

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22656

研究課題名（和文）2タニサイトの構造・機能とネクチン1の発現

研究課題名（英文）Structure and function of alpha2 tanycyte and expression of nectin

研究代表者

清水 達太（Shimizu, Tatsuhiro）

神戸大学・医学研究科・学術研究員

研究者番号：70882869

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：様々な生物の寿命は食事制限により延長するが、個体の老化と寿命を制御する機構の大部分は未解明である。視床下部の第三脳室の側壁を覆うタニサイトは脳脊髄液中のグルコース濃度を感知するほか、成体でも神経幹/前駆細胞機能を持つ。近年、タニサイトが個体の寿命延長に関与することが示唆されているが、加齢時の神経幹/前駆細胞機能の維持機構は不明である。本研究では、神経幹細胞機能の高いタニサイトで特異的に発現する細胞接着分子ネクチンを同定し、神経幹細胞機能の維持に関与する可能性を見出した。また、摂食行動を制御する弓状核に幹細胞マーカーSox2陽性の神経細胞の存在を見出し、加齢により細胞数が減少することを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにタニサイトが個体の寿命延長に関与することが示されているが、成体においてタニサイトの機能がどのように維持されているのかはほとんど解明されていない。本研究ではタニサイトの神経幹細胞機能の維持に細胞接着分子ネクチンの一種が関与する可能性を見出した。今後はこのネクチンがどのようにして神経幹細胞機能を維持するのかを明らかにすることで、個体の老化制御に重要なタニサイトの機能維持機構の解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Although the lifespan of various animals is prolonged by dietary restriction, the mechanisms that regulate aging and lifespan are largely unexplored. The tanycytes lining the lateral wall of the third ventricle of the hypothalamus sense glucose concentrations in cerebrospinal fluid and also have neural stem/progenitor cell functions in adults. Recently, it has been suggested that tanycytes are involved in extending the lifespan. However, the mechanisms that maintain neural stem/progenitor cell function of tanycytes during aging are unknown. In this research project, we identified one of the cell adhesion molecules nectin, which is specifically expressed in 2 tanycytes with high neural stem cell function and may be involved in the maintenance of neural stem cell function. We also found the presence of Sox2 and NeuN double-positive cells in the mouse arcuate nucleus and reported that the number of these cells decreases with age.

研究分野：細胞生物学

キーワード：老化 視床下部 タニサイト 神経幹/前駆細胞 細胞接着分子 ネクチン Sox2

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとした種々の生物の寿命は食事制限により延長することが示されている。その細胞内シグナル伝達経路の一部は解明されているが、大部分は不明であり、現在の老化・寿命研究における重要な課題となっている。栄養源の中でグルコースが細胞にとって最も重要であり、血中のグルコース濃度は膵臓の細胞によって感知・制御される。一方、脳脊髄液中のグルコース濃度は視床下部の第三脳室の側壁を覆うタニサイトによって感知され、その情報が視床下部の神経核の1つである弓状核へと伝達される。弓状核には摂食行動を促進するニューロペプチドY (NPY) とアグーチ関連ペプチド (AgRP) を産生する神経細胞と、摂食行動を抑制に関わるホルモンの前駆体であるプロオピオメラノコルチン (POMC) を産生する神経細胞が存在しており、これらの神経細胞により摂食・満腹中枢の神経活動が制御されている。

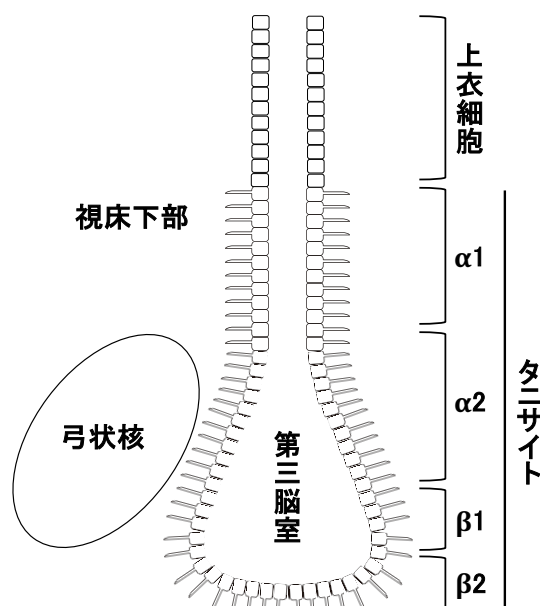


図1. 視床下部タニサイト

また、タニサイトはグルコースセンサーとしての役割に加えて、成体においても神経幹/前駆細胞としての自己増殖能と神経細胞への分化能を有している。さらに、タニサイトはその遺伝子発現の多様性や細胞の位置関係から $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ の大きく4種類に分類されており、中でも $\alpha 2$ タニサイトは神経幹細胞機能が高い細胞群である(図1)。近年、タニサイトの正常な機能維持が個体の寿命延長に関与することが示唆されているが、成体における領域特異的なタニサイトの神経幹/前駆細胞機能の維持機構は未解明である。

