

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461377

研究課題名(和文)ポストGWAS時代における脂質異常症に関わる新規パスウェイと遺伝マーカーの探索

研究課題名(英文)Exploration of novel pathway and genetic markers involved in dyslipidemia at post-GWAS era

研究代表者

岩本 禎彦 (Iwamoto, Sadahiko)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10232711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：血中トリグリセリドレベルに遺伝的関連を示すTRIB1遺伝子産物は、脂質合成のマスターレギュレーターであるChREBPタンパクと分子間相互作用し、ユビキチン・プロテアソーム系でのタンパク分解を制御していると同時にSAP18タンパクと相互作用することによって、MTTP遺伝子の発現制御を行い、VLDL分泌を制御することを明らかにした。TRIB1はこれら2つのメカニズムによって、血清脂質レベルと脂肪肝の両方に作用するため、そのエンハンサーに存在するSNPが遺伝的関連を示すと考えられた。また、内臓肥満にインクレチン遺伝子GIPが遺伝的関連を示すことを初めて明らかにし、特許申請した。

研究成果の概要(英文)：Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP), a master regulator of hepatic lipogenesis, was identified as a novel binding partner of mammalian tribbles homologue 1 (TRIB1), the gene of which showed genetic association with plasma triglyceride levels. TRIB1 enhanced ChREBP proteolysis via ubiquitin-proteasome pathway. TRIB1 simultaneously enhanced mRNA expression of microsomal triglyceride transfer protein (MTTP), a principal molecule for VLDL secretion, via molecular interaction with Sin3A associated protein, 18kD. These two pathways may be involved in the genetic association of TRIB1 SNP in the enhancer element with plasma and hepatic lipid levels. Furthermore, we discovered genetic association of Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) with adiposity levels of visceral fat, which may be a predictive factor for the susceptibility to metabolic syndrome. We applied this result for a patent.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脂質代謝異常 非アルコール性脂肪肝 SNP関連解析 モデルマウス 新規代謝パスウェイ 分子間相互作用 遺伝環境相互作用

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の欧米化に伴って、我が国においても動脈硬化を基盤とした、心血管疾患が死因の第一位を占めるようになり、その前駆病態ともいべきメタボリック症候群も、徐々に増加しつつある。メタボリック症候群の診断基準の中核となっているトリグリセリド値の分散には遺伝要因が大きく関与しており、遺伝率は 30~40%と考えられている。欧米人を対象に行われたゲノムワイド SNP 関連解析 (GWAS) によって明らかになった関連 SNP を全てタイピングしても血清トリグリセリドが示す分散の 5%程度しか説明できない。従って、GWAS によって新規に明らかになった遺伝子が関わるパスウェイ、さらにはそのパスウェイに関わる分子を同定することによって、新たな血清トリグリセリド調節に関わる分子、さらには血清レベルの分散に関わる遺伝子の全貌を明らかにできるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

遺伝解析に基づいて同定された血清脂質関連遺伝子における機能性多型の探索

遺伝解析に基づいて同定された新規脂質関連遺伝子の in vivo のにおける機能的検証ならびに関連する代謝パスウェイの探索

新規脂質関連遺伝子産物が関与する分子間相互作用の探索と in vivo における機能的検証

分子間相互作用する分子における遺伝子変異を複数のゲノムバンクを用いた探索

3. 研究の方法

SNP 関連解析によって明らかになったゲノム領域のバイオインフォマティクスを用いた機能性多型の探索を行う

ウイルスベクターを用いた強制発現とノックダウンマウスを作製し、機能的検証を行うと共に、発現臓器においてトランスクリプトーム解析を行い、関連するシグナルや代謝パスウェイを明らかにする

血清脂質関連遺伝子産物のなかでシグナル伝達や発現調節に関わると考えられる分子については、イースト2ハイブリッドシステムを用いて相互作用する分子のスクリーニングを行い、血清脂質調節に関わる新規分子を同定する

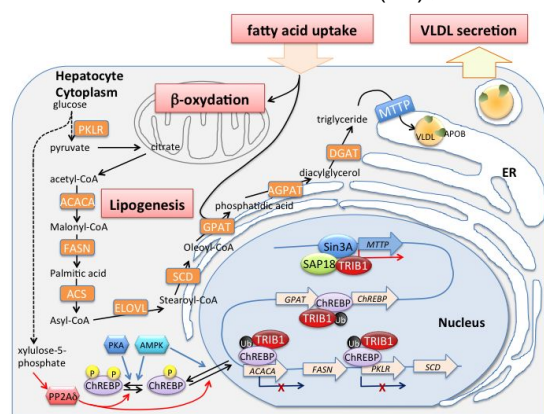
東アジアを中心とした他民族集団のゲノムパネルを用いて、血清脂質関連遺伝子多型を検証し、遺伝・環境相互作用の検討を行う

