HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	脂肪滴周囲蛋白Perilipin 1の機能解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	山本, 浩平
Description	配架番号：2414
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13035号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70564
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kohei_Yamamoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　　氏名　山　本　浩　平

学 位 論 文 題 名

脂肪滴周囲蛋白 Perilipin 1 の機能解析
(Functional analysis of lipid-droplet associated protein Perilipin 1)

【背景と目的】　Perilipin 1 (Perilipin A, PLIN1) は脂肪細胞において最初に同定された脂肪滴周囲蛋白である。脂肪細胞において PLIN1 は脂肪滴表面を覆うように存在し、脂質の貯蔵と分解の双方を調節するオーガナイジングセンターとしての役割が考えられている。PLIN1 の発見以後、共通のドメインを持った脂肪滴周囲蛋白が相次いで発見され、現在では PLIN1、PLIN2 (adipophilin, adipose differentiation-related protein, ADRP)、PLIN3 (tail-interacting protein 47, TIP47)、PLIN4 (S3-12)、PLIN5 (PAT1, LSPD5, OXPAT, MLDP) の 5 種の蛋白によって、Perilipin (PLIN) ファミリーは構成されている。PLIN ファミリーはいずれも細胞内で脂質を脂肪滴として貯蔵する作用を持つが、中でも PLIN1 はトリグリセリド分解酵素 adipose triglyceride lipase (ATGL)との相互作用部位を持ち、強力な脂質貯蔵、分解作用を持つと考えられている。一方で PLIN2 は全身的に細胞内小脂肪滴周囲に発現し、短期的な弱い貯留により、細胞内脂質の受け渡しを担うと考えられている。

PLIN1 は通常脂肪細胞またはステロイド産生組織に限局して発現しているが、近年ではマクロファージ内にも同定されている。マクロファージには少なくとも M1 マクロファージ、M2 マクロファージの二つの極性があり、M1 マクロファージは炎症を促進し、M2 マクロファージは炎症を抑制することにより、動脈硬化形成の過程で重要な役割を果たす。我々の以前の報告、および今回の検討に先んじて行った検討では、M1 マクロファージの浸潤が顕著であったプラーク内には PLIN2 の発現が著明であるのに対し、M2 マクロファージの比率が高いプラーク内には PLIN1 の発現が優位であった。この結果から、マクロファージにおける PLIN1 および PLIN2 の発現は、プラークに浸潤したマクロファージの極性と関連があり、動脈硬化の進展において何らかの役割を持っている可能性が示唆された。第一部においては、マクロファージにおける PLIN1 の過剰発現が動脈硬化の進展に及ぼす影響を明らかとすることを目的とし、過去に当科にて作製、報告した PLIN1 transgenic mice (Plin1Tg) を用いて検討を実施した。

PLIN1 にはこれまでに 4 種のスプライシングバリアント (Perilipin A; PLIN1a、Perilipin B; PLIN1b、Perilipin C; PLIN1c、Perilipin D; PLIN1d) の存在が報告されているが、脂肪細胞において主として発現している PLIN1 は PLIN1a であり、これまでの PLIN1 に関する既報の多くは、脂肪細胞における PLIN1a に関しての検討である。PLIN1 はステロイド産生組織においても発現している事が古くから知られており、ステロイド産生組織においては PLIN1a の発現に加え PLIN1c の発現が報告されているが、その違いに関する報告は少なく、ステロイド産生組織における役割を示した報告はこれまでにない。第二部においては、副腎細胞における PLIN1a、PLIN1c それぞれの機能を明らかとするため、培養副腎細胞株 Y-1 を用いて検討を実施した。

【対象と方法】　第一部）Plin1Tg を動脈硬化モデルマウスである apolipoprotein E knockout mice (ApoeKO) と交配し、Plin1Tg/ApoeKO を作製した。C57BL/6J 野生型マウス、ApoeKO、

ApoeKO/Plin1Tg を普通食下に 20 週齢まで飼育した後、安楽死させて大動脈を採取しオイルレッド O 染色にて動脈硬化領域を評価した。20 週齢における体重、性腺脂肪重量を測定し、血清脂質濃度を ELISA 法にて測定した。大動脈洞部におけるプラーク内マクロファージの極性と PLIN 発現を、免疫染色にて評価した。

