

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790914

研究課題名(和文) アポリポ蛋白 C の新たな転写調節機構の解明

研究課題名(英文) Molecular Dissection of hypoapoC-II caused by defective mRNA transcription

研究代表者

高瀬 暁 (Takase, Satoru)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80508094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：著明な高TG血症を呈するapoC-II欠損症の殆どは蛋白完全欠損例だが、血清apoC-II蛋白が少量検出されるapoC-II低下症(hypoapoC-II)も報告されている。

著明な高TG血症、反復する急性膵炎、測定感度以下(免疫比濁法)のapoC-II蛋白からapoC-II欠損症と診断された自験例は、immunoblotにて少量の血清apoC-II蛋白が検出されhypoapoC-IIと考えられた。末梢血単球由来マクロファージでは転写減少が示されたが、APOC2遺伝子に変異を認めなかった。全ゲノム解析にて転写減少を招き得る異常が検出され、新たな転写調節機構の解明を目指して解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Familial apolipoprotein C-II (apoC-II) deficiency is a rare autosomal recessive disorder with marked hypertriglyceridemia resulting from impaired activation of LPL. In most cases of apoC-II deficiency, causative mutations have been found in the protein-coding region of APOC2 gene; however, several atypical cases of apoC-II deficiency were reported to have markedly reduced, but detectable levels of plasma apoC-II protein (hereafter referred to as hypoapoC-II). A case of apoC-II deficiency was found that is phenotypically identical to hypoapoC-II. We took advantage of a monocyte/macrophage culture system to prove that transcription of apoC-II mRNA was decreased in the patient's cells. However, all of the fifty single nucleotide variants detected in the patient's APOC2 gene were common variants that are supposedly not causative, implying that other mutations regulate apoC-II levels. Whole-genome sequencing is underway to identify the causative mutation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：chylomicronemia apoC- deficiency SNP rare variant

1. 研究開始当初の背景

Apolipoprotein C-II (apoC-II) は Lipoprotein Lipase (LPL) の補因子として働き中性脂肪 (TG) 水解を促進させる。apoC-II 欠損症は著明な高 TG 血症を呈する常染色体劣性遺伝疾患であり、報告例は 30 家系に満たない。apoC-II 蛋白が完全欠損した報告例が殆どを占めるが (nonsense 変異、missense 変異)、血清中に少量の apoC-II 蛋白が検出される apoC-II 低下症 (hypoapoC-II) も報告されている (promoter 変異 1 家系、splice donor site 変異 2 家系)。

著明な高 TG 血症と反復する急性膵炎、測定感度以下の血清 apoC-II 蛋白 (免疫比濁法) から apoC-II 欠損症と診断された自験例は、*APOC2* 蛋白翻訳領域に変異を認めなかった。immunoblot にて少量の apoC-II 蛋白が検出されたため apoC-II 低下症 (hypoapoC-II) と考えられたが、既報とは異なり、promoter、splice donor site にも変異を認めなかった。血清 apoC-II 蛋白減少を招く未知の機序が想定され、本症例の解析により、*APOC2* の調節機構に新たな知見が展開される可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、蛋白翻訳領域、promoter、splice donor site に変異を認めない apoC-II 低下症の発症機序を分子生物学的に解析することにより、転写調節を含めた *APOC2* の制御機構について新たな知見を得ることである。二次元電気泳動法、リパーゼ活性解析により apoC-II 蛋白の解析を行い、mRNA 発現調節について検討し、*cis*-element の異常を探すべく各種解析を行う。

3. 研究の方法

(1) apoC-II 蛋白 isoform の解析 (二次元電気泳動~immunoblot) :

血清から TG-rich リポ蛋白を分離し (超遠心法)、二次元電気泳動法にて apoC-II 蛋白の各 isoform を展開する。抗ヒト apoC-II 抗体を用いて immunoblot を行う。

(2) LPL 活性 :

放射線ラベル ^3H -triolein を基質とし、post heparin plasma (PHP) 中のリパーゼ活性を測定する。1M NaCl 添加前後のリパーゼ活性から LPL 活性を求める。更に、apoC-II 蛋白補充 (正常血清添加) 前後の LPL 活性を検討する。

(3) mRNA 解析 (Northern blot) :

apoC-II 蛋白の主要産生器官である肝臓、小腸の患者組織は入手困難であるため、末梢血から分離した単球を培養皿上で 7 日間培養

し、マクロファージに分化させ mRNA 解析を行う。

APOE/APOC1/APOC4/APOC2 gene cluster および *CLPTM1* (*APOC2* の 3' 側に隣接する遺伝子) の mRNA 発現レベルと LXR agonist (T0901317) 応答性を Northern blot により検討する。また、Actinomycin D による転写阻害下での *APOC2* mRNA の degradation を比較する。

(4) DNA 解析 :

① Southern blot : 制限酵素は BamHI、EcoRI、PstI、SacI、XbaI を使用し、probe は *APOC2* cDNA を用いる。

