

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590998

研究課題名（和文） 白色脂肪細胞の褐色化と動脈硬化粥腫の形成・破綻の機序解明

研究課題名（英文） Mechanism of browning of white adipocyte and growing of atherosclerotic plaque

研究代表者

三好 秀明（MIYOSHI HIDEAKI）

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：30360902

研究成果の概要（和文）：脂肪組織特異的ペリリピン（PLIN1）過剰発現マスの白色脂肪は一部褐色脂肪化し、エネルギー消費亢進により肥満になりにくい痩せたマウスであった。培養脂肪細胞の検討で、過剰PLIN1による脂肪細胞内の脂肪滴萎縮は直接的作用でもあることもわかり、その機序などについて英文誌に報告した。

また、動脈硬化粥腫内のマクロファージの極性とプラークの不安定性について、頸動脈剥離術後の切除プラーク検体65例を用いて検討を行い英文誌に報告をした。

研究成果の概要（英文）：Our findings demonstrate a novel role for PLIN1 expression in adipose tissue metabolism and regulation of obesity and its metabolic complications. Overexpression of PLIN1 in white adipocytes reduces lipid droplet size by decreasing the expression of other lipid droplet proteins like FSP27 and thereby inducing a brown adipose tissue-like phenotype.

In the other study, we investigated the relationship between macrophage polarity and the vulnerability of human atherosclerotic plaques and clinical events. Macrophage polarity of atherosclerotic plaques was associated with clinical incidence of ischemic stroke, and unstable plaques defined by ultrasound.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：代謝異常症，肥満症，動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

ペリリピン（PLIN1）は脂肪滴表面に局限して発現している脂肪細胞内で最多のリン酸化蛋白であり、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。PLIN1はカテコラミンなどによるPKA刺激がないときには脂肪貯留（分解抑制）作用、反対にカテコラミンの刺激が入るとPKAによるリン酸化を

引き起こすが、直接的な脂肪分解活性はなく、HSLやATGLといった脂肪分解酵素やCGI-58（ATGL activator）など様々な脂質代謝関連蛋白との結合や解離などの干渉によって、それらの作用を直接的または間接的に制御するorganizing centerのような役割をもつことが想定されている（Greenberg et al. J

Clin Invest 2011). その中で申請者らは *peri*-/-由来の MEF 細胞の stable line を作成し, siRNA 手法やアデノウイルスシステムを利用してこれまで PLIN1 の機能ドメインの同定や, HSL と ATGL との干渉, 脂肪分解と貯留についての分子学的機構について明らかにしてきた (Miyoshi et al. J Biol Chem 2006, 2007, 2008, Mol Endocrinol 2006, J Cell Biochem 2008, J Lipid Res 2007, 2009 など).

(1) 白色脂肪細胞の褐色化

申請者らは脂肪組織特異的に mouse PLIN1 と human PLIN1 をそれぞれ過剰発現させた 2 系統の PLIN1 過剰発現マウス (*peri* Tg) を作成し, その表現型について解析をしている. PLIN1 欠損マウスが痩せたマウスであり, PLIN1 が脂肪貯留作用も有することから, 当初 *peri* Tg は肥満を呈すると予想していたが, *peri* Tg も痩せたマウスであり, 脂肪組織は 1/2 程に萎縮し, 脂肪細胞は白色・褐色とも縮小化していた. 摂餌量は対象と比べ変化なく, PKA 刺激後の脂肪分解反応も亢進していなかったが, 酸素消費量・エネルギー消費量の亢進を認めた.

