

## 学位論文題名

脂肪細胞特異的 Perilipin 過剰発現マウスにおける  
肥満抵抗性, および糖・脂質代謝改善に関する検討

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】近年問題になっているメタボリックシンドロームの病態を考える上で, 脂肪細胞における脂肪貯留及び分解のメカニズムを解明することは極めて重要な事項である. 脂肪細胞内の脂肪滴表面には多数の脂肪滴結合性蛋白質が存在しているが, それらの中でも Perilipin A(PeriA)は, 脂肪細胞における最多のリン酸化蛋白質であり, カテコラミン刺激後に PKA(プロテインキナーゼ A)によるリン酸化を受け活性化される. そして, 様々な脂質代謝関連蛋白質の制御を行ない, 脂肪細胞内の脂質代謝における中心的な役割を果たしている. PeriA ノックアウトマウス(KO)での研究から, PeriA は PKA 非刺激下では脂肪分解を抑制(脂肪貯留)し, PKA 刺激後は反対に脂肪分解を約 100 倍程度に著しく亢進させる正反対の作用を有することが明らかになっている. 当科で以前に作製した脂肪組織特異的 PeriA 過剰発現トランスジェニック(Tg)マウスは普通食(ND)投与下で摂餌量に差は無いものの, 体重増加の抑制と白色脂肪組織重量の減少, 脂肪細胞の小型化を認めた. 本研究では, 高脂肪食(HFD)投与による体重増加などのフェノタイプや脂質・糖代謝の変化, およびそれらの要因を明らかにする目的で, Tg の生理的・組織学的特徴と, その背景となる遺伝子発現の変化や分子生物学的メカニズムに関する検討を行った.

【対象と方法】Tg は aP2 プロモーターを用いて脂肪組織特異的に PeriA を過剰発現させたものであり, 野生型 C57BL/6 マウス(WT)と比較して褐色脂肪組織で 5 倍, 白色脂肪組織で 2 倍の PeriA 蛋白発現増加を呈する. 全マウスを室温, 自由飲水・摂食, 12 時間毎の明暗期下で飼育し, ND を投与した群, HFD を生後 5 週から 30 週まで投与した群(いずれも n=7)をつくり, 週毎に体重の推移及び摂餌量を観察した. 生後 28 週にて腹腔内ブドウ糖負荷試験(IPGTT), 29 週にて腹腔内インスリン負荷試験(IPITT)を施行し, 30 週にて酸素消費量測定を行った後に解剖し, 血液および各組織を摘出した. そして, 脂肪組織の脂質代謝及び細胞分化関連分子の発現を DNA マイクロアレイ法, リアルタイム PCR 法, ウェスタンブロット法, 免疫組織染色法にて解析した. また, 白色脂肪組織から単離した脂肪細胞に対する脂肪分解刺激実験も施行した.

【結果】HFD を投与した Tg は, WT に比して著明な体重増加抑制を示し, 部位別各脂肪組織重量も Tg において半分程度に有意に減少していた. 摂餌量は WT, Tg の両群間で有意差を認めなかったものの, Tg 群では酸素消費, およびエネルギー消費が 24 時間を通して有意に増加していた. こうした肥満抵抗性やエネルギー代謝亢進の要因を明らかにするために, DNA マイクロアレイ法による白色脂肪組織の遺伝子解析を行ったところ, Tg において脂肪酸の  $\beta$  酸化及び熱産生に関連する遺伝子, 及び脂肪細胞分化に関連する遺伝子の発現増加と, 脂肪合成に関連する遺伝子の発現低下を認めた. この解析結果から, 発現変化が予想された蛋白について, リアルタイム PCR を施行し WT と Tg の WAT における発現量を比較した. その結果, 脂肪合成系遺伝子である SCD1 や DGAT1 等の有意な発現低下を認め, 白色脂肪細胞への分化に関与する RIP140 が Tg にて発現低下していた一方, 褐色脂肪細胞への

分化に関与する PGC1 $\alpha$  が有意に発現亢進しており、脂肪酸の  $\beta$  酸化およびエネルギー燃焼に関与する遺伝子も Tg にて有意な発現亢進がみられた。そして、褐色脂肪細胞に特異的に発現する脱共役蛋白の UCP1 が、Tg の白色脂肪組織に異所性発現していることが示された。また、大きな単房性の脂肪滴形成による中性脂肪蓄積作用を持つ脂肪滴周囲蛋白 FSP27 の発現が、Tg の白色脂肪組織では著明に低下していることも確認した。さらに、IPGTT 並びに IPITT の結果では、HFD を投与した Tg は WT に比べ、ブドウ糖負荷に対する血糖上昇の抑制とインスリン感受性の改善を有意に認め、血清中のインスリン、レプチン濃度も HFD 投与の Tg にて有意に低下していた。これらの要因を明らかにする目的で、白色脂肪細胞における AMPK の活性化を、WT 及び Tg から単離した脂肪細胞の脂肪分解反応前後で評価した。その結果、Tg では脂肪分解刺激の無い定常状態でも既に AMPK の活性化が起こっており、PKA 刺激を加えることでその傾向は顕著となった。