② DNA copy number : genome の RT-PCR を行い *APOC2* の DNA copy number を健常者と比較検討する (*RPLP0* を control とする)。

③ TG 代謝関連遺伝子のシークエンス :

LPL、*APOA5*、*APOC3*、*LMF1*、*GPIHBP1* の蛋白翻訳領域をシークエンスする。

④ *APOC2* 遺伝子周辺の variant 解析 :

APOC2 の 5' 側に隣接する *APOC4* の 3' 端から、3' 側に隣接する *CLPTM1* の 5' 端まで (約 9 kbp) をシークエンスする。allele frequency が database 上に公表されていない SNP に対しては、健常者集団 (384 人) の genotyping を施行し allele frequency を求める。

(5) *APOC2* minigene assay :

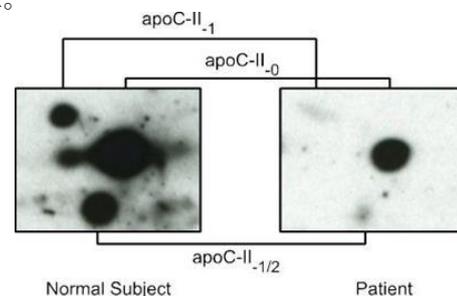
上記 (4)-④ でシークエンスした領域を vector に cloning し、*APOC2* 遺伝子に luciferase 遺伝子を連結して minigene construct を作成する。HEK293、HepG2 を用いて reporter assay を行う。

4. 研究成果

(1) apoC-II 蛋白 isoform の解析 :

・ TG-rich リポ蛋白の二次元電気泳動では、患者 apoC-II 蛋白の各 isoform は健常者と同等の位置にプロットされた。

・ apoC-II 蛋白は正常な構造を持つと示唆され、糖化修飾等の異常の可能性も低いと考えられた。



(2) LPL 活性 :

・ PHP 中の LPL 活性は残存していたが、健常者と比して 48% 減少していた (control vs. the patient: 8.6 vs. 4.5 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{mL}^{-1}$)。

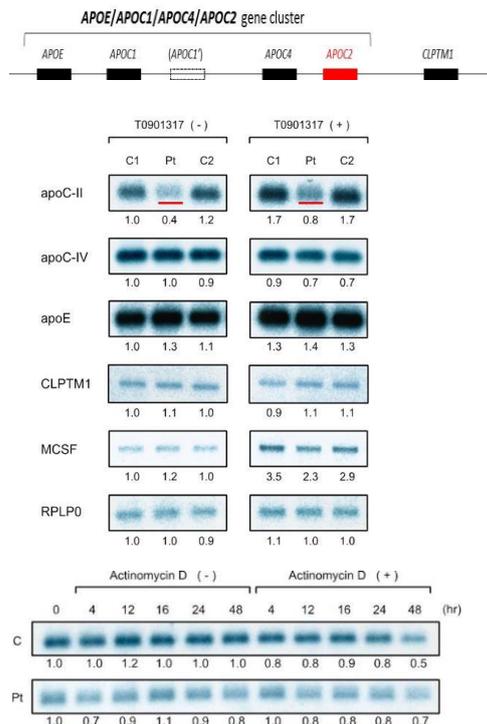
・ 正常血清を添加し apoC-II 蛋白を補充すると、LPL 活性は容量依存的に 1.5 倍に上昇した。

正常血清添加量(μL)	0	0.5	1
LPL 活性($\mu\text{mol h}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	4.5	5.8	6.6

・患者血清中の相対的な apoC-II 蛋白不足が示唆され、著明な高 TG 血症の一因として矛盾しない結果であった。

(3) mRNA 解析 :

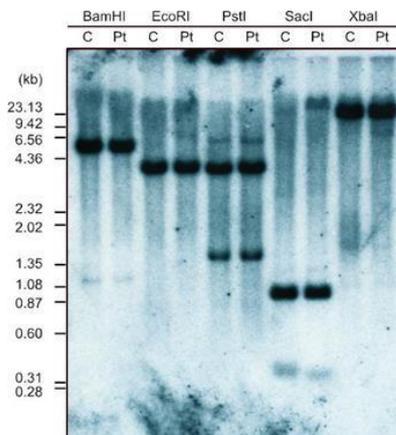
- ・ *APOC2* の mRNA は 60%減少(健常者比)していたが、LXR agonist 応答性は保たれていた。
- ・ Actinomycin D を用いた検討では *APOC2* の degradation の亢進は認められず、転写レベルでの減少が示唆された。
- ・ *APOE*, *APOC4*, *CLPTM1* の mRNA 発現レベルは健常者と同等であった。



(4) DNA 解析 :

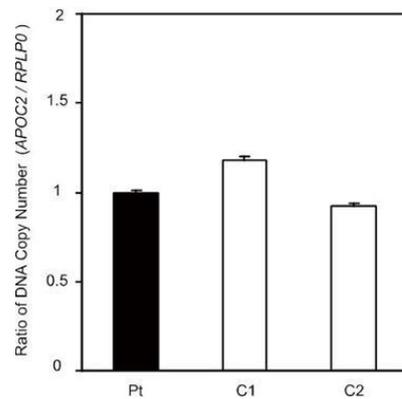
① Southern blot :