(2) マクロファージの泡沫化における PLIN の役割

PLIN1 欠損マウスの脂肪細胞内脂肪滴の周囲には, 本来未分化脂肪細胞に発現して脂肪細胞分化に伴い PLIN1 と置き換わる形で消退していくはずの ADRP/adipophilin (PLIN2) が PLIN1 に代わってそのまま発現している. PLIN2 は非リン酸化蛋白で PLIN1 のような効率的な脂肪分解作用を有さず, 全身の微小脂肪滴を貯留する作用を有しているが, 貯留の状態も不安定で脂肪滴からは常に少量の脂質放出が持続している. 動脈硬化泡沫化細胞内の脂肪滴周囲にも PLIN2 が発現し, 粥腫形成や成長に関与しているとされている. 単球からマクロファージ (M ϕ) への分化に伴い, また酸化 LDL の刺激によって PLIN2 の発現が増加することは既に明らかになっている. 2001 年にヒト内頸動脈の免疫染色で, PLIN1 が安定プラークには発現しないがラプチャープラークでのみ発現しているという報告があったが, その後培養単球細胞 THP-1 などを用いた培養実験では否定的な報告もありしばらく研究は進展していなかった. 2005 年以降, 複数のグループからヒト動脈硬化巣やヒト末梢血由来の単球を初代培養して分化させた M ϕ 内には PLIN1 が発現しているとする報告が相次いだ. しかし, 酸化 LDL などの添加では影響されず, PLIN2 の発現にも影響されない, といった報告や, 酸化 LDL や VLDL の添加で減少する, といった報告など, 一定の見解は得られていなかった. M ϕ での PLIN1 の発現を制御している機序やその役割は全く不明といった状況にあり, 依然その存在を

否定する研究者すらいた.

2. 研究の目的

(1) 脂肪組織特異的 PLIN1 過剰発現マウス (*peri* Tg) はエネルギー消費亢進・肥満抵抗性を呈していた. 脂肪蓄積形態の変化によって, 脂肪組織における脂肪細胞の特性や分化に変化が生じると予測しており, その分子メカニズムを解明することを目的とした.

(2) 動脈硬化粥腫内マクロファージ泡沫化細胞内に PLIN1 が発現していることが最近報告されてきた. その発現意義 (役割) や, 粥腫形成や破綻に対する作用について明らかにすることをもう一つの目的とした.

3. 研究の方法

(1) *peri* Tg の解析

北海道大学医学部動物舎で飼育中の *peri* Tg (ヘテロ) について litter mate をコントロールに評価した. 典型的な白色脂肪細胞の間隙に *peri* Tg で認められる多房性小型脂肪細胞の集簇について, どのような細胞なのか解析を進めた (核染色やミトコンドリア染色, UCP-1 染色, RT-PCR, Western blot). 脂質代謝関連蛋白や, 褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞を特徴づける分化関連蛋白などについては, 網羅的に DNA マイクロアレイを用いて評価した後, real-time PCR や Western blot, 免疫染色にて評価をおこなった. 耐糖能の改善も認めており, その機序についても解析を進めていった.

(2) マクロファージの泡沫化における PLIN の役割

① ヒト内頸動脈剥離術後検体を用いたプラーク形成機序についての解明

ヒト動脈硬化粥腫内での脂肪滴周囲蛋白やマクロファージの役割を解明するために, 市内脳外科協力施設から頸動脈剥離術後の切除プラーク検体 65 例の回収を行った. 患者カルテベースでの情報収集も終了し, 脳卒中を発症した症候性プラークと, ガイドラインに則り予防的手術が行われた非症候性プラークにわけて検討を行った. 切除病変はすぐに mRNA 用, 蛋白用, 免疫染色用に切片を均等分割後に各種保存液に浸潤して当施設まで搬送された. 即日 mRNA と蛋白を抽出した後は各検体は解析まで -80 度で保存した. 内頸動脈剥離術後の検体提供とその使用については, 当大学病院および協力いただいた各神経外科病院の倫理委員会で承認をうけて開始した.

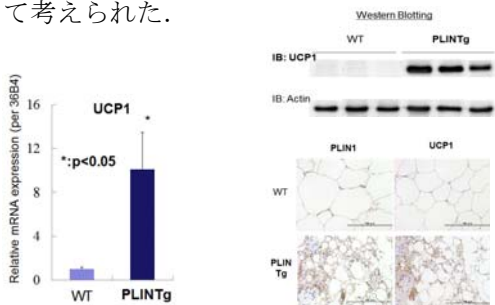
② ヒト末梢血単球由来のマクロファージ初代培養実験系

ヒト末梢血から単球を分離する方法は既報のとおりで, 末梢血から単核球分離用ファイコール液を使用してバッフィーコートを採取, 繰り返し洗浄後に, CD14 磁気ビーズ付

