



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	脂肪滴周囲蛋白Perilipin 1の機能解析
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13035
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70986
Type	doctoral thesis
File Information	Kohei_Yamamoto.pdf



学 位 論 文

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

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

目 次

基礎論文目録および学会発表目録	1 頁
1. 緒言	2-3 頁
2. 略語表	4 頁
3. 第一部	5-27 頁
Perilipin 1 過剰発現マウスにおける動脈硬化進展抑制効果の検討	
3.1 緒言	6-8 頁
3.2 実験方法	9-16 頁
3.2.1 実験に用いた動物	9 頁
3.2.2 腹腔内マクロファージにおける PLIN1 過剰発現の検討	9-11 頁
3.2.3 大動脈動脈硬化領域の評価	12 頁
3.2.4 バイオマーカーの評価	12 頁
3.2.5 プラークにおけるマクロファージ浸潤と PLIN 発現の評価	13-15 頁
3.2.6 統計学的解析	16 頁
3.3 実験結果	17-25 頁
3.3.1 腹腔内マクロファージにおける PLIN1 過剰発現の検討	17-18 頁
3.3.2 大動脈動脈硬化領域の評価	19-21 頁

3.3.3	バイオマーカーの評価	22-23 頁
3.3.4	プラークにおけるマクロファージ浸潤と PLIN 発現の評価	24-25 頁
3.4	考察	26-27 頁
4.	第二部	28-46 頁
	副腎における Perilipin 1 の機能解析	
4.1	緒言	29-30 頁
4.2	実験方法	31-35 頁
4.2.1	実験に用いた細胞	31 頁
4.2.2	脂質負荷による PLIN1a、PLIN1c 発現変化の検討	31-32 頁
4.2.3	脂質負荷によるプロゲステロン産生量変化の検討	32 頁
4.2.4	PLIN1a/1c 発現ベクターの作製	32-33 頁
4.2.5	PLIN1a/1c 発現ベクターによる強制過剰発現の確認	34 頁
4.2.6	PLIN1a/1c 過剰発現系におけるプロゲステロン産生の検討	34 頁
4.2.7	PLIN1a/1c 過剰発現系におけるプレグネノロン産生の検討	35 頁
4.2.8	統計学的解析	35 頁
4.3	実験結果	36-45 頁
4.3.1	脂質負荷による PLIN1a、PLIN1c 発現変化の検討	36-37 頁
4.3.2	脂質負荷によるプロゲステロン産生量変化の検討	38-39 頁
4.3.3	PLIN1a/1c 発現ベクターによる強制過剰発現の確認	40-41 頁

4.3.4	PLIN1a/1c 過剰発現系におけるプロゲステロン産生の検討	42-43 頁
4.3.5	PLIN1a/1c 過剰発現系におけるプレグネノロン産生の検討	44-45 頁
4.4	考察	46 頁
5.	総括および結論	47 頁
6.	謝辞	48 頁
7.	引用文献	49-52 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は下記の論文として投稿中である。

1. Yamamoto K, Miyoshi H, Cho KY, Nakamura A, Greenberg AS, Atsumi T
“Overexpression of Perilipin1 protects against atheroma progression
in apolipoprotein E knockout mice” .

本研究の一部は下記の学会で発表した。

1. Yamamoto K, Miyoshi H, Cho KY, Nakamura A, Atsumi T “Protective
effect of perilipin1 overexpression in macrophages on progression of
atherosclerosis” The 85th EAS Congress, Prague, Czech Republic, 23-
26 April 2017.
2. Yamamoto K, Miyoshi H, Cho KY, Nakamura A, Atsumi T “Perilipin1 in
macrophage protects the progression of atherosclerosis via the change
of macrophage polarity” The 9th Annual Meeting of the Asian
Association for the Study of Diabetes, Nagoya, Japan, 19-20 May 2017.

1. 緒 言

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り、脂肪細胞内最多のリン酸化蛋白である¹。脂肪細胞においては、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。基底条件下において PLIN1 は、トリグリセリド分解酵素 adipose triglyceride lipase (ATGL) の活性因子である CGI-58 と結合することで ATGL と CGI-58 との直接干渉を妨げ、さらにジアシルグリセリド分解酵素 hormone-sensitive lipase (HSL) の作用を抑制することで脂肪分解を強力に減少させる^{2,3}。一方で、カテコラミン刺激条件下においては、増加した cAMP が protein kinase A (PKA) を活性化し、HSL および PLIN1 をリン酸化する⁴。その結果、リン酸化した PLIN1 と解離した CGI-58 が ATGL の脂肪分解活性を 20 倍に増幅し、リン酸化した HSL が脂肪滴表面へ動員されリン酸化 PLIN1 との直接結合後に脂肪分解が促進される⁵。

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)⁶、PLIN3 (tail-interacting protein 47, TIP47)⁷、PLIN4 (S3-12)^{8,9}、PLIN5 (PAT1, LSPD5, OXPAT, MLDP)^{10,11,12} 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 ATGL との相互作用部位を持ち¹³、強力な脂質貯蔵、分解作用を持つと考えられている。そして、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っている。

PLIN1 ノックアウトマウスは、野生型マウスと比較し脂肪組織が約 1/4 に萎縮した痩せ型マウスとなり、脂肪細胞の脂肪滴周囲には PLIN1 に代わり、正常の成熟脂肪細胞には蛋白レベルでの発現を認めない PLIN2 の発現が認められる。PLIN1 ノックアウトマウスから単離された脂肪細胞においては、PKA 刺激のない基底状態においても緩徐な脂肪分解が持続しており、一方で PKA 刺激による脂肪分解反応の低下が認められ、脂質の貯蔵と分解双方の作用を有することが示されている¹⁴。加えてヒトにおける PLIN1 のヘテロ接合性機能喪失型変異は、家族性部分型脂肪萎縮症を呈することが報告されており¹⁵、ヒト脂肪細胞においても、脂質貯蔵における PLIN1 の重要性が示されている。

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 THP-1 細胞およびヒト単球より分化したマクロファージ内にも同定されている¹⁶。脂肪細胞における PLIN1 の機能は上述の通り十分に確立されているが、ステロイド産生組織やマクロファージにおける発現の意義については、未だ明らかになったとは言い難い。本稿においては PLIN1 に関し、第一部ではマクロファージにおける機能を、第二部では副腎における機能を明らかにすることを目的として、検討を実施した。

2. 略 語 表

ANOVA	analysis of variance
ApoeK0	apolipoprotein E knockout mice
ATGL	adipose triglyceride lipase
BSA	bovine serum albumin
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HSL	hormone-sensitive lipase
IL-6	interleukin 6
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
PBS	phosphate buffered saline
PKA	protein kinase A
PLIN	perilipin
Plin1Tg	PLIN1 transgenic mice
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
TAE	tris acetate EDTA
TNF α	tumor necrosis factor-alpha

3. 第 一 部

Perilipin 1 過剰発現マウスにおける
動脈硬化進展抑制効果の検討

3.1 緒 言

動脈硬化は脂質代謝の不均衡と、コレステロールを取り込んだマクロファージの動脈壁への集積に惹起された、不適応な免疫応答により生じる慢性炎症性疾患である¹⁷。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、動脈硬化の過程で重要な役割を果たしている。過去の検討により、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が示されている¹⁸。

我々は以前、頸動脈内膜剥離術によって得られたヒト頸動脈プラーク内のマクロファージの極性について報告した。その報告において、術前に脳虚血の症候を認めた症候性プラークにおいては、M1 マクロファージの増加が顕著であり、おもに高度な狭窄に対して予防的に手術が施行された無症候性プラークにおいては、症候群と比較して浸潤したマクロファージの絶対数が少なく、M2 マクロファージがより高頻度に観察された¹⁹。

マクロファージが脂質を取り込み泡沫化する際、泡沫化した細胞内脂肪滴の周囲に最も豊富に存在する PLIN ファミリー蛋白は PLIN2 であり、動脈硬化の過程においては炎症を増強する作用を持つ可能性が示唆されている²⁰。一方 PLIN1 は THP-1 細胞およびヒト単球より分化したマクロファージ内に同定されているが、泡沫細胞の形成におけるその役割については、未だ議論の別れるところである^{16, 21, 22}。

今回の検討に先んじ、先述のヒト頸動脈プラークにおける検討と共通の検体を用いて、プラーク内の PLIN1 および PLIN2 の発現を検討したところ、M1 マクロファージが多数見られた有症候群において、PLIN2 の発現が著明に高値であり、M2 マクロファージが高頻度に観察された無症候群において、PLIN2 と比較し PLIN1 の発現が優位であるという結果が得られた (Figure 1) (Unpublished Data)。従って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る。

