

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	https://doi.org/10.18910/56130
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

脂肪分化における PLAP-1 の機能解析

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学

阪下 裕美

(指導教員:村上 伸也 教授)

本論文の要旨は第57回日本歯周病学会春季学術大会(2014年5月23、24日、 岐阜)、第58回日本歯周病学会春季学術大会(2015年5月15、16日、千葉)、 EUROPEERIO 8(2015年6月3-6日、London、UK)、第142回日本歯科保 存学会秋季学術大会(2015年6月26、27日、福岡)において発表した。 緒言

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 ^{1,2}。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³。我々 はこれまでに、PLAP-1 が bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) と結合することで BMP-2 によるシグナル伝達を阻害し、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を抑制すること^{4,5}、また、fibroblast growth factor-2 (FGF-2) と結合することで FGF-2 の機能を促進することを明らかとしてきた⁶。さらに、PLAP-1 は transforming growth factor-β (TGF-β) と結合することにより TGF-βの機能を抑制することが報告されている⁷。これらのことから、PLAP-1 は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と考えられる。

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^{8,9}。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 hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α)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¹⁰。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っている。しかしなが ら、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^{8,9,11}。

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¹¹、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¹²、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. 高脂肪食投与によるマウス実験的肥満モデル

本研究におけるすべての動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を得て行った(承認番号:動歯-22-001-0および動歯-26-027-0)。高 脂肪食(high fat diet: HFD)投与による実験的肥満モデルの構築はWang *et al.* の方法に準じて行った¹³。すなわち、5週齢野生型(WT)C57BL/6Jマウス(日 本SLC、静岡、日本)および当研究室にて樹立した*Plap-1ノック*アウト(*Plap-1* KO)マウス⁶を 60 kcal %高脂肪飼料(HFD)(RESEARCH DIETS、New Jersey、 USA)にて、対照群として10 kcal %コントロール飼料(normal chow diet: NCD)

(RESEARCH DIETS) にて 16 週間飼育した。摂餌量は1ケージあたり1週 間の摂取量を計測することにより算出した。

2. マウス各組織および培養細胞における遺伝子発現解析

8 週齡雄性 WT マウスより上顎骨、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、脳、心臓、 肺、肝臓、胃、小腸、大腸、膵臓、腎臓、脾臓、骨髄、筋肉、歯肉を採取した。 また、NCD または HFD での飼育後の WT および *Plap-1* KO マウスから白色脂 肪組織を採取した。採取した組織より RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN、 Hilden、Germany)を用いて全 RNA を抽出した。また、各培養細胞から PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies、California、USA)を用いて全 RNA を抽出した。High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems、 California、USA)を用いて逆転写反応を行い、相補鎖 DNA (cDNA)を作製 した。得られた cDNA を鋳型として表 1 に示す各遺伝子特異的プライマーを用 いて Real-time PCR 解析を行った。PCR 反応は Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies)を用いて StepOnePlus Real-time PCR System (Life Technologies)にて行った。また、*hypoxanthine phosphoribosyltransferase* (*Hprt*) 遺伝子の発現を内部コントロールとして用いた。

遺伝子	GenBank Acc.	シークエンス	
Dlam 1	NM_025711	5'-ATGATGACGATAACGATGATGACGA-3'	
Plap ⁻¹		5'-TGTTGTTTGGAACCGATGTCAGA-3'	
Adipoq	NM_009605	5'-TTCTGTCTGTACGATTGTCAGTGGA-3'	
		5'-GGCATGACTGGGCAGGATTA-3'	

表1 本研究で使用した Real-time PCR 用プライマーシークエンス

T	NM_008493	5'-GAACCTGTCTACTCATGCCAGCAC-3'
Lep		5'-CTGGTCCTGCAGCCTGTTTG-3'
E4/00	NM_010130	5'-GCTATGGGCTTCCAGTCCTGGTGGT-3'
F4/80		5'-GAAGGTCAGCAACCTCGTGTCCTTG-3'
The Car	NM_013693	5'-AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA-3'
Inr-a		5'-GGCACCACTAGTTGGTTGTCTTTG-3'
Пе	NM_031168	5'-CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA-3'
11*6		5'-GCAAGTGCATCATCGTTGTTCATAC-3'
Min 1.	NM_011337	5'-CATGACACTCTGCAACCAAGTCTTC-3'
Mip-1a		5'-GAGCAAAGGCTGTTGGTTTCA-3'
Angl	NM_007482	5'-AGCTCTGGGAATCTGCATGG-3'
Arg1		5'-ATGTACACGATGTCTTTGGCAGATA-3'
CL:212		5'-GATGGCCTCAACCTGGACTG-3'
Chisis	NWI_009892	5'-CGTCAATGATTCCTGCTCCTG-3'
Clas7a	NM_020008	5'-GGTACCCTGACTCAAATTTCACAAC-3'
Clec 7a		5'-CACCACAGTAAGTAGGCTGATTCTC-3'
Esher 4	NM_024406	5'-TGGGAACCTGGAAGCTTGTCTC-3'
Fabp4		5'-GAATTCCACGCCCAGTTTGA-3'
Duran	NM_001127330	5'-GGAGCCTAAGTTTGAGTTTGCTGTG-3'
Pparg		5'-TGCAGCAGGTTGTCTTGGATG-3'
Cabaa	NM_007678	5'- TTGAAGCACAATCGATCCATCC-3'
Ceopa		5'- GCACACTGCCATTGCACAAG-3'
0.11.1	NM_007742	5'-CAGGGTATTGCTGGACAACGTG-3'
Collai		5'-GGACCTTGTTTGCCAGGTTCA-3'
<i>C</i> -19-1	NM_009930	5'-CAGGCCAGTGGCAATGTAAAGA-3'
<i>C013a1</i>		5'-CTCATTGCCTTGCGTGTTTGATA-3'
0.10.1	NM_009933	5'-GAGCTTCTCGATGACGGCTTTC-3'
Colbal		5'-GAGCTGTCTAGCAGGATGGTGATG-3'
Dec	NM_001190451	5'CTGGGCTGGCACAGCATAAGTA3'
Dcn		5'-CGGACAGGGTTGCCGTAAAG-3'
Dama	NM_007542	5'-GATGATTGAGAATGGGAGCCTGA-3'
Bgn		5'-TCCGAAGCCCATAGGACAGAAG-3'
TT	NM_013556	5'-TTGTTGTTGGATATGCCCTTGACTA-3'
<i>Hprt</i>		5'-AGGCAGATGGCCACAGGACTA-3'

3. マウスにおける糖代謝解析

NCD または HFD での飼育前および後に、グルコース負荷試験 (glucose tolerance test: GTT) およびインスリン負荷試験 (insulin tolerance test: ITT) を行った。すなわち、GTT は、マウスに 16 時間絶食させた後、1.5 g/kg glucose (和光純薬工業、大阪、日本)を腹腔内投与し、0、15、30、60、120 分後における血糖値を測定した。ITT は、0.75 U/kg insulin (Novo Nordisk、Bagsvaerd、 Denmark)を腹腔内投与し、0、15、30、60、120 分後における血糖値を測定 した。血糖値測定はワンタッチウルトラ (Johnson & Johnson Services、New Jersey、USA) を用いた。