4. 研究成果

欧米人における GWAS によって血清トリグリセリドとの遺伝的関連が見出された遺伝子 *Trib1* をウイルスベクターを用いてマウス肝臓において強制発現と

ノックダウンさせた結果、*TRIB1* の発現低下は血清脂質の上昇とともに、肝臓内の脂肪蓄積をもたらした。肝臓トランスクリプトーム解析の結果、解糖、脂質合成に関わる遺伝子群の発現上昇が認められた。解糖、脂質合成の両方に関わる分子として脂質合成のマスターレギュレーターである ChREBP のタンパクレベルを調べた結果、*TRIB1* 強制発現による ChREBP の減少が見出され、*TRIB1* は ChREBP と分子間相互作用の結果、ユビキチン・プロテアソーム系での蛋白分解を制御しているのではないかと考えられる結果が得られた。また、*TRIB1* の下流に存在する SNP は、血清脂質レベルだけではなく非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) とも関連することが明らかになった。

ChREBP は血清トリグリセリドレベルと強く関連するが、脂肪肝との関連は認められなかったことから、*TRIB1* と脂肪肝との遺伝的関連には別のターゲット分子が存在している可能性が示唆された。これを同定するために、イーストハイブリッド方を行い、*TRIB1* の新たな結合分子として Sin3A associated protei, 18kD (SAP18)が見出された。ウイルスベクターを用いたマウス肝臓における SAP18 の強制発現は血清脂質レベルの上昇と肝臓脂質の減少、ノックダウンは血清脂質の低下と肝臓脂質の増加をもたらし、肝臓からの VLDL 分泌に関連する可能性が示唆された。トランスクリプトーム解析によって、VLDL 分泌にとって重要な分子である *MTTP* 遺伝子の発現が SAP18 強制発現によって上昇し、SAP18 のノックダウンは *MTTP* 発現低下をもたらすことが明らかになった。*MTTP* の発現変化は *MTTP* 遺伝子発現調節領域への Sin3A の結合を SAP18 が調節している結果であると考えられた。これらの結果から、*TRIB1* は ChREBP タンパクレベルをユビキチン・プロテアソーム系を介して脂質合成を制御していると同時に、SAP18 との相互作用によって、*MTTP* 発現制御を行い、VLDL 分泌制御も行っていることが明らかになった(図)。



欧米人における GWAS によって血清脂質レベルとの遺伝的関連が見出されたが、責任遺伝子が明らかになっていなかった領域、すなわち染色体 19 番に存在する約 300kb の強い連鎖不平衡ブロック *NCAN-CILP2* 領域に機能性の候補遺伝子 *TM6SF2* が見出され、東アジア 5 人種 7 集団において遺伝的検証を行った。その結果、*TM6SF2* 遺伝子の稀なミスセンス SNP は血清コレステロールとトリグリセリド値に強く関連すること、NAFLD とも強く関連することを見出した。また、次世代シーケンサーを用いて *TM6SF2* 遺伝子ならびに、VLDL 分泌に関わる他の 2 分子 (*PNPLA3*, *MTTP*) について、日本人男性 950 人を対象にタイプ・リシーケンスし、*TM6SF2* と *PNPLA3* 遺伝子に機能喪失性レアバリエーションを見出した。

メタボリック症候群における重要な指標である内臓脂肪について関連遺伝子 *GIP* を見出した。

#### 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 11 件)

Boonvisut S, Nakayama K, Makishima S, Watanabe K, Miyashita H, Lkhagvasuren M, Kagawa Y, Iwamoto S.: Replication analysis of genetic association of the *NCAN-CILP2* region with plasma lipid levels and non-alcoholic fatty liver disease in Asian and Pacific ethnic groups. *Lipids Health Dis.* 15:8, 2016

Yang Z, Matsumoto A, Nakayama K, Jimbo EF, Kojima K, Nagata K, Iwamoto S, Yamagata T.: Circadian-relevant genes are highly polymorphic in autism spectrum disorder patients. *Brain Dev.* 38:91-99, 2016

