のCommon SNPでありタンパク質機能に影響を与える可能性は低いと考えた。(3) TGCV患者由来線維芽細胞、およびATGL-KOマウス心臓のプロテオーム解析の再解析を行い、TGCV発症とATGL欠損の心臓において重要と思われる候補分子を同定した。これらは今後のTGCV研究の重要な手掛かりと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The original aim of the study was to find the epigenetic mechanism by which ATGL gene is regulated in idiopathic TGCV (I-TGCV) that has no pathogenic ATGL mutations. However, the ATGL protein mass in I-TGCV patients was found not to be decreased, rather up-regulated, compared to healthy controls. Therefore, the goal of the study needed to be reconsidered. To find new targets for the elucidation of I-TGCV pathogenesis, the followings were performed in this study. (1) A long chain fatty acid (LCFA) metabolism assay using white blood cells from patient's peripheral blood based on ex vivo detection of a fluorescent LCFA probe export, which our laboratory previously developed. (2) Analysis of ATGL coding exons of 24 samples from I-TGCV patients to identify SNPs and to elucidate their relationship with the pathogenesis. (3) More detailed re-analyses of proteome data from fibroblast cells derived from TGCV patients and the hearts of ATGL-knockout mice using our published results.

研究分野：病態分子生物学

キーワード：ATGL TGCV

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 中性脂肪蓄積心筋血管症(Triglyceride deposit cardiomyovascuopathy;TGCV)

TGCV は当研究室によって見出された心筋細胞と冠動脈平滑筋細胞へのトリグリセリド(TG)蓄積による心不全と TG 蓄積型動脈硬化を特徴とする難病である。TGCV は細胞内 TG リパーゼである ATGL が遺伝的に欠損している原発性と、ATGL 遺伝子に変異はないが TGCV の病態を呈す特発性の二つに分類される。

(2) 特発性 TGCV の病態

特発性 TGCV では原発性 TGCV と同様、心筋細胞と冠動脈平滑筋細胞に高い TG 沈着を示す特徴的な染色像が共通して見られる。また、本症には ATGL 遺伝子の欠損が存在しないが、これまでの末梢血白血球におけるポリクロナール抗体を用いた選択的免疫阻害法 (Selective immunoinactivation)を用いて測定した検討で ATGL 活性が著減していた。

2. 研究の目的

(1) 特発性 TGCV における ATGL 活性の著減が、エピジェネティック制御による ATGL タンパク減少に起因している可能性を検討することとした。ATGL 遺伝子領域が加齢などの要因によりエピジェネティックな抑制を受けるという仮説に基づき、すでに ATGL 活性が低下することが示されていた特発性 TGCV 患者白血球画分を用いて ATGL 遺伝子に起こっているエピゲノム変化を調べることを目的とした。これにより発症機序を解明する手掛かりを得、さらに 2 年目以降はカプリン酸投与による ATGL 発現の改善と ATGL 遺伝子のエピゲノム変化との関連性を調べ、本症の治療薬としてのカプリン酸の作用機序を明らかにすることも目的としていくとしていた。しかし、当研究室において作製したモノクローナル抗体を用いた ELISA 系により特発性 TGCV 患者白血球画分では ATGL 活性が著減しているが ATGL タンパク量は減少していないことが判明した。これにより新たな目標の設定を行うこととなった。

(2) これまで特発性 TGCV での ATGL 活性の減少は末梢血白血球画分の抽出液を用いた *in vitro* 酵素活性測定法によって行っていた。本研究では特発性 TGCV での長鎖脂肪酸利用能著減の新たな確認法として生きた白血球細胞に対し当研究室で開発した蛍光長鎖脂肪酸プローブを用いた *ex vivo* 法の応用が可能かどうかを調べた。

(3) 特発性 TGCV の ATGL 遺伝子情報より新たな発症因子を検索する目的で、特発性 TGCV 患者 ATGL 遺伝子内のタンパク質をコードしているエクソン領域における SNPs を詳細に調べた。

(4) TGCV の病態に関わる新たな標的を見つけるため当研究室ですで行っていた TGCV 患者由来線維芽細胞を用いたプロテオーム解析、ATGL-KO マウス心臓を用いたプロテオーム解析のデータを詳細に再解析し、発現の変化しているタンパク質を新たに見出すこととした。