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)²³ を用いて検討を実施した。

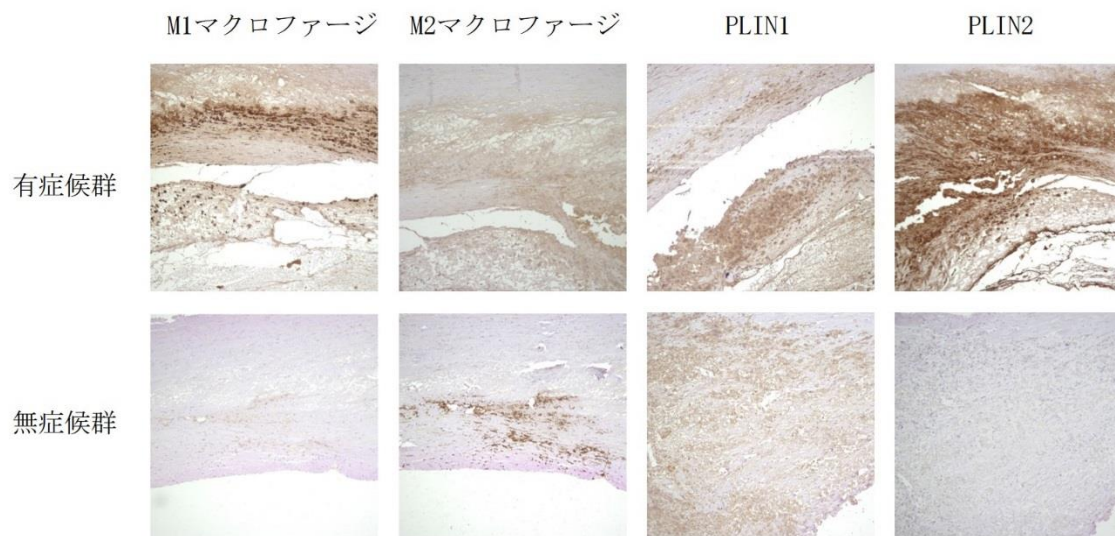


Figure 1 ヒト頸動脈プラーク内のマクロファージ極性と PLIN 発現

有症候群においては M1 マクロファージの増加が特徴的であり、PLIN2 の発現は顕著である。無症候群においては M2 マクロファージが高頻度に観察され、PLIN1 の発現が優位である。（有症候群：術前に脳虚血の症候を認めた群。不安定プラークが多く含まれていると考えられる。無症候群：術前に脳虚血の症候を認めなかった群。安定プラークが多く含まれていたと考えられる。）

3.2 実験方法

3.2.1 実験に用いた動物

PLIN1Tg は C57BL/6J をバックグラウンドとし、aP2 プロモーターを用いて過去に作製し、報告したものをを用いた^{23,24}。Plin1Tg は白色脂肪細胞において 2 倍程度に PLIN1 発現が増大するが、普通食の飼育下においては対照群と比較し、体重、糖脂質代謝に、有意な差を認めないマウスである。Apolipoprotein E knockout mice (ApoeK0) は Jackson Laboratory より購入した。C57BL/6J は日本チャールズ・リバー社より購入した。PLIN1Tg と ApoeK0 を交配し、PLIN1Tg /ApoeK0 を作製した。全てのマウスは室温 25℃の空調のもと、7 時～19 時までを明期とした明暗サイクルの条件下で飼育され、水道水ならびに普通食飼料（オリエンタル酵母工業、MF 飼料）を自由に摂取できるものとした。全ての動物実験は国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に従って行い、遺伝子組換え実験については北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って行った。

3.2.2 腹腔内マクロファージにおける

PLIN1 過剰発現の検討

腹腔内マクロファージを得るため、4% sodium thioglycolate (SIGMA-ALDRICH) phosphate buffered saline (PBS) 50 μ l を腹腔内投与し、翌日イソフルラン吸入麻酔 (AbbVie) によって安楽死させた後、PBS 3 ml にて腹腔内を洗浄し、thioglycolate 誘導マクロファージを回収した。細胞懸濁液を 1X RBC Lysis Buffer (eBioscience) にて洗浄し、RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用い

total RNA を抽出した。抽出した RNA を出発物質として、Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) による解析を実施した。RT-PCR には ReverTra-Plus (東洋紡) および Table 1 に示すプライマーを用いた (tPLIN1: transgenic PLIN1, ePLIN1: endogenous PLIN1)。内因性コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

RT-PCR 反応液を 10× Loading Buffer (タカラバイオ) を用いて 10 倍に希釈した後、1% アガロース Tris Acetate ETDA (TAE) ゲルに 10 μ l/well でアプライし、Mupid-exU (ミューピッド) を用いて 100 V、30 分間 TAE 中で電気泳動を行った。25 ng/ml Ethidium Bromide (ナカライテスク) TAE 溶液 に 30 分間浸漬した後、E-Box VX2 (Viber Lourmat) にて撮影し検討を行った。

Table 1 腹腔内マクロファージにおける PLIN1 発現確認に用いたプライマー

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>tPLIN1</i>	TCTCTCGATACACCGTGCAG	AGGGCTGCTACCTCACTGAA
<i>ePLIN1</i>	TGAAGGGTGTTACGGATAACG	ATGTCTCGGAATTCGCTCTC
<i>GAPDH</i>	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA

3.2.3 大動脈動脈硬化領域の評価

C57BL/6J、ApoeK0、ApoeK0/Plin1Tg を 20 週令で安楽死させ、大動脈洞および大動脈基部より腸骨動脈分岐部までの範囲を採取した。大動脈は付着した脂肪を除去後、en-face 法で切開し、大動脈洞部とともに 4%パラホルムアルデヒド（和光純薬工業）で固定した。大動脈洞部は 10 μ m 厚の凍結切片を作製した。

大動脈洞部切片および大動脈は、蒸留水にて 30 秒間洗浄後、60% 2-プロパノール（ナカライテスク）にて 1 分間アルコール浸透、37°C のオイルレッド O 染色液にて 15 分間染色を行った。オイルレッド O 染色液は、オイルレッド O 0.3g（和光純薬工業）と 99% 2-プロパノール 100ml を激しく振盪した後、蒸留水 70ml を加えて激しく振盪し、濾過したものを用いた。オイルレッド O 染色液の作製は遮光下で行った。60% 2-プロパノールにて 2 分間分別を行い、大動脈洞部切片に関しては、蒸留水にて 3 分間洗浄後、マイヤーヘマトキシリン溶液（和光純薬工業株式会社）にて 5 分間染色、流水にて 2 分間洗浄を行った。アンモニア水（健栄製薬）にて 30 秒間色出しを行い、流水にて 5 分間洗浄後、アパチ封入剤（和光純薬工業）にて封入した。封入後 HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000（KEYENCE）を用いて観察を行い、大動脈に関しては BZ-II 解析アプリケーション（KEYENCE）を用いて、採取された大動脈全域および染色領域の面積測定を行った。

3.2.4 バイオマーカーの評価

C57BL/6J、ApoeK0、ApoeK0/Plin1Tg は安楽死前にイソフルランによる吸入麻酔下に体重測定を行い、心臓血を採取し、性腺周囲脂肪重量を測定した。心臓血から血清を分離し、トリグリセライド E-テストワコー（和光純薬工業）を用いて血清中の中性脂肪濃度を、コレステロール E-テストワコー（和光純薬工業）を用いて血清中の総コレステロール濃度を測定した。

3.2.5 プラークにおける マクロファージ浸潤と PLIN 発現の評価

大動脈洞部凍結切片を風乾し、アセトンにて 30 秒間固定後、PBS にて 5 分間の洗浄を 3 回実施した。0.03% 過酸化水素（和光純薬工業）メタノール（和光純薬工業）溶液にて 30 分間クエンチング処理を行い、PBS にて 5 分間の洗浄を 3 回実施した。1% Bovine Serum Albumin (BSA) (SIGMA-ALDRICH) 溶液にて 60 分間ブロッキング処理を行い、Can Get Signal® Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution A（東洋紡）にて希釈した一次抗体を用いて、一次反応を 4°C overnight で行った。PBS にて 5 分間の洗浄を 4 回行った後、希釈が必要な二次抗体に関しては Can Get Signal® Immunostain Immunoreaction Enhancer Solution B（東洋紡）にて希釈し、二次反応を室温 60 分間行った。二次抗体がビオチン標識のものに関しては、PBS にて 5 分間の洗浄を 4 回行った後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（ニチレイバイオサイエンス）を用いて三次反応を室温 60 分間行った。PBS にて 5 分間の洗浄を 3 回行った後、DAB 基質キット（ニチレイバイオサイエンス）を用いて発色反応を実施した。流水にて 15 分間洗浄した後、マイヤーヘマトキシリン溶液にて 10 秒間染色し、流水にて 5 分間洗浄を実施した。70% エタノール（和光純薬工業）に 30 秒間、90% エタノールに 1 分間、100% エタノールに 3 分間連続して浸漬した後、新たな 100% エタノールに 5 分間浸漬し脱水した。溶液を取り替えながらキシレンに 10 分間ずつ 3 回浸漬して透徹し、マウントクイック（大道産業）を用いて封入した。封入後 HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 を用いて観察を行った。

一次抗体として、マクロファージの検出には抗 CD68 抗体 (Abcam)、M1 マクロファージの検出には抗 CD11c 抗体 (Bio-Rad)、M2 マクロファージの検出には抗 CD206 抗体 (Abcam)、PLIN1 および PLIN2 の検出にはそれぞれ抗 PLIN1 抗体、抗 PLIN2 抗体を用いた^{2,25}。二次抗体として Goat Anti-Rat IgG H&L (Biotin) (Abcam)、ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (ニチレイバイオサイエンス)、Rabbit Anti-Armenian hamster IgG H&L (HRP) (Abcam) のうちそれぞれ適切なものを用いた。最終的に使用した条件を太字とし、検討を行った条件とあわせ Table 2 に示す。