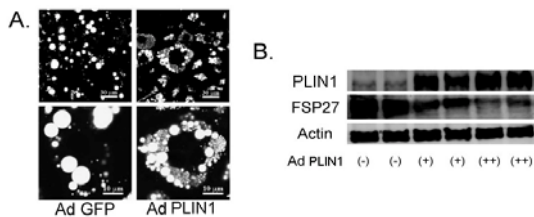
着抗体と MACS 用カラムを用いて単球を採取し、M-CSF 含 RPMI (10%FCS)にて培養を開始した。培養 14 日目以降に酸化 LDL や VLDL などの添加(12h~14d の様々な期間) , もしくはヒト PLIN2 やヒト PLIN1 のアデノウイルスを用いた過剰発現と RNAi を用いたノックダウン実験, TZD, IFN γ , LPS, TNF α , Palmitate, Olyate など各種刺激を加えた際の、ターゲット蛋白の変化を DNA マイクロアレイ, real-time PCR, Western blot, 位相差顕微鏡などで観察することを予定した。貯蔵脂肪量については hexane/isopropanol によって培養脂肪細胞から中性脂肪(TG)とコレステロールエステル(CE)を抽出し、それぞれの測定キットを使用して比較した(mg cell lysate protein 補正)。

4. 研究成果

(1) *peri* Tg の白色脂肪組織には異所性に UCP1 の発現を認め、2010 年の Cell Metabolism での特集などで話題になった白色脂肪の褐色脂肪化がこのマウスで認められた肥満抵抗性や耐糖能の改善の機序として考えられた。

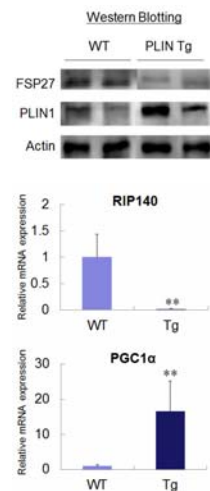


この「誘導型」褐色脂肪発現の機序については、cAMP 増加や PPAR γ 活性化, PGC-1 α の活性化, PRDM16 の発現のなどこの数年の間にいくつか想定されてきており、それらと同マウスでみる変化の関連を検討していった。*peri* Tg の白色脂肪組織内の



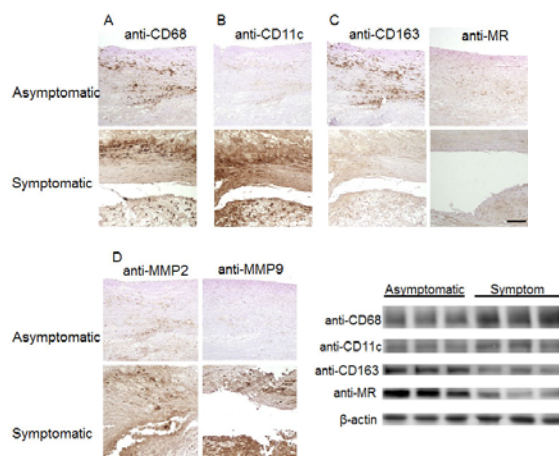
FSP27 の発現が減少しており、3T3-L1 培養脂肪細胞に PLIN1 を過剰発現することで FSP27 の発現が減少したことから、PLIN1 の増加が FSP27 の減少の直接的関与であることは明らかになった。FSP27 ノックアウトマウスの白色脂肪組織内の PGC1 α 増加と RIP140 発現低下について報告されており、*peri* Tg の白色脂肪組織でも同様に確認ができた。脂肪滴周囲構成蛋白の発現変化や脂肪滴サイズ縮小化といった脂肪細胞内の脂肪貯留の環境変

化が、RIP140 の減少や PGC1 α の増加を来し褐色脂肪細胞への分化に関与したということも明らかにした。また同マウスは耐糖能・インスリン抵抗性の改善を呈することがわかっていった。同マウスでの耐糖能改善の機序を解明するために、白色脂肪組織、骨格筋、肝臓などの組織における脂肪酸酸化, AMPK リン酸化, adipokine の関与などについても学会などで発表した。



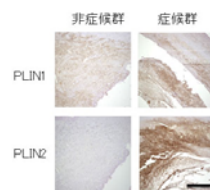
(2) マクロファージの泡沫化における PLIN の役割

① ヒト内頸動脈剥離術後検体を用いたプラーク形成機序についての解明
脳卒中を発症した34の症候性プラークと、31の非症候性プラークにわけて検討を行った。術前に行われた臨床検査や患者背景は両群に差を認めるものはなかったが、症候性プラーク内にはマクロファージの浸潤が著しく多く、そのほとんどがCD11c陽性のM1マクロファージ