4. 血清学的解析

マウスに 16 時間絶食させた後、採血を行い、同血液を転倒混和させて室温に 60 分静置した。凝血を確認後、遠心分離(1500 G、室温、15 分)により得た 血清を解析に用いた。総コレステロールは L タイプワコー CHO・H(和光純薬 工業)、トリグリセリドは L タイプワコー TG・H(和光純薬工業)、遊離脂肪 酸(non-esterified fatty acid: NEFA)は NEFA-SS '栄研'(栄研化学、栃木、 日本)、low-density lipoprotein (LDL) コレステロールはコレステスト LDL (積 水メディカル、東京、日本)、high-density lipoprotein (HDL) コレステロール はコレステスト N HDL (積水メディカル)、グルコースはクイック ネオ GLU-HK(シノテスト、神奈川、日本)を用いて解析した。

5. 歯槽骨吸収量の定量解析

NCD または HFD での飼育前および後の WT および *Plap-1* KO マウスの上顎 を採取し、実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R_mCT2(リガク、東京、日本) により断層撮影を行い、得られた 3 次元画像を 3 次元画像解析ソフトウェア TRI/3D-BON(ラトックシステムエンジニアリング、東京、日本)により 2 次 元化した。画像解析ソフトウェア WinROOF(三谷商事、福井、日本)を用い て、2 次元化した画像におけるセメントエナメル境から歯槽骨頂までの根尖方向 の距離を測定し、第1 臼歯遠心根、第2 臼歯近心および遠心根における測定値 の合計を同上マウスの歯槽骨吸収量とした。

6. 組織学的解析

16 週間の HFD での飼育後の WT および *Plap-1* KO マウスにペントバルビタ ールナトリウム麻酔下で 4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (和 光純薬工業、以下 PFA と略す)を用いて灌流固定し、精巣上体脂肪を採取した。 同組織を PFA にて一晩浸漬固定後、パラフィンで包埋し、LEICA RM2245 (Leica Microsystems、Wetzlar、Germany)を用いて厚さ 3.0 µm の薄切切片 を作製した。薄切切片は、マイヤー・ヘマトキシリン(武藤化学、東京、日本) および1%エオシンY液(和光純薬工業)を用いてヘマトキシリン・エオシン(H-E) 染色を行った。光学顕微鏡 ECLIPSE Ci (Nikon、東京、日本)にて観察およ び写真撮影を行い、画像処理ソフトウェア ImageJ (フリーソフトウェア)を用 いて脂肪細胞の面積を測定し、面積ごとの細胞数の分布を評価した。

7. マウス脂肪前駆 3T3-L1 細胞における *Plap-1* siRNA の導入および脂肪分化 誘導

10% ウシ胎仔血清(Life Technologies、以下 FCS と略す)含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Life Technologies、以下 D-MEM と略す)を用いて、 24 穴培養プレートおよび 6 穴培養プレート(Corning、New York、USA)に 1 穴あたりそれぞれ 4×10⁴、2×10⁵ 個になるよう 3T3-L1 細胞を播種し、*Plap-1* 遺伝子上の配列をターゲットとした、*Plap-1* siRNA(5'-GAUGUUGAAGGAU AUGGAA·3')、またコントロールとして Silencer Select Negative Control siRNA (Life Technologies)(共に 5 nM)を Lipofectamine 3000(Life Technologies)を用いて遺伝子導入した。6 時間後に、10% FCS および 60 µg/ml カナマイシン含有 D-MEM に培地交換した。細胞播種から 72 時間後に 0.5 mM isobutyl-methylxanthine (IBMX、Sigma-Aldrich、Missouri、USA)、1 µM dexamethasone (DEX、Sigma-Aldrich)、10 µg/ml insulin(Sigma-Aldrich) を添加した 10% FCS および 60 µg/ml カナマイシン含有 D-MEM にて 2 日間培 養し、その後、10 µg/ml insulin を添加した 10% FCS および 60 µg/ml カナマイ シン含有 D-MEM にて培養し、脂肪分化誘導を行い、その後、Oil Red O 染色お よび全 RNA 回収を行った。

8. PLAP-1 含有コンディションメディウムの作製

リコンビナント PLAP-1 の発現には、FLAG 標識マウス *Plap-1* 発現アデノウ イルス、および対照群として *LacZ*発現アデノウイルスを用いた 6。10 cm プレ ート (Corning) 上で 10% FCS および 60 µg/ml カナマイシン含有 D-MEM に て培養した 3T3-L1 細胞に FLAG 標識マウス *Plap-1* 遺伝子発現アデノウイルス および *LacZ*遺伝子発現アデノウイルスを感染させ、48 時間後に上清を回収し、 コンディションメディウムとして実験に供した。コンディションメディウム中 の PLAP-1 の発現を確認するため、24µl のコンディションメディウムを 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) に て電気泳動を行い、HRP 標識マウス抗 FLAG 抗体 (1: 10000、Sigma-Aldrich) を用いたウェスタンブロット法を行った。PLAP-1 タンパク質は SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific, Illinois, USA) により検出した。

9. PLAP-1 含有コンディションメディウムを用いた脂肪分化誘導

50 µg/ml Fibronectin (Becton Dickinson、New Jersey、USA)を24 穴培養 プレートおよび6 穴培養プレートに1 穴あたりそれぞれ300 µl、1.5 ml 滴下し、 37℃で1時間インキュベートした後、Phosphate Buffered Saline (和光純薬工 業、以下 PBS と略す)で洗浄したプレートを実験に供した。24 穴培養プレート および6 穴培養プレートに1 穴あたりそれぞれ2×104、8×104 個になるよう 3T3-L1 細胞を播種し、2日後に培地交換を行った。さらに2日後、コンフルエ ント状態に達した3T3-L1 細胞に0.5 mM IBMX、1 µM DEX、10 µg/ml insulin を添加した PLAP-1 含有コンディションメディウムにて2日間培養し、その後、 10 µg/ml insulin を添加した PLAP-1 含有コンディションメディウムにて培養 し、脂肪分化誘導を行い、その後、24 穴培養プレートについては Oil Red O 染 色、6 穴培養プレートから全 RNA 回収を行った。

10. マウス皮下脂肪由来脂肪前駆細胞の分離および脂肪分化誘導

10-12 週齢の雌性 WT および *Plap-1* KO マウスの皮下脂肪を採取し RNeasy Lipid Tissue Mini Kit を用いて、全 RNA を抽出した。さらに皮下脂肪を細切 後、4000 units/ml collagenase (Sigma-Aldrich)、0.1 mg/ml DNase I (Roche、 Basel、Switzerland)を添加した 10% FCS および 60 µg/ml カナマイシン含有 D-MEM にて反応させ (37°C、30 分)、セルストレーナー (BD Biosciences、 California、USA)を用いて同液を濾過し、遠心分離 (500 G、室温、10 分) した。最上層の成熟脂肪細胞群 (mature adipocyte fraction: MAF) および、 遠沈した細胞ペレットの間質血管細胞群 (stromal vascular fraction: SVF)を 実験に供した。SVF を 10% FCS および 60 µg/ml カナマイシン含有 D-MEM にて懸濁し、24 穴培養プレートおよび 6 穴培養プレートに播種した。翌日、 PBS にて 3 回洗浄し、コンフルエント状態まで培養した。10 µM pioglitazone

