

平成 22 年 3 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790629

研究課題名（和文） 中枢神経系における脂肪酸β酸化の特異性の解析

研究課題名（英文） Analysis of specificity of fatty acids beta-oxidation in the central nerve system

研究代表者

大河原 剛 (OHKAWARA TAKESHI)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：20469034

研究成果の概要（和文）：神経細胞への分化誘導が可能な P19 テラトカルシノーマ細胞株を用いて、脂肪酸β酸化系酵素の発現解析を行った。その結果、神経前駆細胞と神経細胞において、Acads を除く全てのミトコンドリアの脂肪酸β酸化系酵素とペルオキシソームの脂肪酸β酸化系酵素が発現していることを明らかにした。さらに、それらの酵素の発現量は、神経細胞への分化に伴って増加することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The embryonic carcinoma P19 cells are a well established cell line commonly used as an in vitro neuronal differentiation model. I analyzed expression pattern of fatty acids beta-oxidation enzymes using this cell line through the process of neuronal differentiation. Immunocytochemical and real time PCR experiments showed that almost all fatty acids beta-oxidation enzymes are expressed in the neural precursor cells and neurons. In addition, expression levels of these enzymes were increased through the process of neuronal differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 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・神経内科学

キーワード：神経分子病態学・エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳における従来の栄養素の代謝研究

脳の栄養素の代謝研究においては、臓器全体を対象に行われてきた。脳ではブドウ

糖のみを栄養素にすることが常識として教科書に記載されてきた。私たちは脳において脂肪酸β-酸化の存在を示す努力を行ってきた。脂肪酸β-酸化能の測定を行うには、放射

性同位元素でラベルした脂肪酸を基質とし over all 測定を行う必要がある。脳ではアシル CoA 水解酵素活性が高いために基質が分解され、脂肪酸 β -酸化能については判断できない。そのため脂肪酸 β -酸化系酵素に対する抗体の使用が唯一の解決手段となるが、脳切片を材料とした蛍光染色では、局在を十分に示すことが不可能である。以上の理由から脳で β -酸化が行われているかどうかについて判断がつけられなかった。この様な理由で、これまで国内外において脂肪酸 β -酸化を正面から取り上げ明確な結果を得た報告は存在しない。

(2) 神経細胞の脂肪酸 β -酸化能の有無を調べようとする方法

脳の細胞分画を行い、ミトコンドリアを取り出して活性と免疫反応をみることを試みた。しかしながら、大脳皮質には神経細胞と3種類のグリア細胞が存在しており、脳のホモジネートから神経細胞のミトコンドリアのみを単離するのは不可能であった。新たな手法として、神経組織から初代培養を行うことにより、顕微鏡下で個々の細胞を見分けることが可能となったため、ラット海馬の初代培養を材料として、蛍光抗体法を行ったところ、ミトコンドリアとペルオキシソームの β -酸化の酵素の局在を示すことができた。特にアストロサイトにおいては明瞭に局在を示すことができた。

(3) アストロサイトに脂肪酸 β -酸化系酵素が存在する

我々はこれまでに初代培養系のアストロサイトにおいて、ミトコンドリアとペルオキシソームの脂肪酸 β -酸化系酵素が発現していることを明らかにしている。その結果を再確認し、さらに展開する研究を着想した。

2. 研究の目的

脳における脂肪酸 β -酸化の存在を示し、その位置づけを明らかにする。脳はブドウ糖のみで栄養されていると長い間信じられており、脂肪酸 β -酸化についてはその存在が顧みられなかった。初代培養アストロサイトを脂肪酸 β -酸化系酵素に対する抗体で染色したところ、意外なことに、ミトコンドリアとペルオキシソームの脂肪酸 β -酸化系の全酵素の存在を示すことができた。本研究においては、この予備的なデータを出発点とし、脳における栄養素としての脂肪酸代謝を酵素を視点として解明する。具体的には以下の4点に関して、明らかにする。

