

脂質代謝関連遺伝子 perilipinの発現機構の解析

永井 聡 [北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座/医員]

背景・目的

過剰なエネルギーを貯蔵する脂肪細胞内の脂肪滴周囲に存在する蛋白としてperilipin（ペリリピン）がある。このペリリピンは、脂肪滴サイズの増大にも、一方で脂肪分解にも重要な蛋白である。

我々はPPAR γ がペリリピン遺伝子の調節に直接関与していることを明らかにしており、本研究では、肥満治療の標的としてのペリリピンの発現量に影響を与える薬剤を同定し、肥満の治療の新たな方向性を見いだすことを目的として、PPAR δ 作動薬と高脂血症治療薬プラバスタチンのペリリピンの発現調節への影響について検討した。

内容・方法

PPAR γ 、PPAR δ およびRXR α 発現ベクターをそれぞれ作成し、cos-7細胞に遺伝子導入して発現を確認した。次に、マウスペリリピン遺伝子の5'側非翻訳領域2.4kbをルシフェラーゼ発現ベクターにライゲーションし、PPAR γ 、PPAR δ およびRXR α 発現ベクターとともにNIH-3T3細胞に遺伝子導入した。また、分化刺激後の3T3-L1脂肪細胞にPPAR δ 作動薬GW501516を添加した上で遺伝子導入し、これらのレポーターアッセイを施行した。さらに、GW501516を3T3-L1脂肪細胞に添加し、RT-PCRおよびリアルタイムPCRにてPPAR δ がペリリピン遺伝子を直接調節するかどうかについて検討した。最後に、3T3-L1脂肪細胞にプラバスタチンを投与し、リアルタイムPCRおよびウェスタンブロットにてペリリピンに対する作用について検討した。

結果・成果

PPAR γ 、PPAR δ のそれぞれの発現ベクター作成し、peroxisome proliferator-activated receptor responsive element (PPRE)を含むルシフェラーゼ発現ベクターとともにNIH-3T3細胞に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を検討したところ、いずれの発現ベクターでもルシフェラーゼ活性の上昇を認め、発現ベクターの活性および、ペリリピン遺伝子のプロモーター領域のPPREのPPAR δ 反応性が確認された。

種々の長さのペリリピンプロモーター領域を連結させたルシフェラーゼ発現ベクターを作成し、PPAR δ 発現ベクターとともにNIH-3T3細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を検討したところ、GW501516を添加した場合にPPREを含むルシフェラーゼ発現ベクターでのみ著明に活性は上昇し、PPREを含まない他のルシフェラーゼ発現ベクターでは明らかな活性の上昇を認めな

かった。PPAR δ は、我々の同定したPPREを介してペリリピン遺伝子の発現を亢進させることが明らかとなった。

分化刺激後の3T3-L1脂肪細胞において、PPAR δ がペリリピン遺伝子発現に直接関わるかどうかについて検討した。分化刺激後GW501516を添加して培養し、0、1、2、4、6、8日目にtotal RNAを採取し、RT-PCRを施行したところ、ペリリピンの発現量が4日目までは増加していた。次に、PPAR γ 作動薬ピオグリタゾンとGW501516をそれぞれまたは同時に添加し、4日目に採取したサンプルを用いてリアルタイムRT-PCRを施行したところ、ピオグリタゾンまたはGW501516添加ではいずれもペリリピンのmRNA発現量は増加しており、同時添加によりさらに発現量が増加していることからこれらリガンドの転写促進作用は相加的であることが明らかとなった。PPAR δ は3T3-L1脂肪細胞において恒常的に発現しており、脂肪細胞におけるペリリピンの発現調節には、PPAR γ だけではなく、PPAR δ も作用していると考えられた。ペリリピンの発現増加は脂肪分解を促進させ、肥満を是正する可能性があり、PPAR δ は従来の報告により、脂肪燃焼を促進させることが明らかとなっていることから、抗肥満薬としてPPAR δ 作動薬が期待される。

3T3-L1脂肪細胞の分化刺激後3日目に、種々の濃度で高脂血症治療薬プラバスタチンを投与しリアルタイムRT-PCRにてペリリピン遺伝子の発現量を検討した。その結果、プラバスタチン濃度依存性にペリリピンの遺伝子発現は増加した。一方、ウェスタンブロットでは、プラバスタチン濃度依存性にペリリピンのタンパクは減少した。これは、プラバスタチンによりペリリピン蛋白の分解が促進され、その代償として発現が亢進していた可能性が考えられた。

今後の展望

ペリリピンは脂肪滴の増大と分解の両者に必須な蛋白であり、本研究でその発現調節には、PPAR γ に加えPPAR δ も関与していることが明らかとなった。ペリリピンを標的とした肥満治療は現在糖尿病治療薬として使用されているPPAR γ 作動薬とともに、脂肪燃焼を促進するPPAR δ 作動薬が有効と考えられ、in vivoでペリリピンの発現に関する検討が必要となる。また、プラバスタチンは、ペリリピンの代謝に影響を与える可能性が示唆された。今後、その機序を解明すること、他のスタチン製剤での検討が必要である。