



Title	脂肪分化におけるPLAP-1の機能解析
Author(s)	阪下, 裕美
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/56130">https://doi.org/10.18910/56130</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 阪 下 裕 美 )

## 論文題名

脂肪分化におけるPLAP-1の機能解析

## 論文内容の要旨

## 【研究目的】

我々の研究室にてヒト歯根膜cDNAライブラリーより見出したperiodontal ligament associated protein-1 (PLAP-1) は分子量約40 kDaのプロテオグリカン様分子であり、歯根膜組織において高発現している新規細胞外基質タンパク (ECM) である。PLAP-1はN末端領域に4つ、C末端領域に2つのシステイン残基を含むコンセンサスモチーフを有し、中央部には10個のleucine-rich repeat (LRR) ドメインを持つことから、Decorin、Biglycanと共にsmall leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) family class I に属している。我々はこれまでに、PLAP-1が様々なサイトカインの作用を制御することにより歯根膜の恒常性維持に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。

肥満は、脂肪細胞の増殖と肥大化により引き起こされる白色脂肪組織が過剰に蓄積した状態である。脂肪の過度な蓄積により、脂肪組織において慢性炎症が惹起され、炎症性サイトカインの産生が亢進することでインスリン抵抗性といった肥満病態が形成される。また、脂肪細胞の増殖と肥大化により脂肪組織において、低酸素状態が誘導され、低酸素誘導転写因子であるHIF-1 $\alpha$ の発現が上昇する結果、ECM発現が亢進することが報告されている。ECMは正常範囲内での脂肪組織の拡大において、組織に柔軟性を与えることでメカニカルサポートの役割を担うが、肥満が進行してECMが過剰に産生されると、脂肪組織の線維化が引き起こされ、脂肪細胞の細胞死が誘導される。そして、マクロファージが同組織に浸潤することで慢性炎症状態が惹起される。脂肪組織の線維化においては、I 型、III型および VI 型コラーゲンの関与が明らかとなっているが、非コラーゲンECM分子の役割についてはいまだ不明な点が多い。興味深いことに、Biglycanが肥満病態を促進することが近年報告されたことで、Biglycanと相同性の高いPLAP-1も脂肪細胞の分化および肥満病態の進行に関与している可能性があるとの作業仮説を立てるに我々は至った。歯根膜に高発現するPLAP-1の脂肪組織における機能および歯周組織への影響を解析することで、近年、関連が報告されている歯周病と肥満病態の関連における機序の一端を明らかにし、そのことが両病態の発症や進行に関連する新たな分子メカニズムの解明や治療法の開発などにつながるものと期待される。そこで本研究において、高脂肪食投与による肥満モデルマウスを用いて、肥満病態におけるPLAP-1の機能解析を行った。さらに、マウス脂肪前駆細胞を用いて、脂肪分化および脂肪組織の線維化におけるPLAP-1の関与についての解析を行った。

## 【材料および方法】

① マウス全身組織における *PLAP-1* の発現解析

C57BL/6 J (WT) マウスの各組織からRNAを抽出し、*PLAP-1* 遺伝子の発現をReal-time PCRにて検討した。

② *PLAP-1* ノックアウト (*PLAP-1* KO) マウスにおける肥満病態の解析

5週齢の雄のWTおよび*PLAP-1* KOマウスの体重を測定し、グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験、上顎骨のマイクロCT撮影を行った。これらのマウスに普通食または高脂肪食を与え、経日的に体重を測定し、16週間後にグルコース負荷試験、インスリン負荷試験を行った。さらに、血清の生化学検査、脂肪組織におけるマクロファージマーカー遺伝子の発現についてReal-time PCRにて検討した。上顎骨のマイクロCT撮影を行い、セメントエナメル境と歯槽骨頂間との距離を測定することにより骨吸収状態の評価を行った。

③ *PLAP-1* ノックダウン脂肪前駆細胞における脂肪分化解析

small interfering RNA (siRNA) を用いてマウス脂肪前駆細胞3T3-L1における *PLAP-1* の発現を抑制した。同細胞をコンフルエントまで培養し、10% FCSおよび0.5 mM isobutyl-methylxanthine (IBMX)、1  $\mu$ M dexamethasone (DEX)、10  $\mu$ g/ml insulin含有Dulbecco's Modified Eagle's (D-MEM) にて2日間培養し、その後、10% FCSおよび10  $\mu$ g/ml insulin含有D-MEMにて培養し、脂肪分化誘導を行った。脂肪前駆細胞から脂肪細胞へ分化する際に細胞

内に蓄積される脂肪滴をOil Red Oにより染色し、定量解析を行った。さらにReal-time PCRにて脂肪分化関連遺伝子の発現を検討した。

#### ④ リコンビナントPLAP-1存在下における脂肪前駆細胞の脂肪分化解析

PLAP-1発現アデノウイルスを3T3-L1細胞に感染させ、感染2日後に培養上清を回収しPLAP-1コンディショニングメディウムとして使用した。また、*LacZ*発現アデノウイルス感染による培養上清をコントロールとした。PLAP-1コンディショニングメディウム存在下にて3T3-L1細胞の脂肪分化誘導を行い、上記③と同様の項目について検討を行った。