(1) 神経細胞とグリア細胞における脂肪酸 β -酸化の存在を確定し、特徴を解明する。

(2) 脳における脂肪酸輸送系の存在を明ら

かにする。

(3) 関連する栄養代謝系であるケトン体代謝の脳における有無を調べる。

(4) 脳における細胞分化と脂肪酸 β -酸化出現の関係を調べる。

3. 研究の方法

(1) P19 細胞の神経細胞への分化誘導

未分化状態の P19 細胞をトリプシン処理によって回収し、レチノイン酸存在下で4日間バクテリア用のプレートを用いて浮遊培養した後に、レチノイン酸を除いて poly-D lysine でコートした細胞培養用のプレートまたはカバーガラスに撒き直して培養することで神経細胞への分化誘導を行った。この方法で、90%以上の P19 細胞が、神経細胞へと分化した。

(2) P19 細胞の免疫組織化学

神経分化誘導後、2日目、5日目の P19 細胞を PBS で洗浄後、4%パラフォルムアルデヒドで固定した。固定した細胞を PBS で3回洗浄した後、blocking 液 (10% 胎仔牛血清、0.1% Tween-20 in PBS) で室温1時間ブロッキングした後、blocking 液で希釈した1次抗体と4℃で一晩反応させた。各1次抗体の希釈濃度は以下の通りである。Anti-Tuj-1 antibody (COVANCE, MMS-435P) ; 1 μ g/ml, Anti-Nestin antibody (CHEMICON, MAB353) ; 2.75 μ g/ml, Anti-Catalase antibody ; 1.25 μ g/ml, Anti-Acox1 antibody ; 5 μ g/ml, Anti-Citrate synthase antibody ; 5 μ g/ml, Anti-Hsd17b10 antibody ; 5 μ g/ml。0.1% Tween-20 in PBS で4回洗浄した後、blocking 液で2000倍に希釈した2次抗体 (anti-mouse IgG Alexa546, anti-rabbit IgG Alexa488) と室温1時間反応させた。その後、0.1% Tween-20 in PBS で4回洗浄し、Prolong Gold antifade reagent を用いて封入を行った。核の染色は DAPI を用いて行い、OLYMPUS BX51 (OLYMPUS) 蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。表1に示した P19 細胞を神経細胞に分化誘導した際の神経前駆細胞と神経細胞の割合に関しては、神経分化誘導後2日目、5日目の P19 細胞を、Tuj-1 antibody (Ab) と Anti-Nestin antibody と DAPI により三重染色を行い、撮影した写真を詳細に解析することにより、Tuj1 Ab 陽性細胞と Nestin Ab 陽性細胞の割合を算出した。神経分化誘導後2日目では255個の5日目では224個の細胞を解析し、Tuj1 Ab 陽性細胞と Nestin Ab 陽性細胞の割合を算出した。

(3) リアルタイム PCR

未分化状態、レチノイン酸存在下で4日間

浮遊培養した状態、レチノイン酸を除いて poly-D lysine でコートした細胞培養用のプレートに撒き直して2日目 (Day 2)、5日目 (Day 5) の P19 細胞から、ISOGEN (日本ジーン) を用いて total RNA の回収を行った。QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて cDNA の合成を行い、Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI) を用いてリアルタイム PCR を行った。各遺伝子の発現量は、ABI PRISM 7900HT (ABI) を用いて検出した。GAPDH の発現量を内部コントロールとして用いた。

4. 研究成果

(1) 神経細胞の分化過程における脂肪酸β-酸化系酵素の発現を調べる目的で、神経細胞に分化誘導可能な embryonic carcinoma 細胞 (P19) を用いた研究を計画した。P19 細胞を神経細胞に分化誘導した際の神経前駆細胞と神経細胞の割合を調べるため、レチノイン酸処理により P19 細胞を神経細胞に分化誘導し、2日目、5日目の細胞を、神経前駆細胞のマーカーである Nestin に対する抗体と神経細胞のマーカーである Neuronal Class III β-tubulin に対する抗体 (Tuj1 Ab) で免疫染色を行い、Nestin 発現細胞と Tuj1 Ab 陽性細胞の割合を調べた (表1)。その結果、神経分化誘導後2日目では、75.3%の細胞が神経前駆細胞のマーカーである Nestin を発現していたのに対し、神経分化誘導後5日目では、91.0%の細胞が神経細胞のマーカーである Tuj1 Ab 陽性であった。以上の結果から、神経分化誘導後2日目では神経前駆細胞が多数を占めるのに対し、5日目では分化した神経細胞が大部分を占めていることが明らかとなった。

| | Nestin + Tuj1 - | Nestin + Tuj1 + | Nestin - Tuj1 + |
|-------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Day 2 | 39.2% | 36.1% | 24.7% |
| Day 5 | 8.9% | 14.7% | 76.3% |