(Sigma-Aldrich)、0.5 mM IBMX、1 μM DEX、1 μM insulin を添加した 10% FCS および 60 μg/ml カナマイシン含有 D-MEM にて 2 日間培養し、その後、 100 nM insulin を添加した 10% FCS および 60 μg/ml カナマイシン含有 D-MEM にて培養し、Oil Red O 染色および全 RNA 回収を行った。

11. Oil Red O 染色と脂肪滴形成量の定量性解析

3T3-L1 細胞およびマウス皮下脂肪由来脂肪前駆細胞における脂肪滴形成は リピットアッセイキット(コスモ・バイオ、北海道、日本)を用いた Oil Red O 染色により検出した。すなわち、細胞を PBS で洗浄後、10%ホルムアルデヒド液(和光純薬工業)にて一晩固定した。精製水で洗浄後、Oil Red O 液にて 15分間染色、精製水で3回洗浄し、精製水中で光学顕微鏡 ECLIPSE Ti (Nikon)にて観察および写真撮影を行った。脂肪滴形成量の定量性解析については、抽出液(イソプロパノール)にて2時間、色素を抽出した後、Multiskan^M FC 吸光マイクロプレートリーダ (Thermo Scientific)にて 540 nm での吸光度を測定した。

12. 統計処理

実験データは平均値±標準誤差で示した。有意差検定は 2 群比較は Student's-t 検定を、多群比較は分散分析 (ANOVA) を行った後に post-hoc と して Tukey 検定を用いて行い、p < 0.05 を有意差があるものとした。

結果

1. マウス全身組織における Plap-1 の発現解析

マウスの全身組織における *Plap-1*の発現を Real-time PCR で解析した。その 結果、歯根膜を含む上顎組織のみならず、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、筋肉 においてもその発現が認められた(図1)。このことから PLAP-1 は白色脂肪組 織において恒常的に発現することで、同組織において何らかの役割を担ってい ることが示唆された。



図1 マウス全身組織における *PLAP-1*の発現

8 週齢雄 C57BL/6J マウスの各組織から全 RNA を抽出し、*Plap-1*の発現を Real-time PCR 法により解析した。解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示した。Maxilla: 上顎 骨、White adipose tissue: 白色脂肪組織、Brown adipose tissue: 褐色脂肪組織、Brain: 脳、 Heart: 心臓、Lung: 肺、Liver: 肝臓、Stomach: 胃、Small intestine: 小腸、Large intestine: 大腸、Pancreas: 膵臓、Kidney: 腎臓、Spleen: 脾臓、Bone marrow: 骨髄、Muscle: 筋 肉、Gingiva: 歯肉。

2. マウス実験的肥満モデルの解析

高脂肪食(HFD)投与による肥満モデルマウスの構築を行った。マウスにHFD を投与した結果、普通食(NCD)を投与したマウスと比較して有意な体重増加 が認められた(図2A)。また、グルコース負荷試験(GTT)、インスリン負荷試 験(ITT)の結果、HFD 投与により耐糖能およびインスリン感受性の悪化が誘 導された (図 2B)。血清解析の結果、HFD 投与により、総コレステロール、 HDL コレステロール、グルコースの値が有意に高値を示し、一方で、HFD 投 与 4 週間後においてトリグリセリドの値は有意に低値を示した (図 2C)。 次に、 精巣上体脂肪組織における Plap-1の発現を Real-time PCR にて経時的に解析し たところ、投与実験開始2週間前、すなわち3週齢において認められる Plap-1 の発現は投与実験開始1週間前、すなわち4週齢において有意に上昇しNCD投 与群ではその後、Plap-1の発現低下が認められた。一方、投与8週間後におい て、HFD 投与群では NCD 投与群と比較して Plap-1 の有意な発現上昇が認めら れた(図 2D)。さらに、HFD 投与による歯槽骨吸収への影響を調べるために、 上顎歯槽骨のマイクロ CT 撮影を行い、歯槽骨吸収の評価を行った結果、HFD 投与4週間後において歯槽骨吸収の増大傾向が認められ、HFD 投与16週間後 においては有意な歯槽骨吸収が認められた(図 2E、F)。







図2 マウス実験的肥満モデルの解析

A. マウス実験的肥満モデルの体重変化 5週齢雄 C57BL/6J マウスに高脂肪食(HFD) あ るいは対照群として普通食(NCD)を投与し、その体重を経日的に測定した。各群n = 7。 B. HFD 投与時の糖代謝能 16 週間の NCD または HFD 投与後にグルコース負荷試験 (GTT) およびインスリン負荷試験(ITT)を行い、経時的に血糖値を測定した。各群 n= 4。 C. HFD 投与時の血清代謝マーカー NCD または HFD 投与期間中の血清代謝マーカ ー値の経時点変化を示した。各群 n = 3。T-CHO:総コレステロール、TG:トリグリセリド、 LDL-C: LDL コレステロール、HDL-C: HDL コレステロール、NEFA: 遊離脂肪酸、GLU: グルコース。 D. 脂肪組織における Plap-1 発現 NCD または HFD 投与期間中の精巣上 体脂肪組織における Plap-1 発現を Real-time PCR にて解析した。Plap-1 の発現量は投与 前のマウスにおける発現量を1としたときの相対値として示した。2: 投与実験開始2週間 前、すなわち3週齢群(n=3)、-1: 投与実験開始1週間前、すなわち4週齢群(n=3)、 0: 投与実験開始時、すなわち 5 週齢群 (n = 5)、4:4 週間の NCD または HFD 投与群(各 n=5)、8:8週間の NCD または HFD 投与群(各 n=5)、16:16 週間の NCD または HFD **E. F. HFD 投与時の歯槽骨吸収** NCD または HFD 投与期間中の上 投与群(各n=5)。 顎歯槽骨マイクロ CT 像を示した(E)。歯槽骨吸収量はセメントエナメル境から歯槽骨頂 までの根尖方向の距離を測定し、第1臼歯遠心根(a)、第2臼歯近心(b)および遠心根(c) における測定値の合計(a + b + c)を歯槽骨吸収量として示した(F)。各群 n = 14。解析 結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示した。*: p<0.05、**: p<0.01

3. 高脂肪食投与 PLAP-1 KO マウスにおける体重変化および脂肪細胞の肥大化

*in vivo*における PLAP-1 の肥満病態に及ぼす影響を検討するため、当研究室 にて樹立した *Plap-1* KO マウスに HFD を投与し、肥満病態の解析を行った。5 週齢雄の WT および *Plap-1* KO マウスに 16 週間 HFD を投与した結果、WT と 比較して、*Plap-1* KO マウスにおいて、有意な体重増加の抑制が認められた(図 3A)。このとき、WT と *Plap-1* KO マウスにおける摂餌量に差は認められなか った(図 3B)。HFD 投与後の精巣上体脂肪の H-E 染色を行った結果、WT と比 較して *Plap-1* KO マウスにおいて脂肪細胞の肥大化が軽度であることが示され た(図 3C)。さらに、脂肪細胞の面積を定量化した結果、HFD 投与の *PLAP-1* KO マウスにおいて、脂肪細胞1 個あたりの平均細胞面積が WT と比較して有意に 小さく(図 3D)、小さい面積の細胞が多く存在していることが明らかとなった (図 3E)。