#### ⑤ WTおよびPLAP-1 KOマウス由来初代培養脂肪前駆細胞の脂肪分化解析

WTおよびPLAP-1 KOマウスの皮下脂肪を採取し、10% FCSおよび4000 units/ml コラゲナーゼ、0.1 mg/ml DNaseを含むD-MEMにて反応させ、セルストレーナーを用いて同液を濾過し、遠心（500 G、室温、10分）および上清吸引後、10% FCS含有D-MEMにて培養した。翌日、PBSにて3回洗浄し、コンフルエントまで培養した。そして、10% FCS、10  $\mu$ M pioglitazone、1  $\mu$ M insulin、0.5 mM IBMX、1  $\mu$ M DEX含有D-MEMにて2日間培養し、その後、10% FCSおよび100 nM insulin含有D-MEMにて培養し、脂肪分化誘導を行い、Oil Red Oによる染色、および脂肪分化関連遺伝子の発現をReal-time PCRにて検討した。

#### ⑥ WTおよびPLAP-1 KOマウス脂肪組織における細胞外基質（ECM）発現解析

WTおよびPLAP-1 KOマウスの皮下脂肪より分離した間質血管細胞群（stromal vascular fraction: SVF）と成熟脂肪細胞群（mature adipocyte fraction: MAF）におけるECM遺伝子発現をReal-time PCRにて解析した。

### 【結果】

① WTマウスの各組織を用いたリアルタイムPCR法の解析結果より、PLAP-1は脂肪組織において恒常的に発現していることが明らかとなった。

② WTマウスにおいては、高脂肪食を投与することにより体重が増加し耐糖能およびインスリン感受性の悪化を認めたが、PLAP-1 KOマウスでは、これらの肥満病態に対して抵抗性を示した。そして、高脂肪食投与時のWTマウスの脂肪組織におけるPLAP-1の発現をReal-time PCRにて経時的に検討した結果、高脂肪食投与8週間後において、一時的な発現上昇を認めた。また、WTマウスでは上顎骨において高脂肪食誘導性の骨吸収を認めたが、PLAP-1 KOマウスでは高脂肪食誘導性の骨吸収が抑制された。さらに、脂肪組織におけるマクロファージマーカー遺伝子の発現はPLAP-1 KOマウスにおいて低値を示した。また血清検査の結果、トリグリセリドの値がPLAP-1 KOマウスで高値を示した。

③ siRNAにてPLAP-1の発現を抑制した3T3-L1細胞を脂肪分化誘導した結果、脂肪滴の形成は抑制され、脂肪分化関連遺伝子の発現も低下していた。

④ PLAP-1コンディショニングメディウム存在下で脂肪分化誘導を行った結果、脂肪滴の形成は増加し、脂肪分化関連遺伝子の発現上昇も認めた。

⑤ PLAP-1 KOマウス由来脂肪前駆細胞の脂肪分化誘導を行った結果、WTマウスに比べて、脂肪滴の形成および脂肪分化関連遺伝子の発現が抑制された。

⑥ PLAP-1の遺伝子発現はMAFと比較してSVFで亢進を認めた。また、SVFではCollagen 1 $\alpha$ 1 (Col1 $\alpha$ 1)、Collagen 6 $\alpha$ 1 (Col6 $\alpha$ 1)、Decorin (Dcn)、Biglycan (Bgn)の発現はPLAP-1 KOマウスにおいて有意に低く、一方、MAFでは、PLAP-1 KOマウスにおいてCol1 $\alpha$ 1、Dcnの発現が有意に高く、Col6 $\alpha$ 1、Bgnの発現が有意に低かった。

### 【結論および考察】

PLAP-1遺伝子欠損により、肥満病態及び脂肪細胞分化が抑制されることが明らかとなった。すなわち、PLAP-1は脂肪分化を促進することが示された。PLAP-1は脂肪前駆細胞の分化や、血液中の中性脂肪（トリグリセリド）を遊離脂肪酸とグリセロールに分解する働きをもつlipoprotein lipase（LPL）の活性、マクロファージの脂肪細胞への浸潤に影響を与えている可能性が考えられる。また、脂肪組織の拡大により引き起こされる低酸素状態により低酸素誘導転写因子HIF-1 $\alpha$ の発現が誘導され、ECMが過剰発現する過程においてPLAP-1の発現が誘導されることで脂肪組織の線維化に何らかの作用を及ぼしたことが考えられる。そして、PLAP-1ノックアウトにより脂肪肥満病態が抑制された結果、血流を介した歯周組織への炎症性サイトカインの影響が低下したため、歯槽骨吸収が抑制されたと考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 阪 下 裕 美 )			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	村上 伸也
	副 査	教授	仲野 和彦
	副 査	准教授	河合 伸治
	副 査	講師	村上 智彦
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、歯根膜において特徴的に発現し歯周組織の恒常性維持に重要な役割を担う細胞外基質タンパクである periodontal ligament associated protein-1 (PLAP-1) が脂肪組織に及ぼす影響について、高脂肪食誘導性の肥満モデルマウスおよび脂肪前駆細胞を用いて解析したものである。</p> <p>その結果、<i>PLAP-1</i> ノックアウトマウスは高脂肪食誘導性の肥満病態および歯槽骨吸収に抵抗性を示すこと、また、PLAP-1 は脂肪前駆細胞の脂肪分化を促進することが明らかとなった。以上の結果より、PLAP-1 が歯周組織の恒常性維持のみならず脂肪分化の過程においても重要な役割を担うことが明らかとなった。これらの研究成果は、PLAP-1 の脂肪組織における機能および歯周組織への影響を明らかにすると共に、近年、関連が報告されている歯周病と肥満病態の関連を解明する上で重要な知見を与えるものであり、博士(歯学) の学位を授与するのに値するものと認める。</p>			