

氏名・(本籍)	あい ばら だい すけ 藍 原 大 甫 (山口県)			
学位の種類	博 士 (薬 学)			
報告番号	甲第1561号			
学位授与の日付	平成27年3月24日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(課程博士)			
学位論文題目	脂肪肝に特異的に発現する新規PPAR γ 標的 遺伝子に関する研究			
論文審査委員	(主 査)	福岡大学	教授	山 野 茂
	(副 査)	福岡大学	准教授	本 田 伸一郎
		福岡大学	准教授	松 末 公彦

内 容 の 要 旨

核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) は、2型糖尿病モデルである *ob/ob* マウスの脂肪肝形成に関与している(1)。当研究室では、PPAR γ によって発現制御される fat-specific protein 27 (FSP27) が、肝細胞への脂肪蓄積を促し、*ob/ob* マウスの脂肪肝形成に関与することを見出した(2)。さらに、PPAR γ 依存的な脂肪肝形成に関与する遺伝子を単離するために、肝臓特異的に PPAR γ を欠損させた *ob/ob* マウスの肝臓を用いて GeneChip 解析を行った。その結果、PPAR γ により著しく発現が促進される機能未知 *liver PPAR γ -dependent gene 1 (LPD1)* 遺伝子の単離に成功した。本研究では、*FSP27* 及び *LPD1* 遺伝子にフォーカスし、1) 脂肪肝発症の成因の違いが *FSP27* 遺伝子の発現に影響するかを明らかにすること、2) *LPD1* 遺伝子の発現性及び LPD1 タンパクの生理機能を解明することを目的とした。

1) 成因の異なる脂肪肝における *FSP27* 遺伝子の発現解析

Ob/ob マウスとは成因の異なる脂肪肝モデルマウスにおいても *FSP27* 遺伝子の発現が誘導されるか否かを明らかにするために、肥満モデル (*db/db*)、高脂肪食処理 (HF)、メチオニン・コリン欠損食処

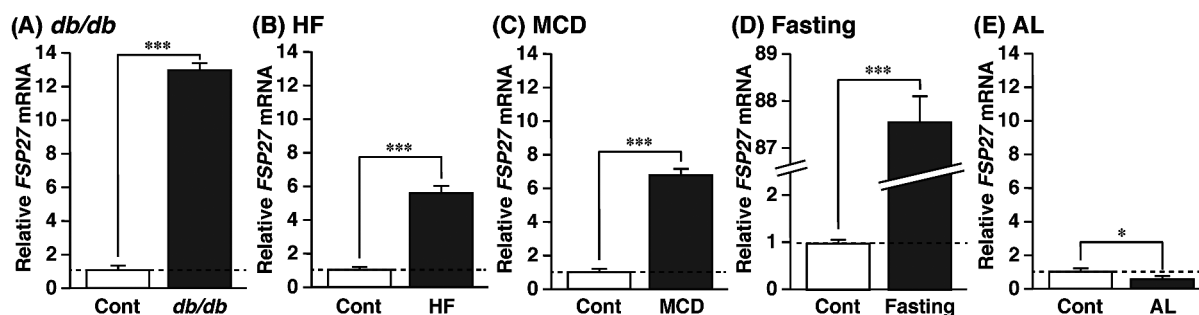


Fig. 1. *FSP27* mRNA expression in fatty liver developed by different methods.

理 (MCD)、絶食処理 (Fasting) 及びアルコール処理 (AL) マウスの脂肪肝における *FSP27* 遺伝子の発現をリアルタイム PCR法にて解析した。その結果、*FSP27* 遺伝子の発現は、コントロールと比べて *db/db* マウスの脂肪肝で約 13 倍、HF 脂肪肝で約 6 倍、MCD 脂肪肝で約 7 倍及び Fasting 脂肪肝で 80 倍以上の著しい誘導が認められた (Fig. 1A, B, C and D)。一方、AL 脂肪肝における *FSP27* 遺伝子の発現は、コントロールと比べて有意な低下が認められた (Fig. 1E)。これらの結果から、*FSP27* 遺伝子の発現は、*db/db*、HF、MCD 及び Fasting マウスの脂肪肝において特異的に誘導されることが明らかとなった (3)。

