

平成 21 年 4 月 2 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590076
 研究課題名（和文） 生活習慣病原因解明の基盤となる構造体である細胞内脂肪滴の生物薬学的研究
 研究課題名（英文） Biological and pharmaceutical study on intracellular lipid droplets which are the key organelle to understand life style diseases.
 研究代表者
 板部 洋之（ITABE HIROYUKI）
 昭和大学・薬学部・教授
 研究者番号：30203079

研究成果の概要：

生活習慣病の要因である肥満や高脂血症は、脂質代謝異常に起因する。脂質代謝の基盤として注目されている細胞内脂肪滴は、種々細胞に普遍的に存在し脂質の蓄積と利用を担う構造体である。絶食により一過的に脂肪蓄積が亢進するマウス肝で、脂肪滴局在タンパク質の ADRP が顕著に誘導され、その ADRP は通常の脂肪滴や膜画分とは異なる中間比重画分に分布することを見出した。培養肝細胞 HuH-7 に脂肪酸を添加すると、ADRP が誘導され脂肪滴が生成するが中間比重脂肪滴は生じない。一方、グルカゴン刺激すると中間比重脂肪滴が出現した。この反応はジブチリル cAMP で再現され、A キナーゼ阻害剤によって抑制されたことから、肝細胞内脂肪滴形成を伴う脂肪蓄積に、グルカゴン刺激による cAMP 依存性の調節機構が存在することが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：細胞内脂肪滴、ADRP、脂肪酸、グルカゴン、A キナーゼ、

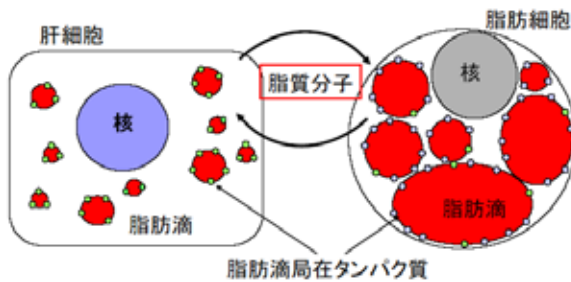
1. 研究開始当初の背景

近年、高血圧、糖尿病、動脈硬化症、肥満などの生活習慣病の広がりが、社会的重要性を増してきている。脂質代謝調節は、肥満や高脂血症に関わり、さらにインスリン抵抗性を介してメタボリックシンドロームの発症

と密接に関わっている。それに伴って進行する動脈硬化症や脂肪肝では顕著な脂肪蓄積と脂肪滴形成が見られている。

肥満は脂肪組織に大量のトリグリセリド（TG）が蓄積している状態であるが、この脂質は脂肪細胞内に脂肪滴を形成して蓄積している。動脈硬化病巣に見られる泡沫細胞は、

TG やコレステリルエステルなどの中性脂質を細胞質内に脂肪滴を形成して蓄積する。肝臓は常に大量の脂質が取込まれ分泌している脂質代謝の中継点であるが、生理的な状態でも小型の脂肪滴が存在し、脂質の輸送と蓄積に関わっている。脂肪滴は受動的に脂質を蓄積するのではなく、状況に応じて細胞外への脂質遊離を調節する役割を持つことが示された。さらに脂肪滴特異的に局在するタンパク質 (ADRP、ペリリピン) が見つかると、脂肪滴は細胞内の新たな機能的構造物であると考えられるようになってきた。



我々はこれまでに、マウスマクロファージ系細胞株 J774 およびヒト肝細胞株 HuH-7 細胞から脂肪滴を単離し、ADRP (Adipose differentiation-related protein; アディポフィリンとも呼ばれる) が脂肪滴の主要タンパク質であることをプロテオミクスの手法により確かめた (Fujimoto, Itabe, et al. BBA Mol. Cell. 1644 (2004) 47)。また、ADRP の発現量は細胞内 TG 量と連動しており、泡沫細胞の退縮に際してはユビキチン-プロテアソーム系による分解でその量が調節されることを示した (Masuda, Itabe, et al. J. Lipid Res. 47 (2006) 87)。

これまでの内外の研究は培養細胞レベルでの検討がほとんどで、組織レベルでの脂肪滴タンパク質の挙動とその役割についてはまだ良く分かっていなかった。脂肪滴局在タンパク質の発現が mRNA レベルと相関せず、脂質の存在量を含めて環境条件で変化することから、タンパク質の発現量をきちんと追跡することが必要であると考えられた。

