

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06624

研究課題名（和文）ペルオキシソーム動態の視床下部機能維持における役割と作用機構の解明

研究課題名（英文）The role of peroxisomal dynamics in hypothalamic functions

研究代表者

杉浦 歩 (Sugiura, Ayumu)

順天堂大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70784974

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：視床下部の代謝中枢としての機能維持には神経幹細胞やその神経新生の維持が重要である。本研究課題は個体代謝調節の中枢である視床下部弓状核に注目し、ペルオキシソーム動態の視床下部機能維持における役割と作用機構を解明することを目的とした。神経幹細胞と考えられているタニサイトを中心に視床下部におけるペルオキシソームを解析した。マウス脳凍結切片を用いたin vivo、初代培養細胞を用いたin vitro双方の結果より、ペルオキシソームが突起や軸索も含めて、広く分布していることが観察された。また、正常な分布には正常な機能が必要であることも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、視床下部と代謝性や加齢性疾患の関係が徐々に明らかになりつつある。しかし、糖や脂質の実際の代謝の場であるオルガネラ、特にペルオキシソームの視床下部における応答については十分な理解は得られていない。本研究ではペルオキシソームの基本的な分布や局在や機能との関連を解析した。この成果を基盤とし、個体の恒常性維持機構におけるオルガネラ応答の理解や、加齢や肥満性の代謝性障害機構の解明や治療応用、基礎生物学や医学研究の発展に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The maintenance of neural stem cells and their neurogenic potential is important to maintain the function of the hypothalamus as a metabolic center. This research project focused on the hypothalamic arch nucleus, the center of individual metabolic regulation, and aimed to elucidate the role and mechanism of action of peroxisomal dynamics in the maintenance of hypothalamic function. We analyzed peroxisomes in the hypothalamus, focusing on tanycytes, which are considered as neural stem cells. Both in vivo using frozen sections of mouse brain and in vitro using primary cultured cells, it was observed that peroxisomes are widely distributed, including projections and axons. The results also suggested that normal peroxisomal distribution requires normal function.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ペルオキシソーム 視床下部 神経幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソームは真核生物のほぼ全ての細胞に存在する、脂質二重膜に囲まれた細胞内代謝に重要なオルガネラである。その機能のうち脂肪酸の $\beta$ 酸化と過酸化水素の分解は生物種、組織によらず保存されているが、脂質やアミノ酸の合成や分解などの機能は多様性を持つ。細胞内ペルオキシソーム代謝活性はその数によって調節され、細胞内・外の環境に応じダイナミックに変化する。主に既存のペルオキシソームからの成長・分裂により数を増やすが、細胞内膜構造から新たに形成される *de novo* 合成経路も存在する。障害を受けたペルオキシソームはペルオキシソーム特異的オートファジー（ペキソファジー）などにより分解される。ペルオキシソームの機能と動態は相互に制御されており、代謝装置としての正常な機能を発揮するためにはその動態が重要である。ペルオキシソーム動態の制御因子の変異は、機能的ペルオキシソームやペルオキシソーム構造自体が欠如するペルオキシソーム形成異常症を引き起こす。特に重篤な Zellweger 症候群では、多臓器不全を引き起こし乳児期早期に死亡する。ペルオキシソームの個体における重要性はこのようなペルオキシソーム形成異常症由来の患者サンプルやモデル動物を使った研究によって、個体発生・分化の初期における役割は明らかにされつつあるが、正常な個体におけるストレスや加齢におけるペルオキシソームの役割は未だに不明な部分が多く残されている。

視床下部は複数の神経核からなり、末梢からのシグナルの受容や脳脊髄液成分を感知して応答することにより個体の恒常性維持の中核として機能している。基底部に位置する弓状核は食欲や性行動を調節しており、神経細胞やグリア細胞に加えて神経幹細胞が存在し、成体脳における神経新生が起こる領域の一つでもある。成体の視床下部における新生神経の起源であると考えられているタニサイトは第三脳室に面した側壁を構成している。タニサイトは自己増殖能や神経細胞への分化能といった神経幹/前駆細胞（以下幹細胞）様の機能に加え、第三脳室の脳脊髄液中の栄養素を感知し、代謝産物などをシグナルとして神経細胞へと伝達し、視床下部の機能維持や調節において重要な役割を担っている。高脂肪食摂餌や加齢などのストレス下において、弓状核の機能低下や神経幹細胞数、神経新生の減少が観察されており、視床下部と代謝性や加齢性疾患の関係が徐々に明らかになりつつある。しかし、糖や脂質の実際の代謝の場であるオルガネラ、特にペルオキシソームの視床下部における応答については十分な理解は得られていない。