【考察】 Peri KO マウス(KO)が肥満抵抗性と脂肪萎縮を認めたことより、Tg 作製当初は Tg が肥満マウスになることを想定していたが、Tg も KO 同様肥満抵抗性と脂肪萎縮を認めた。様々な代謝関連蛋白の発現変化について解析を行った結果、脂肪酸  $\beta$  酸化及び熱産生に関連する遺伝子の発現増加と、脂肪合成関連遺伝子の発現低下が認められた。また、個体における酸素消費量、エネルギー消費量も Tg で有意に増加しており、エネルギー消費亢進が Tg における脂肪重量減少と関係していることが考えられた。熱産生に関与する蛋白の中でも、特に WAT における UCP1 の発現が Tg で顕著に認められた。UCP1 は褐色脂肪のミトコンドリアに特異的に発現する蛋白であるが、本研究では Tg の WAT における UCP1 の異所性発現が mRNA レベル、蛋白レベル、及び組織像で確認された。近年、脂肪細胞の発生や分化に関する報告が相次いでいるが、間葉系幹細胞由来の、脂肪組織内の微小血管周囲に発現する Adipoblast にて PGC1 $\alpha$  等が作用すれば褐色脂肪への分化が誘導され、RIP140 等が作用すれば白色脂肪への分化が促されるとされており、白色脂肪が褐色脂肪化する可能性を示唆している。本研究では、Tg の WAT における RIP140 の著明な発現低下と、PGC1 $\alpha$  等の発現増加が認められ、Tg の WAT 内で褐色脂肪細胞への分化誘導が起きている可能性が考えられる。また、FSP27 のノックアウトマウスの解析結果報告では、同マウスは肥満抵抗性と酸素消費の亢進、耐糖能改善を示し、脂肪酸  $\beta$  酸化等に関与する遺伝子の発現増加など、Tg と類似した特徴を呈していた。今回の検討では、Tg の WAT にて FSP27 が mRNA レベルでも蛋白レベルでも発現低下していたことより、脂肪滴の縮小化は FSP27 の発現低下を介した可能性が考えられた。この両マウスの脂肪滴縮小化がどのように白色脂肪の褐色脂肪様変化に結び付くのかは今後さらなる検討が必要であるが、「脂肪滴の大きさ」といった細胞内環境変化が、脂肪細胞の特性そのものを変化させる可能性が考えられる。本研究では他に、Tg にて高脂肪食負荷に対する耐糖能悪化やインスリン抵抗性、レプチン抵抗性の改善が認められ、インスリンやレプチンの作用を介さずに糖代謝を改善する系として AMPK 活性化経路を考えた。脂肪細胞内の Peri A 発現によって AMPK の活性化がおこることが *in vitro* の研究で明らかにされているが、今回 Tg から単離した脂肪細胞においても同様の結果が得られており、PeriA 発現が AMPK 活性化を惹起することが *in vitro*, *ex vivo* の両者において示された。

【結論】 Perilipin 過剰発現マウスでは高脂肪食負荷に対する肥満抵抗性、脂肪組織重量の減少、脂肪細胞縮小化が認められた。野生型マウスと比して摂餌量には差を認めなかったが、酸素消費量やエネルギー消費量が亢進していた。これらの背景として、脂肪組織における脂肪酸酸化や熱産生に関連する蛋白の遺伝子発現亢進、並びに脂肪合成系の遺伝子発現低下があり、FSP27 の発現低下が関与すると考えられる白色脂肪組織の褐色脂肪様変化を認めた。高脂肪食投与 Perilipin 過剰発現マウスでは、耐糖能の悪化やインスリン抵抗性が有意に改善しており、その要因として AMPK の活性化が考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫  
副 査 教 授 畠 山 鎮 次  
副 査 教 授 筒 井 裕 之