2) *LPD1* 遺伝子の発現性及び *LPD1* タンパクの生理機能の解析

a) *LPD1* 遺伝子の発現解析

LPD1 遺伝子は、単離の経緯から PPAR γ による脂肪肝形成に関与していることが考えられた。そこで、*LPD1* 遺伝子の発現が PPAR γ 依存的事であることを確かめるために、マウス各組織及び細胞における *LPD1* mRNA の発現解析をリアルタイム PCR法で行った。なお、*LPD1* 遺伝子の転写開始点の解析結果 (4)、及びデータベースによる解析から、*LPD1* 遺伝子に

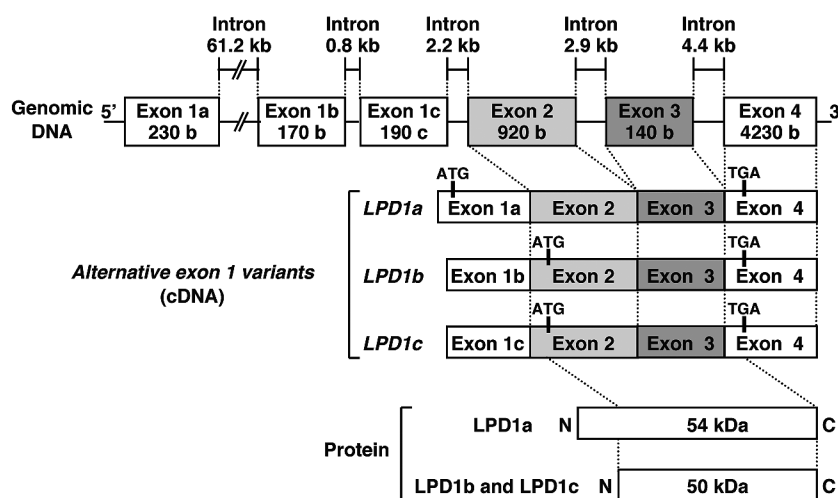


Fig. 2. Genomic structure of the liver PPAR γ -dependent gene 1 (*LPD1*) gene in mouse.

は、エキソン1の異なる3つのバリエーション (*LPD1a*、*1b* 及び *1c*) の存在が明らかになった (Fig. 2)。また、*LPD1b* と *1c* は同一のタンパクであること、*LPD1a* は、*LPD1b* 及び *1c* の N-末端に 31 アミノ酸が付加されたタンパクであることが推察される (Fig. 2)。

PPAR γ 野生型 *ob/ob* マウス (*ob/ob*-PPAR γ WT) 肝における *LPD1b* の発現量は、PPAR γ 野生型-正常マウス (*OB/OB*-PPAR γ WT) 肝の約 10 倍の値を示し、PPAR γ 特異的リガンドであるロジグリタゾン (RGZ) 処理すると、さらに約 9 倍の付加的な発現誘導が認められた (Fig. 3)。一方、PPAR γ を欠損させたマウス (*ob/ob*-PPAR γ KO) では、RGZ 未処理及び処理群とも、*LPD1b* の発現量は著しく低下し、PPAR γ の欠損により発現が抑制されることが明らかになった (Fig. 3)。*LPD1c* の発現パターンは、*LPD1b* と類

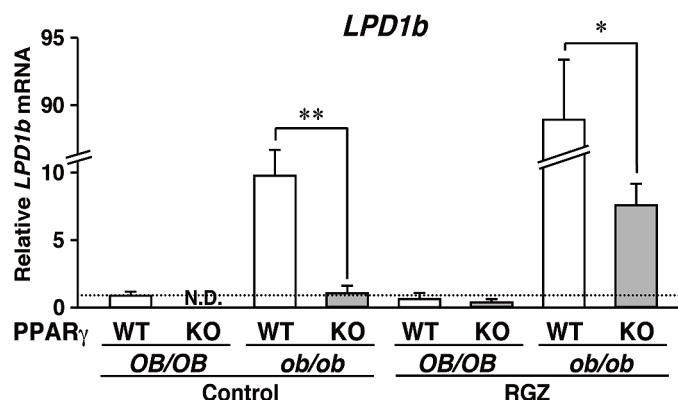


Fig. 3. The expression of *LPD1b* mRNA depends on the hepatic PPAR γ and fatty liver formation.

