



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	脂肪滴周囲蛋白Perilipin 1の機能解析 [全文の要約]
Author(s)	山本, 浩平
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2414 他
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/2115/70565
Type	doctoral thesis
File Information	Kohei_Yamamoto_summary.pdf



学 位 論 文 （要 約）

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

2 0 1 8 年 3 月

北 海 道 大 学

山 本 浩 平

学位論文の要約

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ズ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局限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に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エーション (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にするため、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 (ApoeK0) と交配し、Plin1Tg/ApoeK0 を作製した。C57BL/6J 野生型マウス、ApoeK0、ApoeK0/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。ApoeK0 において広範な動脈硬化領域を認めたが、ApoeK0/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 ($3.3 \pm 1.2\%$) と比較し ApoeK0 ($14.4 \pm 3.0\%$) において有意な増大が認められ ($P < 0.01$ vs C57BL/6J)、ApoeK0/Plin1Tg ($5.6 \pm 1.9\%$) においては ApoeK0 と比較し有意な縮小が認められた ($P < 0.01$ vs Plin1Tg/ApoeK0)。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、ApoeK0、ApoeK0/Plin1Tg 両群で有意に高値であったが、ApoeK0、ApoeK0/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。ApoeK0、ApoeK0/Plin1Tg のプラーク内にはマクロファージの浸潤が認められ、ApoeK0 においては M1 マクロファージの浸潤が優位であったが、ApoeK0/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。ApoeK0 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 ApoeK0/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】

第一部) 通常の ApoeK0 と比較して、PLIN1 の過剰発現を誘導した ApoeK0 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。マウスにおける動脈硬化領域の形成や増大は、リピッドコアの形成や脆弱性プラークの破綻から生じるヒトの動脈硬化性疾患を完全に反映しているとは言い難い。しかしながら本研究で見出されたプラーク内マクロファージの極性変化は、局所における炎症性の変化を

示唆しており、慢性炎症が関与する動脈硬化形成の機序は、ヒトと共通するものであると考える。

第二部) 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 の機能を明らかにするため、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】

脂肪滴周囲蛋白 PLIN1 に関し、マクロファージおよび副腎細胞における機能を遺伝子改変マウス、培養副腎細胞株を用いて考察した。本研究によって明らかとなった知見は以下の通りである。

- 1) マクロファージにおける PLIN1 の過剰発現は動脈硬化抑制的に働く。
- 2) PLIN1 は主たる動脈硬化リスク因子とは独立した動脈硬化保護作用を持つ。
- 3) マクロファージ内 PLIN1 発現量とその極性変化を誘導し炎症性を規定する可能性がある。
- 4) コレステロール負荷により副腎細胞のプロゲステロン産生量が増加する。
- 5) PLIN1 過剰発現により副腎細胞のプレグネノロン産生量は増加の傾向を示す。

ApoeK0 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。マクロファージ内脂肪滴周囲の PLIN1 発現の増加が、脂肪滴の安定貯留に寄与し、マクロファージの炎症表現型に影響を与えた可能性が推測される。動脈硬化性疾患は単一の原因ではなく多様な原因によって生じる疾患であり、その発症機序、治療戦略は病態により多岐にわたる。本研究が、今後の動脈硬化性疾患の病態の更なる解明、ひいては将来の治療戦略向上の一助となることを期待する。培養副腎細胞株においては、コレステロールの負荷によりプロゲステロンの産生量が増加するとともに PLIN1 の発現が増加し、一方で PLIN1 の強制過剰発現によってプレグネノロンの産生量が増加する傾向が示され、PLIN1 がステロイド産生に何らかの役割を持つことが示唆された。ステロイド産生組織における PLIN1 の機能はいまだ未解明であり、本研究がその機能の解明、ひいては現在原因不明とされる病態の理解、解明につながることを期待する。