

学 位 論 文 題 名

脂質代謝における perilipin の作用に関する研究

－トランスジェニックマウスを用いた機能解析－

学位論文内容の要旨

1. 緒言

肥満は糖尿病、高脂血症などの生活習慣病の主要な危険因子であり、肥満によるインスリン抵抗性が生活習慣病の発症と深くかかわっていることが明らかになっている。肥満症や2型糖尿病は全身の遊離脂肪酸(FFA)の増加を伴い、このことは直接インスリン抵抗性を導くと言われている。さらにこの FFA は脂肪細胞に由来するものであり、脂肪細胞からの FFA の放出を抑制することで2型糖尿病における血糖上昇を改善することが指摘されている。

脂肪細胞は、過剰なエネルギーを脂肪滴内にトリアシルグリセロールとして貯蔵し、必要に応じてそのエネルギーを脂肪酸として放出する。脂肪細胞における脂肪分解(水解)反応は、生体のエネルギー貯蔵の出納において重要な反応であり、本反応がホルモン感受性リパーゼ(HSL)を介することは知られているが、その機序の詳細は解明されていない。HSL の脂肪分解作用を修飾する蛋白質のひとつとしてペリリピン(perilipin)が挙げられる。ペリリピンは、脂肪組織ならびにステロイド産生臓器に特異的に発現している蛋白で、細胞内の脂肪滴表面に局在している。HSL と同様に cAMP 依存性プロテインキナーゼ A (PKA)によりリン酸化され、HSL と脂肪滴との相互作用の調節に関与することが推測されている。非刺激下ではペリリピンは脂肪滴表面を包み込むように局在しているが、カテコールアミンの刺激によるリン酸化により、脂肪滴上から細胞質へ移動し、HSL が脂肪滴に結合するのを容易にすることが報告されている。

本研究では、ペリリピンの作用を個体レベルで包括的に解析し、肥満発症、脂質代謝への関与を明らかにする目的で、脂肪細胞特異的に発現する、ヒトペリリピン過剰発現トランスジェニックマウスの開発を行った。

2. 対象と方法

導入 DNA として、脂肪細胞特異的発現を導く adipocyte fatty acid-binding protein (aP2) のプロモーター・エンハンサー領域を含む 5.4kb の DNA 断片下流に、1.8kb の全蛋白翻訳領域を含むヒトペリリピン A cDNA の *Hind*III/*Eco*RI 断片と 0.4kb の SV40 intron polyA を含んだ全長 7.7kb の DNA 断片を作成した。この DNA を用いてトランスジェニックマウスを作成し、尾より抽出したゲノム DNA を用いて、PCR 法とサザンブロット法にてスクリーニングを行い、解析を行った。

RT-PCR 法と Western blot 法を用いて、各組織におけるそれぞれ遺伝子、蛋白レベルでのヒトペリリピンの発現を確認した。表現型の検討として、体重測定や白色脂肪組織量の検討、脂肪組織の病理組織学的検討、血中レプチン、脂質パラメーターの測定、腹腔内ブドウ糖投与による耐糖能検査、酸素消費量検査を施行した。又、*in vivo*、*in vitro* におけるイソプロテレノールに対する脂肪分解反応についてイソプロテレノールを用

いて検討を行った。*in vivo* としてはマウス腹腔内にイソプロテレノールを投与し、投与前と15分後の血中 FFA 濃度の変化を検討した。*in vitro* の検討としては、副睾丸周囲白色脂肪組織より単離した白色脂肪細胞を用いて、adenosine 添加、非添加状態にてイソプロテレノールで刺激し、上清中への FFA 放出量を検討した。

3. 結果

ヒトペリリピン A の全蛋白翻訳領域を含む遺伝子を、脂肪細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウス (以下 Tg マウス) を樹立した。尾より抽出したゲノム DNA をサザンブロットにて解析し、約 30 コピーの遺伝子の導入を確認した。この Tg マウスの白色、褐色脂肪組織における RNA と蛋白レベルでのヒトペリリピンの発現を、RT-PCR、Western blot 法にて確認した。

Tg マウスの体重は、摂食量に差がないにも関わらず低値をとり、白色脂肪組織重量の減少を認めた。組織染色では Tg マウスにおいて、白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞の小型化を認めた。腹腔内ブドウ糖負荷試験における Tg マウスの耐糖能には異常を認めなかった。血中脂質の検査では、総コレステロールや中性脂肪は有意な変化を認めなかったものの、Tg マウスの FFA は高値を呈していた。又、血中レプチン値は体重の増加に比例して高値をとったが、対照に比しその増加率は低値を示し、このことは脂肪組織の減少に伴うと予想された。酸素消費量は Tg マウスにおいて低下していたが、このことはレプチン減少を介する結果生じたものと考えた。*in vivo* における脂肪分解反応の検討では、腹腔内へのイソプロテレノール投与により、血中 FFA の増加率が Tg マウスで亢進していた。次に、副睾丸周囲白色脂肪組織より単離した白色脂肪細胞を用いて、上清中に放出される FFA 濃度を指標に *in vitro* での脂肪分解反応を検討した。単離した白色脂肪細胞において adenosine を添加せず cAMP、PKA 活性を抑制しない状態では、イソプロテレノールによる刺激前の上清への FFA 放出量が約 3 倍と著明に亢進していた。一方、adenosine を添加した場合は、イソプロテレノールによる上清中への FFA 放出量は約 2 倍の亢進を認めた。よって Tg マウスにおいて、脂肪分解反応の基礎値と、カテコールアミンに対する反応性の両者が亢進していると考えた。