表1. P19 細胞における Tuj1 Ab 陽性細胞と Nestin Ab 陽性細胞の割合。

P19 細胞をレチノイン酸処理により神経細胞に分化誘導し、2日目 (Day 2) と5日目 (Day 5) の細胞において、Tuj1 Ab 陽性細胞と Nestin Ab 陽性細胞の割合を調べた。その結果、神経分化誘導後2日目では、Nestin Ab 陽性 Tuj1 Ab 陰性の細胞が 39.2%、Nestin Ab 陽性 Tuj1 Ab 陽性の細胞が 36.1%、Nestin Ab 陰性 Tuj1 Ab 陽性の細胞が 24.7% 存在した。分化誘導後5日目では、Nestin Ab 陽性 Tuj1 Ab 陰性の細胞が 8.9%、Nestin Ab 陽性 Tuj1 Ab 陽性の細胞が 14.7%、Nestin Ab 陰性 Tuj1

Ab 陽性の細胞が 76.3% 存在した。

(2) 神経前駆細胞において脂肪酸β-酸化系酵素が発現しているのか調べるために、P19 細胞を神経に分化誘導し2日目の細胞を、神経前駆細胞のマーカーである Nestin に対する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、Nestin 発現細胞において、ミトコンドリアの脂肪酸β-酸化系酵素である Hsd17b10 の発現が見られたことから、神経前駆細胞においてミトコンドリアの脂肪酸β-酸化系酵素が存在していることを明らかにした (図1A)。さらに、Nestin 発現細胞において、ペルオキシソームの脂肪酸β-酸化系酵素である Acox1 の発現が見られたことから、神経前駆細胞においてペルオキシソームの脂肪酸β-酸化系酵素が存在していることを明らかにした (図1B)。

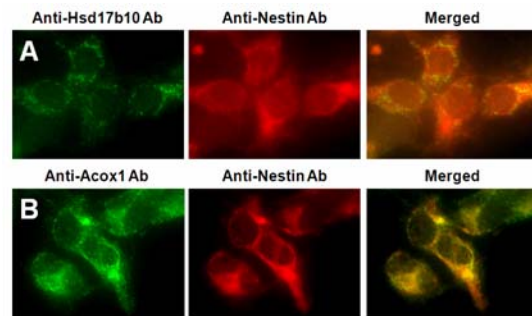


図1. 神経前駆細胞における脂肪酸β-酸化系酵素の発現。

P19 細胞を神経に分化誘導し2日目の細胞を神経前駆細胞のマーカーである Nestin に対する抗体を用いて2重染色を行った。その結果、神経前駆細胞において、ミトコンドリアの脂肪酸β-酸化系酵素である Hsd17b10 (A) とペルオキシソームの脂肪酸β-酸化系酵素である Acox1 (B) が発現していることを明らかにした。

(3) 神経細胞において脂肪酸β-酸化系酵素が発現しているのか調べるために、P19 細胞を神経細胞に分化誘導し、神経細胞のマーカーである Neuronal Class III β-tubulin に対する抗体 (Tuj1 Ab) を用いて免疫染色を行った。その結果、Tuj1 Ab 陽性細胞において、ミトコンドリアの脂肪酸β-酸化系酵素である Hsd17b10 の発現が見られたことから、神経細胞においてミトコンドリアの脂肪酸β-酸化系酵素が存在していることを明らかにした (図2A)。さらに、Tuj1 Ab 陽性細胞において、ペルオキシソームの脂肪酸β-酸化系酵素である Acox1 の発現が見られたことから、神経細胞においてペルオキシソームの脂肪酸β-酸化系酵素が存在していることを明らかにした (図2B)。