Table 2 免疫染色に用いた抗体と染色条件

一次抗体	CD68	CD11c	CD206	PLIN1	PLIN2
					200
			1000		
一次抗体	1000	20	3000	100	500
希釈倍率（倍）	2000	50	5000	200	1000
			10000	400	3000
					5000
二次抗体	Rat	Armerian-Hamster	Rabbit	Rabbit	Rabbit
二次抗体		500			
希釈倍率（倍）	1000	1000	1	1	1
					5
		150	20		10
	90	240	30	60	20
発色時間（秒）	180	300	60	120	30
	300	480	90	150	150
		1200	300	300	180
					240

3.2.6 統計学的解析

結果は平均±標準偏差にて表記した。3 群間の比較には analysis of variance (ANOVA) を用い、Post hoc 解析には Tukey-Kramer 検定を用いた。統計解析には JMP Pro version 12.0.1 (SAS) を用い、P 値 0.05 未満を有意とした。

3.3 実 験 結 果

3.3.1 腹腔内マクロファージにおける PLIN1 過剰発現の検討

C57BL/6J および Plin1Tg より採取した thioglycollate 誘導性腹腔内マクロファージの RT-PCR による検討において、Plin1Tg では内因性 PLIN1 遺伝子に加え、C57BL/6J では認められない PLIN1 導入遺伝子が検出され、Plin1Tg のマクロファージにおける PLIN1 過剰発現の誘導が確認された (Figure 2)。

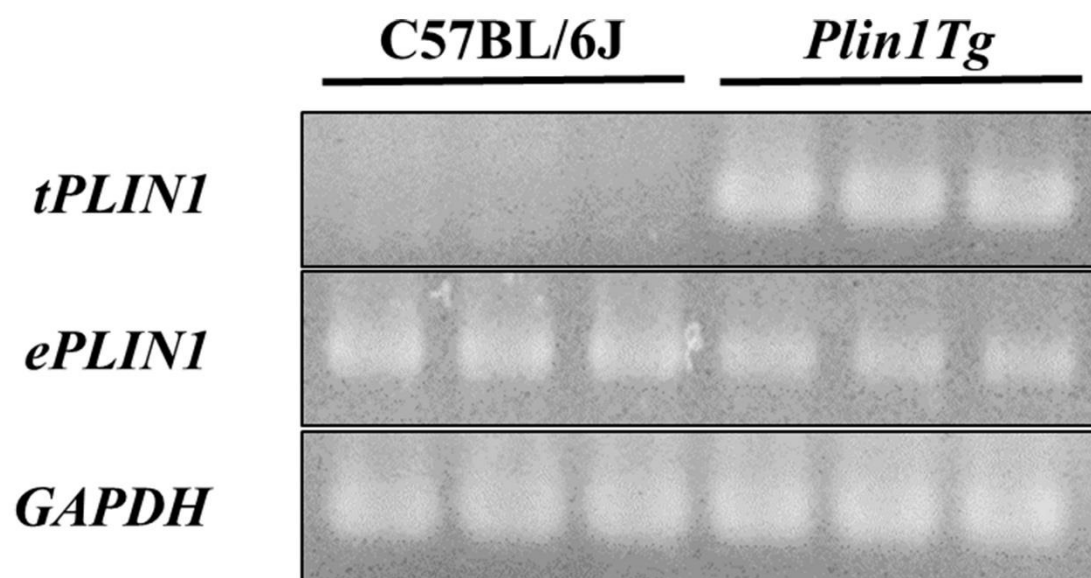


Figure 2 腹腔内マクロファージにおける PLIN1 導入遺伝子発現

C57BL/6J マウス及び *Plin1Tg* マウスの Thioglycollate 誘導性腹腔内マクロファージより抽出した RNA の RT-PCR 電気泳動像。tPLIN1: transgenic PLIN1, ePLIN1: endogenous PLIN1、GAPDH は内因性コントロール。

3.3.2 大動脈動脈硬化領域の評価

大動脈洞部切片および大動脈における動脈硬化領域を、オイルレッド O 染色にて評価した。大動脈洞部において、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 (Figure 3)。大動脈全域においても大動脈洞部と同様、動脈硬化領域は C57BL/6J においてはほとんど認めず、ApoeK0 においては広範な出現を認め、ApoeK0/Plin1Tg において減少を認めた (Figure 4A)。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) (Figure 4B)。

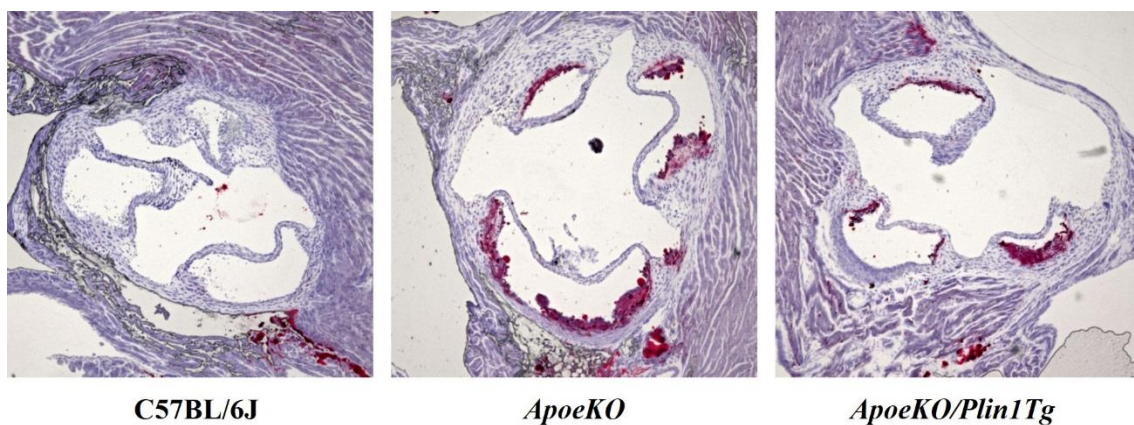


Figure 3 大動脈洞部における動脈硬化領域
大動脈洞部 10 μ m 厚凍結切片のオイルレッド O 染色像。C57BL/6J、ApoeKO、ApoeKO/Plin1Tg の各群の代表的結果を示す。

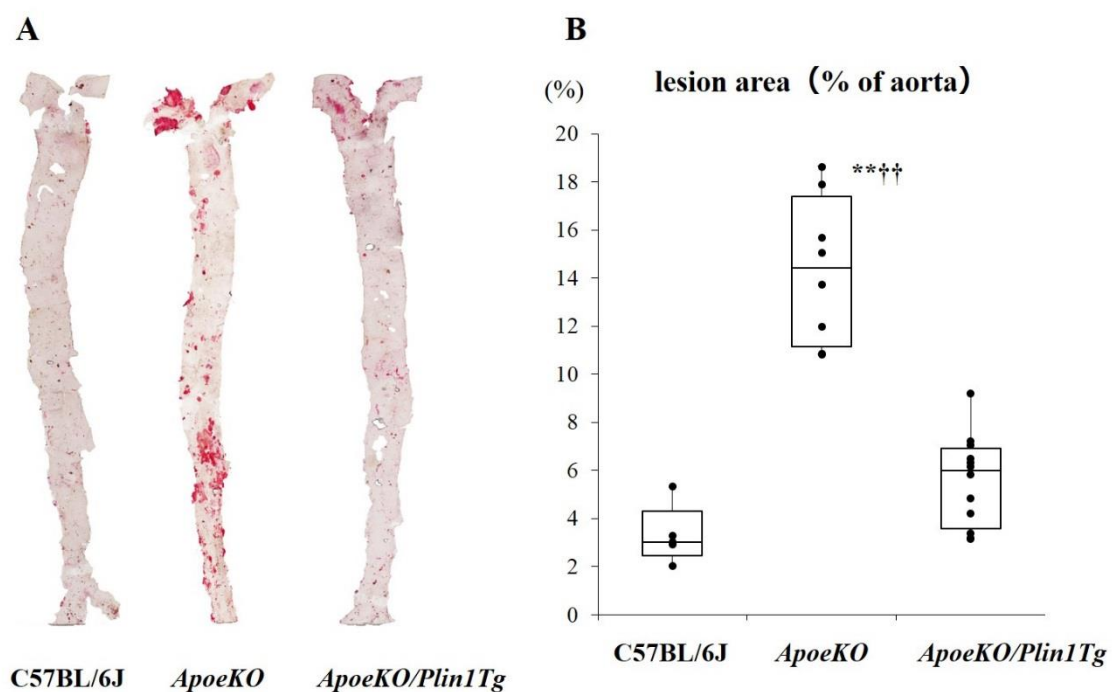


Figure 4 大動脈全域における動脈硬化領域

A) 大動脈全域の en-face 法によるオイルレッド O 染色像。C57BL/6J、ApoeKO、ApoeKO/Plin1Tg の各群の代表的結果を示す。B) 大動脈全域に対して動脈硬化領域が占める割合面積の一元配置図。** P < 0.01 vs C57BL/6J, †† P < 0.01 vs Plin1Tg/ApoeKO.