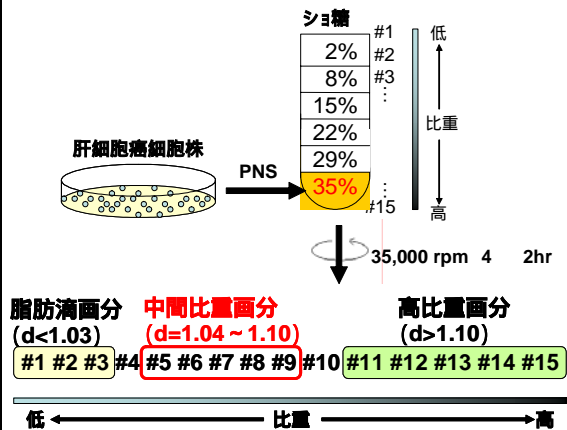
2. 研究の目的

脂肪滴が普遍的に存在する細胞内小器官であり、細胞レベルでの脂質代謝脂質代謝調節は、肥満や高脂血症に関わり、さらにインスリン抵抗性を介してメタボリックシンドロームの発症と密接に関わっている。脂肪蓄積と脂肪滴形成は多くの病態とも関わっており、動脈硬化症や脂肪肝では顕著な脂肪滴形成が知られている。脂肪滴の形成・増加・退縮の調節機構を解明することは、細胞レベルでの脂質の動員の流れを理解することで

あり、全身の脂質代謝調節の基盤であると考えられた。本研究では、絶食時の肝脂肪蓄積、および脂肪肝モデルにおける肝細胞脂肪滴の性状から、新たな性状を示す中間比重脂肪滴を見出し、この脂肪滴様構造体の生成機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

B57/BL6 マウスを一晩 (16 h) 絶食させた後、肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織を摘出する。組織ホモジネートを密度勾配遠心法にて種々細胞構成成分を分画すると、脂肪滴は遠心チューブの上端に回収される。ヒト肝細胞株 HuH-7 細胞に、100 nM グルカゴンと 600 μ M オレイン酸または 100 μ M ジブチリル cAMP を添加した条件で 24 時間培養後、細胞ライゼートを、同様にショ糖密度勾配遠心法にて細胞内構成積分を分画する。分離した脂肪滴画分中の TG、遊離脂肪酸含量を測定し、ウェスタンブロット法で ADRP を検出する。



4. 研究成果

絶食時には、血糖値の低下に伴い脂肪からのエネルギー利用が高まる。脂肪組織の TG が分解され、血中の遊離脂肪酸が増加する。この脂肪酸が肝に移行し一時的に脂肪蓄積する。対照マウス肝では、遠心チューブのトップ、低比重画分に ADRP と TG が分布し、脂肪滴の存在が確かめられる。16 時間絶食したマウスの肝では、TG の増加に伴って ADRP が誘導されるが、この時の ADRP は TG に富むいわゆる脂肪滴だけでなく、TG 含量の比較的小さい中間比重画分にも回収される。

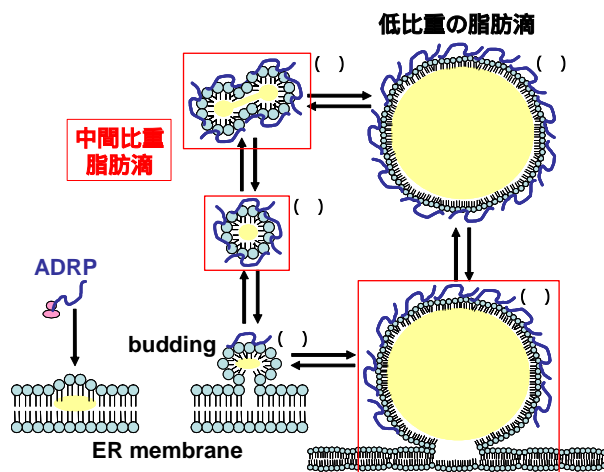
このような中間比重画分への ADRP の分布は、コリン・メチオニン欠乏食を与えたマウスの脂肪肝モデルにおいても再現され、生理的および病理的な肝脂質蓄積時に共通して見られる現象であることが分かった。

中間比重脂肪滴が形成を促す要因を探索

するために、ヒト肝細胞株 HuH-7 細胞における ADRP の分布とその変動を解析した。培地にオレイン酸を添加し 24 時間培養すると、HuH-7 細胞内に TG が蓄積し、Oil red O 染色で脂肪滴の形成が確認できる。しかし意外なことに、オレイン酸添加 HuH-7 では TG とともに ADRP 量が増加するが、両者は低比重脂質画分 ($d < 1.024$) に選択的に回収された。この場合には、中間比重脂肪滴は観察されず、TG 蓄積とは異なる条件が ADRP の挙動を制御していることが示唆された。

絶食時には脂肪組織から放出される遊離脂肪酸が血中に増えるだけでなく、血糖の変動に応じてグルカゴンも分泌される。そこで、オレイン酸とグルカゴンを共に HuH-7 細胞に添加したところ、TG および ADRP 量が約 2.1 倍に増加したのみならず、低比重脂質画分から中間比重画分 ($d=1.047 \sim 1.100$) に脂肪滴が認められた。グルカゴンのみの添加でも、ADRP が中間比重画分に分布したことから、グルカゴンが比重の異なる ADRP 含有粒子の形成の促進因子であると考えられた。