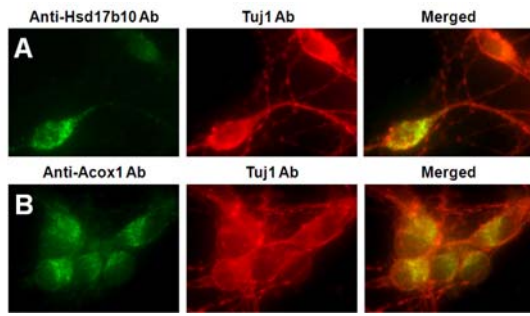
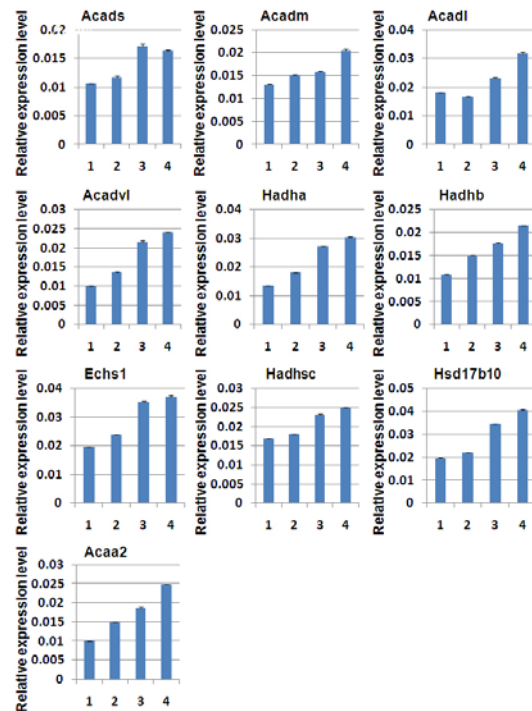


図 2. 神経細胞における脂肪酸 β -酸化系酵素の発現。

P19 細胞を神経に分化誘導し 5 日目の細胞を神経細胞のマーカーである Neuronal Class III β -tubulin に対する抗体 (TuJ1 Ab) を用いて 2 重染色を行った。その結果、神経細胞において、ミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化系酵素である Hsd17b10 (A) とペルオキシソームの脂肪酸 β -酸化系酵素である Acox1 (B) が発現していることを明らかにした。

(4) Hsd17b10, Acox1 以外の脂肪酸 β -酸化系酵素が神経前駆細胞と神経細胞で発現しているのか調べる目的で、P19 細胞を神経細胞に分化誘導し、神経前駆細胞が多数を占める 2 日目、神経細胞が大部分を占める 5 日目の細胞から total RNA を抽出し、リアルタイム PCR を行った。ミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化系酵素である Acads, Acadm, Acadl, Acadvl, Hadha, Hadhb, Echs1, Hadhsc, Hsd17b10, Acaa2 の発現をリアルタイム PCR により調べた結果、P19 細胞をレチノイン酸存在下で 4 日間浮遊培養した状態、神経分化誘導後 2 日目、神経分化誘導後 5 日目と神経前駆細胞から神経細胞への分化が進むに従って、Acads 以外のミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化系酵素の発現量が増加することが明らかとなった (図 3)。以上の結果から、神経前駆細胞や神経細胞においてミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化系酵素が、神経前駆細胞から神経細胞への分化過程や分化した神経細胞において何らかの機能を持っている可能性が示唆された。また、短鎖脂肪酸の β -酸化に関与する Acads の発現が分化誘導後 2 日目で高いことから、短鎖脂肪酸の β -酸化は特に神経細胞への分化の過程で重要な働きをしている可能性が考えられる。これまでは発現していないと考えられていた神経細胞においてもミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化系酵素の存在が示唆されたことから、従来は、ブドウ糖のみが栄養素として働くと考えられていた神経細胞において、脂肪酸も栄養素として働いている可能性が示唆された。