3.3.3 バイオマーカーの評価

ApoeK0 における PLIN1 の過剰発現が、バイオマーカーにどのような影響を及ぼすかを検討した。結果を Table 3 に示す。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。

Table 3 バイオマーカー

	C57BL/6J	<i>ApoeKO</i>	<i>Plin1Tg/ApoeKO</i>	P
body weight (g)	26.6 ± 3.1	29.0 ± 4.5	27.5 ± 3.9	0.3735
gonadal fat (mg)	356 ± 78	332 ± 124	424 ± 190	0.2997
triglyceride (mg/dl)	69 ± 25	99 ± 43	120 ± 71	0.1345
total cholesterol (mg/dl)	72 ± 11	395 ± 80*	471 ± 138*	<0.01

*p <0.01 vs C57BL/6J.

3.3.4 プラークにおける マクロファージ浸潤と PLIN 発現の評価

プラーク内に浸潤したマクロファージの極性、およびプラーク内に発現している PLIN1、PLIN2 の発現を評価した (Figure 5)。C57BL/6J にはほとんどプラークを認めず、明らかなマクロファージ浸潤および PLIN 発現は認められなかった。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。

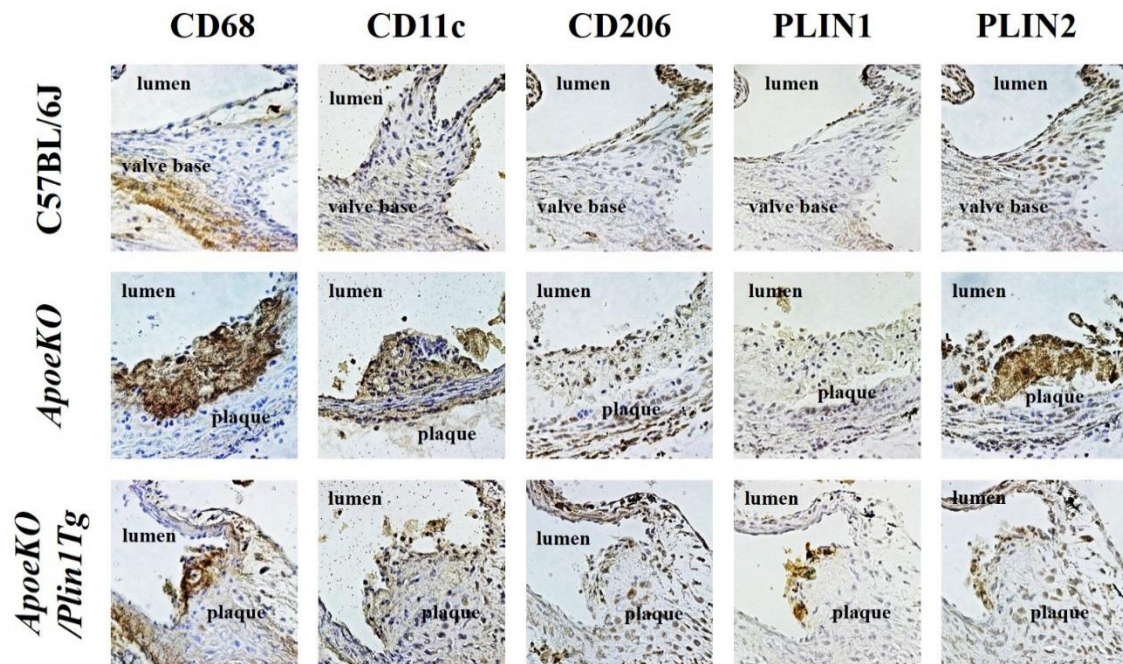


Figure 5 プラーク内に浸潤したマクロファージと PLIN 発現
大動脈洞部凍結切片におけるマクロファージおよび PLIN の免疫染色像。
C57BL/6J、ApoeKO、ApoeKO/Plin1Tg の各群の代表的結果を示す。マイヤーヘマトキシリン溶液および抗 CD68 抗体（マクロファージ）、抗 CD11c 抗体（M1 マクロファージ）、抗 CD206 抗体（M2 マクロファージ）、抗 PLIN1 抗体（PLIN1）、抗 PLIN2 抗体（PLIN2）を用いて酵素抗体法にて染色し、動脈硬化プラークの代表的な部位（ApoeKO および ApoeKO/Plin1Tg）もしくは大動脈弁基部（C57BL/6J）を示した。

3.4 考 察

本研究において、我々は PLIN1 の過剰発現が動脈硬化の進展にどのような影響を及ぼすかを評価した。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事を支持する結果となった。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通り明確な差を認めず、この動脈硬化抑制作用はマクロファージにおける直接的な作用と考えられた。近年の報告では LDL 受容体ノックアウトマウスにおいて、PLIN1 を同時にノックアウトすると動脈硬化領域が増大したとするものがあり²⁶、本検討と同様 PLIN1 の動脈硬化保護作用を示す知見と考えられる。しかしながら既報においては、PLIN1 機能不全によって明らかな体重および脂肪重量の減少が認められており、動脈硬化保護作用が PLIN1 の間接的な作用であった可能性を除外できていなかった。我々の知見は過去の報告と一致して PLIN1 の動脈硬化保護作用を示し、加えてその作用がマクロファージにおける直接的な作用であったことを明確にしたものと考えられる。

我々はまた、PLIN1 の過剰発現がプラーク内のマクロファージ極性変化を誘導した可能性を見出しており、この変化は動脈硬化領域の減少を説明し得るものであるかもしれない。プラーク内マクロファージのバランスは動的であり、マクロファージの絶対数および炎症表現型双方が、プラークの運命には影響を及ぼすとされる¹⁷。PLIN1 は THP-1 細胞およびヒト単球より分化したマクロファージ内に同定されているが、泡沫細胞の形成におけるその役割については、未だ議論の別れるところである^{16, 21, 22}。一方で PLIN2 に関しては、ヒトおよびマウスのマクロファージから分化した泡沫細胞内において、最も豊富な PLIN ファミリー蛋白として知られており^{27, 28, 29}、アセチル化 LDL コレステロールによって誘導されたマクロファージにおいて、PLIN2 は tumor necrosis factor- α (TNF α)、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、interleukin 6 (IL-6) の産生

を増加させ、動脈硬化の形成において炎症を増強することがその役割の一つではないかと推察されている²⁰。ApoEKOにおいてPLIN2を不活化すると、動脈硬化領域内の泡沫細胞における脂肪滴数が有意に減少し、動脈硬化を抑制したという報告があり、PLIN1と反対にPLIN2は動脈硬化惹起性に作用していることが示唆される²⁸。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。

脂肪細胞においてPLIN1とPLIN2に密接な関連があることは十分に確立されている。通常の脂肪細胞分化の培養過程においては、培養初期の未分化脂肪細胞にはPLIN2の発現が生じ、数日後にPLIN1の発現が生じてくるに従いPLIN2発現は消失していく。一方でPLIN1を欠損し脂肪細胞へ分化させると、分化の過程においてPLIN2の発現は一定のまま残存する⁴。PLIN1ノックアウトマウスの脂肪細胞においては、PLIN1ではなくPLIN2が小型化した脂肪滴の表面を覆っており、基底条件下では脂肪分解反応が増加し、PKA刺激下では脂肪分解反応が低下している¹⁴。

PLIN1は基底条件下においては脂肪分解を抑制し安定して中性脂肪を貯蔵するとともに、PKA刺激条件下においては脂肪分解をもたらす。一方、PLIN2は効果的に脂質を貯蔵することができず、PKAの非刺激条件下においても少量ではあるが持続的な脂肪分解を生じている。故に、PLIN1ノックアウトマウスにおいては、恒常的な弱い脂肪分解のため縮小化した脂肪細胞、脂肪組織が観察される³⁰。

マクロファージが泡沫細胞へ分化する過程において、細胞内の脂肪滴表面には通常PLIN2が存在している³¹。マクロファージ内へ過剰な脂質が流入すると、PLIN2の脂質貯蔵能はPLIN1と比較し劣るため、微弱な脂肪分解が常に生じる事となり、マクロファージ内およびマクロファージ周囲の遊離脂肪酸および遊離コレステロール濃度上昇を誘導する可能性がある。マクロファージ内のPLIN1発現量が多くなれば、中性脂肪やコレステロールは安定して脂肪滴内に貯蔵されるようになるため、脂肪分解を介した脂肪酸の産生は抑制されることとなり、それ故にプラーク内の炎症が抑制される結果となるのかもしれない。しかしながらその機序を証明するためには、更なる検討が必要である。

4. 第 二 部

副腎における Perilipin 1 の機能解析

4.1 緒 言

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³²、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 は脂肪細胞に加え、副腎皮質細胞や精巣細胞、卵巣細胞などの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³³、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、スプライシングバリエーション間の違いに関しての既報は少なく、その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。

当教室では以前脂肪細胞における PLIN1 の発現調節機構について、ルシフェラーゼアッセイを用いて検討、報告しており、脂肪細胞においては Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) が PLIN1 の転写調節を担っている事が明らかとなっている³⁴。当教室先行研究において、同様の手法で培養副腎細胞株 Y-1 における発現調節機構をルシフェラーゼアッセイにて検討したところ、培養脂肪細胞では著明なルシフェラーゼ活性の増加が見られた PPAR γ の応答配列を含むレポーター遺伝子を導入しても、Y-1 においてはコントロールベクターと比較し明らかなルシフェラーゼ活性の増加はなく、副腎細胞においては脂肪細胞とは異なる PLIN1 の発現調節機構の存在が示唆された (Unpublished Data)。