図3 HFD 投与後の *Plap-1* KO マウスにおける体重および脂肪細胞の肥大化の解析 A. HFD 投与時の体重変化 5週齢雄 WT および *Plap-1* KO マウスに 16週間 NCD または HFD を投与し、体重を経日的に測定した。WT/NCD: WT に NCD 投与した群 (n = 11)、 *Plap-1* KO/NCD: *Plap-1* KO に NCD 投与した群 (n = 8)、WT/HFD: WT に HFD 投与し た群 (n = 7)、*Plap-1* KO/HFD: *Plap-1* KO に HFD 投与した群 (n = 9)。*: p < 0.05 vs WT/HFD、**: p < 0.01 vs WT/HFD **B. NCD および HFD 投与時の摂餌量** NCD または HFD 投与期間中の WT および *Plap-1* KO マウス 1 匹あたり 1 日の平均摂餌量を示した。 各群 n = 4。 C-E. HFD 投与時の脂肪細胞の面積 HFD 投与 16週間後の WT および *Plap-1* KO マウスの精巣上体脂肪における H-E 染色像 (C)、脂肪細胞 1 個あたりの平均面積 (D)、 分布 (E) を示した。解析はマウス一匹あたり最低 100 個の細胞について行った。各群 n = 3。解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示した。**: p < 0.01

4. 高脂肪食投与 Plap-1 KO マウスにおける糖代謝能と血清代謝マーカー

次に、WT および *Plap-1* KO マウスにおける糖代謝能を比較検討するため、 GTT および ITT を行った。HFD 投与前の 5 週齢 WT と *Plap-1* KO マウスにお ける耐糖能およびインスリン感受性に差は認められなかった(図 4A)。しかし、 HFD 投与 16 週間後では *Plap-1* KO マウスにおいて HFD により誘導される耐 糖能およびインスリン感受性の悪化抑制が認められた(図 4B)。次に、HFD 投 与後に血清検査を行った結果、*Plap-1* KO マウスにおいて、総コレステロール、 HDL コレステロール、グルコースの値が有意に低く、一方、トリグリセリドの 値については *Plap-1* KO マウスで有意に高いことが示された(図 4C)。



図4 HFD 投与後の *Plap-1* KO マウスにおける糖代謝能および血清代謝マーカーの解析 A.5 週齢における WT と *Plap-1* KO マウスの糖代謝能 5 週齢雄の WT と *Plap-1* KO マウ スに GTT および ITT を行い、血糖値を経時的に測定した。WT (n=9)、*Plap-1* KO (n= 9)。B. NCD または HFD 投与後における WT と *Plap-1* KO マウスの糖代謝能 NCD また は HFD16 週間投与後の WT と *Plap-1* KO マウスに GTT および ITT を行い、血糖値を経 時的に測定した。WT/NCD: WT に NCD 投与した群 (n=8)、*Plap-1* KO/NCD: *Plap-1* KO に NCD 投与した群 (n=8)、WT/HFD: WT に HFD 投与した群 (n=10)、*Plap-1* KO/HFD: *Plap-1* KO に HFD 投与した群 (n = 11)。##: p < 0.01 vs WT/NCD、*: p < 0.05 vs WT/HFD、**: p < 0.01 vs WT/HFD C. HFD 投与時の血清代謝マーカー WT および *Plap-1* KO マウスに 16 週間の HFD 投与後、血清における代謝マーカーを測定した。各群 WT (n=6)、*Plap-1* KO (n=11)。T-CHO: 総コレステロール、NEFA: 遊離脂肪酸、GLU: グルコース。解析結果は、それぞれ平均値士標準誤差で示した。*:p < 0.05、**: p < 0.01

5. 高脂肪食投与 *Plap-1* KO マウス脂肪組織におけるアディポサイトカインお よびマクロファージマーカーの遺伝子発現

次に、HFD 投与 16 週間後の精巣上体脂肪におけるアディポサイトカインの 発現を Real-time PCR により解析した(図 5)。脂肪酸の燃焼と糖の取り込みを 促進しインスリン抵抗性を改善する善玉アディポサイトカインである Adipoq¹⁴ の発現は有意差はないものの Plap-1 KO マウスで高い傾向を示した(p=0.148)。 一方、摂食抑制ホルモンである Lep については差はほとんど認められなかった。 さらに、肥満病態においては脂肪組織にマクロファージが浸潤し慢性炎症状態 となることから、精巣上体脂肪におけるマクロファージマーカー遺伝子である F4/80 の発現について Real-time PCR により解析した結果、有意差はないもの の Plap-1 KO マウスにおいて低い傾向が認められた(p=0.064)。精巣上体脂 肪におけるマクロファージの浸潤をさらに詳細に解析するために、M1 および M2 マクロファージマーカー遺伝子の発現を Real-time PCR により解析した。 その結果、M1 マクロファージマーカーである Tnf-a および Mip-1a¹⁵、そして、 M2 マクロファージマーカーである Clec7a¹⁵の発現が Plap-1 KO マウスにおい て有意に低いことが示された。これらの結果より、Plap-1 KO マウスにおいて は脂肪組織へのマクロファージの浸潤が抑制されていることが示唆された。



図5 HFD 投与後の Plap-1 KO マウスの脂肪組織におけるアディポサイトカインおよび マクロファージマーカーの遺伝子発現解析 HFD16 週間投与後の WT および Plap-1 KO マウスの精巣上体脂肪組織における遺伝子の発現を Real-time PCR にて解析した。Adipoq: adiponectin、Lep: leptin、F4/80: adhesion G protein-coupled receptor E1、Tnf-a: tumor necrosis factor、II6: interleukin 6、Mip-1a: chemokine (C-C motif) ligand 3、Arg1: arginase、Chi3l3: chitinase-like 3、Clec7a: C-type lectin domain family 7, member a。 WT (n = 4)、Plap-1 KO (n = 5)。各遺伝子の発現量は WT マウスにおける発現量を 1 と したときの相対値として示した。解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示した。*: p< 0.05

6. 高脂肪食投与 Plap-1 KO マウスにおける歯槽骨吸収

次に *Plap-1* KO マウスにおける上顎歯槽骨吸収量の解析を行った。その結果、 *Plap-1* KO マウスでは HFD により誘導される歯槽骨吸収は、WT マウスと比較 して軽度であることが示された(図 6A、B)。



図 6 HFD 投与 Plap-1 KO マウスにおける上顎歯槽骨吸収の解析

A.B. HFD 投与による歯槽骨吸収への影響WT および *Plap-1* KO マウスに16週間の HFD 投与後、上顎歯槽骨のマイクロ CT 像を示した(A)。歯槽骨吸収量はセメントエナメル境 から歯槽骨頂までの距離を測定し、第1臼歯遠心根(a)、第2臼歯近心(b) および遠心根(c) における測定値の合計(a + b + c)を歯槽骨吸収量として示した(B)。Before feeding/WT: 投与前の WT 群(n = 10)、Before feeding/*Plap-1* KO: 投与前の *Plap-1* KO 群(n = 10)、16 weeks after feeding/NCD/WT: NCD 投与後の WT 群(n = 10)、16 weeks after feeding/NCD/*Plap-1* KO: NCD 投与後の *Plap-1* KO 群(n = 8)、16 weeks after feeding/HFD/WT: HFD 投与後の WT 群(n = 10)、16 weeks after feeding/HFD/*Plap-1* KO: HFD 投与後の Plap-1 KO 群(n = 10)。解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示した。 *: p < 0.05、**: p < 0.01