タニサイトは側底部から1本の突起を伸ばしており、その細胞体は互いに接着して上皮細胞のように一層の細胞シートを形成することで、脳脊髄液と視床下部間のバリアとして機能している。このバリア機能には、アドヘレンスジャンクションとタイトジャンクションなどの細胞間接着機構が重要であり、この細胞間接着機構は上皮細胞ではかなり解明されているが、タニサイトではほとんど未解明である。アドヘレンスジャンクションやタイトジャンクションの形成には細胞接着分子が必須であるが、この分子は細胞接着能以外にも細胞内シグナル伝達制御など多彩な役割を果たしている。そこで本研究では、アドヘレンスジャンクションの形成に関与する細胞接着分子であるネクチンとカドヘリンに着目し、これらの細胞接着分子の発現の多様性がタニサイトの神経幹/前駆細胞機能の維持に関与することを予想し、実験を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、タニサイトにおけるネクチンとカドヘリンをはじめとした細胞接着分子の局在の特異性を解析することで、タニサイトの神経幹/前駆細胞機能の維持機構を解明する。さらに加齢や高脂肪食ストレスでタニサイトや視床下部における遺伝子発現がどのように変化していくのか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウスの作成

$\alpha 2$ タニサイトで特異的に発現するネクチンの flox マウスとネスチンプロモーターで CreERT2 を発現するマウスを交配させた。得られた産仔が8週齢に達した時点でタモキシフェンを5日間連続で投与し、タニサイトを含む幹細胞において $\alpha 2$ タニサイトで特異的に発現するネクチンをノックアウトさせた。

(2) 組織染色

野生型の若齢マウス(3ヶ月齢)と老齢マウス(24-25ヶ月齢)を用意した。また、野生型マウスに10週齢から通常食と高脂肪食を16週間与え続けたマウスを準備した。これらのマウスと上記のマウスを灌流固定して脳切片を作製し、ネクチン、カドヘリンや幹細胞マーカー Sox2 などの抗体を用いて組織染色を行った。

4. 研究成果

第三脳室の側壁は上部から下部へ向かって、上衣細胞、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ タニサイトによって覆われている（図 1）。まず、カドヘリンの局在を検討したところ、N-カドヘリンは上衣細胞と全てのタニサイトで一様に発現していた。一方で、3種類のネクチンの局在を検討したところ、全て異なる発現パターンを示し、上衣細胞とタニサイトの全てで発現するもの、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ タニサイトで発現するもの、 $\alpha 2$ タニサイトで特異的に発現するものが存在した。また、カドヘリンとネクチンのそれぞれの結合分子である β -カテニン、アファディンの局在を検討したところ、いずれも上衣細胞とタニサイトの全てで発現していた。以上の結果から、細胞接着分子のうち、ネクチンは領域により発現の特異性があることが示唆された。

次に加齢で細胞接着分子の発現がどのように変化するか老齢マウスで検討した。まず、カドヘリンの局在を検討したところ、N-カドヘリンは若齢マウスと老齢マウスで発現に変化は見られなかった。一方で、3種類のネクチンの局在を検討したところ、上衣細胞とタニサイトの全てで発現するものと、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ タニサイトで発現するものの2種類のネクチンは老齢マウスでも発現に変化は見られなかった。しかし、 $\alpha 2$ タニサイトで特異的に発現するネクチンは老齢マウスでは若齢マウスと比較して陽性細胞数が減少し、残る細胞の一部では発現が増加していた。よって、 $\alpha 2$ タニサイトで特異的に発現するネクチンが陽性の細胞は加齢により減少することが示唆された。