培養肝細胞に PLIN1a、PLIN1c を強制過剰発現し、細胞内に貯留する脂質と発現する PLIN の関連をみた検討においては、PLIN1a と中性脂肪、PLIN1c とコレステロールエステルの局在に相関が見られている³⁵。ステロイド産生組織でのステロイド合成の過程における出発物質は、細胞内に取り込まれたコレステロールエステルであり、ステロイド産生組織においてのみ PLIN1c が明瞭に発現している事実と合わせ、PLIN1、特に PLIN1c は、ステロイド産生組織において、コレステロールエステルの貯蔵等を介して、ステロイド合成の過程に何らかの関わりを有する可能性が推測される。

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、脂質負荷による PLIN1a、PLIN1c 発現量の変化、PLIN1a、PLIN1c 発現ベクターの作製、PLIN1a、PLIN1c 強制過剰発現によるステロイドホルモン産生量の変化についての検討を実施した。

4.2 実験方法

4.2.1 実験に用いた細胞

実験には American Type Culture Collection より購入した培養副腎細胞株 Y-1 を、Passage 8-12 の期間で用いた。培地として Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12) (SIGMA-ALDRICH) に 15% Horse serum, New Zealand Origin (GIBCO)、2.5% Fetal bovine serum (GIBCO)、1% Penicillin/streptomycin (Meiji Seika ファルマ) の割合で加えたものを使用し、5% CO₂、37°C の環境で培養した。

4.2.2 脂質負荷による

PLIN1a、PLIN1c 発現変化の検討

6-well plate に Y-1 を 2.0×10^5 個/well で播種し、翌日コレステロール 0 or 50 or 100 or 200 μ M、かつオレイン酸 0 or 150 μ M にて培地に添加した。overnight で培養後、CellLytic M (SIGMA-ALDRICH) を用いて手順書に従い蛋白を抽出し、Western blot 法を用いて PLIN1a 蛋白、PLIN1c 蛋白を検出した。内因性コントロールには β -actin を用いた。

負荷用コレステロールの調整は既報に従い、コレステロール (SIGMA-ALDRICH) をクロロホルム (ナカライテスク) およびメタノール (和光純薬工業) の等容量混和液にて溶解して 50 mg/ml のコレステロールストックとし、ガラス容器内で窒素ガスを用いてクロロホルムおよびメタノールを揮発させ、8 mM Methyl- β -cyclodextrin (SIGMA-ALDRICH) 水溶液を加えてコレステロール 1mM とし、vortex および sonication にて混和し、37°C にて overnight で溶解のち、直前に 0.45 μ m フィルターにて濾過して使用した。負荷用オレイン酸の調整は同様に既報に従い、オレイン酸 (SIGMA-ALDRICH) をエタノールで溶解して 25 mg/ml のオレイン酸ストックとし、等容量の 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液

(関東化学)を加えて vortex にて混和し、2.4 mM fatty acid free BSA (SIGMA-ALDRICH) 水溶液を加え、50°Cにて 5 分間溶解ののち、直前に 0.22 μ m フィルターにて濾過して使用した。

Wester blot 法には、一次抗体として PLIN1a および PLIN1c の検出には抗 PLIN1 抗体^{2,25} を 1000 倍に、 β -actin の検出には Actin (C-11) (Santa Cruz) を 2000 倍に、Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution A (東洋紡)にて希釈して用い、二次抗体として抗 PLIN1 抗体に対し Goat Anti-rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate (BIO RAD) を 10000 倍に、Actin (C-11) に対し Donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz) を 20000 倍に、Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution B (東洋紡)にて希釈して用いた。

4.2.3 脂質負荷による

プロゲステロン産生量変化の検討

12-well plate に Y-1 を 1.0×10^5 個/well で播種し、翌日コレステロール 0 or 50 μ M、かつオレイン酸 0 or 150 μ M にて培地に添加した。overnight で培養後、培地を単味の DMEM/F12 1.0 ml/well に変更し、更に 37°C で 3 時間培養ののち、培養上清を回収し、Progesterone EIA Kit (Cayman) にて手順書に従い、培養液中のプロゲステロン濃度を測定した。

4.2.4 PLIN1a/1c 発現ベクターの作製

C57BL/6J マウスの副腎より RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いて得られた total RNA を出発物質として、ReverTra-Plus™ (東洋紡)を用いて手順書に従い、RT-PCR にて PLIN1a、PLIN1c の cDNA を作製した。得られた cDNA をテンプレートとし、pENTR™/SD/D-TOPO™ (Thermo Fisher) をエントリークロン、Gateway™ pEF-DEST51 Vector (Thermo Fisher) をデスティネーションベクターとして、Gateway™法にて手順書に従い PLIN1a、PLIN1c の発現ベクターを作製した。作製に用いたプライマーを Table 4 に示す。

Table 4 PLIN1a、PLIN1c 発現ベクター作製に使用したプライマー

Gene		Primer
<i>PLIN1a</i> (RT-PCR)	Forward	GCGTGGAGAGTAAGGATGTCA
	Reverse	AGCAGGGGCGCAGTCT
<i>PLIN1c</i> (RT-PCR)	Forward	GTAAGGATGTCAATGAACAAGGGCCCA
	Reverse	TACTCTATTCCATTCCCCTCCTTTTCAC
<i>PLIN1a</i> (TOPO® cloning)	Forward	CACCGTAAGGATGTCAATGAACAAGGGCC
	Reverse	TCACTTGTCATCGTCATCCTTG TAGTCGCTCTTCTTGCGCAGCTGG
<i>PLIN1c</i> (TOPO® cloning)	Forward	CACCGTAAGGATGTCAATGAACAAGGGCC
	Reverse	CTCTATTCCATTCCCCTCCTTTTCAC

4.2.5 PLIN1a/1c 発現ベクターによる 強制過剰発現の確認

12-well plate に Y-1 を 1.0×10^5 個/well で播種し、翌日 Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher) $2 \mu\text{l/well}$ を用いて、手順書に従い、インサートを挿入していないコントロールベクター (Gateway™ pEF-DEST51 Vector: Thermo Fisher) および作製した PLIN1a、PLIN1c 発現ベクターを、DNA $1 \mu\text{g/well}$ にて Y-1 へトランスフェクションした。トランスフェクションから 48 時間後に Cellytic M (SIGMA-ALDRICH) を用いて手順書に従い蛋白を抽出し、Western blot 法を用いて PLIN1a 蛋白、PLIN1c 蛋白を検出した。内因性コントロールには β -actin を用いた。Western blot 法に使用した抗体および抗体希釈条件は 4.2.2 と同様とした。

4.2.6 PLIN1a/1c 過剰発現系における プロゲステロン産生の検討

12-well plate に Y-1 を 1.0×10^5 個/well で播種し、翌日 4.2.5 と同様の手法でコントロールベクターおよび PLIN1a、PLIN1c 発現ベクターを Y-1 へトランスフェクションした。トランスフェクションの翌日、コレステロール 0 or $50 \mu\text{M}$ 、かつオレイン酸 0 or $150 \mu\text{M}$ にて培地に添加した。トランスフェクションの 48 時間後、培地を単味の DMEM/F12 1.0 ml/well に変更し、更に 37°C で 3 時間培養ののち、培養上清を回収し、Progesterone EIA Kit (Cayman) にて手順書に従い、培養液中のプロゲステロン濃度を測定した。

4.2.7 PLIN1a/1c 過剰発現系における プレグネノロン産生の検討

12-well plate に Y-1 を 1.0×10^5 個/well で播種し、翌日 4.2.5 と同様の手法でコントロールベクターおよび PLIN1a、PLIN1c 発現ベクターを Y-1 へトランスフェクションした。トランスフェクションの翌日、コレステロール 0 or 50 μM を培地に添加した。トランスフェクションの 48 時間後、培地を単味の DMEM/F12 1.0 ml/well に変更し、Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH) (SIGMA-ALDRICH) 0 or 50 or 500 pM および Trilostane (SIGMA-ALDRICH) 30 μM を添加し、更に 37°C で 3 時間培養ののち、培養上清を回収し、Pregnenolone ELISA Kit (Abnova) にて手順書に従い、培養液中のプレグネノロン濃度を測定した。

4.2.8 統計学的解析

結果は平均±標準誤差にて表記した。3 群間以上の比較には analysis of variance (ANOVA) を用い、Post hoc 解析には Tukey-Kramer 検定を用いた。統計解析には JMP Pro version 12.0.1 (SAS) を用い、P 値 0.05 未満を有意とした。

4.3 実 験 結 果

4.3.1 脂質負荷による

PLIN1a、PLIN1c 発現変化の検討

培養副腎細胞株 Y-1 に脂質負荷を行い、Western blot 法にて PLIN1a、PLIN1c 発現の変化を検討した。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。PLIN1a、PLIN1c の機能を個別に評価するため、以降の検討ではコレステロールの負荷濃度は 50 μ M とした。