であること、炎症性サイトカインや線溶系酵素が多く発現していることを明らかにした。反対に非症候群のプラークにはマクロファージの浸潤が少なく、浸潤しているマクロファージのほとんどがCD163やMR陽性のM2マクロファージであることを示し、国内および海外の学会や英文雑誌J Stroke Cerebrovasc Dis で発表した。

さらにマクロファージ内の脂肪滴周囲における PLIN1とPLIN2についての解析を行っている。非症候性プラークと比較し症候性プラークにはPLIN2の発現が著しく増加し、反対に



PLIN1は非症候性にも症候性にも発現を認めていた。

② ヒト末梢血単球由来のマクロファージ初代培養実験系

マクロファージ内の核周辺にある大きなサイズの脂肪滴の周囲にはPLIN1発現しており、PLIN2は細胞質に広く小脂肪滴に発現していることを確認した。成熟脂肪細胞内では脂肪分解反応直後にしかPLIN1とPLIN2の同時発現を認めないが、マクロファージではその脂肪貯留におけるPLIN発現の形態が異なっていた。酸化LDLを添加した際とVLDLレムナントを添加した際のPLIN1とPLIN2の発現量の変化にも違いがあり、マクロファージの極性を示す表面マーカーの発現変化や炎症性変化との関連について、研究を進めている。ヒト末梢血由来の培養マクロファージに、様々な刺激を付加したときの泡沫化に関連すると考えられる因子の変動を検索中である。また、PLIN1とPLIN2の役割を明らかにする目的で、過剰発現などによる上記因子の変化や脂肪貯留能の変化などについての実験も進行中である。今後はRNAiを用いた実験を追加して解析を進めていく予定である。

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 10 件)

1. Nakagaki O, Miyoshi H, Sawada T, Atsumi T, Kondo T, Atsumi T. Epalrestat improves diabetic wound healing via increased expression of nerve growth factor. **Exp Clin Endocrinol Diabetes** 2013; 121: 1-6. 査読あり
2. Miyoshi A, Nagai S, Takeda M, Kondo T, Nomoto H, Kameda H, Hirai A, Cho K, Kimachi K, Shimizu C, Atsumi T, Miyoshi H. Ovarian morphology and prevalence of polycystic ovary syndrome in Japanese women with type 1 diabetes mellitus. **J Diabetes Invest**, 2013 (in press) 査読あり
3. Yong KC, 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**, 2013 (in press) 査読あり
4. 三好秀明 脂肪の貯留分解制御と全身のエネルギー代謝—脂肪滴周囲蛋白ベリリピン— **肥満学会誌** 145-145, 2012 査読なし
5. Tajima K, Nagai S, Miyoshi H, Kondo T, Shimada S, Yanagisawa K, Hirayama E, Yoshioka N, Koike T: A comparison of pregnancy outcomes in Japanese women with type 2 and type 1 diabetes mellitus at tertiary centers. **Diabetol Int** 2:86-93, 2011 査読あり
6. Greenberg AS, Coleman RA, Kraemer FB, McManaman JL, Obin MS, Puri V, Yan QW, Miyoshi H, Mashek DG. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. **J Clin Invest**. 2011;121(6):2102-2110 査読あり
7. Sawada T, Miyoshi H, Shimada K, Suzuki A, Okamatsu-Ogura Y, Koike T. Perilipin Overexpression in White Adipose Tissue Induces a Brown Fat-like Phenotype. **PLoS One**. 2010;5(11):e14006 査読あり
8. Nanjo K, Nagai S, Shimizu C, Tajima T, Kondo T, Miyoshi H, Yoshioka N, Koike T. Identification and functional analysis of novel calcium-sensing receptor gene mutation in familial hypocalciuric hypercalcemia. **Endocr J**. 29;57(9):787-92, 2010 査読あり
9. Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Kondo T, Miyoshi H, Tajima T, Terauchi Y, Yoshioka N, Koike T. Problems in diagnosing atypical Gitelman's syndrome presenting with normomagneseamia. **Clin Endocrinol**. 72(2):272-6. 2010 査読あり
10. Miyoshi H, Souza SC, Endo M, Sawada T, Perfield JW 2nd, Shimizu C, Stancheva Z, Nagai S, Strissel KJ, Yoshioka N, Obin MS, Koike T, Greenberg AS. Perilipin overexpression in mice protects against diet-induced obesity. **J Lipid Res**. 2010 51(5): 975-82 査読あり