4. 結語

脂肪細胞特異的にペリリピンを過剰発現させたマウスを作成し、生体におけるペリリピンの機能について解析した。ペリリピントランスジェニックマウスでは、体重増加の抑制と脂肪細胞の小型化ならびに脂肪分解反応の亢進を認めた。以上の結果から、ペリリピンは生体における脂質代謝の調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。今後脂肪細胞における脂質代謝機能を解明する上で、本動物は有用なモデル動物であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

脂質代謝における perilipin の作用に関する研究

－トランスジェニックマウスを用いた機能解析－

肥満は糖尿病、高脂血症などの生活習慣病の主要な危険因子であり、肥満によるインスリン抵抗性が生活習慣病の発症と深くかかわっていることが明らかになっている。脂肪細胞における脂肪分解（水解）反応は、生体のエネルギー貯蔵の出納において重要な反応であり、本反応がホルモン感受性リパーゼ(HSL)を介することは知られているが、その機序の詳細は解明されていない。HSLの脂肪分解作用を修飾する蛋白質のひとつとしてペリリピン(perilipin)が挙げられる。ペリリピンは、脂肪組織ならびにステロイド産生臓器に特異的に発現している蛋白で、細胞内の脂肪滴表面に局在し、HSLと同様にcAMP依存性プロテインキナーゼA(PKA)によりリン酸化され、HSLと脂肪滴との相互作用の調節に関与することが推測されている。in vitroでの検討で、HSLのみをリン酸化しても脂肪分解が起こらないことから、脂肪分解反応におけるペリリピンの果たす役割が重要と考えられる。本研究では、ペリリピンの作用を個体レベルで包括的に解析し、肥満発症、脂質代謝への関与を明らかにする目的で、脂肪細胞特異的に発現する、ヒトペリリピン過剰発現トランスジェニックマウス（以下Tgマウス）の開発を行った。

導入DNAとして、脂肪細胞特異的発現を導く adipocyte fatty acid-binding protein (aP2)のプロモーター・エンハンサー領域を含む5.4kbのDNA断片下流に、1.8kbの全蛋白翻訳領域を含むヒトペリリピンA cDNAと0.4kbのSV40 intron polyAを結合した全長7.7kbのDNA断片を作成した。このDNAを用いてTgマウスを作成し、体重測定、白色脂肪組織量の検討、脂肪組織の病理組織学的検討、血中レプチン、脂質パラメーターの測定、腹腔内ブドウ糖投与による耐糖能検査、酸素消費量測定、脂肪分解反応について解析を行った。尾より抽出したゲノムDNAをサザンブロットにて解析し、約30コピーの遺伝子の導入を確認した。このTgマウスの白色、褐色脂肪組織におけるRNAと蛋白レベルでのヒトペリリピンの発現は、RT-PCR、Western blot法にて確認した。

Tgマウスの体重は、摂食量に差がないにも関わらず低値をとり、白色脂肪組織重量の減少と、白色ならびに褐色脂肪細胞の小型化を認めた。血漿総コレス

テロールや中性脂肪は有意な変化を認めなかったものの、遊離脂肪酸(FFA)は高値を呈していた。腹腔内ブドウ糖負荷試験におけるTgマウスの耐糖能は異常を認めなかった。又、血中レプチン値は体重の増加に比例して高値をとったが、対照に比しその増加率は低値を示し、このことは脂肪組織の減少に伴うと予想された。酸素消費量はTgマウスにおいて低下していたが、このことはレプチン減少を介する結果生じたものと考えた。*in vivo*における脂肪分解反応の検討では、腹腔内へのイソプロテレノール投与により、血中FFAの増加率がTgマウスで亢進していた。次に、副睾丸周囲白色脂肪組織より単離した白色脂肪細胞を用いて、上清中に放出されるFFA濃度を指標に*in vitro*での脂肪分解反応を検討した。単離した白色脂肪細胞においてadenosineを添加せずcAMP、PKA活性を抑制しない基礎状態では、イソプロテレノールによる刺激前の上清へのFFA放出量が約3倍と著明に亢進していた。一方、adenosineを添加した場合は、イソプロテレノールによる上清中へのFFA放出量は約2倍の亢進を認めた。よってTgマウスにおいて、脂肪分解反応の基礎値と、カテコールアミンに対する反応性の両者が亢進していると考えた。以上から本論文において、ペリリピンは生体における脂質代謝の調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

質疑応答においては浅香教授から、Tgマウスが体重減少をきたしたことより同動物の甲状腺機能について、申請者の用いたイソプロテレノールをカテコラミンの代わりに使用することによる実験系への影響について、ペリリピンかHSLどちらか一方のみが增強されることで脂肪分解が起こりうるかどうかについて、HSLノックアウトマウスの表現型について、ペリリピンの抗肥満薬としての可能性について、の質問があった。次いで石橋教授から、ペリリピンTgマウスのHSL活性について、ペリリピンの糖代謝に及ぼす影響について、血漿レプチン値と体重の相関に対する統計学的な解釈、またTgマウスの酸素消費量が体重減少にもかかわらず低下した理由について、小池教授から、申請者が実験に用いたものと別の系のTgマウスについて、さらにペリリピンの臨床応用についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切に回答した。

本論文における検討から、今後は肥満症や糖尿病における臨床応用や、脂肪細胞における脂肪分解作用へのペリリピン機能の解明が期待される。今後脂肪細胞における脂質代謝機能を解明する上で、本動物は有用なモデル動物であると考えられた。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。