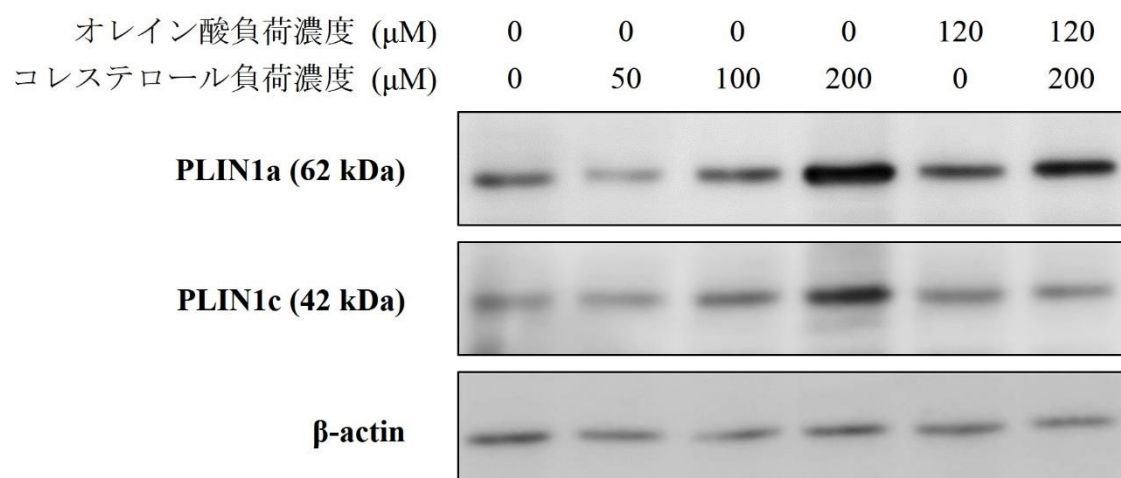


Figure 6 脂質負荷による PLIN1a、PLIN1c 発現の変化

脂質負荷を行い培養した培養副腎細胞株 Y-1 の Western blot 像。様々な濃度でオレイン酸、コレステロールを添加し、overnight で培養後に蛋白を抽出し、一次抗体として抗 PLIN1 抗体、内因性コントロールして β -actin を用いた。同じ検討を 3 度繰り返し行い、代表的な結果を図示した。

4.3.2 脂質負荷による プロゲステロン産生量変化の検討

培養副腎細胞株 Y-1 に脂質負荷を行い、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法にて培養上清中のプロゲステロン濃度を測定した。脂質負荷はオレイン酸 150 μ M、コレステロール 50 μ M、およびそれら共負荷にて行った。プロゲステロン濃度は脂質負荷なし (1616 $\pm$ 50 pg/ml) と比較し、オレイン酸負荷 (1615 $\pm$ 26 pg/ml) では有意な変化を認めなかったが、コレステロール負荷 (2075 $\pm$ 41 pg/ml) およびオレイン酸とコレステロールの共負荷 (2101 $\pm$ 23 pg/ml) にて有意 ($P < 0.01$) な上昇を認めた。

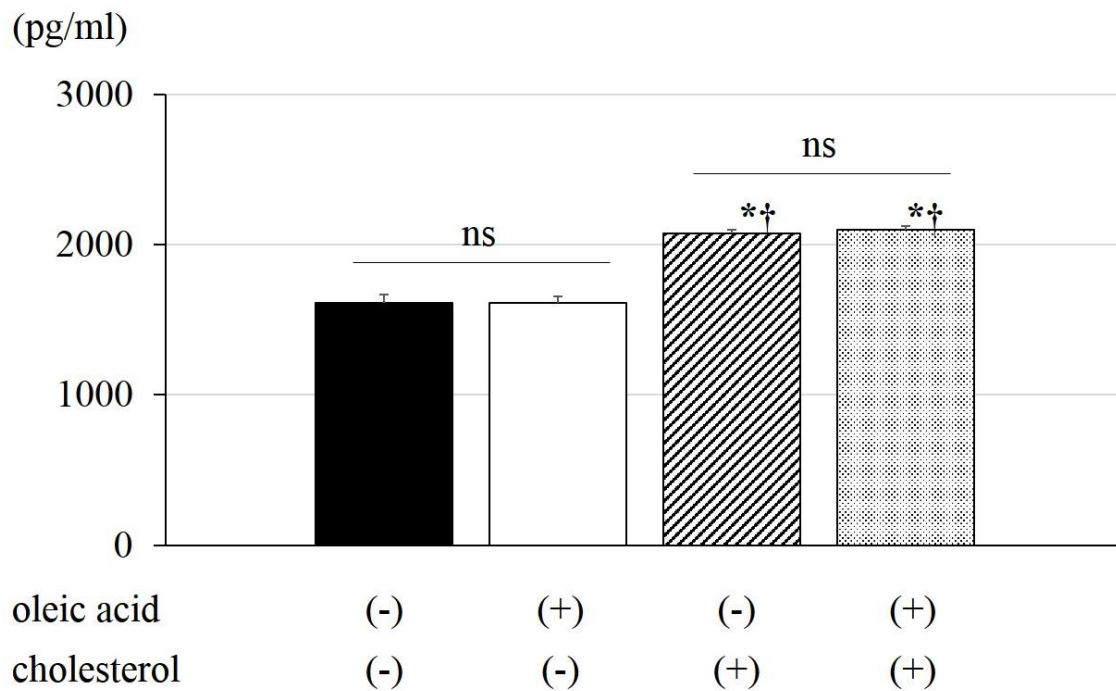


Figure 7 脂質負荷によるプロゲステロン産生量の変化

脂質負荷を行い培養した培養副腎細胞株 Y-1 の培養上清中プロゲステロン濃度。triplicate にて同じ検討を 3 度繰り返し行い、代表的な結果を図示した。

*P < 0.01 vs oleic acid (-) cholesterol (-), †P < 0.01 vs oleic acid (+) cholesterol (-).

4.3.3 PLIN1a、PLIN1c 発現ベクターによる 強制過剰発現系の確認

培養副腎細胞株 Y-1 にコントロールベクターおよび PLIN1a、PLIN1c 発現ベクターをトランスフェクションし、Western blot 法にて PLIN1a、PLIN1c 発現の変化を検討した。PLIN1a、PLIN1c とともに発現ベクター導入による強制過剰発現の実現を確認した。

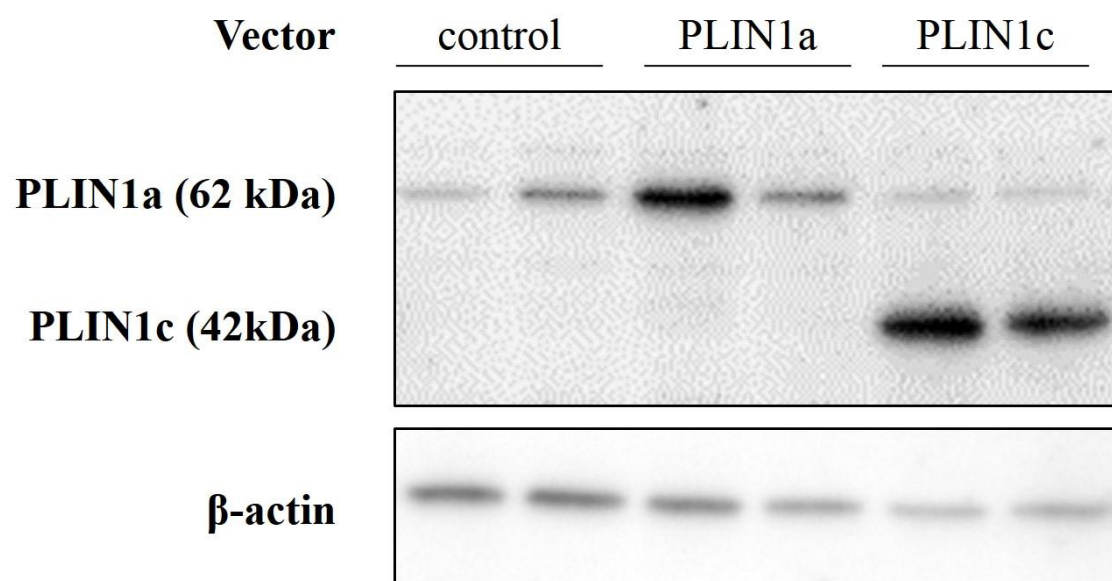


Figure 8 PLIN1a、PLIN1c による強制過剰発現系の確認
 コントロールベクター、PLIN1a、PLIN1c 発現ベクターのトランスフェクション
 を行った培養副腎細胞株 Y-1 の Western blot 像。

4.3.4 PLIN1a/1c 過剰発現系における プロゲステロン産生の検討

培養副腎細胞株 Y-1 にコントロールベクターおよび PLIN1a、PLIN1c 発現ベクターをトランスフェクションし、ELISA 法にて培養上清中のプロゲステロン濃度を測定した。脂質負荷はオレイン酸 150 μ M、コレステロール 50 μ M、およびそれらの共負荷にて行った。脂質負荷の有無、負荷した脂質の種類に関わらず、コントロールベクターと比較し、PLIN1a、PLIN1c 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 ($P < 0.01$) 低下した。

