

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15086

研究課題名（和文）視床下部タニサイトにおけるネクチン-1によるグルコース濃度の感知制御機構

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of glucose concentration sensing by nectin-1 in hypothalamic tanycytes.

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） 3,500,000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のうち、2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、老化過程におけるこれらの機能の制御機構は不明である。本研究では、2タニサイトで特異的に発現する細胞接着分子ネクチン-1に着目し、ネクチン-1がタニサイトの分化を抑制してその機能を維持し、その結果、摂食行動を制御する弓状核の神経細胞数の維持を制御していることが明らかになった。

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グルコース濃度感知機能と神経幹/前駆細胞機能がどのように制御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、ネクチン-1によるタニサイトの神経幹細胞機能の維持機構の一端を解明した。この機構はグルコース感知機構の解明にも繋がると考えられる。今後は、ネクチン-1による神経幹細胞機能の維持機構を明らかにする。これらの成果は、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で期待されるため、本研究の学術的意義や社会的意義は非常に高い。

研究成果の概要（英文）：The lifespan of various animals is prolonged by dietary restriction, but the regulatory mechanisms of aging and lifespan are largely unexplored. 2-Tanycytes, one of the tanycytes lining the lateral wall of the third ventricle of the hypothalamus, sense glucose concentrations in the cerebrospinal fluid and also have neural stem/progenitor cell functions in adults. It was recently reported that tanycytes are involved in extending murine lifespan, but it is unknown how tanycytes maintain these cell functions during aging. In this research project, I focused on one of the cell adhesion molecules nectin-1, which is specifically expressed in 2-tanycytes, and showed that nectin-1 inhibited tanycyte differentiation, maintaining their neural stem/progenitor cell function, which in turn regulates the maintenance of the number of neurons in the arcuate nucleus.

研究分野：細胞生物学

キーワード：老化 視床下部 弓状核 タニサイト グルコース感知 神経幹/前駆細胞 細胞接着分子 ネクチン

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとした様々な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が、個体の老化・寿命の制御機構の多くが未解明である。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る。グルコースはトランスポーター GLUT1/2 を介してタニサイトに取り込まれ、細胞内で ATP や乳酸に代謝される。これらの代謝物は視床下部の神経核のひとつである弓状核へと放出される。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。

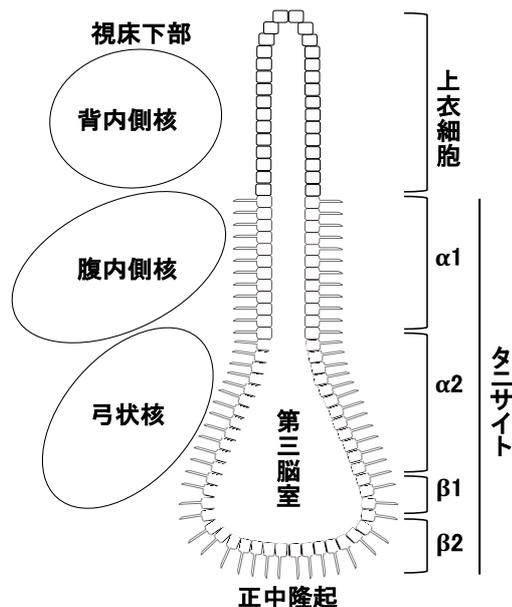


図1 視床下部タニサイト

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。また、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種類に分類されている(図1)。さらに、タニサイトは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おり、中でも  $\alpha 2$  タニサイトはグルコース感知機能の役割に加えて、神経幹細胞機能が高いことが知られている。

近年、視床下部は老化・寿命を司る上位中枢として注目されており、弓状核で産生される摂食制御ホルモンは老化や寿命と関連することが示されている。このホルモン産生制御には  $\alpha 2$  タニサイトの正常なグルコース感知機能と神経幹/前駆細胞機能が重要であるが、老化過程におけるこれらの機能の制御機構は不明である。