- ・ SNP (rs5120) による患者 genome における *SacI* サイト消失の他は、明らかな major rearrangement は指摘されなかった。



② DNA copy number :

- ・ *APOC2* の DNA copy number の減少は指摘されなかった (健常者比)。



③ TG 代謝関連遺伝子のシーケンス :

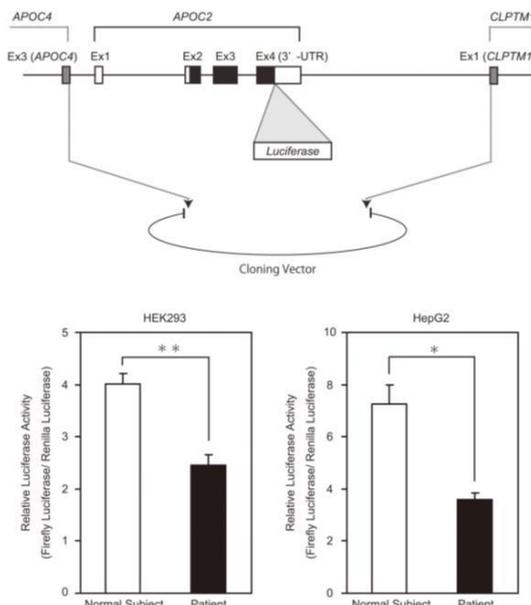
- ・ *LPL*, *APOA5*, *APOC3*, *LMF1*, *GPIHBP1* の蛋白翻訳領域に変異は認められなかった。

④ *APOC2* 遺伝子周辺の variant 解析 :

- ・ *APOC2* 5'側の *APOC4* 3'端から 3'側の *CLPTM1* 5'端までの領域に reference と異なる variant が 50 個認められた。いずれも db SNP に登録されていた。
- ・ allele frequency 不明の variant に対し健常者集団 (384 人) の genotyping を施行したところ、いずれも >15% と示された。rare variant は認められなかった。

(5) *APOC2* minigene assay :

- ・ 上記 (4)-④ の領域を含む minigene を HEK293, HepG2 に transfection し reporter assay を施行したところ、健常者に対しそれぞれ 39%、51%減少していた。



以上の結果から、*APOC2* 遺伝子周辺領域の SNP のみでは転写調節の異常を説明する事が困難と考えられた。*APOC2* 遺伝子領域外の変異をエクソン外も含めて検索すべく、

whole genome sequence 解析を施行した。予備的知見ではあるが、*APOC2* の転写調節に影響し得ると考えられる異常が検出されており、更に解析を進めている。

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 1 件)

1. Takase S, Osuga J, Fujita H, Hara K, Sekiya M, Igarashi M, Takanashi M, Takeuchi Y, Izumida Y, Ohta K, Kumagai M, Nishi M, Kubota M, Masuda Y, Taira Y, Okazaki S, Iizuka Y, Yahagi N, Ohashi K, Yoshida H, Yanai H, Tada N, Gotoda T, Ishibashi S, Kadowaki T, Okazaki H.
Apolipoprotein C-II deficiency with no rare variant in the APOC2 gene.
J Atheroscler Thromb. 2013; 20 (5): 481-93. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. 高瀬暁, 大須賀淳一, 藤田逸人, 原一雄, 関谷元博, 五十嵐正樹, 高梨幹生, 武内謙憲, 泉田欣彦, 太田啓介, 熊谷真義, 西真貴子, 久保田みどり, 升田紫, 平美乃, 岡崎佐智子, 飯塚陽子, 矢作直也, 大橋健, 吉田博, 柳井秀勝, 多田紀夫, 後藤田貴也, 石橋俊, 岡崎啓明, 門脇孝:
「Apolipoprotein C-II deficiency with no rare variant in the APOC2 gene」第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2013 年 5 月 16 日 熊本)
2. 高瀬暁, 大須賀淳一, 藤田逸人, 原一雄, 高梨幹生, 飯塚陽子, 吉田博, 柳内秀勝, 多田紀夫, 山田信博, 石橋俊, 岡崎啓明, 門脇孝:「蛋白翻訳領域に変異の無い非典型的アポ C-II 欠損症の分子生物学的解析」第 45 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (2013 年 7 月 18 日 東京)
3. 高瀬暁, 大須賀淳一, 藤田逸人, 原一雄, 高梨幹生, 泉田欣彦, 久保田みどり, 升田紫, 飯塚陽子, 吉田博, 柳内秀勝, 多田紀夫, 山田信博, 石橋俊, 岡崎啓明, 門脇孝:「蛋白翻訳領域に変異の無い apoC-II 欠損/低下症の分子生物学的解析」第 34 回日本肥満学会 (2013 年 10 月 12 日 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高瀬 暁 (TAKASE, Satoru)

東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80508094