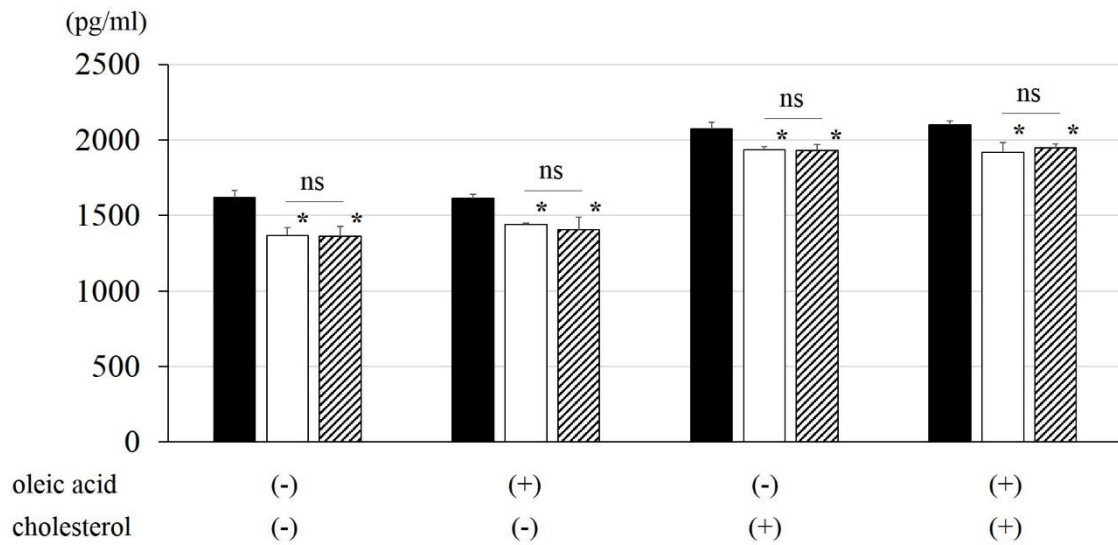


Figure 9 PLIN1a、PLIN1c 強制過剰発現によるプロゲステロン産生量の変化
培養副腎細胞株 Y-1 の培養上清中プロゲステロン濃度。黒塗りはコントロールベクター、白抜きは PLIN1a 発現ベクター、斜線付きは PLIN1c 発現ベクターをトランスフェクションしたものを示す。triplicate にて同じ検討を 3 度繰り返して行い、代表的な結果を図示した。*P < 0.01 vs control vector.

4.3.5 PLIN1a/1c 過剰発現系における プレグネノロン産生の検討

培養副腎細胞株 Y-1 にコントロールベクターおよび PLIN1a、PLIN1c 発現ベクターをトランスフェクションし、ELISA 法にて培養上清中のプレグネノロン濃度を測定した。脂質負荷はコレステロール 50 μ M、ACTH 負荷は 50 pM もしくは 500 pM にて行った。PLIN1a、PLIN1c の過剰発現により、培養上清中のプレグネノロン濃度は上昇の傾向を示し、コレステロール、ACTH の負荷によってより顕著となる傾向が示された。

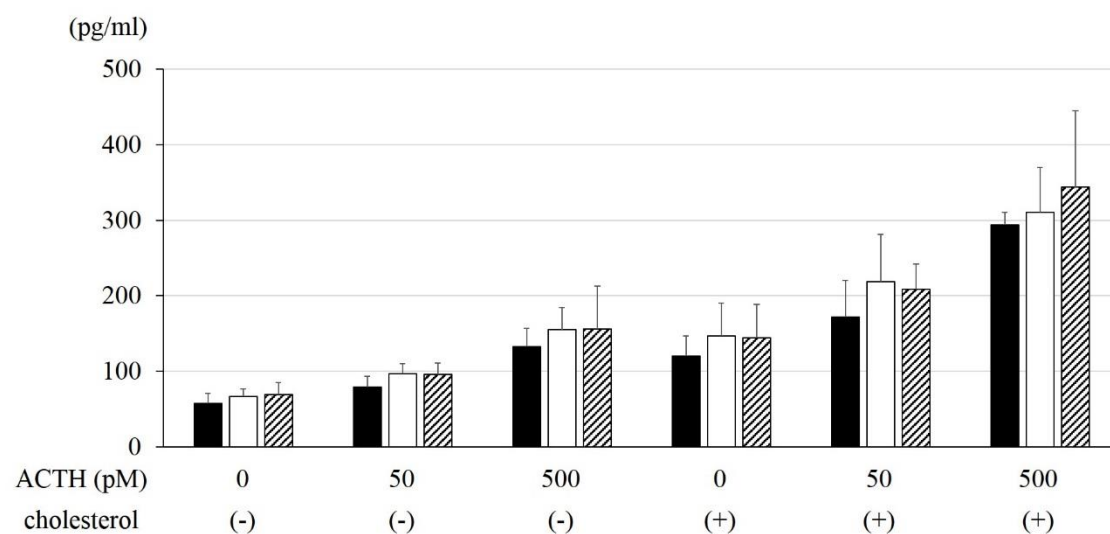


Figure 10 PLIN1a、PLIN1c 強制過剰発現によるプレグネノロン産生量の変化
培養副腎細胞株 Y-1 の培養上清中プロゲステロン濃度。黒塗りはコントロールベクター、白抜きは PLIN1a 発現ベクター、斜線付きは PLIN1c 発現ベクターをトランスフェクションしたものを示す。triplicate にて同じ検討を 3 度繰り返し行い、代表的な結果を図示した。

4.4 考 察

本検討において我々は、ステロイド産生組織における PLIN1 の役割、および PLIN1a、PLIN1c の違いを明らかにするため、培養副腎細胞株 Y-1 を用い、脂質の負荷が PLIN1 発現に及ぼす影響と、PLIN1a および PLIN1c の過剰発現系を作製し、それぞれの過剰発現がステロイド産生にどのような影響を及ぼすかを評価した。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 の発現が主として増強され、既報と同様³⁵、PLIN1a は主に中性脂肪の貯蔵に、PLIN1c は主にコレステロールエステルの貯蔵に機能している事を支持する結果であった。

過剰発現系を用いた検討においては、PLIN1a、PLIN1c いずれの過剰発現系においても、PLIN1 の過剰発現によって Y-1 のプロゲステロン産生量は低下する結果となった。この結果からは PLIN1 の発現増強によって、細胞内に貯蔵可能な脂質の量が増加し、ステロイド合成の低下につながった可能性と、プロゲステロンは Y-1 の主たる産生ステロイドではあるものの、培養細胞のステロイド合成能の変化を正確には反映していない可能性が考えられた。そのため同様の過剰発現系を用いて、ACTH 負荷によりステロイド産生刺激を加え、ステロイド合成系の最も上流に位置するプレグネノロンの測定を実施したところ、細胞培養液中のプレグネノロン濃度は、PLIN1a、PLIN1c の過剰発現によって上昇し、その変化は ACTH の刺激によってより顕著となるという結果が得られた。

既報では HSL ノックアウトマウスにおいて、コルチコステロン産生量が減少し、ACTH への反応性が低下することや³⁶、vimentin ノックアウトマウスにおいてもコルチコステロン産生量が減少し、ACTH への反応性が低下する事が報告されており³⁷、同様に HSL などと干渉し細胞内脂質代謝に重要な機能を持つ 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は高い。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。

5. 総括および結論

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 発現量の変化が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。

6. 謝 辞

本研究実施の機会を与えて頂きました、北海道大学大学院医学院・医学研究院免疫・代謝内科学教室教授、渥美達也先生に深く感謝の意を表します。また本研究を統括し、全般にわたり直接のご指導を頂きました同教室診療准教授、三好秀明先生に深く感謝の意を表します。

北海道大学病院検査・輸血部准教授、清水力先生には終始丁寧なご指導、ご助言を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

北海道大学病院臨床研修センター准教授、石森直樹先生にはマウス大動脈の採取法および動脈硬化領域の評価に関し、丁寧なご指導、ご助言を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

当教室助教、中村昭伸先生、曹圭龍先生、客員臨床講師、永井聡先生には終始丁寧なご指導、ご助言を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

当教室助教、Olga Amengual 先生には論文の作成や学会発表等に関し、丁寧なご指導、ご助言を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