Horiguchi S, Nakayama K, Iwamoto S, Ishijima A, Minezaki T, Baba M, Kontai Y, Horikawa C, Kawashima H, Shibata H, Kagawa Y, Kawabata T: Associations between a fatty acid desaturase gene polymorphism and blood arachidonic acid compositions in Japanese elderly. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 105:9-14, 2015

Fujita-Jimbo E, Tanabe Y, Yu Z, Kojima K, Mori M, Li H, Iwamoto S, Yamagata T, Momoi MY, Momoi T.: The association of *GPR85* with

*PSD-95-neurologin complex and autism spectrum disorder: a molecular analysis.* *Mol Autism.* 6:17, 2015

Iwamoto S, Boonvisut S, Makishima S, Ishizuka Y, Watanabe K, Nakayama K.: The role of *TRIB1* in lipid metabolism; from genetics to pathways. *Biochem Soc Trans.* 43:1063-1068, 2015

Makishima S, Boonvisut S, Ishizuka Y, Watanabe K, Nakayama K, Iwamoto S.: Sin3A-associated protein, 18 kDa, a novel binding partner of *TRIB1*, regulates *MTTP* expression. *J Lipid Res.* 56:1145-1152, 2015

Nakayama K, Miyashita H, Iwamoto S.: Seasonal effects of the *UCP3* and the *RPTOR* gene polymorphisms on obesity traits in Japanese adults. *J Physiol Anthropol.* 33:38, 2014

Nakayama K, Watanabe K, Boonvisut S, Makishima S, Miyashita H, Iwamoto S.: Common variants of *GIP* are associated with visceral fat accumulation in Japanese adults. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 307:G1108-1114, 2014

Ishizuka Y, Nakayama K, Ogawa A, Makishima S, Boonvisut S, Hirao A, Iwasaki Y, Yada T, Yanagisawa Y, Miyashita H, Takahashi M, Iwamoto S.: *TRIB1* downregulates hepatic lipogenesis and glycogenesis via multiple molecular interactions. *J Mol Endocrinol.* 52:145-158, 2014

Naka I, Hikami K, Nakayama K, Koga M, Nishida N, Kimura R, Furusawa T, Natsuhara K, Yamauchi T, Nakazawa M, Ataka Y, Ishida T, Inaoka T, Iwamoto S, Matsumura Y, Ohtsuka R, Tsuchiya N, Ohashi J: A functional SNP upstream of the beta-2 adrenergic receptor gene (*ADRB2*) is associated with obesity in Oceanic populations. *International journal of obesity* 37:1204-1210, 2013

Nakayama K, Miyashita H, Yanagisawa Y, Iwamoto S.: Seasonal effects of *UCP1* gene polymorphism on visceral fat accumulation in Japanese adults. *PLoS One.* 8:e74720, 2013

[学会発表](計 20 件)

Boonvisut S, Iwamoto S, Nakayama K, Watanabe K. Genetic and functional assessment of rare alleles of *NAFLD* susceptibility loci in Japanese. The 13th International Congress of Human Genetics, Kyoto, April 3-7, 2016

Nakayama K, Ohashi J, Munkhtulga L,

Iwamoto S. Detection of population specific signals of positive selection in Mongolians. The 13th International Congress of Human Genetics, Kyoto, April 3-7, 2016

中山一大、大橋順、ルハグワスレン・ムンフトルガ、岩本禎彦 : 高密度 SNP ジェノタイピングによるモンゴル人特異的な自然選択の検出 第 69 回日本人類学会大会 (東京) 2015 年 10 月 11 日

Boonvisut S、渡邊和寿、中山一大、岩本禎彦 : Resequencing analysis of NAFLD associated genes in 950 Japanese males. 日本人類遺伝学会第 60 回大会 (新宿) 2015 年 10 月 14 日~17 日

岩本禎彦、巻嶋咲穂、Supichaya Boonvisut、渡邊和寿、中山一大: 血清脂質関連遺伝子 TRIB1 の肝臓脂質レベル調節メカニズム. 第 36 回日本肥満学会 (名古屋) 2015 年 10 月 2 日~3 日

渡邊和寿、Supichaya Boonvisut、中山一大、Leibel Rudolph、岩本禎彦 : 新規糖尿病感受性遺伝子 I1dr2 の機能解析. 第 58 回日本糖尿病学会 (山口) 2015 年 5 月 21 日~24 日

