

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580204

研究課題名(和文) 脂質異常症における細胞膜微小ドメインの変容とその機能解析

研究課題名(英文) Changes in behavior and cell membrane structure in the central nervous system of apoE- and ABC A1-deficient mice

研究代表者

津嶋 宏美 (TSUSHIMA, Hiromi)

金城学院大学・薬学部・教授

研究者番号：10080079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪含有飼料摂取ラット、apoEノックアウト(KO)マウスとABCA1 KOマウスの中枢神経機能と細胞膜構造変化を検討した。高大豆油含有飼料摂取動物では、中枢体温調節機能の変化、脳組織の脂肪酸組成n-6/n-3比の上昇、カベオリンmRNA発現低下が示された。一方、apoE KOマウスでは空間認知機能の低下と痛覚鈍麻、ABC A1 KOマウスではともに反対の表現型を示した。また、ABC A1 KOマウスの視床下部カベオリンmRNA発現は増加していたがタンパク量は変化していなかったこと、apoE KOマウスのカベオリンタンパク量は変化していなかったことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated functions of the central nervous system (CNS) and caveolin distribution/expression using rats fed high-fat diet, apoE knockout (KO) mice and ABC A1 KO mice showing high and low concentration of cholesterol in the plasma, respectively. The high-soybean oil intake induced abnormal regulation of body temperature in the CNS, increase in n-6/n-3 ratio of fatty acid composition of the hypothalamus, decrease in caveolin mRNA expression. On the other hand, apoE KO mice showed spatial cognitive dysfunction and hypoalgesia, and in ABCA1 KO mice, the opposite behavior was observed. Caveolin mRNA expression in the hypothalamus of ABC A1 KO mice was increased, however, the protein did not increase. ABCA1 KO mice did not change expression of caveolin protein.

研究分野：薬理学

キーワード：行動解析 apo Eノックアウトマウス ABCA1 ノックアウトマウス カベオリン

1. 研究開始当初の背景

近年、脂質がうつ病・統合失調症・アルツハイマー病等中枢神経疾患とも関連していることが指摘されている。脂質は細胞膜成分として重要であり、中枢神経系での正常とは異なった脂質分子で構成された細胞膜では、膜安定性や脂質ラフト/カベオラなど膜マイクロドメイン構造が変化することになる。このことは、受容体/イオンチャネル/輸送体など膜タンパク質の局在・機能変化をもたらし、さらには細胞内情報伝達分子との共役への影響があり、神経機能が影響をうけることが推測される。事実、*invitro* 実験系では培養液に加えられた脂質成分によって培養細胞の細胞膜脂質組成が変化しカリウムイオンチャネルの開口時間が短縮することなどが報告されている。

2. 研究の目的

生体膜構造変化と機能発現の連関に関する研究は培養細胞を用いた *in vitro* 系で行なわれているに過ぎない。生体機能や病態との関連を検討するためには *in vivo* 系の実験がより有用であると考え、脂質異常症を呈する各種高脂肪食で長期飼育した実験動物、*apoE* ノックアウト (KO) マウス (高脂血症・動脈硬化発症モデル動物)、*ABCA1* および *A7 KO* マウス (コレステロール輸送体欠損動物) を用い、神経細胞機能を解析するとともに形態学的、薬理学的あるいは生化学的・分子生物学的手法などの方法を駆使して細胞膜の変容を明らかにし、脂質 細胞膜ダイナミクス機能連関を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 実験動物：高脂肪含有飼料 (20 W/W% 大豆油/魚油/ラード) と通常飼育飼料を与えたラットと *apoE* KO マウス、*ABC A1 KO* マウスと *ABC A7 KO* マウス、野生型 (WT; C57BL/6J) マウスを使用した。

(2) 体温・運動量の測定：テレメトリー法を用いた。

(3) 行動解析：高架式十字迷路・オープンフィールド・モリス水迷路による行動を解析ソフトにより検討した。また、ホットプレート法による痛覚感受性を調べた。

(4) 生化学的解析：各種実験動物の脳組織と血漿を用いて、電気泳動・ウエスタンブロッティング法によるカベオリンタンパク量、PCR法による各種タンパク質の mRNA 発現量、ガスクロマトグラフィー法により測定し脂肪酸のプロファイリング作成、コレステロールの定量、アレイキットを用いて血中サイトカイン濃度測定、免疫組織化学的手法による中枢神経系のカベオリン分布、細胞膜安定性を調べるため、骨髄細胞を採取し分化誘導した肥満細胞を用いて、各種刺激に