グルカゴンは、三量体 G タンパク質 Gs を介して、アデニル酸シクラーゼを活性化し cAMP 依存性の情報伝達系を動かすことが良く知られている。そこで、HuH-7 細胞にオレイン酸とジブチリル cAMP を共に添加したところ、グルカゴン添加した場合と同様に中間比重画分に脂肪滴が認められた。また、アデニル酸シクラーゼ阻害剤である Rp-adenosine 3',5'-cyclic monophosphorothioate (Rp), あるいは protein kinase A inhibitor 14-22 amide (PKI) の共存下では、グルカゴン刺激による中間比重脂肪滴への ADRP 分布が抑制された。これらのことから、ADRP はグルカゴン刺激下、cAMP 依存性の機構により、細胞内において局在を変え中間比重の脂肪滴様粒子を形成することが示唆された。



細胞内でどのように新しく脂肪滴が作られ

るのか、その仕組みはまだ十分には明らかになっていない。一説によると、小胞体がリン脂質二重層の間に脂質を溜め込み、小型のふくらみを形成し、それが出芽 (budding) することによって脂肪滴になると言われている。また最近では、脂肪滴が小胞体やミトコンドリアなどと接触した複合体を形成している可能性が指摘されるようになってきた。本研究で見出した中間比重脂肪滴は、ADRP 量に対して TG が少なく比重がやや高い粒子である。そのよう特性を持つためには、発芽したばかりの小型粒子、あるいは小胞体膜と結合した状態の複合体など、いくつかの可能性が考えられる。

本研究で示された ADRP の細胞内動態は、脂質代謝の変動時に ADRP と脂肪滴が激しく動的に動いていることを示唆し、そして脂肪滴の形成が単に脂質の量で決ってくるのではなくむしろグルカゴンなどのホルモンによって調節された応答であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 23 件)

Suzuk K, Takahashi K, Nishimaki-Mogami T, Kagechika H, Yamamoto M, and Itabe H.: Docosahexaenoic acid induces adipose differentiation-related protein through activation of retinoid X receptor in human choriocarcinoma BeWo cells. **Biol. Pharm. Bull.** 2009, In press

Kato R, Mori C, Kitazato K, Arata S, Obama T, Mori M, Takahashi K, Aiuchi T, Takano T, and Itabe H.: Transient increase in plasma oxidized LDL during the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2009, 29(1):33-39.

Shiraishi Y, Watanabe T, Suguro T, Nagashima M, Kato R, Hongo S, Itabe H, Miyazaki A, Hirano T, Adachi M. Chronic urotensin II infusion enhances macrophage foam cell formation and atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. **J. Hypertens.** 2008, 26(10):1955-1965.

Sato H, Kato R, Isogai Y, Saka G, Ohtsuki M, Taketomi Y, Yamamoto K,

Tsutsumi K, Yamada J, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Kobayashi T, Ikeda K, Taguchi R, Hatakeyama S, Hara S, Kudo I, Itabe H, and Murakami M.: Analyses of group III secreted phospholipase A2 transgenic mice reveals potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis. **J. Biol. Chem.** 2008, 283(48): 33483-33497

Obama T, Kato R, Masuda Y, Takahashi K, Aiuchi T, and Itabe H.: Analysis of modified apolipoprotein B-100 structures formed in oxidized low-density lipoprotein using LC-MS/MS. **Proteomics.** 2007, 7:2132-2141.

Fujimoto Y, Itabe H, Kinoshita T, Homma KJ, Onoduka J, Mori M, Yamaguchi S, Makita M, Higashi Y, Yamashita A, Takano T.: Involvement of long chain acyl-CoA synthetase in local synthesis of neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets in human hepatocyte HuH7. **J. Lipid Res.** 2007, 48:1280-1292

〔学会発表〕(計 20 件)

H. Itabe.: Structure and generation of plasma oxidized LDL during the atherogenesis. Lipid Peroxidation 2008 2008年10月 (軽井沢)

H. Itabe, Y. Masuda, N. Sasabe, K. Kitazato, K. Takahashi, J. Aoki, H. Arai, and T. Takano.: Induction of intracellular lipid droplet proteins by lipids in pathological conditions. The 3rd International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators 2007年5月 Sorrento, Italy

H. Itabe.: Behavior of plasma oxidized LDL levels during the early stage of atherogenesis in apolipoprotein E knockout mice. Oxidative Stress Summit 2007年7月 (大阪)

H. Itabe.: Atherosclerosis and inflammation: a perspective through oxidized low-density lipoprotein. The 1st International Symposium on Development of Anti-inflammatory Drugs. 2007年1月 Gyeongsan, Korea

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板部 洋之 (ITABE HIROYUKI)
昭和大学・薬学部・教授
研究者番号: 30203079

(2) 研究分担者

高橋 勝彦 (TAKAHASHI KATSUHIKO)
昭和薬科大学・准教授
研究者番号: 80307066

加藤 里奈 (KATO RINA)
昭和大学・薬学部・助教
研究者番号: 30392400

小浜 孝士 (OBAMA TAKASHI)
昭和大学・薬学部・助教
研究者番号: 60395647

(3) 連携研究者

なし