Iwamoto S、Makishima S、Boonvisut S、Ishizuka Y、Watanabe K、Nakayama K: Novel binding partners of TRIB1 involved in lipid metabolisms. 2015 tribbles meeting, Budapest, Hungary, April 22-24, 2015

Boonvisut S、Makishima S、Watanabe K、Nakayama K、Iwamoto S: Minor allele of SNPs in NCAN-CILP2 region negatively affect on plasma triglyceride but positively on LDL in Japanese. 日本人類遺伝学会第 59 回大会、東京、2014 年 11 月 20 日

Makishima S、Boonvisut S、Watanabe K、Nakayama K、Iwamoto S: A novel pathway involved in the susceptibility of non-alcoholic fatty liver diseases. American Society of Human Genetics 64th Annual Meeting, San Diego, USA, October 18-22, 2014.

Boonvisut S、Makishima S、Watanabe K、Nakayama K、Iwamoto S: Functional fine mapping of the genes involved in plasma lipid metabolism in the LD-block of NCAN/CILP2/PBX4 region. American Society of Human Genetics 64th Annual Meeting, San Diego, USA, October 18-22, 2014.

中山一大、大橋順、ムンフトルガ・ルハグワスレン、香川靖雄、宮下 洋、

岩本禎彦 : 多様な生活習慣をもつアジア・オセアニア人集団のゲノム情報の比較研究. 日本人類遺伝学会第 59 回大会、東京、2014 年 11 月 20 日

中山一大、大橋順、香川靖雄、岩本禎彦 : アジア・オセアニア人における代謝特性の民族差の理解を目指したゲノムワイド SNP 研究. 第 68 回日本人類学会大会、浜松、2014 年 11 月 1 日

中山一大、宮下洋、渡邊和寿、巻嶋咲穂、Boonvisut Supichaya、岩本禎彦 : GIP および GIPR の遺伝的多型は日本人成人の内臓脂肪蓄積と関連する. 第 35 回日本肥満学会、宮崎、2014 年 10 月 25 日.

渡邊和寿、中山一大、Leibel Rudolph、岩本禎彦 : 新規糖尿病感受性遺伝子 I1dr2 の機能解析. 第 35 回日本肥満学会、宮崎、2014 年 10 月 24 日.

中山一大、大橋 順、Munkhtulga Lkhagvasuren、宮下 洋、岩本禎彦 : モンゴル人と東アジア農耕民族の代謝特性の解明を目指したゲノム人類学研究. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会、札幌、2014 年 5 月 31 日

中山一大、宮下洋、岩本禎彦 : UCP1-3826G/A が内臓脂肪蓄積に及ぼす影響の季節性. 日本人類遺伝学会第 58 回大会、仙台、2013 年 11 月 20 日~23 日

中山一大、大橋順、ムンフトルガ・ルハグワスレン、岩本禎彦 : モンゴル人の代謝特性の解明を目指したゲノムワイド SNP 研究. 第 67 回日本人類学会大会、つくば、2013 年 11 月 2 日

中山一大、宮下洋、柳沢佳子、岩本禎彦 : 熱産生関連遺伝子多型が内臓脂肪蓄積に及ぼす影響の季節性. 第 68 回日本生理人類学会、金沢、2013 年 6 月 8 日

巻嶋咲穂、Boonvisut Supichaya、森川千絵、中山一大、岩本禎彦 : 新規肝臓脂質レベル調節分子の同定. 第 33 回日本肥満学会、東京都、2013 年 10 月 11 日~12 日.

Boonvisut Supichaya、巻嶋咲穂、森川千絵、中山一大、岩本禎彦 : Functional screening of NCAN-CILP2 region for the genes involved in plasma lipid metabolism. 日本人類遺伝学会第 58 回大会、仙台、2013 年 11 月 20 日~23 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)

名称 : 内臓脂肪蓄積感受性の判定方法  
発明者 : 岩本禎彦、中山一大、大崎紀子、下豊留玲

権利者：花王株式会社  
種類：  
番号：特願 2014-060342  
出願年月日：平成 26 年 3 月 24 日  
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岩本 禎彦 ( IWAMOTO SADAHIKO )  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10232711

##### (2) 研究分担者

中山 一大 ( NAKAYAMA KAZUHIRO )  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90301449

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：