似していたが、RGZ未処理の *ob/ob*-PPAR γ WT肝で低レベルであることが *LPD1b* とは異なっていた。また、*LPD1a* については、RGZ未処理及び処理群の *ob/ob*-PPAR γ WT肝とも、*OB/OB*-PPAR γ WT肝の約2倍の発現誘導が認められた。*LPD1a* 及び *1c* の発現とも、*LPD1b* と同様に、PPAR γ の欠損により著しく抑制された。これらの結果より、*LPD1* の3つのバリエントはいずれも *ob/ob* マウスの肝臓において PPAR γ 依存的な発現を示すことが明らかになった。また、*LPD1* バリエントは、*ob/ob* マウスの脂肪肝以外に、白色、褐色脂肪組織及び3T3-L1成熟脂肪細胞においても高レベルで発現していることが明らかになった。

b) *LPD1* タンパクの細胞内局在解析

LPD1 タンパクの局在を明らかにすることは、*LPD1* の機能を類推する上で重要である。*LPD1* バリエントタンパクを特異的に認識する抗体を用いた Western blot法により、*LPD1* の細胞内局在を解析した。その結果、*LPD1* は、*ob/ob* マウスの脂肪肝及び3T3-L1成熟脂肪細胞において、主にミクロソーム分に認められた。なお、このミクロソーム画分には、ミクロソーム以外に細胞骨格や細胞膜成分も含まれていた。

ミクロソーム画分を1%TritonX-100で処理すると膜成分は可溶化され、細胞骨格等是不溶性で遠心後に沈殿することが知られている。そこで、3T3-L1成熟脂肪細胞のミクロソーム画分(Ms)を1%Triton X-100処理した後、可溶性画分(Sol)及び不溶性画分(Insol)に分画し、*LPD1* の両画分への分布について調べた。その結果、*LPD1* は1% Triton X-100不溶性画分に認められ、その分布は、主に不溶性画分に検出された細胞骨格構成タンパクの1つである vimentinと良く一致したが、1% TritonX-100可溶性画分のみを検出された小胞体マーカー calreticulinとは異なっていた(Fig. 4)。よって、*LPD1* は、細胞骨格を含む1% Triton X-100不溶性画分に局在することが明らかになった。

c) 3T3-L1成熟脂肪細胞における *LPD1* タンパクの機能解析

LPD1 バリエントタンパクの発現は、*ob/ob* マウスの脂肪肝以外にも3T3-L1前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化過程において著しく誘導された。ゆえに、*LPD1* は、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化過程において機能していることが推測される。そこで、強制発現させた *LPD1b* が、成熟脂肪細胞への分化誘導に与える影響を確かめた。*LPD1b* ある

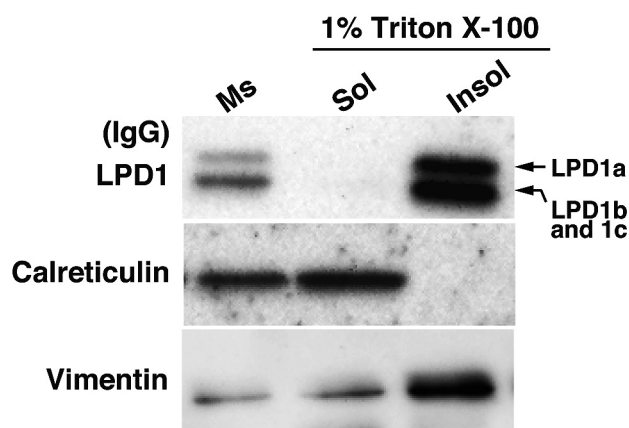


Fig. 4. *LPD1* is localized in the Triton X-100 insoluble fraction.