研究代表者はこれまでに研究活動スタート支援(20K22656)を受給し、 $\alpha 2$  タニサイトで特異的に発現する細胞接着分子ネクチン-1を同定した。ネクチン-1は細胞間の接着だけでなく、細胞内シグナル伝達制御など多彩な役割を持つ。そこで本研究では、ネクチン-1が  $\alpha 2$  タニサイトの領域特異的なグルコース感知機能と神経幹細胞機能を制御すると予想し、実験を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究では、 $\alpha 2$  タニサイトで特異的に発現する細胞接着分子ネクチン-1に着目し、 $\alpha 2$  タニサイトのグルコース感知機能と神経幹細胞機能の制御機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウスの作成と組織染色

ネクチン-1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、タモキシフェン投与により、任意の時期からネスチン陽性細胞でネクチン-1を欠損させることができる N1 cK0 マウスを作成した。さらに、N1 cK0 マウスと CreERT2 により tdTomato を発現する Ai9 マウスを交配し、N1 cK0; Ai9 マウスを作成した。

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ネクチン-1を欠損させた。投与開始から任意の時期に灌流固定して脳切片を作製し、各抗体を用いて組織染色を行った。

#### (2) 初代培養タニサイト

生後14日目の野生型マウスから視床下部を取り出し、血清入り培地で T75 flask にて培養した。細胞がコンフルエントに近い状態から一晚振盪し、T75 flask の底面に残った細胞を24ウェルプレートに撒き直した。同時に siRNA をトランスフェクションし、24時間後に無血清培地に入れ換えた。培地交換から2日目にウエスタンブロット用のサンプルを作製し、5日目に免疫染色用に細胞を固定して各抗体を用いて免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 視床下部において、ネクチン-1は $\alpha 2$ タニサイトの他に、正中隆起へ投射する神経軸索にも発現していた。成体における $\alpha 2$ タニサイトのネクチン-1の機能を検討するために、N1 cKOマウスの8週齢からタモキシフェンを5日間連続で投与したところ、投与開始から2週間後以降では $\alpha 2$ タニサイトのネクチン-1の発現が顕著に減少していた。一方で、正中隆起のネクチン-1のシグナルは変化していなかった。したがって、N1 cKOマウスに8週齢からタモキシフェンを投与することで、視床下部では $\alpha 2$ タニサイト特異的にネクチン-1を欠損させることができることが明らかになった。

(2) ネクチン-1欠損時に $\alpha 2$ タニサイトからの増殖と分化が変化するか検討するため、N1 cKO; Ai9マウスにタモキシフェンを投与し、投与から2週間後と4週間後に灌流固定して脳切片を作製し、tdTomatoをRFP抗体で検出して神経細胞マーカーNeuNと共染色した。ネスチンは神経細胞やアストロサイトでは発現していないため、タモキシフェン投与後にタニサイトはRFP陽性となるが、神経細胞やアストロサイトはRFP陰性である。もし、タモキシフェン投与後にRFP陽性のタニサイトから神経細胞へ分化した場合、その神経細胞はRFP/NeuNが二重陽性となると考えられる。この仮定に基づいて検討したところ、タモキシフェン投与から2週間後には、floxをホモで持つN1 cKOマウスでは、floxをヘテロで持つコントロールより、弓状核、腹内側核、背内側核でRFP/NeuN二重陽性細胞が増加し、タモキシフェン投与から4週間後には、その数がさらに増加していた。これらの結果から、タニサイトのネクチン-1の欠損により、タニサイトから神経細胞への分化が促進されることが明らかになった。また、N1 cKOマウスでは、タモキシフェン投与後にアストロサイトマーカーS100 $\beta$ とRFPの二重陽性細胞も認められ、タニサイトからアストロサイトへも分化していることも明らかになった。