## 2. 研究の目的

本研究課題は個体代謝調節の中核である視床下部弓状核に注目し、ペルオキシソーム動態の視床下部機能維持における役割と作用機構を解明することを目的とした。

近年のイメージング技術等の発展により、オルガネラ間の直接的な接着の解析が進み、その細胞生物学的意義や分子機構が明らかになってきており、オルガネラ生物学は複数のオルガネラを包括的に理解しようとする新時代を向かえつつある。ペルオキシソーム、ミトコンドリア、小胞体は細胞内を動的に動く細胞内代謝の中心的オルガネラで、代謝経路や形態制御因子など多くの共通点を有する。特にペルオキシソームとミトコンドリアは脂質の酸化や活性酸素種の除去などの機能に加え、転写因子、形態制御、オートファジー、自然免疫シグナル伝達など多くの分子機構も共有しているが、その相互制御については十分な理解が得られておらず、オルガネラネットワークの構成員としてのペルオキシソームの役割は

未知な部分が多く残されている。本研究課題ではマウス個体や初代培養細胞系を用いてペルオキシソーム動態を解析し、その分子機構や意義を個体レベルの組織機能維持機構にまで発展させることを目指しており、学術的独自性と創造性は高いと考えている。

### 3. 研究の方法

視床下部の代謝中枢としての機能維持には神経幹細胞やその神経新生能の維持が重要である。本研究課題では、視床下部の神経幹細胞と考えられているタニサイトを中心に視床下部におけるペルオキシソーム動態をマウスや初代培養細胞を用いて解析し、その役割や作用機構の解明を目指した。

#### (1) 視床下部弓状核におけるペルオキシソームの局在・形態の同定

視床下部のタニサイトにおけるペルオキシソームの局在や形態はほとんど不明である。マウス脳より凍結切片を作製し、各細胞種マーカーやオルガネラマーカー、ペキソファジーマーカーに対する抗体を用いて免疫組織蛍光学的に解析し、ペルオキシソームの局在や形態を同定した。

#### (2) 視床下部由来初代培養細胞におけるペルオキシソームの局在・形態の同定

研究代表者らは先行研究において、マウス視床下部から単離したタニサイトや神経幹細胞塊を培養・維持する初代培養系を確立した。この系を用いて、種々の条件下における細胞の増殖能や神経細胞への分化能を評価した。さらにペルオキシソームをライブセルイメージングや免疫蛍光染色法などにより観察し、神経幹細胞能とペルオキシソーム動態との関係性やその制御機構を解明することを試みた。

#### (3) ペルオキシソーム機能阻害が神経幹細胞能に及ぼす影響の解析

上記の実験系を用いてペルオキシソーム機能阻害やストレスモデル下での、ペルオキシソーム動態やタニサイト（神経幹細胞）の増殖・分化能を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1)(2) 視床下部弓状核および視床下部由来初代培養細胞におけるペルオキシソームの局在・形態の同定

本研究課題ではまず、視床下部におけるペルオキシソームの基本的な分布や形態を解析した。C57BL/6マウスより作製した脳凍結切片をペルオキシソーム膜タンパク質であるPMP70に対する抗体で免疫蛍光染色し、蛍光顕微鏡で局在や形態を観察したところ、PMP70陽性のペルオキシソームは脳内全域で広く分布していた（図1A上段）。タニサイトは視床下部の神経幹細胞とも考えられており、第三脳室に面した側壁を構成し、実質へと伸ばした突起を介して栄養シグナルの伝達を担っている。タニサイトにおけるペルオキシソームは細胞体・突起双方に広く分布していることが観察された（図1A下段、矢頭）。また、初代培養タニサイトにおいても同様に細胞体から突起まで広く分布しており、特に突起の先端部に多くのペルオキシソームが確認された（図1B）。神経幹細胞塊の培地中の成長因子を除くと、樹状突起や軸索を伸ばし神経細胞へと分化する。分化誘導後の神経細胞では細胞体と軸索中、軸索先端にペルオキシソームが観察された。一方で、樹状突起や軸索の分枝ではほとんどペルオキシソームは観察されなかった（図1C）。これらの結果より、ペルオキシソームが細胞体における代謝だけでなく、突起や軸索中での栄養シグナル伝達や局所的な代謝に関わっていることが示唆された。