3. 研究の方法

(1) Alexa680 標識 Beta-Methyl-Phenylpentadecanoic acid(BMPP)は心臓核医学検査に用いられているヨウ素標識脂肪酸アナログ BMIPP を元に当研究室で開発した蛍光標識脂肪酸プローブである。この Alexa680-BMPP を原発性 TGCV 患者の白血球画分に取り込ませた後、その排出能を見ることにより原発性 TGCV 患者における長鎖脂肪酸利用の著減を調べた。さらに同一の患者の白血球画分を用いてカプリン酸治療後の排出能の改善の確認が Alexa680-BMPP 法により可能であるかどうかを調べた。

末梢血からの白血球画分の調製：原発性 TGCV 患者、健康人コントロールの末梢血 6ml にヘタセップ液を 1:5 で加え、赤血球を沈殿させた後、上層の除赤血球画分を回収した。遠心により沈殿物を洗浄し DMEM 培地 2.2ml に懸濁し白血球画分とした。

Alexa680-BMPP 取り込みと排出：白血球画分 400ul に Alexa680-BMPP を終濃度 0.075uM となるように添加し、室温 30 分間の取り込みを行った後、外液の Alexa680-BMPP を遠心によって除去し、DMEM 培地 500ul に再懸濁、37℃, 2 時間の Alexa680-BMPP 排出を行った。

FACS 測定：排出操作を行った白血球画分は BD FACS lysing 液で完全に赤血球を除去、固定した後、MacQuant Analyzer (Miltenyi Biotec)を用いて好中球における Alexa680 強度測定を行った。

(2) 特発性 TGCV の 24 検体の ATGL 遺伝子エクソン配列内の SNPs を詳細に調べた。エクソン配列は常法に従い患者末梢血よりゲノム DNA を単離し PCR で ATGL 遺伝子エクソン領域を増幅しダイレクトシーケンスを行うことにより決定した。

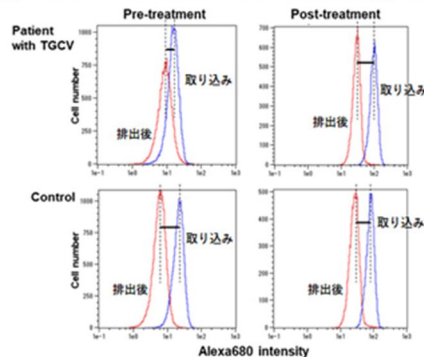
(3) 当研究室で行った TGCV 患者由来皮膚線維芽細胞を用いたプロテオーム解析(Hara Y., Orphanet J Rare Dis 2013)および ATGL-KO マウス心臓を用いたプロテオーム解析(Hara Y., J Oleo Sci 2020)は nano LC MS/MS による精密なプロテオーム差異解析である。これらのデータを詳細に再検討し、TGCV 患者細胞でコントロール細胞に対して有意に発現変化しているタンパク質あるいは ATGL-KO マウス心臓でコントロールマウスに対して有意に発現変化しているタンパク質を探索した。それらを細胞発現用ベクターコンストラクトとして構築し HeLa 細胞での発現を行った。

4. 研究成果

(1) Alexa680-BMPP 排出による原発性 TGCV 患者由来好中球における長鎖脂肪酸利用能の解析

FACS 解析の結果、原発性 TGCV 患者の好中球では Alexa680-BMPP 排出能が健常人コントロールに比較し低下していることが確認された(図 1 左)。さらにトリカプリン治療後の好中球では Alexa680-BMPP 排出が改善していることが示された(図 1 右)。これらのことから当研究室で開発された蛍光標識長鎖脂肪酸アナログ Alexa680-BMPP は *ex vivo* において白血球画分を用いて長鎖脂肪酸代謝能を見るプローブとして TGCV 研究に有効であると判断できた。

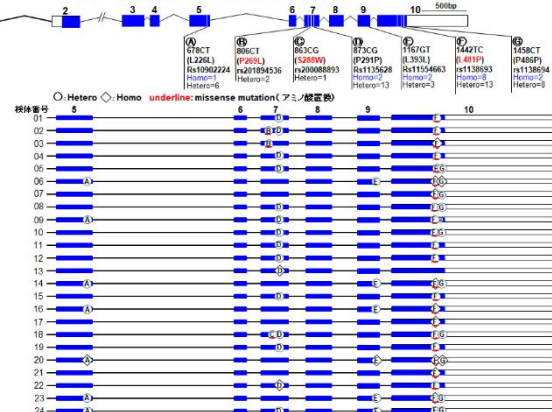
図1 好中球へのAlexa680-BMPP取り込みと排出のFACS解析



(2) 特発性 TGCV の 24 検体の ATGL 遺伝子エキソン配列内の SNPs の解析

ATGL エキソン解析の結果、24 検体すべてにおいて ATGL をコードする配列に欠損を生じさせる変異はなく完全なタンパク質として発現していることが考えられた。また、トータル 7 個の SNPs が見つかったが、これらはデータベース検索により日本人の ATGL 遺伝子の SNPs としてはありふれたものであると判断され、タンパク質機能に影響を与えていることは考えにくかった(図 2)。これらのことから特発性 TGCV において ATGL 活性が低下している理由は他の因子との相互作用である可能性が考えられ、今後は ATGL の酵素活性を調節する因子の同定が重要な課題である。