図 3. P19 細胞におけるミトコンドリア脂肪

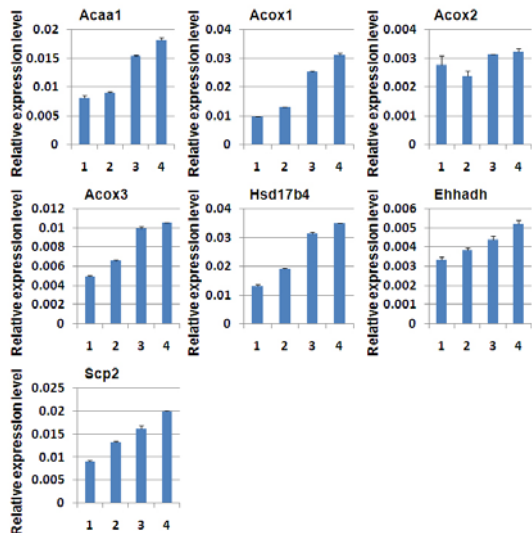


酸 β -酸化系酵素の発現。

未分化状態 (1)、レチノイン酸存在下で 4 日間浮遊培養した状態 (2)、神経分化誘導後 2 日目 (3)、5 日目 (4) の P19 細胞から、RNA を抽出し、脂肪酸 β -酸化系の各酵素に対する特異的なプライマーを用いて、リアルタイム PCR を行った。その結果、Acads を除く全てのミトコンドリア脂肪酸 β -酸化系酵素の発現量が、神経細胞への分化に伴って増加することが明らかとなった。縦軸は GAPDH の発現量を 1 とした時の相対的な発現量を示している。

さらにペルオキシソームの脂肪酸 β -酸化系酵素である Acaa1, Acox1, Acox2, Acox3, Hsd17b4, Ehhadh, Scp2 の発現をリアルタイム PCR により調べた結果、P19 細胞をレチノイン酸存在下で 4 日間浮遊培養した状態、神経分化誘導後 2 日目、神経分化誘導後 5 日目と神経前駆細胞から神経細胞への分化が進むに従って、全てのペルオキシソームの脂肪酸 β -酸化系酵素の発現量が増加することが明らかとなった (図 4)。ペルオキシソームの脂肪酸 β -酸化系については、先天的酵素欠損症により脳の形成不全が起こることが知られていることから、ペルオキシソームの脂肪酸 β -酸化系酵素が神経前駆細胞から神経細胞への分化に重要な働きをしていることが考えられる。本研究により、ペルオキシソームの脂肪酸 β -酸化系酵素の発現量が神経前駆細胞よりも神経細胞において高いことが明らかになった。以上のことから、ペルオキシソームの脂肪酸 β -酸化系は分化した神経細胞においても重要な働きをしている可能性が考えられる。

図 4. P19 細胞におけるペルオキシソーム脂肪酸 β -酸化系酵素の発現。



未分化状態（1）、レチノイン酸存在下で4日間浮遊培養した状態（2）、神経分化誘導後2日目（3）、5日目（4）のP19細胞から、RNAを抽出し、脂肪酸 β -酸化系の各酵素に対する特異的なプライマーを用いて、リアルタイムPCRを行った。その結果、全てのペルオキシソーム脂肪酸 β -酸化系酵素の発現量が、神経細胞への分化に伴って増加することが明らかとなった。縦軸はGAPDHの発現量を1とした時の相対的な発現量を示している。

最期に、本研究により、神経細胞においてミトコンドリアの脂肪酸 β -酸化系酵素の存在が示唆されたことから、従来はブドウ糖のみが栄養素として働くと考えられていた神経細胞においても、脂肪酸が栄養素として働いている可能性が示唆された。さらに神経前駆細胞だけではなく神経細胞においても、ペルオキシソームの脂肪酸 β -酸化系酵素の存在が示唆されたことから、ペルオキシソームの脂肪酸 β -酸化系酵素は分化した神経細胞においても何らかの機能を担っている可能性が考えられる。

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1件）

大河原剛、深澤元晶、厚沢季美江、白田信光、杉山敏、DEHPのメタボリックシンドロームのモデル動物への効果、Therapeutic research、査読無、29巻、2008、1913-1914、

〔学会発表〕（計1件）

①大河原剛、アミロイド前駆体蛋白質の細胞内ドメインは、遺伝子発現をダイナミックに変化させる。、日本分子生物学会、2009

年12月9日、パシフィコ横浜（神奈川県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河原 剛 (OHKAWARA TAKESHI)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：20469034

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：