7. Plap-1 ノックダウン条件下における脂肪前駆 3T3-L1 細胞の脂肪分化解析

次に、脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化過程における PLAP-1 の機能 を解析するため、siRNAにより *Plap-1*の遺伝子発現をノックダウンした 3T3-L1 細胞を用いた脂肪分化誘導実験を行った。siRNA による *Plap-1*の遺伝子発現抑 制を Real-time PCR により確認した(図 7A)。同細胞株を脂肪分化誘導培地に て 11 日間培養後、Oil Red O 染色を行ったところ、*Plap-1 ノックダウン* 3T3-L1 細胞において、対照群と比較して脂肪滴形成が少ないことが明らかとなり(図 7B)、脂肪滴定量解析の結果、脂肪滴形成量が *Plap-1 ノックダウン* 3T3-L1 細 胞において有意に低いことが示された(図 7C)。さらに、脂肪分化の指標とな る *Adipoq、Fabp4、Pparg* および *Cebpa* の発現が *Plap-1 ノックダウン* 3T3-L1 細胞において有意に抑制されていることが明らかとなった(図 7D)。以上の結 果から、3T3-L1 細胞において *Plap-1* の遺伝子発現をノックダウンすることに より脂肪分化が抑制されることが示された。







図7 Plap-1ノックダウンが 3T3-L1 細胞の脂肪分化に及ぼす影響

A. siRNA による Plap-1 の発現抑制 siRNA 導入 3T3-L1 細胞における Plap-1 の発現を Real-time PCR にて解析した。Control siRNA: コントロール siRNA 導入 3T3-L1 細胞、 *Plap-1* siRNA: *Plap-1* siRNA 導入 3T3-L1 細胞。各群 n = 3。 B.C. Plap-1 ノックダウン 3T3-L1 細胞における脂肪滴形成量の解析 Plap-1 / ックダウン 3T3-L1 細胞の脂肪分化に より形成された脂肪滴の Oil Red O 染色像を示した(B)。Oil Red O により染色された脂 防滴を抽出し、540 nm の吸光度を測定することで定量化した(C)。各群 n = 4。 D. *Plap-1* ノックダウン 3T3-L1 細胞における脂肪分化関連遺伝子の発現解析 Plap-1 ノックダウン 3T3-L1 細胞の脂肪分化過程における脂肪分化関連遺伝子発現を Real-time PCR により解 析した。Adipoq: adiponectin、Fabp4: fatty acid binding protein 4、Pparg: peroxisome proliferator activated receptor gamma, Cebpa: CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha。Control siRNA/Induction (-): コントロール siRNA 導入 3T3-L1 細胞 分化誘導(一)群、Plap-1 siRNA/Induction(一): Plap-1 siRNA 導入 3T3-L1 細胞分化 誘導(-)群、Control siRNA/Induction(+):コントロール siRNA 導入 3T3-L1 細胞分 化誘導(+)群、Plap-1 siRNA/Induction(+): Plap-1 siRNA 導入 3T3-L1 細胞分化誘 導(+)群。各群 n = 3。3回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。 解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示した。*: p<0.05、**: p<0.01

8. リコンビナント PLAP-1 を用いた脂肪前駆細胞の脂肪分化解析

次に、リコンビナント PLAP-1 を用いた 3T3-L1 細胞の脂肪分化誘導実験を 行った。*Plap-1* 遺伝子発現アデノウイルスベクターを感染させた 3T3-L1 細胞 より得た培養上清 (PLAP-1 CM)存在下で、3T3-L1 細胞の脂肪分化誘導を行 った。PLAP-1 CM 中の PLAP-1 タンパク質はウェスタンブロット法により検出 した (図 8A)。Oil Red O 染色および定量解析の結果、PLAP-1 CM 添加により 脂肪滴形成が促進されることが明らかとなった (図 8B、BC)。さらに Real-time PCR の結果、*Adipoq、Fabp4、Pparg、*および *Cebpa*の発現が PLAP-1 CM 存 在下において有意に上昇することが示された (図 8D)。以上の結果より、リコ ンビナント PLAP-1 により 3T3-L1 細胞の脂肪分化が促進されることが明らか となった。



Β.

Control CM

PLAP-1 CM







A. PLAP-1 CM 中の PLAP-1 タンパク質発現解析 PLAP-1 CM 中の PLAP-1 タンパク質 を HRP 標識マウス抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。IB: anti-FLAG: 抗 FLAG 抗体によるブロッテッィング。 B.C. リコンビナント PLAP-1 存 在下における脂肪滴形成量の解析 PLAP-1 CM 存在下での 3T3-L1 細胞における脂肪滴の Oil Red O 染色像を示した(B)。Oil Red O により染色された脂肪滴を抽出し、540 nm の 吸光度を測定することで定量化した(C)。Control CM: コントロール CM 存在下にて脂肪 分化させた 3T3·L1 細胞、PLAP·1 CM: PLAP·1 CM 存在下にて脂肪分化させた 3T3·L1 細 胞。各群 n = 4。 D. PLAP-1 CM 存在下にて脂肪分化させた 3T3-L1 細胞の脂肪分化関連 遺伝子発現解析 PLAP-1 CM 存在下にて脂肪分化させた 3T3-L1 細胞における脂肪分化関 連遺伝子の経時的な発現を Real-time PCR により解析した。Control CM/Induction(-): コントロール CM 存在下脂肪分化誘導(-)群、PLAP-1 CM/Induction(-): PLAP-1 CM 存在下脂肪分化誘導(-)群、Control CM/Induction(+):コントロール CM 存在下脂 肪分化誘導(+)群、PLAP-1 CM/Induction(+):PLAP-1 CM存在下脂肪分化誘導(+) 群。各群 n = 3。3回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。解析結果 は、それぞれ平均値±標準誤差で示した。*: p<0.05、**: p<0.01

9. Plap-1 KO マウス由来脂肪前駆細胞の脂肪分化解析

Plap-1 KO マウスの脂肪細胞分化能を検討するために、WT および Plap-1 KO マウスの皮下脂肪を採取し、脂肪前駆細胞を含む SVF を分離し、同細胞群を用 いて脂肪分化誘導実験を行った。SVF 単離時、遠心分離により上層には MAF を認めるため、WT マウスの SVF および MAF における Plap-1の遺伝子発現を 比較検討したところ、興味深いことに、SVF において有意に高い Plap-1発現が 認められた(図 9A)。同 SVF を脂肪分化誘導した結果、Plap-1 KO マウス由来 SVF において、WT マウス由来 SVF と比較して、脂肪滴の形成が有意に低いこ とが明らかとなった(図 9B、C)。さらに、脂肪分化関連遺伝子の発現を解析し た結果、Plap-1 KO マウス由来 SVF においては、Adipoq、Fabp4、Pparg、お よび Cebpa の遺伝子発現が有意に低下していることが明らかとなった(図 9D)。 以上の結果より、Plap-1 KO マウス由来の SVF は成熟脂肪細胞への分化能が低 下していることが明らかとなった。





