

機関番号：31310

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590180

研究課題名 (和文) 視・聴・嗅覚受容器における脂質の役割を、脂肪酸結合蛋白の機能解析を通して追及する

研究課題名 (英文) Analysis of functional significance of lipids in receptors for vision, hearing and olfaction by way of functional analysis of fatty acid binding proteins

研究代表者

齋野幸子 (SAINO SACHIKO)

東北文化学園大学・客員教授

研究者番号：50312559

**研究成果の概要(和文)**: 成熟マウスの網膜では脳型 FABP が錐状体視細胞に、心臓型 FABP がアマクリン・双極・水平細胞に、そして表皮型 FABP が神経節細胞に局在した。非神経性細胞については、脂肪型 FABP が正常時には内在性ミクログリアに局在したが、光照射後の変性過程の網膜では侵入する多数のマクロファージに表皮型 FABP が強く局在発現したので、これら 2 種の FABP 分子の免疫組織化学的反応により傷害時神経系における両細胞の分別同定が可能だと示唆された。内耳では、音受容の有毛細胞にはいずれの FABP も発現局在しなかったが、それを囲む支持細胞に多様な発現が認められた: 心臓型 FABP が内外柱細胞と外指節細胞に、脳型 FABP が境界細胞とヘンセン細胞と線維芽細胞に局在。神経系での非神経細胞の機能が最近注目されているが、これら 2 種の FABP の遺伝子ノックアウトマウスの聴覚に異常は検出されなかった。これらの感覚器に加えて、腸パイエル板の樹状細胞とパイエル板を覆う上皮内の M 細胞に表皮型 FABP が局在することを明らかにし、FABPs の腸免疫反応での役割が強く示唆された。

**研究成果の概要(英文)**: In the retina of normal adult mice, B-FABP was mainly localized in the cone photoreceptor cells, H-FABP in some populations of amacrine/bipolar/horizontal interneurons, and E-FABP in ganglion cells, suggesting the discrete functional involvement of FABPs and their ligands, FAs in the photoreception and photo-transmission. In addition, A-FABP-like immunoreactivity was located in resident microglia of normal retinae. In damaged retinae following photic injury, E-FABP was intensely localized in invasive macrophages, allowing discrete identification of the resident microglia and invasive macrophages by A- and E-FABP immunoreactivity, respectively. In the inner ear of normal adult mice, H (heart-type) -FABP was localized in inner and outer pillar cells and outer phalangeal cells, while B (brain-type)-FABP was localized in border cells and cells of Hensen, and fibrocytes in the spiral limbus and spiral prominence. However, no hair cells expressed any species of FABPs. Although the FABP species and/or their ligands, FAs, is suggested to play important roles in the regulation of the hearing function, mutant mice with deletion of the gene for either H- or B-FABP did not show any impairment of the hearing ability. In addition to the two sensory organs, E-FABP was expressed/localized in most, if not all, populations of the dendritic cells in the subepithelial domes, follicles and interfollicular regions of Peyer's patches and presumptive macrophages in their germinal centers, and all M cells in the follicle-associated epithelium of mouse intestine. The immunoreactivity in both of the cell populations makes it easy to recognize the accumulation of DCs in the subepithelial domes in close proximity to the base of M cells, which is essential for luminal antigens to be transported to Peyer's patches. E-FABP may play some important roles in the mucosal immune

reaction through Peyer's patches and associated structures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：脂肪酸結合蛋白、網膜、内耳、パイエル板、免疫組織化学

### 1. 研究開始当初の背景

脂肪酸は脂質の主たる構成要素のひとつであり、細胞の重要なエネルギー基質であり、それから合成されるリン脂質やコレステロールは細胞膜の形成に必須であると共に、脂肪酸が生理活性物質として重要な役割を担い、さらにシグナル伝達にも深く関与する可能性も最近示唆されてきている。炭素数の少ない脂肪酸は水溶性であるが、炭素数12個以上の長鎖脂肪酸は不溶性である。よって長鎖脂肪酸が細胞内を移動してその機能を発揮するには、長鎖脂肪酸と結合して、これを可溶化する脂肪酸結合タンパク（fatty acid binding proteins FABPs）が必須である。FABP分子ファミリーは分子量約14kDaの低分子量細胞内タンパクで、これまでに哺乳類で12種の分子種が同定されており、各々が最初に分離された組織・器官の名を冠して心臓型（H）、脳型（B）、表皮型（E）、脂肪細胞型（A）などに命名されている。一般に、分離同定されたタンパク質の機能を理解するには先ずそれらの組織細胞内局在の知見が必須である。この点に関してFABPsについては我々（近藤研究室）による解析結果が国内外の他の研究グループに比して圧倒的大いなる寄与をしてきた。しかし、FABPsの発現局在に関して視・聴・嗅覚の感覚器系および腸免疫での知見は未だ無い。

