

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20791286
研究課題名（和文）ミューラー細胞における脂質代謝に関する網羅的な組織化学
研究課題名（英文）Immunohistochemical study of fatty acid metabolism in Müller cells of the retina.

研究代表者
厚沢 季美江（ATSUZAWA KIMIE）
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号：60387727

研究成果の概要（和文）：

網膜 Müller 細胞における脂肪酸 β -酸化に着目し、栄養代謝を中心とした Müller 細胞の機能形態学的性質を明らかにすることを目的とした。網羅的な生化学的解析により、網膜におけるミトコンドリア脂肪酸 β -酸化系酵素の蛋白と遺伝子発現を調べた結果、肝臓の約 10 分の 1 量程度と少ないことが示された。免疫電顕により、それらが Müller 細胞の特にミトコンドリアに局在していることが確認された。脂肪酸 β -酸化系酵素の一部の先天性欠損児において網膜色素変性症が報告されており、本研究結果はその発症機構解明に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The nutrient metabolism of Müller cell of the retina, fatty acid β -oxidation system in particular, was attempted by biological and morphological studies. All the enzymes examined were shown to be present in the retina with the amount of protein and gene expression in the retina being about 1/10 of those in the liver. Electron microscopic immunohistochemistry revealed the enzymes to be localized to the mitochondria of Müller cells. The present results are helpful in elucidating the pathogenesis of retinal pigmentary degeneration in the inborn error of metabolism in fatty acid β -oxidation.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2009 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 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：外科系臨床医学

キーワード：眼組織化学

1. 研究開始当初の背景

網膜は脳と同様に、エネルギー産生のための唯一の栄養源はブドウ糖であり、脂肪酸は栄養素とならないと言われてきた。Müller 細胞はブドウ糖を代謝し自身の栄養源とするとともに乳酸を産生し、神経細胞を養うと考えられてきた。脂肪酸については、脂肪酸β-酸化系と、関連する代謝系であるケトン体の生成・分解について一考もされてこなかった。

予備的な研究において、網膜において Müller 細胞のみに脂肪酸β-酸化系酵素群が局在する新規の知見を得た。

脂肪酸β-酸化系の酵素 LCAD の欠損において網膜の変性が起きると知られている。糖尿病性網膜症や網膜色素変性症においても脂質代謝の異常が一因であると推定されている。これらの疾患病態解明において、網膜における脂肪酸β-酸化系を考慮することが必要と考えられる。

2. 研究の目的

Müller 細胞の栄養素の代謝について仮説を提案したい。Müller 細胞には解糖系と乳酸の産生系に加え、脂肪酸β-酸化系が存在し、両者が TCA 回路におけるエネルギー産生に寄与する。さらにケトン体を産生する経路も存在し、ケトン体が産生された場合は網膜神経細胞に手渡され、エネルギー源となる可能性もある。この仮説を立証することにより、網膜の疾患の病態解明の基盤を作ることを目的とする。

3. 研究の方法

材料：ラット網膜組織、単離した Müller 細胞

a) 抗体による蛋白質の検出：代謝系全酵素に対する抗体（抗体アレイ）

・Western blot による酵素蛋白質の定量的検出

・蛍光抗体法による酵素蛋白局在の解析

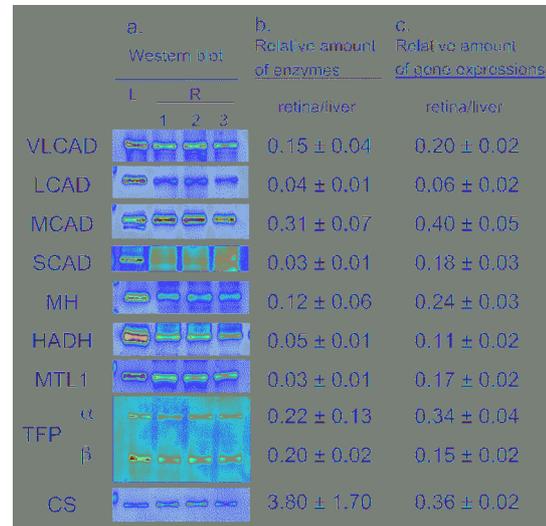
・免疫電顕法による酵素蛋白質の微小局在の検出

b) 遺伝子発現の検出：DNA microarray による遺伝子発現の定量

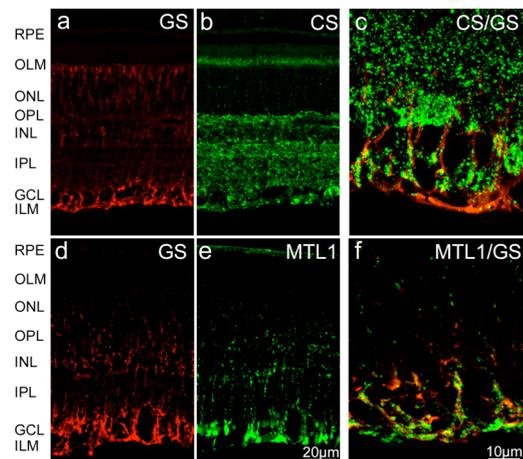
4. 研究成果

(1) Western blot, DNA microarray：成体ラット網膜組織を用いてミトコンドリア脂肪酸β酸化系酵素について Western blot (a, b)、DNA microarray (c)を行った。対照の肝臓組織と比較すると、網膜では蛋白量は肝臓の 1/50 程度、遺伝子発現量は肝