よるケミカルメディエーター遊離量測定を行った。

4. 研究成果

(1) 高脂肪含有飼料摂取ラットを用いた検討：各種高濃度脂質含有飼料で長期飼育した実験動物の体温の日内変動を測定した。通常飼料摂取群 (ND) に比較し、高大豆油 (HSD) とラード含有飼料摂取群において、体温の低下が認められ、特に暗期より明期への移行時間帯に顕著であった (Fig. 1)。

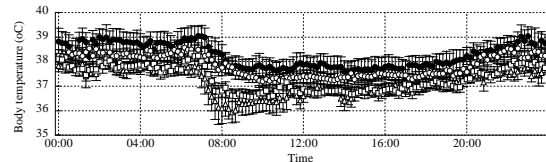


Fig. 1 Changes in body temperature after 20-week dietary Intervention : ●:Normal diet ; ○:High fish oil diet ; △:High soybean oil diet ; □:high lard diet

また、HSD では、ND より IL-1 (脳室内投与) による発熱作用の増強、ポンペシン (脳室内投与) による体温低下作用の減弱が認められ、中枢体温調節機能が変化していることが推測された。HSD では、視床下部脂肪酸 n-6/n-3 比の有意な上昇、甲状腺刺激ホルモン サブユニットの mRNA 発現の増加、カベオリン mRNA 発現の減少を認めた。30 種の代表的アディポカインの血中濃度を測定したが、高脂肪含有飼料摂取群で大部分のアディポカイン濃度は上昇していたが、HSD のみが有意に変化しているものはなかった。

(2) *apoE*・*ABCA1*・*ABCA7* KO マウスを用いた検討

行動解析

オープンフィールド実験においては、WT マウスと比較し、*ABCA7* KO マウスにおいて移動距離、移動速度が低い傾向にあった。他の KO マウスは、差がなかった。

高架式十字迷路実験では、*ABCA1* KO マウ

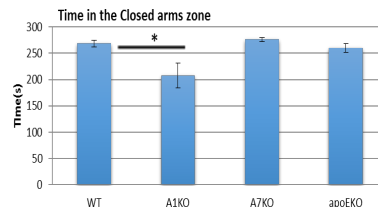


Fig.2 Time in the closed arm of elevated plus maze  
WT: wild type mice; A1KO: ABC A1 KO mice; A7KO: ABC A7 KO mice; apoE KO: apoE KO mice; \*P<0.05 vs. WT

スにおいて、オープンアームの滞在時間は差がなかったが、クローズドアームの滞在時間

が有意に短く、センター部分の滞在時間が延長していた (Fig. 2)。移動距離や速度は変化なかった。

モリス水迷路実験では、実験開始 5 日後の島への到達時間を Fig.3 に示した。apoE KO マウスは到達時間が有意に延長していたが、ABCA1 KO マウスでは短縮し、空間記憶・認知能力に差が認められた。

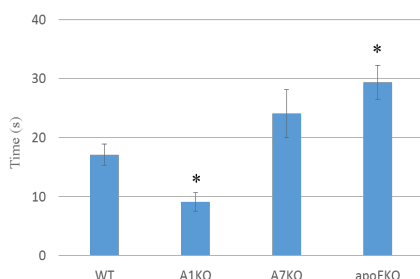


Fig. 3 Latency to the island finding on the fifth day of Morris water maze  
\*P<0.05 vs. WT

ホットプレート法では、Fig. 4 に示すように、ABC A1 KO マウスは痛覚過敏、apoE KO マウスは痛覚鈍麻を呈した。ABC A1 KO マウスの痛覚過敏はインドメタシン前処置により抑制されたが、ブプレノルフィン前処置では影響がなかった。

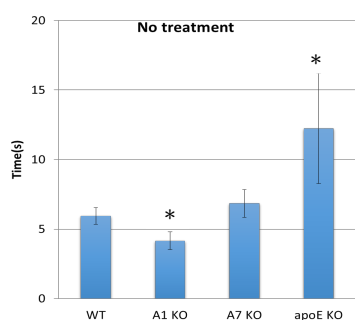


Fig. 4 Latency to paw withdrawal in the hot plate test  
\*P<0.05 vs. WT

#### カベオリンの発現

ABCA1 KO マウスの視床下部におけるカベオリン mRNA の発現は、WT マウスと比較し増加していたが、大脳では有意な差は認められなかった。一方、ABCA7 KO マウスの視床下部ではカベオリン mRNA の発現が変化なかったが、大脳では増加していた。しかしながら、電気泳動・ウエスタンブロッティング法によるカベオリンタンパク量は、ABCA1・ABCA7・apoE KO マウスのいずれにおいても WT マウスとの差は認められなかった。また、抗カベオリン抗体による免疫組織染色においても 4 種のマウスで差は認められなかった。