### 2. 研究の目的

脂肪酸結合タンパク FABPs 各分子種の発現局在を視・聴・嗅覚の感覚器系および腸免疫の場において細胞レベルで解明する。併せて、表皮角化細胞での E-FABP の機能と脳における H-FABP の機能についても、これまでの我々の成果を基に更なる解明に努める。

### 3. 研究の方法

成熟雄マウスを型の如く4%パラホルムアルデヒド還流固定をして、網膜と内耳および腸

を摘出して免疫組織化学的解析に処する。内耳の場合は摘出する前に4%EDTA液で頭蓋骨の脱灰をする。光照射による網膜組織反応を調べるには3500-7000lux7時間照射後にコントロール環境（-200lux）に戻して継時的に組織採取する。内耳へのFABPの機能的意義を調べる目的で既に自作のE-FABP遺伝子ノックアウトマウスに型の如く聴力検査を実施した。免疫組織化学解析に用いた抗体はE-, B-, H-, A-のFABP、calretinin, GFAP, CaKIV, F4/80, Iba1, PKC $\alpha$ , peanut agglutinin lectin, NKM16-2-4, CD11c, GL7, CD4, B220, LAMP2,  $\alpha$ SMAであり、主としてDAB法（光顕と電顕）と蛍光法（光顕）で解析した。表皮角化細胞の解析には免疫組織化学法に加えて、ノーザンブロット、インムノブロット、DNAアレイ、BrdU標識実験、各種脂肪酸含量の生化学的定量解を型の如くの方法に従って実施した。

### 4. 研究成果

網膜では錐体型視細胞がB-FABP、アマクリン細胞と双極細胞と水平細胞がH-FABP、神経節細胞がE-FABPを、内在性ミクログリアがA-FABPを細胞特異的に発現局在させていることを明らかにした。ミュラー細胞にはE-FABP免疫反応が弱く検出されたが同遺伝子欠損マウスの網膜でも同様に見いだされるので、他者の報告と異なりミュラー細胞はE-FABPを発現しないと結論づけた。光照射による網膜変性過程において、照射後1日をピークにA-FABP陽性ミクログリアが数を若干増加させ微細突起を伸長させるが照射後4日ではほぼ正常に戻ることが検出された。対照的に、照射後1日から網膜外境界近傍にE-FABP強陽性で大型の細胞体と放射状突起を持つ細胞が出現して数を増し、照射後4日では著しくその数と突起伸長を増加させて網膜全層（外側により多い）に出現分布し、以後漸

次減少して照射後1週間では正常時よりは多数だが激減していた。その細胞形状と免疫二重染色と数増減と分布特性から E-FABP 陽性細胞は網膜変性に伴い侵入した外来性マクロファージと同定した。従来、神経系において変性過程で内在性ミクログリアと外来性マクロファージの関与は知られているが、両細胞種の分別同定は困難であった。本研究で A-, E-FABP 抗体により明瞭に両細胞腫を分別同定出来たことは、広く中枢神経系における両細胞腫の変性過程への関与の詳細がより明らかになる契機を提供すると考えられる。

内耳の蝸牛管では H-FABP が内外柱細胞と外指節細胞に発現し、B-FABP が境界細胞とヘンセン細胞およびラセン板縁とラセン隆起の線維芽細胞に発現局在した。これらは全て支持細胞の一種であるが、内外の有毛細胞はいずれの FABP をも発現しなかった。内耳の支持細胞がいくつかの生理活性分子を発現することは最近報告されている。ある種のチャンネルに加えてシクロオキシゲナーゼがヘンセン・ダイテルス細胞に、プロスタノイド受容体が指節細胞とヘンセン細胞とラセン靭帯線維芽細胞に発現することが報告され、これらは細胞内や膜の脂肪酸を含む脂肪代謝関連分子と関係が深い。また、内耳の支持細胞は非哺乳類では有毛細胞の幹細胞であることが最近報告され、内耳での B-FABP 遺伝子発現が COUP-TF1 転写因子で制御されることも報告されている。哺乳類脳では B-FABP がグリア細胞に発現し、海馬ではニューロンとグリアの幹細胞とみなされるラジアルグリアに B-FABP が発現することも知られている。よって、今回明らかにされた内耳支持細胞に B-, H- の FABP が発現することは、脂肪酸を含めた細胞内脂肪環境が聴覚受容の有毛細胞の機能に影響を与える可能性を十分に示唆する。しかし、本研究で予備的に B-, H-FABP 遺伝子ノックアウトマウスでの型の如くの聴覚テストでは未だ明確な異常は検出されなかった。今後は検出条件と刺激条件を種々変えて何らかの聴覚障害の有無を調べる予定である。