〔学会発表〕（計 13 件）

- (1) Yong KC, Miyoshi H, Atsumi T. Relationship between lipid droplet proteins and lipid storage in macrophages in human atherosclerotic plaques. 73th American Diabetes Association 2013年06月21～25日 McCormick Place Convention Center (Chicago, USA)
- (2) Yong KC, Miyoshi H, Atsumi T. The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. 48th European Association for the Study of Diabetes Annual Meeting. 2012年10月1～5日, Messe Berlin (Germany)
- (3) 曹 圭龍, 三好秀明, 渥美達也. 内頸動脈剥離術後ブランク内浸潤マクロファージと不安定性評価 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 2012年05月17日～19日 パシフィコ横浜 (横浜市)
- (4) Miyoshi H, Sawada T, Koike T. Perilipin Overexpression in White Adipose Tissue Induces a Brown Fat-like Phenotype Sapporo International Rheumatology and Autoimmunity System 2012年2月26日 Royton Sapporo (Sapporo)
- (5) 三好秀明. シンポジウム「脂肪細胞の最前線」脂肪の貯留分解制御と全身のエネルギー代謝 第32回日本肥満学会年次学術集会 2011年9月23日 淡路夢舞台国際会議場 (淡路市)
- (6) 澤田享 三好秀明 Perilipin Overexpression in White Adipose Tissue Induces a Brown Fat-like Phenotype シンポジウム「褐色細胞研究の新展開」2011年8月18日 北海道大学獣医学部 (札幌市)
- (7) 三好秀明 「ドナーレシピエントのメタボリック症候群対策」脂質異常 第27回腎移植・血管外科研究会 2011年6月25日 定山溪万世閣ホテルミリオーネ (札幌市)
- (8) 澤田享, 三好秀明 ペリリピン過剰発現マウスにおける糖代謝改善 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011年5月19日～21日 ロイトン札幌 (札幌市)
- (9) 三好秀明 脂肪の貯留・分解制御と全身のエネルギー代謝－脂肪滴周囲蛋白ペリ

リピンの研究から－ 日本臨床化学会第20回北海道支部例会 2010年12月18日 北海道大学学術交流会館 (札幌市)

- (10) 三好秀明 ペリリピン過剰発現による白色脂肪細胞の褐色化 第31回日本肥満学会年次学術集会 2010年10月1日 前橋テルサ他 (前橋市)
- (11) Sawada T, Miyoshi H, Kondo T, Nagai S, Yoshioka N, Koike T. Perilipin Overexpression in White Adipose Tissue Induces a Brown Fat-Like Phenotype. 70th scientific sessions of American Diabetes Association 2010年6月25～29日 Orange County Convention Center, Orlando, USA
- (12) 三好秀明 脂肪組織特異的ペリリピン過剰発現マウスの白色脂肪組織中のUCP-1発現 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 2010年5月29日 岡山全日空ホテル (岡山市)
- (13) 澤田享, 三好秀明, 近藤琢磨, 永井聡, 小池隆夫. 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 第47回日本臨床分子医学会学術総会 2010年4月11日 東京国際フォーラム (東京)

〔図書〕（計 3 件）

- (1) 三好秀明 インスリンと DPP4 阻害薬 室蘭医師会 室医会報 2012;103-106 査読なし
- (2) 三好秀明 Perilipin と脂肪滴 Annual Review 2010 糖尿病・代謝・内分泌 2010;105-112 査読なし
- (3) 三好秀明 メタボリックシンドローム発症にかかわるその他の液性および神経性因子 ペリリピン 日本臨床「メタボリックシンドローム」2010(2) ;314-318 査読なし

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学大学院医学研究科内科学講座 免疫・代謝内科学分野

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~e20677/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 秀明 (MIYOSHI HIDEAKI)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：30360902

(2) 研究分担者(2011年度で終了)

永井 聡 (NAGAI SO)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：70507590

(3) 連携研究者

なし