次に高脂肪食によるストレスで細胞接着分子の発現がどのように変化するか検討した。まず、カドヘリンの局在を検討したところ、N-カドヘリンの発現に変化は見られなかった。一方で、3種類のネクチンの局在を検討したところ、上衣細胞とタニサイトの全てで発現するものと、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ タニサイトで発現するものの2種類のネクチンの発現は変化しなかった。しかし、 $\alpha 2$ タニサイトで特異的に発現するネクチンは老齢マウスとは異なり、陽性細胞数はほとんど変化しなかったが、発現が減少していた。以上の結果から、 $\alpha 2$ タニサイトで特異的に発現するネクチンが加齢や高脂肪食ストレスで変化することが示唆された。

これまでに $\alpha 2$ タニサイトは特に神経幹細胞機能が高いことが報告されている。そこで、 $\alpha 2$ タニサイトで特異的に発現するネクチンの機能を解析するために、タニサイトでこのネクチンをノックアウトできるマウスを作成した。すると、このマウスでは時間経過と共に、通常一層の幹細胞マーカーSox2 陽性のタニサイトがネクチンの欠損で多層化していた。以上の結果から、 $\alpha 2$ タニサイトで特異的に発現するネクチンは、 $\alpha 2$ タニサイトの増殖と分化を抑制することで成体でも $\alpha 2$ タニサイトの神経幹細胞機能を維持している可能性がある。

また、タニサイトにおける Sox2 の発現を確認したところ、既報告の通り、老齢マウスや高脂肪食によるストレスを与えたマウスでタニサイトにおける Sox2 の発現は減少していた。一方で、弓状核においても Sox2 陽性の細胞が存在しており、その数は加齢により減少していた。

この Sox2 陽性となる細胞が神経細胞かグリア細胞であるか検討するために各種細胞マーカーとの共染色を行った。その結果、Sox2 陽性細胞の多くが神経細胞マーカーNeuN との二重陽性細胞であった。弓状核には NPY/AgRP 産生神経細胞と POMC 産生神経細胞が存在することから、Sox2 と NeuN の二重陽性細胞がどちらのホルモンを産生する細胞か若齢マウスで検討した。その結果、Sox2 と AgRP が二重陽性となる細胞はほとんど見られず、Sox2 陽性細胞の多くは POMC より産生される副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) と二重陽性であった。よって、Sox2 と NeuN の二重陽性細胞は NPY/AgRP 産生神経細胞ではなく、POMC 産生神経細胞の一部であることが示唆された。

さらに、老齢マウスと高脂肪食マウスで Sox2 と NeuN の二重陽性細胞がどのように変化するか検討したところ、いずれのマウスにおいても Sox2 陽性のタニサイトと同様に細胞数が減少していた。以上の成果は Front. Aging Neurosci. 誌に報告した（図 2）。

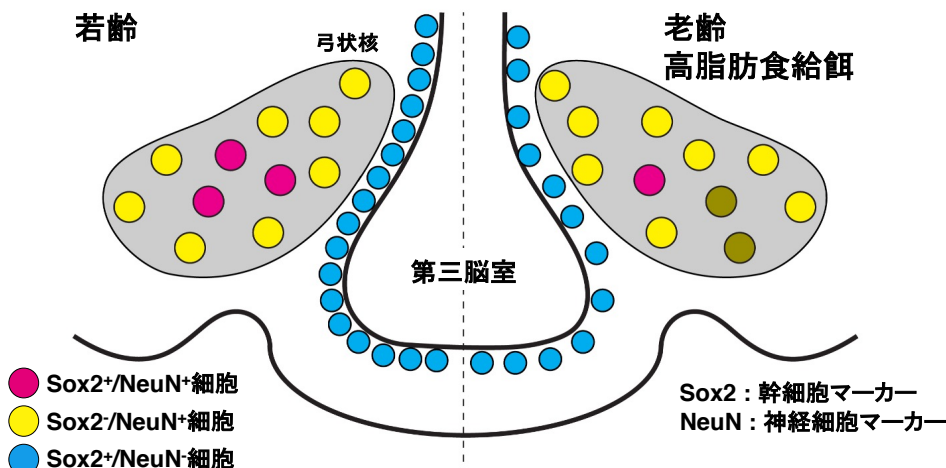


図 2. 弓状核における Sox2 と NeuN の二重陽性細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugiura Ayumu, Shimizu Tatsuhiro, Kameyama Takeshi, Maruo Tomohiko, Kedashiro Shin, Miyata Muneaki, Mizutani Kiyohito, Takai Yoshimi	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of Sox2 and NeuN Double-Positive Cells in the Mouse Hypothalamic Arcuate Nucleus and Their Reduction in Number With Aging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Aging Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnagi.2020.609911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------