学 位 論 文 題 名

## 脂肪細胞特異的 Perilipin 過剰発現マウスにおける 肥満抵抗性，および糖・脂質代謝改善に関する検討

脂肪細胞内の脂肪滴表面には多数の脂肪滴結合性蛋白質が存在しているが、それらの中でも脂肪細胞における最多のリン酸化蛋白である Perilipin A(PeriA)は、様々な脂質代謝関連蛋白の制御を行ない、脂肪細胞内の脂質代謝における中心的な役割を果たしている。以前に作製した脂肪組織特異的 PeriA 過剰発現トランスジェニック(Tg)マウスは普通食(ND)投与下で摂餌量に差は無いものの、体重増加の抑制と白色脂肪組織重量の減少、脂肪細胞の小型化を認めた。本研究では、高脂肪食(HFD)投与による体重増加などのフェノタイプや脂質・糖代謝の変化、およびそれらの要因を明らかにする目的で、Tgの生理的・組織学的特徴と、その背景となる分子生物学的メカニズムに関する検討を行った。全マウスをND投与群、およびHFD投与群(いずれもn=7)に分け、週毎に体重の推移及び摂餌量を観察し、腹腔内ブドウ糖負荷試験(IPGTT)、腹腔内インスリン負荷試験(IPITT)、酸素消費量測定を行った後に解剖した。その結果、TgはWTに比してHFD投与に対する肥満抵抗性を有意に示した。摂餌量は両群間で有意差を認めなかったものの、Tg群では酸素・エネルギー消費が有意に増加していた。白色脂肪組織の遺伝子解析を行ったところ、Tgにおいて脂肪合成系遺伝子であるSCDやDGAT等の明らかな発現低下を認め、白色脂肪細胞への分化に関与するRIP140がTgにて発現低下していた一方、褐色脂肪細胞への分化に関与するPGC1 $\alpha$ や、脂肪酸の $\beta$ 酸化などに関与する遺伝子がTgにて有意に発現亢進していた。そして、褐色脂肪細胞に特異的に発現するUCP1が、Tgの白色脂肪組織に異所性発現していることも示された。さらに、IPGTT並びにIPITTの結果では、HFDを投与したTgはWTに比べ、耐糖能およびインスリン感受性の改善を有意に認め、Tgの白色脂肪細胞ではAMPKの活性化が認められた。近年、白色脂肪の褐色脂肪化に関する報告が相次いでいるが、本研究ではTgのWATにおけるRIP140の著明な発現低下と、PGC1 $\alpha$ 等の発現増加が認められ、TgのWAT内で褐色脂肪細胞への分化誘導が起きている可能性が考えられる。また、ある特定の脂肪滴周囲蛋白の発現を変化させたマウスの解析結果報告でも、今回のTgと類似した結果を示しており、「脂肪滴の大きさ」といった細胞内環境変化が、脂肪細胞の特性そのものを変化させる可能性が考えられるが、そのメカニズムに関しては今後さらなる検討が必要である。

以上の発表後、副査の畠山鎮次教授より数点の質問があった。まず、今回の研究ではヘテロのTgを用いているが、ホモTgについて解析をしているかとの内容であったが、ホモTgはヘテロ同士の交配で作成可能であるが、作成および解析については現在取り組み中であ

る旨を申請者は回答した。また、PeriAの構造や、PeriAは脂肪細胞分化のマスター蛋白であるのかについても問われたが、PeriAの立体構造は現時点では未解明であること、また近年FSP27なる脂肪滴周囲蛋白をノックアウトしたマウスにて、本研究のTgと類似した表現型のほか、RIP140の発現低下、更にPeriA mRNAの代償性発現増加などが認められた文献報告を引用し、PeriAはFSP27など他の脂肪滴周囲蛋白とともに、脂肪細胞内環境を調節することで脂肪細胞分化をコントロールしている可能性を現時点では想定している旨を回答した。次いで、副査の筒井裕之教授からは、Tgにおける白色脂肪の形態学的変化などについての質問があったが、Tgの白色脂肪組織はWTよりも小型で軽いが、KOマウスなどでみられるような色調の変化までは呈さないこと、また白色脂肪の褐色脂肪化に関してはUCP1の異所性発現を確認したことでそう判断した旨を回答した。その他、AMPKの上流にSirt1などの因子が存在することが近年相次いで報告されているが、Sirt1などの検討の有無に関する質問もあったが、本研究の遺伝子解析ではSirt1は関与していない旨を回答した。最後に主査の小池隆夫教授より、PeriAの臨床応用に関する質問が寄せられたが、PeriAは構造蛋白であるため、ヒトの脂肪組織のPeriA発現を直接変化させて治療に結びつけることは現時点では困難であること、しかしヒトにおいてPeriAの発現量や、特定の遺伝子型と肥満・糖尿病との関連を示した報告も複数あり、PeriAを調べることで患者個人個人の肥満・糖尿病治療の方向性を立てるテイラーメイド治療に応用できる可能性がある旨を回答し、また血管内動脈硬化巣(プラーク)における脂肪滴周囲蛋白発現とプラークの安定性に関する最近の知見に基づいた臨床研究を開始していることについても説明した。

この論文は、本学が初めて作製に成功したPeriA過剰発現マウスにおける肥満抵抗性や代謝変化の根底に、白色脂肪の褐色脂肪化が存在することを明らかにした点で高く評価され、今後の肥満・糖尿病の臨床において脂肪細胞の質的变化に着目した治療が更に重要性を増すことが期待される。

審査員一同は、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。