研究主題とした感覚器における FABP 機能の解析に加えて、本研究では免疫系として腸パイエル板と末梢リンパ節での FABP の局在および皮膚表皮角化細胞での機能的解析をも遂行した。

腸パイエル板部では E-FABP が上皮下円蓋と濾胞と濾胞間領域に局在する殆どの樹状細胞、および、胚芽中心の殆どのマクロファージ、そして濾胞を覆う上皮の全ての M-細胞に発現することを免疫電顕法を含めて明確に示した。消化管粘膜での免疫反応を担う場であるパイエル板とその関連構造において、内腔に露出する M-細胞と上皮直下の樹状細胞・マクロファージが統一的に同じ FABP 分

子種を発現することは、その分子ないしリガンドである脂肪酸がこの場での免疫反応に重要な機能（我々が既報の脾臓樹状細胞におけるインターロイキン 15 を介するシグナル伝達による可能性も含め）を担うことを強く示唆する。と同時に、E-FABP 抗体がこの腸免疫の場を顕微鏡下で容易に同定する安定的検出子として有用であることが示された。

リンパ節では平滑筋アクチン (αSMA) 免疫陽性の網状細胞（リンパ節特有の線維芽細胞の一種で T 細胞領域の基質網状構築を維持する）に B-FABP が発現局在することを明らかにした。B-FABP 遺伝子ノックアウトマウスのリンパ節では CD4+細胞の割合が有意に上昇していた。この所見から、網状細胞は単に構造支持機能だけでなく、この細胞における B-FABP とそのリガンド FA とが究極的に T 細胞ホメオスターシス維持に何らかの関与をすることを強く示唆する。

正常表皮角化細胞は E-FABP を強く発現し、皮膚創傷や Psoriasis ではその発現が過剰になる。E-FABP 遺伝子ノックアウトマウスの角化細胞では分化特異タンパクである keratin-1, involucrin, loricrin の発現減少が検出された。keratin-1 はリノール酸誘導体の 13-HODE で誘導され、この誘導は NF-κB 活性上昇を伴うことが知られている。この遺伝子ノックアウトの角化細胞では 13-HODE 発現と NF-κB 誘導が低下していた。リノール酸減少が 13-HODE の減少となりそれが NF-κB 誘導低下で keratin-1 の発現低下となる結果、角化細胞分化異常となるのが Psoriasis への FABP 関与機構であることを明らかにした。

## 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 5 件)

1. Saino-Saito S, Nourani RM, Iwasa H, Kondo H, Owada Y (2009) Cell Tiss Res 338(2):191-201.
2. Suzuki R, Nourani MR, Saino-Saito S, Kondo H, Owada Y(2009)Histochem Cell Biol 132(6):577-584
3. Saino-Saito S, Suzuki R, Tokuda N, Abe H, Kondo H, Owada Y(2010) Ann Anat 192(4)210-214
4. Tokuda N,他 7 名と Kondo H (2010) Histochem Cell Biol 134(5):445-452
5. Ogawa E 他 11 名と Kondo H (2011) J Invest Dermatol 131(3):604-612
6. Motohashi K 他 4 名と Kondo H (2009) Yakugaku Zasshi 129(2)191-195

[学会発表] (計 0 件)

〔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 齋野幸子

(サイノサチコ)

東北文化学園大学客員教授 医療福祉学部

研究者番号：50312559

(2) 研究分担者 近藤尚武

(コンドウヒサタケ)

東北文化学園大学教授 医療福祉学部

研究者番号：20004723

(3) 連携研究者 大和田祐二

(オオワダユウジ)

山口大学大学院医学系研究科 教授

研究者番号：20292211