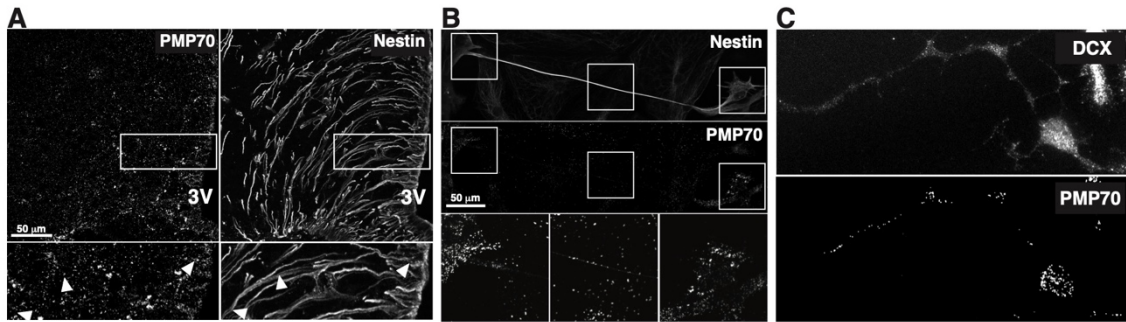


図1 各種細胞におけるペルオキシソームの局在

**A)** マウス脳視床下部の冠状切片。矢頭はタニサイト中のペルオキシソームを示す。PMP70: ペルオキシソームマーカー、Nestin: タニサイトマーカー、3V: 第三脳室。**B)** 初代培養タニサイト。**C)** 神経幹細胞塊から分化させた神経細胞。DCX: 神経細胞マーカー

### (3) ペルオキシソーム機能障害が神経幹細胞能に及ぼす影響の解析

#### <細胞機能における脂肪酸β酸化の役割>

近年、細胞分化過程においてミトコンドリアの数や分布、細胞内代謝シフトが起きることが明らかになってきている。しかし、これらの過程におけるペルオキシソームの局在や機能はほとんど解析が進んでいない。ペルオキシソームの形態制御因子や機能の多くはミトコンドリアと共有されていることから、ペルオキシソームも神経幹細胞の増殖や分化に関わっていることが予想される。これらのことを検証するために、ペルオキシソームにおけるβ酸化の律速酵素であるACOX1の阻害剤TDYA (10,12-Tricosadiynoic acid)、そのコントロールとして、ミトコンドリア脂肪酸β酸化阻害剤であるEtomoxir添加培地中での神経幹細胞の増殖や神経細胞への分化を解析した。それぞれの条件において、10 nM、100 nM、1 μMの3点の濃度で3日間経時的な観察を行なったが、これらの条件において脂肪酸β酸化阻害による変化は観察されなかった。つぎに、脂肪酸β酸化活性とペルオキシソームダイナミクスの関係を調べるために、TDYA存在下で3日間神経分化誘導処理した神経幹細胞塊のペルオキシソームを免疫蛍光染色により観察した。TDYA処理した細胞の細胞体ではコントロールと同様にペルオキシソームが広く分布していることが確認されたが、軸索中のペルオキシソームはコントロール処理群と比べて少なかった。これらの結果は、脂肪酸のβ酸化は神経細胞への分化には影響を与えないが、軸索へ輸送されるペルオキシソームは機能的な活性を持つことが必要であることを示唆している。

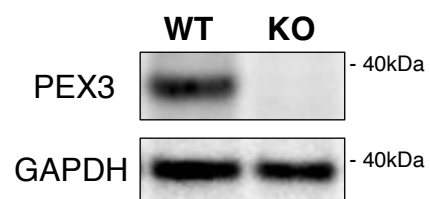
#### <ストレス応答>

神経幹細胞が存在している視床下部基底部の一部は第三脳室に面しており、脳脊髄液中のシグナルや栄養、ストレスに応答していると考えられている。高脂肪食摂餌下のマウス視床下部では第三脳室脳脊髄液中の遊離脂肪酸、特にパルミチン酸濃度が上昇し、炎症反応や、小胞体ストレス応答、神経細胞死など様々なストレス、あるいはオートファジーなどが誘導される。酸化ストレスなどで傷害を受けたペルオキシソームはペキソファジーで分解される。先行研究において高脂肪食摂餌マウスのタニサイトのペルオキシソームとオートファジーの関係を調べたところ、ペキソファジーマーカーの一つである p62/SQSTM1 とペルオキシソームの共局在が確認された。本研究課題では視床下部ストレスモデルとして、初代神経幹細胞の培養液中にパルミチン酸を添加し、増殖や神経細胞分化への影響、ペルオキシソームの局在および形態を免疫蛍光染色法により観察した。