図9 Plap-1 KO マウス由来 SVF の脂肪分化解析

A. WTマウス皮下脂肪由来 SVF および MAF における *Plap-1*の遺伝子発現 10-12 週齢の 雌 WT マウスの皮下脂肪より分離した SVF および MAF における *Plap-1* の遺伝子発現を Real-time PCR により解析した。各群 n = 3。 B.C. WT および *Plap-1* KO マウス皮下脂 肪由来 SVF の脂肪分化における脂肪滴形成量の解析 10-12 週齢雌の WT および *Plap-1* KO マウス皮下脂肪由来 SVF を脂肪分化した時に形成された脂肪滴の Oil Red O 染色像を 示した(B)。Oil Red O により染色された脂肪滴を抽出し、540 nm の吸光度を測定するこ とで脂肪滴形成量を定量化した(C)。WT: WT マウス由来 SVF 脂肪分化誘導群、*Plap-1* KO *Plap-1* KO マウス由来 SVF 脂肪分化誘導群。各群 n = 4。 D. WT および *Plap-1* KO マウ ス皮下脂肪由来 SVF における脂肪分化関連遺伝子の発現解析 WT および *Plap-1* KO マウ ス皮下脂肪由来 SVF における脂肪分化関連遺伝子発現を Real-time PCR により解析した。 WT/Induction(-): WT マウス由来 SVF 脂肪分化誘導(-) 群、*Plap-1* KO/Induction (-): *Plap-1* KO マウス由来 SVF 脂肪分化誘導(-) 群、WT/Induction(+): WT マ

(-): *Plap-1* KO マウス田来 SVF 脂肪分化誘導(-) 犇、W17Induction(+): W1マ ウス由来 SVF 脂肪分化誘導(+) 群、*Plap-1* KO/Induction(+): *Plap-1* KO マウス由来 SVF 脂肪分化誘導(+) 群。各群 n = 3。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的 なものを示す。解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示した。*: *p* < 0.05、**: *p* < 0.01

10. マウス脂肪組織における ECM の発現解析

脂肪細胞を取り囲む ECM はメカニカルサポートの機能を有し、脂肪組織の恒常性維持に重要な役割を果たしている^{11,16}。一方、肥満の進行により脂肪組織が拡大する際には、ECM 遺伝子発現が上昇して、特に I、Ⅲ、およびVI型コラーゲン等が過剰に蓄積することで脂肪組織の線維化が惹起され、機能障害が引き起こされる¹¹。PLAP-1 も ECM のひとつであることから、脂肪組織における恒常性維持と線維化に関与している可能性が考えられる。そこで、10 週齢雄 *Plap-1* KOマウスおよび WT マウスの皮下脂肪組織、さらに皮下脂肪より分離した SVF および MAF における ECM 遺伝子発現を Real-time PCR にて比較検討した。その結果、皮下脂肪組織全体では ECM 遺伝子発現に差を認めなかったが(図 10A)、SVF では *Col1a1、Col6a1、Dcn、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、*Col1a1、Dcn*の発現が有意に高く、*Col6a1、Bgn*の発現が有意に低いことが示された(図 10B)。以上の結果から、WT および *Plap-1* KO マウス脂肪組織における ECM の発現パターンが細胞レベルで異なっていることが明らかとなった。



図 10 脂肪組織における ECM 発現解析

A. WT および *Plap-1* KO マウス由来皮下脂肪組織における ECM 遺伝子発現 10 週齢雌の WT および *Plap-1* KO の皮下脂肪における ECM の遺伝子発現を Real-time PCR により解 析した。 B. WT および *Plap-1* KO マウスの皮下脂肪より分離した SVF および MAF にお ける ECM 遺伝子発現 10 週齢雌の WT および *Plap-1* KO の皮下脂肪より分離した SVF および MAF における ECM の遺伝子発現を Real-time PCR により解析した。各 ECM の 発現量は WT マウスにおける発現量を 1 としたときの相対値として示した。 *Col1a1: collagen, type I, alpha 1、Col3a1: collagen, type III, alpha 1、Col6a1: collagen, type VI, alpha 1、Dcn: decorin、Bgn: biglycan。解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で 示した。*: p<0.05、**: p<0.01*

本研究は、脂肪分化および肥満病態における PLAP-1の機能を解析するため、 Plap-1 KO マウスにおける HFD 誘導性の肥満病態を解析し、さらに、脂肪前駆 細胞を用いて PLAP-1 が脂肪分化に及ぼす影響を解析したものである。本研究 の結果、PLAP-1 が歯根膜のみならず脂肪組織においても発現し、肥満病態を促 進的に制御すること、肥満進行において重要な役割を担う ECM の発現に関与し ていること、また高脂肪食投与による歯槽骨吸収に関与していることを明らか とした。さらに、PLAP-1 は脂肪前駆細胞において脂肪分化を促進的に制御して いることを明らかにした。

インスリンの分泌障害やインスリン感受性の障害が特徴の 2 型糖尿病の主要 原因の一つとして肥満があげられる。これまでの研究からマウスに高脂肪食を 投与することで、体重が増加し、インスリン感受性の悪化、また血清のグルコ ースや総コレステロール、の値の変化が認められて肥満病態が誘導されること が報告されている 17-19。本研究においても、高脂肪食投与により肥満病態が誘 導され、肥満モデルマウスが構築された。脂肪細胞は ECM により取り囲まれ、 柔軟性を与えられることで正常な拡大が可能となる。NCD にて飼育した WT マ ウスの脂肪組織では、Plap-1は4週齢において発現のピークを示し、加齢とと もに、徐々に低下することから、PLAP-1は脂肪組織の正常な増大や組織恒常性 維持に関与している可能性が考えられる。一方、高脂肪食誘導性の肥満におい ては脂肪組織の急速な拡大が起こる結果、脂肪組織が低酸素状態となり、低酸 素誘導転写因子 HIF-1αが誘導され、ECM が過剰発現し、脂肪組織の線維化が 引き起こされる¹¹。高脂肪食投与8週間後において、WTマウス脂肪組織におけ る Plap-1 遺伝子発現の有意な上昇が認められた。HIF-1αにより PLAP-1 の発 現が亢進することから(現在、山本らにより論文作成中)、高脂肪食投与による 肥満進行の過程で HIF-1α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 た可能性が考えられる。一方、Plap-1 KO マウスの脂肪細胞は WT マウスと比 較して肥大化が抑制された。PLAP-1 分子が失われることにより脂肪組織を取 り囲む ECM に何らかの影響を及ぼし、脂肪組織の線維化が抑制された可能性が 考えられる。

高脂肪食により誘導される線維化した ECM に囲まれた脂肪細胞は機能を失って壊死し、そこに M1 マクロファージが浸潤することで炎症が惹起される²⁰。 浸潤したマクロファージから TNF-αなどの炎症性サイトカインが過剰に産生され、全身におよぶことでインスリン抵抗性が誘導されると考えられている²¹。 *Plap-1* KO マウスの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が 低かったことから、*Plap-1* KO マウスでは脂肪組織へのマクロファージの浸潤 が抑制され、炎症性サイトカインの産生が低下した結果、インスリン抵抗性の 悪化が抑制された可能性が考えられる。さらに、PLAP-1 がスキルス性胃ガン周 囲のガン線維芽細胞に高発現し、ガン細胞上の CD44 分子に結合して、ガン細 胞の運動性を亢進することが報告されていることから²²、脂肪組織において、 PLAP-1 が CD44 分子を介してマクロファージの浸潤を促進している可能性も 考えられる。