臓の 1/10 程度であることが確かめられた。

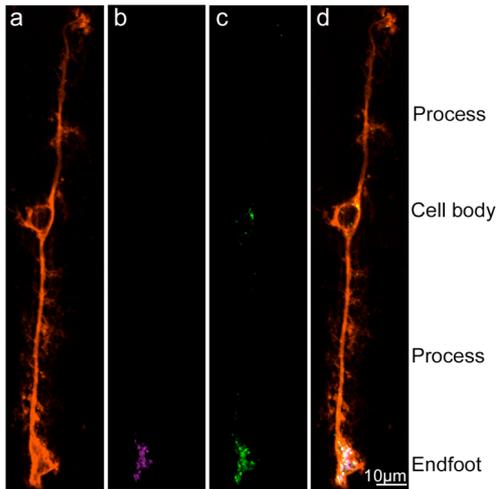


(2) 凍結切片の蛍光抗体法：網膜組織を用いてミトコンドリア脂肪酸β酸化系酵素の一つである MTL1 について蛍光抗体法を行った。GS は Müller 細胞のマーカーとして用いた(a, d)。TCA 回路の酵素である CS は比較のために用いた (b)。MTL1 は Müller 細胞に局在しているのに対し、CS は網膜全体に分散していた。

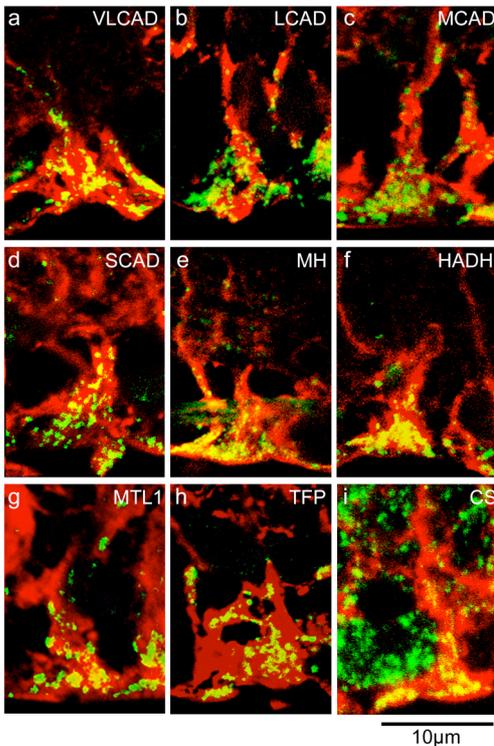


(3) 単離した Müller 細胞の蛍光抗体法：単離した Müller 細胞を用いてミトコンドリア脂肪酸β酸化系酵素の一つである MTL1 について蛍光抗体法を行った。Müller 細胞のマーカーとして GS を用いた(a)。ミトコンドリア

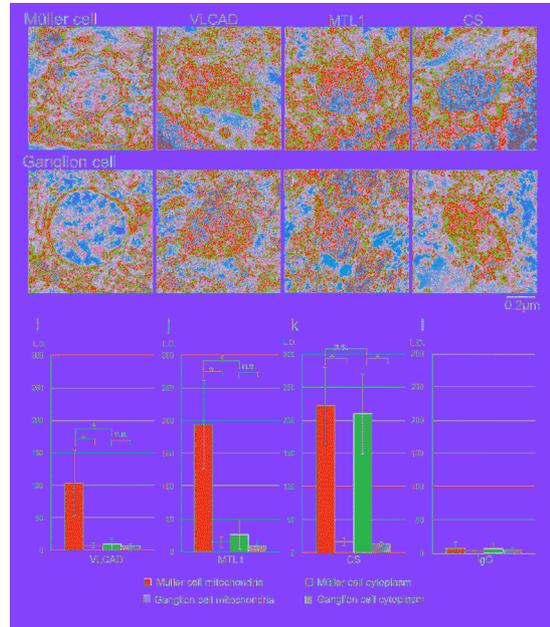
は streptavidin (b) で染色した。画像を重ねると MTL1 がミトコンドリアに局在していることが確かめられた(d)。



(4) 凍結切片の蛍光抗体法：成体網膜を用い、ミトコンドリア脂肪酸β酸化系酵素を蛍光抗体法で染色した組織を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Müller細胞のマーカーとしてGSを用いた。CSは網膜全体が染色されていたのに対し、脂肪酸β酸化系酵素の染色はMüller細胞のendfootに局在していた。



(5) 免疫電顕：Müller細胞のミトコンドリア (a) は、脂肪酸β酸化系酵素 VLCAD, MTL1 と CS の両者が陽性であった (b-d)。視神経細胞のミトコンドリア (e) は、脂肪酸β酸化系酵素 VLCAD, MTL1 は陰性で (f, g)、CS は陽性であった (h)。



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 6 件)

- ①. Atsuzawa K 他、Immunohistochemical localization of mitochondrial fatty acid β-oxidation enzymes in Müller cells of the retina. *Histochem Cell Biol.* 査読有、投稿中
- ②. Fukasawa M, Atsuzawa K 他、Immunohistochemical Localization of Mitochondrial Fatty Acid β-Oxidation Enzymes in Rat Testis. *J Histochem Cytochem.* 査読有、58(2), 195-206, 2010
- ③. Atsuzawa K 他、High-contrast imaging of plastic-embedded tissues by phase contrast electron microscopy. *J Electron Microsc.* 査読有、58 (2), 35-45, 2009.

[学会発表] (計 7 件)

- ①. Atsuzawa K 他 Immunohistochemical and DNA microarray analysis of rat retinal Müller cells. Experimental Biology 2009, Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, LA, USA, 2009年4月19-20日
- ②. 厚沢季美江 他、網膜におけるミトコンドリア

ア脂肪酸β酸化系の免疫電顕的研究, 第
41回日本臨床分子形態学会・学術集会,
神戸国際会議場, 2009年9月5日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

厚沢季美江 (ATSUZAWA KIMIE)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号: 60387727