p62/SQSTM1 は選択的オートファジーにおいて、ユビキチン化された基質とオートファゴソームのアダプタータンパク質として機能し、ペキソファジーの過程でペルオキシソームへの集積が観察される。パルミチン酸処理した初代培養タニサイトを各マーカーで免疫蛍光染色したところ、一部のペルオキシソームが凝集（クラスター化）していることが観察された。また、p62/SQSTM1 陽性構造の増加も観察され、一部のペルオキシソームと共局在を示した。次に細胞内ペルオキシソーム量をウェスタンブロッティングで生化学的に解析したが、形態学的な解析と同様に、ペルオキシソーム量の変化は確認されなかった。また、p62/SQSTM1 や LC3-II の増加がパルミチン酸処理細胞においてタンパク質レベルで確認された。一方で、Bafilomycin A1 処理によるリソソーム分解阻害下では、p62/SQSTM1 や LC3-II の増加はパルミチン酸処理により低下することから、パルミチン酸はオートファジーフラックスに対して抑制的に作用していることが示唆された。恒常的なペルオキシソーム分解の 70-80%がペキソファジーにより行われているという報告もあるが、本実験条件ではペキソファジーによるペルオキシソーム分解は確認されなかった。

#### <PEX KO 細胞の樹立>

ペルオキシソームはペロキシン（Peroxin, PEX）と呼ばれる一連の遺伝子群により構造と機能が維持されている。これら PEX 遺伝子の変異はペルオキシソームの一部の機能や構造異常を引き起こす。ペルオキシソーム欠損細胞は通常培養条件での培養が可能であり、野生型の原因遺伝子を発現させることで構造異常が回復する。このような実験系を用いてペルオキシソーム膜をダイナミックに変化させ、上記の結果で得られたペルオキシソーム凝集の分子機構を調べるために、ペルオキシソーム膜への新規結合タンパク質の同定を試みた。ゲノム編集等によりノックアウト細胞を取得し、目的遺伝子発現の消失をタンパク質レベルで確認した（図 2）。その後、ノックアウトされた遺伝子あるいはペルオキシソーム膜タンパク質に対する遺伝子をコードしたレンチウイルスを用いて、薬剤誘導性遺伝子発現安定細胞株を樹立した。ノックアウトされた遺伝子を発現誘導することによりペルオキシソームの構造異常が回復することを免疫蛍光染色により確認した。これらの細胞よりペルオキシソーム膜タンパク質を免疫沈降法により単離し、共沈降物を質量分析することにより結合タンパク質の同定を試みた。複数のノックアウト細胞と野生型細胞より得られた共沈降物を比較することで、非特異的結合タンパク質の排除を図り、制御因子候補を絞り込んだ。生物学的に独立した 2 回の実験により、膜動態の制御に関わる複数のタンパク質が候補因子として同定された。



**図 2 PEX3 KO 細胞の作製**  
HAP1 細胞 PEX3 ノックアウト (KO) をウェスタンブロッティングで確認した。

以上のように、本研究課題ではまずペルオキシソームの基本的な局在等を同定し、タニサイトの突起や神経軸索への分布から局所的な機能が予想された。今後は阻害剤やペルオキシソーム機能関連遺伝子の KO 細胞を用いた分子細胞生物学的な解析により、ペルオキシソーム動態の視床下部機能維持における役割と作用機構の解明を目指したい。これらの成果は、個体の恒常性維持機構におけるオルガネラ応答の理解や、加齢や肥満性の代謝性障害機構の解明や治療応用、基礎生物学や医学研究の発展の基盤となることが期待される。

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 515
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉浦 歩
2. 発表標題 小胞輸送でつながるミトコンドリアとペルオキシソーム
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉浦 歩、藤森 俊彦、岡崎 康司
2. 発表標題 発生過程におけるペルオキシソーム動態
3. 学会等名 第95回日本生化学会年会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------