肥満病態をはじめとしたメタボリックシンドロームは歯周病と関連があるこ とがこれまでに報告されている^{23,24}。実際にマウスの実験系でも、絹糸結紮歯 周炎モデルマウスにおいて、口腔内常在菌の菌叢バランスが崩壊してパターン 認識受容体である Nod1 を介した破骨細胞の活性化が誘導され、骨吸収が起こ ることが示されている²⁵。また、マウスにおいて、高脂肪食投与により一部の 歯周病原細菌の割合が増加することが報告されている²⁶。本研究においては、 絹糸結紮や LPS 投与などの介入を行うことなく、歯槽骨の吸収が誘導されたこ とから、高脂肪食投与により口腔内常在菌の菌叢バランスが崩壊して Nod1 を 介した歯槽骨吸収が誘導された可能性が考えられる。

また、肥満により脂肪組織における TNF-αの産生が亢進して循環量が上昇す ることで、C 反応性タンパク(CRP)の産生が亢進し、全身の炎症を誘導する ことが報告されている ²⁷。*Plap-1* KO マウスにおいては、脂肪組織における炎 症が抑制されたことにより、TNF-αをはじめとした炎症性サイトカインの歯周 組織への作用が低下した結果、歯槽骨吸収が抑制された可能性が考えられる。 今後、*Plap-1* KO マウス血中の炎症性サイトカインについて詳細な解析が求め られる。また、近年肥満と腸内細菌叢との関連が注目され、高脂肪食摂取の結 果、腸内細菌叢の変化が認められることが示されている ²⁸。さらに、マウスに *Porphyromonas gingivalis*を経口投与すると、腸内細菌叢が変化し、全身的な 炎症を引き起こすことが示されている ²⁹。これらの報告より、肥満病態と歯周 病とを結びつけるメカニズムのひとつに腸内細菌叢の変化が考えられ、本研究 において、WT と *Plap-1* KO マウスでは、高脂肪食による腸内細菌叢の変化が 異なった結果、脂肪組織の炎症および歯槽骨吸収に差が生じた可能性も考えら れる。

血管内皮細胞の lipoprotein lipase(LPL)が活性化することにより血液中の 中性脂肪(トリグリセリド)が脂肪滴として脂肪細胞へ取り込まれる^{30,31}。興 味深いことに、本研究において高脂肪食を投与した *Plap-1* KO マウスの血清ト リグリセリドは WT マウスと比較して有意に高かった。これは *Plap-1* KO マウ スの脂肪組織における LPL 活性が低下し、その結果、血清トリグリセリドが高 くなっている可能性が考えられる。トリグリセリドの脂肪細胞への取り込みは LPL が low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP) と結合する ことで促進されること³²、また、PLAP-1 と構造上で類似性を持つ Decorin の leucine-rich repeat 部位が LRP と結合することで TGF-βシグナルを制御してい ることから³³、PLAP-1 も LRP を介して LPL 活性に影響を与える可能性が考え られる。

3T3-L1 細胞を用いて脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化過程における PLAP-1 の機能を検討した結果、PLAP-1 は脂肪分化を促進することが明らかと なった。脂肪細胞において TGF-βの発現抑制により脂肪分化が促進されること から、TGF-βが脂肪分化を抑制していると考えられる³⁴。一方、PLAP-1 は TGF-β 作用を抑制することから⁷、PLAP-1 が TGF-β抑制を介して脂肪分化を促進して いる可能性が考えられる。

マウス皮下脂肪において、PLAP-1 は、成熟脂肪細胞を多く含む MAF ではな く、SVF で発現していることが示された。SVF には脂肪前駆細胞、血管内皮細 胞、線維芽細胞などが含まれる³⁵。PLAP-1 は脂肪前駆細胞だけではなく、脂肪 組織の間葉系細胞にも発現することが示唆され、他の ECM との相互関係により 脂肪組織の恒常性維持に関与していることが考えられる。脂肪組織の線維化に は ECM のなかでも I、III、VI型コラーゲンなどが関与していることが報告され ており¹¹、特に脂肪組織に特徴的なVI型コラーゲンを欠損したマウスでは、脂 肪組織の線維化が抑制され、脂肪組織における炎症性マーカーの発現低下およ び糖代謝が改善される¹⁶。したがって、本研究においても Plap-1 KO マウス SVF における Col6a1の発現が低下していることから、脂肪組織における炎症抑制や 糖代謝改善を認めた可能性が考えられる。また、Plap-1 KO マウスの SVF にお いて、Dcn、Bgn の発現が有意に低いことから、PLAP-1 が同じ SLRP family である Decorin や Biglycan の脂肪組織における発現に影響を及ぼし、脂肪組織 の線維化を促進している可能性が考えられる。今後、Plap-1 KO マウスの脂肪 組織における線維化について組織学的な解析が必要である。

PLAP-1 は N 末端領域のアスパラギン酸の連続配列数がヒト個人により異な る 7。当研究室ではこれまでに、N 末端領域のアスパラギン酸の連続配列数が 14 個である PLAP-1(D14型 PLAP-1)は13 個である PLAP-1(D13型 PLAP-1) と比較して BMP-2 との結合能が高く、BMP-2 により誘導される歯根膜細胞の 硬組織形成分化をより強く抑制することを明らかとしている³⁶。ヒト脂肪組織 においても、PLAP-1の遺伝子多型が肥満病態および脂肪分化に影響し、さらに は歯周組織に影響を与える可能性が考えられる。今後、ヒトにおける PLAP-1 遺伝子多型と肥満病態、および歯周病との関連性を疫学的に調査することによ り、両病態の発症や進行に関する新たな分子メカニズムの解明や治療法の開発 が期待される。

最後に、本研究の結果から、脂肪組織における PLAP-1 の役割を以下のよう に考察する。PLAP-1 は脂肪組織における ECM の1つとして、TGF-βの作用を 抑制することで脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化を促進している(図 11 ①)。さらに、高脂肪食等による肥満においては、低酸素誘導転写因子 HIF-1α により PLAP-1 の発現が亢進され(図 11②)、VI型コラーゲン、Decorin、Biglycan 等の ECM に作用を及ぼし脂肪組織の線維化が促進される。また LPL 活性(図 11③) や CD44 分子を介した脂肪組織へのマクロファージの浸潤(図 11④) が PLAP-1 により促進される。脂肪組織において産生された炎症性サイトカインが 血流を介して歯周組織に影響を及ぼすことで、歯槽骨吸収が誘導される(図 11 ⑤)。



図 11 脂肪分化および肥満病態における PLAP-1 の機能および歯周組織との関連

①PLAP-1 は TGF-βを抑制することで脂肪分化を促進する。②HIF-1αにより PLAP-1 の発 現が上昇し他の ECM 発現に影響を及ぼし、脂肪組織の線維化が起こる。③PLAP-1 は LPL 活性を制御することにより脂肪分化を促進する。④PLAP-1 は CD44 を介してマクロファー ジの浸潤を促進する。⑤脂肪細胞で産生された炎症性サイトカインが血流を介して歯周組 織に影響を及ぼす。

結論

本研究結果より以下の結論を得た。

- 1. *Plap-1* KO 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 示した。
- 2. 3T3-L1 細胞において PLAP-1 は脂肪分化を促進した。
- 3. *Plap-1* KO マウスの皮下脂肪由来 SVF は WT マウス由来 SVF と比較して脂肪分化能が低かった。
- SVF では *Col1a1、Col6a1、Dcn、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 *Col1a1、Dcn*の 発現が有意に高く、*Col6a1、Bgn*の発現が有意に低かった。