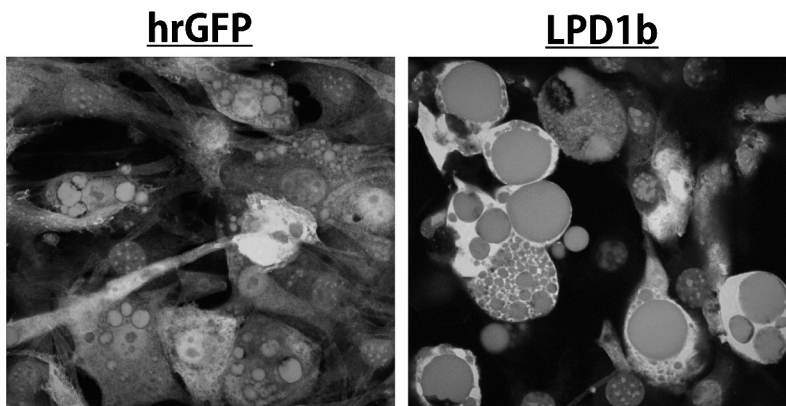


Fig. 5. Overexpressed *LPD1b* induces lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes.

いはコントロールとして humanized renilla green fluorescent protein (hrGFP) を前駆脂肪細胞に強制発現させ、分化誘導 10 日目に各種蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡にて検鏡した。なお、赤は脂肪滴、青は核を示している。その結果、LPD1b 発現細胞は、コントロール細胞に比べて分化の進んだ球形細胞が多く、大型で肥大化した単房性の脂肪滴を含む細胞が多数認められた (Fig. 5)。また、LPD1b 発現細胞における分化マーカー遺伝子の発現は、分化誘導 3 日目以降、コントロール細胞と比べて有意な誘導が認められた。よって、LPD1b タンパクは、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化誘導及びそれに伴う脂肪滴の肥大化促進に関与していることが示唆された。

予備的な実験から、LPD1 タンパクは糖の取り込みに関与していることが推察されたので、LPD1 のノックダウンが成熟脂肪細胞の糖取り込みに与える影響について検討した。まず、LPD1 ノックダウン細胞 (LPD1-shRNA) における LPD1 の発現は、コントロール (LacZ-shRNA) 細胞に比べて明らかに抑制されていることを確認した (Fig. 6)。次に、LPD1 ノックダウン細胞における 2-deoxy-D-glucose (2DG) の取り込みに対するインスリン処理の影響について調べた。その結果、インスリン処理により LPD1 ノックダウン細胞の 2DG 取り込み量が、コントロール細胞 (LacZ-shRNA) に比べて有意に減少することが明らかになった (Fig. 6)。また、LPD1 ノックダウン細胞の細胞膜のグルコーストランスポーター 4 (GLUT4) 量は、コントロール細胞に比べて低レベルであることも明らかになった。これらの結果から、LPD1 は、細胞膜の GLUT4 量を上昇させることで、糖取り込みを促進していることが示唆された。

本研究の成果により、*FSP27* 遺伝子は脂肪肝発症の成因の違いにより、その発現性が大きく異なることが明らかになった (3)。*LPD1* 遺伝子の 3 つのバリエーション (*LPD1a*, *1b* 及び *1c*) は、いずれも新規 PPAR γ 標的遺伝子であることが強く示唆された。また、LPD1 バリエーションタンパクは、細胞骨格を含む 1% Triton X-100 不溶性画分に局在することが明らかになった。さらに、LPD1 バリエーションタンパクは、脂肪細胞における脂肪蓄積及び糖取り込み促進に関与していることが示唆された。LPD1 の詳細な生理的機能の解明は今後の課題であるが、少なくとも LPD1 バリエーションタンパクによる脂肪蓄積の促進は、*FSP27* と同様に PPAR γ 依存的な脂肪肝形成に強く関与していると考えられる。

(引用文献)

- (1) Matsusue, K. *et al.*, *J Clin Invest.*, **111**, 737-747 (2003).
- (2) Matsusue, K. *et al.*, *Cell Metab.*, **7** (4), 302-311 (2008).
- (3) Aibara, D. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **36** (11), 1766-1722 (2013).
- (4) Yamanaka, K. (2008) Article of master degree.