当教室実験助手、藤森なつみさん、妹尾智里さん、渡邊真理華さんのご協力なしに実験を遂行することはできませんでした。ここに深く感謝の意を表します。

最後に、本研究の実施、論文作成にあたり、ご協力、ご助言、ご支援を頂きましたすべてのみなさまに、心より御礼申し上げます。

7. 引 用 文 献

- 1 Greenberg, A. S., Egan, J. J., Wek, S. A., Garty, N. B., Blanchettemackie, E. J. & Londos, C. Perilipin, a Major Hormonally Regulated Adipocyte-Specific Phosphoprotein Associated with the Periphery of Lipid Storage Droplets. *J. Biol. Chem.* 266, 11341-11346 (1991).
- 2 Miyoshi, H., Perfield, J. W., 2nd, Souza, S. C., Shen, W. J., Zhang, H. H., Stancheva, Z. S., Kraemer, F. B., Obin, M. S. & Greenberg, A. S. Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 282, 996-1002 (2007).
- 3 Miyoshi, H., Perfield, J. W., 2nd, Obin, M. S. & Greenberg, A. S. Adipose triglyceride lipase regulates basal lipolysis and lipid droplet size in adipocytes. *J. Cell. Biochem.* 105, 1430-1436 (2008).
- 4 Miyoshi, H., Souza, S. C., Zhang, H. H., Strissel, K. J., Christoffolete, M. A., Kovsan, J., Rudich, A., Kraemer, F. B., Bianco, A. C., Obin, M. S. & Greenberg, A. S. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 281, 15837-15844 (2006).
- 5 Greenberg, A. S., Coleman, R. A., Kraemer, F. B., McManaman, J. L., Obin, M. S., Puri, V., Yan, Q. W., Miyoshi, H. & Mashek, D. G. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* 121, 2102-2110 (2011).
- 6 Gross, D. N., Miyoshi, H., Hosaka, T., Zhang, H. H., Pino, E. C., Souza, S., Obin, M., Greenberg, A. S. & Pilch, P. F. Dynamics of lipid droplet-associated proteins during hormonally stimulated lipolysis in engineered adipocytes: stabilization and lipid droplet binding of adipocyte differentiation-related protein/adipophilin. *Mol. Endocrinol.* 20, 459-466 (2006).
- 7 Kimmel, A. R., Brasaemle, D. L., McAndrews-Hill, M., Sztalryd, C. & Londos, C. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J. Lipid Res.* 51, 468-471 (2010).
- 8 Scherer, P. E., Bickel, P. E., Kotler, M. & Lodish, H. F. Cloning of cell-specific secreted and surface proteins by subtractive antibody screening. *Nat. Biotechnol.* 16, 581-586 (1998).
- 9 Wolins, N. E., Skinner, J. R., Schoenfish, M. J., Tzekov, A., Bensch, K. G. & Bickel, P. E. Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. *J. Biol. Chem.* 278, 37713-

- 37721 (2003).
- 10 Dalen, K. T., Dahl, T., Holter, E., Arntsen, B., Londos, C., Sztalryd, C. & Nebb, H. I. LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 210-227 (2007).
 - 11 Wolins, N. E., Quaynor, B. K., Skinner, J. R., Tzekov, A., Croce, M. A., Gropler, M. C., Varma, V., Yao-Borengasser, A., Rasouli, N., Kern, P. A., Finck, B. N. & Bickel, P. E. OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization. *Diabetes* 55, 3418-3428 (2006).
 - 12 Yamaguchi, T., Matsushita, S., Motojima, K., Hirose, F. & Osumi, T. MLDP, a novel PAT family protein localized to lipid droplets and enriched in the heart, is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 281, 14232-14240 (2006).
 - 13 Granneman, J. G., Moore, H. P., Krishnamoorthy, R. & Rathod, M. Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *J. Biol. Chem.* 284, 34538-34544 (2009).
 - 14 Tansey, J. T., Sztalryd, C., Gruia-Gray, J., Roush, D. L., Zee, J. V., Gavrilova, O., Reitman, M. L., Deng, C. X., Li, C., Kimmel, A. R. & Londos, C. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6494-6499 (2001).
 - 15 Gandotra, S., Le Dour, C., Bottomley, W., Cervera, P., Giral, P., Reznik, Y., Charpentier, G., Auclair, M., Delepine, M., Barroso, I., Semple, R. K., Lathrop, M., Lascols, O., Capeau, J., O'Rahilly, S., Magre, J., Savage, D. B. & Vigouroux, C. Perilipin deficiency and autosomal dominant partial lipodystrophy. *N. Engl. J. Med.* 364, 740-748 (2011).
 - 16 Faber, B. C., Cleutjens, K. B., Niessen, R. L., Aarts, P. L., Boon, W., Greenberg, A. S., Kitslaar, P. J., Tordoir, J. H. & Daemen, M. J. Identification of genes potentially involved in rupture of human atherosclerotic plaques. *Circ. Res.* 89, 547-554 (2001).
 - 17 Moore, K. J., Sheedy, F. J. & Fisher, E. A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 709-721 (2013).
 - 18 Canton, J., Neculai, D. & Grinstein, S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 621-634 (2013).
 - 19 Cho, K. Y., Miyoshi, H., Kuroda, S., Yasuda, H., Kamiyama, K., Nakagawara, J., Takigami, M., Kondo, T. & Atsumi, T. The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 22, 910-918 (2013).

- 20 Chen, F. L., Yang, Z. H., Wang, X. C., Liu, Y., Yang, Y. H., Li, L. X., Liang, W. C., Zhou, W. B. & Hu, R. M. Adipophilin affects the expression of TNF- α , MCP-1, and IL-6 in THP-1 macrophages. *Mol. Cell. Biochem.* 337, 193-199 (2010).
- 21 Hofnagel, O., Buers, I., Schnoor, M., Lorkowski, S. & Robenek, H. Expression of perilipin isoforms in cell types involved in atherogenesis. *Atherosclerosis* 190, 14-15; author reply 16-17 (2007).
- 22 Larigauderie, G., Bouhrel, M. A., Furman, C., Jaye, M., Fruchart, J. C. & Rouis, M. Perilipin, a potential substitute for adipophilin in triglyceride storage in human macrophages. *Atherosclerosis* 189, 142-148 (2006).
- 23 Miyoshi, H., Souza, S. C., Endo, M., Sawada, T., Perfield, J. W., 2nd, Shimizu, C., Stancheva, Z., Nagai, S., Strissel, K. J., Yoshioka, N., Obin, M. S., Koike, T. & Greenberg, A. S. Perilipin overexpression in mice protects against diet-induced obesity. *J. Lipid Res.* 51, 975-982 (2010).
- 24 Sawada, T., Miyoshi, H., Shimada, K., Suzuki, A., Okamatsu-Ogura, Y., Perfield, J. W., 2nd, Kondo, T., Nagai, S., Shimizu, C., Yoshioka, N., Greenberg, A. S., Kimura, K. & Koike, T. Perilipin overexpression in white adipose tissue induces a brown fat-like phenotype. *PLoS One* 5, e14006 (2010).
- 25 Souza, S. C., Muliro, K. V., Liscum, L., Lien, P., Yamamoto, M. T., Schaffer, J. E., Dallal, G. E., Wang, X., Kraemer, F. B., Obin, M. & Greenberg, A. S. Modulation of hormone-sensitive lipase and protein kinase A-mediated lipolysis by perilipin A in an adenoviral reconstituted system. *J. Biol. Chem.* 277, 8267-8272 (2002).
- 26 Langlois, D., Forcheron, F., Li, J. Y., del Carmine, P., Neggazi, S. & Beylot, M. Increased atherosclerosis in mice deficient in perilipin1. *Lipids Health Dis.* 10, 169 (2011).
- 27 Buechler, C., Ritter, M., Duong, C. Q., Orso, E., Kapinsky, M. & Schmitz, G. Adipophilin is a sensitive marker for lipid loading in human blood monocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1532, 97-104 (2001).
- 28 Larigauderie, G., Furman, C., Jaye, M., Lasselin, C., Copin, C., Fruchart, J. C., Castro, G. & Rouis, M. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 504-510 (2004).
- 29 Paul, A., Chang, B. H., Li, L., Yechoor, V. K. & Chan, L. Deficiency of adipose differentiation-related protein impairs foam cell formation and protects against atherosclerosis. *Circ. Res.* 102, 1492-1501 (2008).
- 30 Martinez-Botas, J., Anderson, J. B., Tessier, D., Lapillonne, A., Chang, B. H., Quast, M. J., Gorenstein, D., Chen, K. H. & Chan, L. Absence of perilipin results in leanness

- and reverses obesity in *Lepr*(db/db) mice. *Nat. Genet.* 26, 474-479 (2000).
- 31 Yuan, Y., Li, P. & Ye, J. Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis. *Protein Cell* 3, 173-181 (2012).
 - 32 Lu, X., Gruia-Gray, J., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Londos, C. & Kimmel, A. R. The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. *Mamm. Genome* 12, 741-749 (2001).
 - 33 Servetnick, D. A., Brasaemle, D. L., Gruia-Gray, J., Kimmel, A. R., Wolff, J. & Londos, C. Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 270, 16970-16973 (1995).
 - 34 Nagai, S., Shimizu, C., Umetsu, M., Taniguchi, S., Endo, M., Miyoshi, H., Yoshioka, N., Kubo, M. & Koike, T. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor responsive element within the murine perilipin gene. *Endocrinology* 145, 2346-2356 (2004).
 - 35 Hsieh, K., Lee, Y. K., Londos, C., Raaka, B. M., Dalen, K. T. & Kimmel, A. R. Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets. *J. Cell Sci.* 125, 4067-4076 (2012).
 - 36 Kraemer, F. B., Shen, W. J., Natsu, V., Patel, S., Osuga, J., Ishibashi, S. & Azhar, S. Adrenal neutral cholesteryl ester hydrolase: identification, subcellular distribution, and sex differences. *Endocrinology* 143, 801-806 (2002).
 - 37 Shen, W. J., Zaidi, S. K., Patel, S., Cortez, Y., Ueno, M., Azhar, R., Azhar, S. & Kraemer, F. B. Ablation of vimentin results in defective steroidogenesis. *Endocrinology* 153, 3249-3257 (2012).