#### 血中サイトカイン濃度

アディポカインアレイキットを用いて、40 種の血中濃度を網羅的に調べた (Fig. 5)。apoE KO マウスは、すべてにおいて低い傾向を示し

た。特に、各種インターロイキンの濃度が低かった。

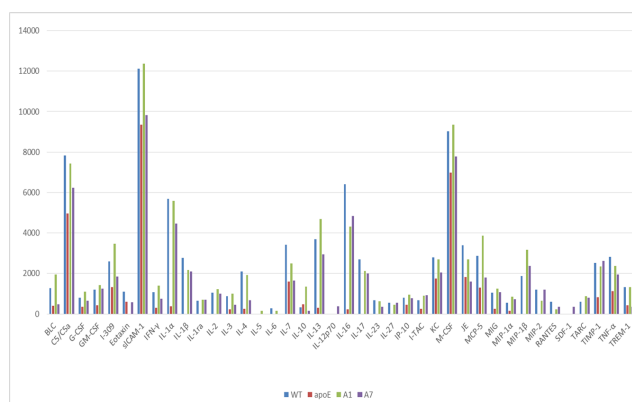


Fig. 5 Detection of various cytokines in the plasma of apoE KO mice, ABC A1 KO mice and ABC A7 KO mice

#### <引用文献>

- B. Dziedzic, et al., Various Dietary fats differentially change the gene expression of neuropeptides involved in body weight regulation in rats, *J. Neuroendocri.* 19, 364-373, 2007
- M. Guizy, et al., Modulation of the artrial specific Kv 1.5 channel by the n-3 poly-unsaturated fatty acid,  $\alpha$ -linolenic acid, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44, 323-335, 2008
- R. S. Chapkin et al., Docosaenoic acid alters the size and distribution of cell surface micro- domains, *Bioch. Biophys. Acta* 1778, 466- 471, 2008
- H. Tsushima, et al., Long-term high-soybean oil feeding alters regulation of body temperature in rats, *Biol. Pharm. Bull.* 37, 2014, 1003-1013

#### 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 2 件)

- H. Tsushima, et al., Long-term high-soybean oil feeding alters regulation of body temperature in rats, *Biol.Pharm.Bull.* 査読有, Vol.37, 2014, 1003-1013  
<http://doi.org/10.1248/bpb.b13-00977> ht
- Y. Hashimoto, K. Yamada, H. Tsushima, et al., Three dissimilar high-fat diets differentially regulate lipid and glucose metabolism in obesity-resitant Slc:Wistar/ST rats, *Lipid*, 査読有, 48, 2013, 803-815  
DOI: 10.1007/s11745-013-3805-3

〔学会発表〕(計 5件)

稲掛綾香、岩田怜奈、松原つばさ、津嶋宏美、視索前野における Insulin 様成長因子-1 の体温調節への影響、生体機能と創薬シンポジウム、2015年8月27日、舟橋

津嶋宏美他、ABC A1 トランスポーターノックアウトマウスにおける細胞膜微小ドメインの検討、第 23 回大会日本脂質栄養学会、2014年8月29日、東京

森-河辺真由美、橋本由佳、津嶋宏美他、動脈硬化モデルマウスにおける血管機能障害と脂質分析、第 23 回大会日本脂質栄養学会、2014年8月29日、東京

津嶋宏美他、高大豆油含有飼料摂取ラットにおける低体温、第 22 回大会日本脂質栄養学会、2013年9月5日、高知

山田英里、津嶋宏美他、異なる種類の高脂肪食がラット褐色脂肪組織の生化学指標に及ぼす影響、第 21 回大会日本脂質栄養学会、2012年9月7日、相模原

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

津嶋宏美 (TSUSHIMA, Hiromi)

金城学院大学・薬学部・教授

研究者番号：10080079

### (2)研究分担者

堂前純子 (DOHMAE, Sumiko)

名古屋市立大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70227700