第二部）Y-1 にオレイン酸およびコレステロールのいずれか一方、またはその両者を負荷して PLIN1a および PLIN1c の発現の変化を Western blot 法にて評価した。またその際の培養上清中プロゲステロン濃度を ELISA 法にて測定した。PLIN1a および PLIN1c の発現ベクターを Gateway™法にて作製し、リポフェクション法にて Y-1 にトランスフェクションさせ、Western blot 法にて PLIN1a および PLIN1c 過剰発現の誘導を確認した。Y-1 に PLIN1a または PLIN1c を過剰発現させ、培養上清中のプロゲステロン濃度を ELISA 法にて測定した。同様に Y-1 に PLIN1a または 1c を過剰発現させ、Trilostane を加えて培養上清中のプレグネノロン濃度を ELISA 法にて測定した。

【結果】　第一部）C57BL/6J ではほとんど動脈硬化領域を認めなかった。ApoeKO において広範な動脈硬化領域を認めたが、ApoeKO/Plin1Tg において動脈硬化領域面積は縮小していた。大動脈全域に対して動脈硬化領域が占める面積の割合は、C57BL/6J（3.3 ± 1.2%）と比較し ApoeKO（14.4 ± 3.0%）において有意な増大が認められ（P <0.01 vs C57BL/6J）、ApoeKO/Plin1Tg（5.6 ± 1.9%）においては ApoeKO と比較し有意な縮小が認められた(P <0.01 vs Plin1Tg/ApoeKO)。体重、性腺周囲脂肪重量、血清中性脂肪濃度は 3 群間に有意差を認めなかった。血清総コレステロール濃度は C57BL/6J と比較し、ApoeKO、ApoeKO/Plin1Tg 両群で有意に高値であったが、ApoeKO、ApoeKO/Plin1Tg 間には有意な差を認めなかった。C57BL/6J にはほとんどプラークを認めなかった。ApoeKO、ApoeKO/Plin1Tg のプラーク内にはマクロファージの浸潤が認められ、ApoeKO においては M1 マクロファージの浸潤が優位であったが、ApoeKO/Plin1Tg においては浸潤したマクロファージの極性に明確な違いを認めなかった。ApoeKO のプラーク内に PLIN1 の発現は明らかではなく、PLIN2 の高度な発現が認められた。一方で ApoeKO/Plin1Tg のプラーク内には明瞭な PLIN1 発現が観察され、高度な PLIN2 発現は認めなかった。

第二部）Y-1 において PLIN1a はオレイン酸の負荷、コレステロールの高濃度負荷により発現増強が認められた。PLIN1c はコレステロールの負荷により発現増強が見られたが、オレイン酸負荷では明らかな発現増強を認めなかった。培養上清中プロゲステロン濃度はオレイン酸負荷では有意な変化を認めなかったが、コレステロール負荷およびオレイン酸とコレステロールの共負荷にて有意な上昇を認めた。発現ベクター導入による PLIN1a および PLIN1c 過剰発現の誘導を確認した。PLIN1a または PLIN1c の過剰発現により、培養上清中のプロゲステロン濃度は有意に低下したが、プレグネノロン濃度は上昇する傾向を示した。

【考察】　通常の ApoeKO と比較して、PLIN1 の過剰発現を誘導した ApoeKO においては動脈硬化領域の減少が認められ、PLIN1 が動脈硬化の抑制作用を有していると考えられた。PLIN1 の過剰発現はマクロファージだけでなく脂肪細胞にも認められるが、体重や内臓脂肪重量、血清脂質といった一般的な動脈硬化のリスク因子について、今回の普通食を用いた比較的短期間の検討では既報と同様明確な差を認めず、PLIN1 はマクロファージにおける直接的な動脈硬化抑制作用を持つものと考えられた。Y-1 においては中性脂肪の負荷によって PLIN1a の発現が、コレステロールの負荷によって PLIN1c の発現が増強され、PLIN1a は中性脂肪の貯蔵に、PLIN1c はコレステロールエステルの貯蔵に機能している事が示唆された。PLIN1a および PLIN1c 過剰発現系を用いた検討では、プロゲステロン産生量の低下とプレグネノロン産生量増加が示唆され、PLIN1 がステロイド合成に何らかの役割を持っている可能性が示された。副腎細胞内における PLIN1 の機能を明らかとするため、今後は PLIN1 過剰発現系での検討の継続に加え PLIN1 ノックダウン系での検討も必要と考えられ、現在進行中である。

【結論】　ApoeKO における PLIN1 の過剰発現は、動脈硬化の進展を一般的な動脈硬化のリスク因子とは独立して抑制した。Y-1 における PLIN1 の過剰発現は、Y-1 のステロイドホルモン産生量に変化をもたらす可能性が示唆された。