以上のことから、PLAP-1は脂肪分化および肥満病態を促進的に制御していることが示された。

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なるご指導と御校閲を賜りました大阪大学 大 学院歯学研究科 ロ腔分子免疫制御学講座 村上伸也教授に深甚なる謝意を表 します。また、本研究の進行にあたり直接御指導ならびに御助言を頂きました 山田聡講師に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行に対して様々なご協力を頂きました大阪大学大学院歯 学研究科ロ腔分子免疫制御学講座(ロ腔治療学教室)の教室員の皆様に厚く御 礼申し上げます。

文献

- Yamada S, Murakami S, Matoba R, Ozawa Y, Yokokoji T, Nakahira Y, Ikezawa K, Takayama S, Matsubara K, Okada H. Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a novel SLRP family gene. *Gene* 2001;275(2):279-286.
- Yamada S, Tomoeda M, Ozawa Y, Yoneda S, Terashima Y, Ikezawa S, Saito M, Toyosawa S. PLAP-1/aspirin , a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J Biol Chem* 2007;282(32): 23070-23080.
- Henry SP, Takanosu M, Boyd TC, Mayne PM, Eberspaecher H, Zhou W, de Crombrugghe B, Hook M, Mayne R. Expression pattern and gene characterization of asporin. a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. J Biol Chem 2001;276(15):12212-12221.
- 4. Tomoeda M, Yamada S, Shirai H, Ozawa Y, Yanagita, Murakami S. PLAP-1/aspirin inhibits activation of BMP receptor via its leucine-rich repeat motif. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;371(2):191-196.
- Yamada S, Kitamura M, Murakami S. PLAP-1: A novel molecule regulating homeostasis of periodontal tissues. *Japanese Dental Science Review* 2008;44(2):137-144.
- Awata T, Yamada S, Tsushima K, Sakashita H, Yamaba S, Kajikawa T, Yamashita M, Takedachi M, Yanagita M, Kitamura M, Murakami S. PLAP-1/Asporin Positively Regulates FGF-2 Activity. J Dent Res 2015;94(10):1417-1424.
- Kizawa H, Kou I, Iida A, Sudo A, Miyamoto Y, Fukuda A, Mabuchi A, Kotani A, Kawakami A, Yamamoto S, Uchida A, Nakamura K, Notoya K, Nakamura Y, Ikegawa S. An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet* 2005;37 (2):138-144.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest 2003;112(12):1796-1808.
- 9. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a

crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest 2003;112(12):1821-1830.

- 10. Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, Wang ZV, Landskroner-Eiger S, Dineen S, Magalang UJ, Brekken RA, Scherer PE. Hypoxia-inducible factor 1 alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol* 2009;29(16):4467-4483.
- 11. Sun K, Tordjman J, Clément K, Scherer PE. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab* 2013;18(4):470-477.
- Ward MG, Ajuwon KM. Biglycan deletion alters adiponectin expression in murine adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *PLoS One* 2012;7(11):e50554.
- 13. Wang CY, Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol* 2012;821:421-433.
- 14. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002;8(7):731-737.
- 15. Ji Y, Sun S, Xia S, Yang L, Li X, Qi L. Short term high fat diet challenge promotes alternative macrophage polarization in adipose tissue via natural killer T cells and interleukin-4. J Biol Chem 2012;287(29):24378-24386.
- 16. Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, Zhang BB, Bonaldo P, Chua S, Scherer PE. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol* 2009;29(6):1575-1591.
- 17. Cha YS, Rhee SJ, Heo YR. Acanthopanax senticosus extract prepared from cultured cells decreases adiposity and obesity indices in C57BL/6J mice fed a high fat diet. *J Med Food* 2004;7(4):422-429.
- 18. Jiang T, Wang Z, Proctor G, Moskowitz S, Liebman SE, Rogers T, Lucia MS, Li J, Levi M. Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. J Biol Chem 2005;280(37):32317-32325.
- Fukuchi Y, Hiramitsu M, Okada M, Hayashi S, Nabeno Y, Osawa T, Naito M. Lemon Polyphenols Suppress Diet-induced Obesity by

Up-Regulation of mRNA Levels of the Enzymes Involved in beta-Oxidation in Mouse White Adipose Tissue. *J Clin Biochem Nutr* 2008;43(3):201-209.

- 20. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. J Lipid Res 2005;46(11):2347-2355.
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 1997;389(6651):610-614.
- 22. Satoyoshi R, Kuriyama S, Aiba N, Yashiro M, Tanaka M. Asporin activates coordinated invasion of scirrhous gastric cancer and cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* 2015; 34(5): 650-660.
- Chaffee BW, Weston SJ. Association between chronic periodontal disease and obesity: a systematic review and meta-analysis. J Periodontol 2010;81(12):1708-1724.
- Keller A, Rohde JF, Raymond K, Heitmann BL. Association between periodontal disease and overweight and obesity: a systematic review. J Periodontol 2015;86(6):766-776.
- 25. Jiao Y, Darzi Y, Tawaratsumida K, Marchesan JT, Hasegawa M, Moon H, Chen GY, Núñez G, Giannobile WV, Raes J, Inohara N. Induction of bone loss by pathobiont-mediated Nod1 signaling in the oral cavity. *Cell Host Microbe* 2013;13(5):595-601.
- 26. Blasco-Baque V, Serino M, Vergnes JN, Riant E, Loubieres P, Arnal JF, Gourdy P, Sixou M, Burcelin R, Kemoun P. High-fat diet induces periodontitis in mice through lipopolysaccharides (LPS) receptor signaling: protective action of estrogens. *PLoS One* 2012;7(11):e48220.
- 27. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005;96(9):939-949.
- 28. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, Knight R, Ahima RS, Bushman F, Wu GD. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology* 2009;137(5):1716-1724. e1-2.
- 29. Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Yamazaki K. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes

associated with alteration of gut microbiota. Sci Rep 2014;4:4828.

- 30. Takahashi S, Suzuki J, Kohno M, Oida K, Tamai T, Miyabo S, Yamamoto T, Nakai T. Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 1995;270(26):15747-15754.
- 31. Tao H, Aakula S, Abumrad NN, Hajri T. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates the expression and function of very-low-density lipoprotein receptor. Am J Physiol Endocrinol Metab 2010;298(1):E68-79.
- 32. Chappell DA, Fry GL, Waknitz MA, Muhonen LE, Pladet MW, Iverius PH, Strickland DK. Lipoprotein lipase induces catabolism of normal triglyceride-rich lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in vitro. A process facilitated by cell-surface proteoglycans. J Biol Chem 1993;268(19):14168-14175.
- 33. Cabello-Verrugio C, Santander C, Cofré C, Acuña MJ, Melo F, Brandan E. The internal region leucine-rich repeat 6 of decorin interacts with low density lipoprotein receptor-related protein-1, modulates transforming growth factor (TGF)-8-dependent signaling, and inhibits TGF-8-dependent fibrotic response in skeletal muscles. J Biol Chem 2012;287(9):6773-6787.
- 34. Hirata K, Katayama K, Nakajima A, Takada K, Kamisaki Y, Wada K. Role of leukotriene B4 receptor signaling in human preadipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;429(3-4): 197-203.
- 35. Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells *in vivo*. *Cell* 2008;135(2):240-249.
- 36. Kajikawa T, Yamada S, Tauchi T, Awata T, Yamaba S, Fujihara C, Murakami S. Inhibitory effects of PLAP-1/asporin on periodontal ligament cells. J Dent Res 2014;93(4):400-405.