図2 特発性TGCVIにおけるATGL遺伝子エキソン内のSNPs



(3) TGCV 発症の標的タンパク質を見出すためのプロテオームデータ再解析

TGCV 患者由来皮膚線維芽細胞を用いたプロテオーム解析

3 名の原発性 TGCV 患者由来皮膚線維芽細胞 LC1, LC2, LC4 とコントロール皮膚線維芽細胞を比較したプロテオームデータを再度詳細に解析した。その結果、3 つの患者細胞で共に有意に増加しているタンパク質として CTHRC1、減少しているタンパク質として ALDH3A2, ASS1, SQRDL を見出した(表 1)。CTHRC1 は心臓や肺で線維化時に増大し、血管リモデリングに関与とされる分泌タンパク質であり TGCV の病態に関わる有望な候補タンパク質である。

表1 TGCV患者線維芽細胞で変化していたタンパク質

Symbol	名称	ratio LC1	ratio LC2	ratio LC4	
CTHRC1	Collagen triple helix repeat-containing protein 1	2.21	2.03	2.84	増大
ALDH3A2	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2	0.55	0.38	0.56	減少
ASS1	Argininosuccinate synthase 1	0.44	0.57	0.49	減少
SQRDL	Sulfide quinone reductase-like (yeast)	0.58	0.46	0.57	減少

ALDH3A2 は脂肪族アルデヒドを脂肪酸へ酸化し無毒化する酵素でありその欠損は先天性魚鱗癬の原因となり、また ASS1(アルギニノコハク酸シンターゼ)は尿素サイクルを構成する酵素であり共に代謝に重要であると考えられる。

ATGL-KO マウス心臓を用いたプロテオーム解析

ATGL-KO マウスとコントロールマウスの心臓タンパク質を比較したプロテオームデータを再度詳細に解析した。その結果、新たに複数のタンパク質を ATGL-KO 心臓で有意に増大し機能的に重要であると推測できるものとして見出した(表 2)。その中でも BDH1 はケトン体であるアセト酢酸と

表2 ATGL-KOマウス心臓で増大していたタンパク質

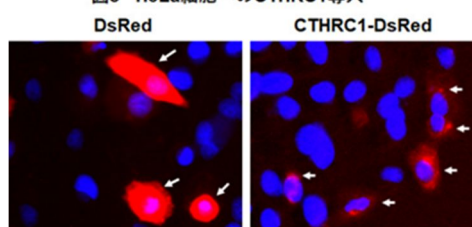
Symbol	名称	KO female	KO male	ave.	
UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	2.37	2.36	2.37	増大
SQSTM1	Sequestosome-1	2.1	2.04	2.07	増大
BDH1	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	2.12	1.94	2.03	増大
SERPINB1A	Serpina serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a	2.24	1.84	2.04	増大
S100A6	S100 calcium binding protein A6 (calycyclin)	2.01	1.85	1.93	増大
ACE	Angiotensin-converting enzyme	2.06	1.72	1.89	増大

-ヒドロキシ酪酸の変換を行う酵素であり、ケトン体は長鎖脂肪酸の利用不全時に代替エネルギーとして働くこと、心機能保護の活性を持つことが知られていることから TGCV の病態に関わる分子として有望な候補タンパク質であると考えられた。また SQSTM1 は p62 とも呼ばれ選択的オートファジー開始に重要であることが知られ、長鎖脂肪酸代謝不全時の病態に関連すると思われた。

TGCV の病態に関わる候補タンパク質の細胞での発現

上記の候補タンパク質から CTHRC1 と BDH1 に着目し、細胞内での長鎖脂肪酸代謝との関連を調べる目的で赤色蛍光タンパク質 DsRed との融合タンパク質として細胞で発現させるベクターコンストラクトを作製した。それら発現コンストラクトを HeLa 細胞に導入し発現を確認した(図 3)。

図3 HeLa細胞へのCTHRC1導入



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	平野 賢一 (Hirano Ken-ichi) (30332737)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授(常勤) (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関