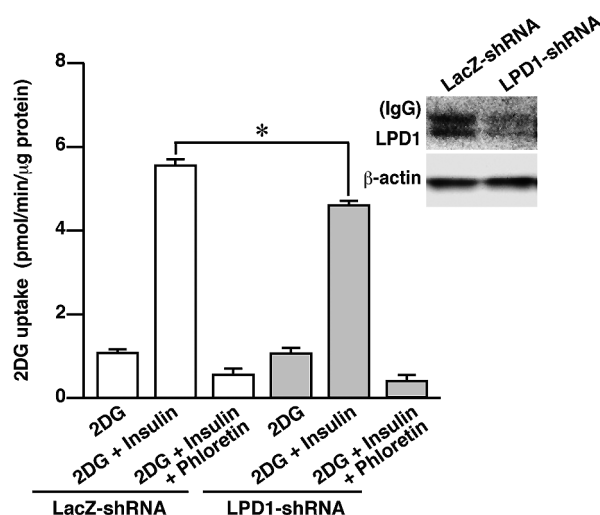


Fig. 6. Effect of LPD1 knockdown on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes.

審査の結果の要旨

Peroxisomeproliferator-activatedreceptor γ (PPAR γ) は、2型糖尿病モデルである *ob/ob* マウスの脂肪肝に高発現しており、脂肪肝発症に必須な核内受容体である。PPAR γ は、その標的遺伝子である fat specific protein 27 (FSP27) の発現を上昇させ、肝臓への脂肪蓄積を促している。また、申請者らは FSP27 以外の脂肪肝発症に関与する遺伝子を網羅的に単離するために、肝臓特異的に PPAR γ を欠損させた *ob/ob* マウス肝臓の GeneChip 解析を行い、機能未知 *liver PPAR γ -dependent gene 1 (LPD1)* 遺伝子の単離に成功した。

本研究は、脂肪肝発症に関与する FSP27 及び LPD1 遺伝子にフォーカスし、1) 脂肪肝発症の成因の違いが、FSP27 遺伝子の発現に影響するか否か、2) LPD1 遺伝子の組織・細胞における発現性及び LPD1 タンパクの生理機能の解明を目的に行った。

第一章では、*ob/ob* マウスとは成因の異なる様々な脂肪肝モデルマウスにおける FSP27 の発現を確かめた。FSP27 の発現はコントロールに比べて高脂肪食、メチオニン・コリン欠損食、絶食誘導性脂肪肝において誘導されたが、アルコール誘導性脂肪肝においては誘導されなかった。よって FSP27 遺伝子の発現は、脂肪肝発症の成因の違いにより大きく異なることが明らかになった。

第二章では、LPD1 遺伝子が PPAR γ 標的遺伝子であることを証明するために、マウス各組織及び細胞株における詳細な LPD1 の発現解析を行なった。まず、単離した LPD1 遺伝子の転写開始点を決定したところ、LPD1 遺伝子にはエキソン1の異なる3つのバリエーション (*LPD1a, 1b, 1c*) の存在が明らかになった。3つの LPD1 バリエーション遺伝子は、いずれも *ob/ob* マウスの脂肪肝、白色・褐色脂肪組織及び 3T3-L1 成熟脂肪細胞に高発現しており、それらの発現は PPAR γ の発現に依存した。

第三章では、*ob/ob* マウスの脂肪肝及び 3T3-L1 成熟脂肪細胞における LPD1 の細胞内局在解析を行なった。LPD1 の発現は、ミクロソーム画分に認められ、細胞骨格等がリッチな 1% Triton X-100 不溶性画分に局在していた。

第四章では、LPD1 の強制発現及びノックダウンシステムを用い、3T3-L1 成熟脂肪細胞における LPD1 の機能解析を行なった。LPD1b の高発現は、脂肪細胞への分化及び脂肪滴の肥大化を促進した。また、LPD1 は細胞膜のグルコーストランスポーター量を上昇させ、糖取り込みを促進した。

これらの結果より、LPD1 は、FSP27 と同様に PPAR γ による脂肪肝発症に関与している可能性が高いと考えられる。

以上、本研究は、独創的に展開され、脂肪肝形成に関する多数の興味ある新たな知見を見出したことになる。本研究の成果は、今後の肥満や2型糖尿病患者に併発する脂肪肝形成の分子メカニズムの解明を目指す研究に非常に有用な情報を提供するものであり、この分野の研究のさらなる展開に大きく貢献すると考えられる。また、申請者の公聴会審査におけるプレゼンテーション及び質疑に対する応答は適切であった。

以上、申請者は学位を授与するに値するものと判断した。