(3) ネクチン-1の欠損によりタニサイトの増殖が変化するか検討するため、N1 cKOマウスにタモキシフェンを投与し、投与から2週間後に灌流固定して脳切片を作製し、細胞周期マーカーを染色した。N1 cKOマウスでも細胞周期マーカーであるKi67やリン酸化ヒストンH3(S10)は変化しなかった。これらの結果から、ネクチン-1はタニサイトの分化のみを抑制し、細胞増殖には関与しないことが明らかになった。

(4) *In vitro*でネクチン-1によるタニサイトの分化抑制機構を詳細に解析するために、初代培養タニサイトの実験系を導入した。生後14日目の野生型マウスから視床下部を取り出し、血清入り培地でT75 flaskを用いて培養した。細胞がコンフルエントに近い状態から一晩振盪して、T75 flaskの底面に残った細胞を24ウェルプレートに撒き直し、24時間後に無血清培地に入れ換えた。培地交換から2日後に細胞を固定して免疫染色すると、多くの細胞でタニサイトのマーカーであるビメンチンやネスチンが陽性であった。一方、神経細胞マーカーTuj1やアストロサイトマーカーGFAPが陽性の細胞は少なかった。GFAPは $\alpha 1$ タニサイトでも発現しているため、この培養系では主に $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ の細胞集団を培養できることが明らかになった。

(5) この培養系を用いてネクチン-1をノックダウンできるかを検討した。24ウェルプレートに細胞を撒くと同時にsiRNAをトランスフェクションし、24時間後に無血清培地に入れ換えた。培地交換から2日目に細胞を回収してサンプルを調製し、ウェスタンブロットを行ったところ、培地交換から2日目でネクチン-1のタンパク質量は顕著に減少していた。この結果から、初代培養タニサイトにおいてネクチン-1をノックダウンできることが明らかになった。

(6) この実験系でネクチン-1をノックダウンすることでタニサイトから神経細胞への分化が増加するか検討した。培地交換から5日目に細胞を固定し、免疫染色を行った。その結果、ネクチン-1 siRNAをトランスフェクションした細胞では、コントロールsiRNAと比較してTuj1陽性の細胞数が顕著に増加していた。これらの結果から、*in vitro*においてもネクチン-1はタニサイトの神経細胞への分化を抑制していることが明らかになった。

(7) タニサイトのネクチン-1を長期に欠損させた時の影響を検討するため、N1 cKOマウスを長期に飼育した。その結果、タモキシフェン投与から4週間後では弓状核の神経細胞数が増加したのに対し、12週間後以降では逆に神経細胞数が減少していた。したがって、タニサイトのネクチン-1は弓状核の神経細胞数の維持に必要であることが明らかになった。

以上の結果から、 $\alpha 2$ タニサイトのネクチン-1は、タニサイトの分化を抑制してその神経幹細胞機能を維持し、その結果弓状核の神経細胞数の維持を制御していることが明らかになった(図2)。

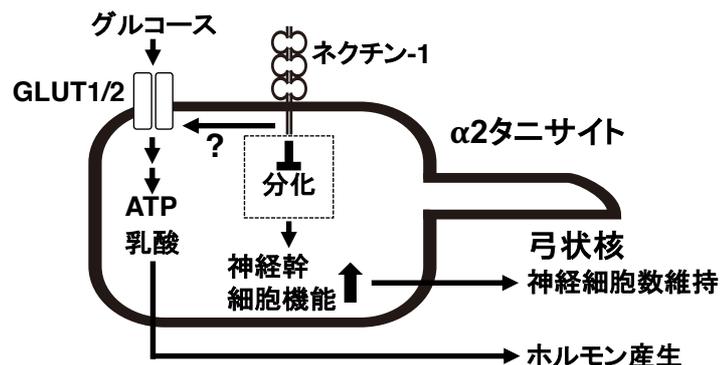


図2  $\alpha 2$ タニサイトにおけるネクチン-1の役割

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------