

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792018

研究課題名（和文）網膜ミュラー細胞における脂肪酸β酸化系の存在意義に関する研究

研究課題名（英文）The role for fatty acid β-oxidation system in retinal Müller cell.

研究代表者

厚沢 季美江 (ATSUZAWA KIMIE)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：60387727

研究成果の概要（和文）：本研究は、網膜ミュラー細胞・神経節細胞の2種の培養細胞の栄養代謝能を、脂肪酸β酸化を中心に調べることを目的とした。ミュラー細胞の初代培養系の確立に時間を要したが、ほぼ純粋な培養系を確立できた。遺伝子発現解析、酵素蛋白検出といった実験により、ミュラー細胞に脂肪酸β酸化能とケトン体代謝能が存在することが示された。神経節細胞の純粋培養は困難で、代替として大脳神経細胞の初代培養系を用いて特性を調べた結果、神経細胞は極わずかの脂肪酸β酸化能を持つことが確かめられた。これらの結果は、網膜のエネルギー産生機構について新しい知見を提示できると考えている。論文として発表準備中である。

研究成果の概要（英文）：The nutrient metabolism of Müller cell and retinal ganglion cell of the retina, fatty acid β-oxidation system in particular, was attempted by biological and morphological studies. All the enzymes examined were shown to be present in the cultured retinal Müller cell by immunofluorescent microscopy. Because of difficulty with establishment of the culture system of retinal ganglion cells, primary cultured hippocampal neuron and astrocytes were attempted alternatively. Mature neurons contain relatively small amount of fatty acid β-oxidation enzymes as that of the liver tissue. The present results are helpful in elucidating the energy production system in the retina.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸β酸化系は、エネルギー産生に加え脂肪酸の細胞傷害に対する解毒機能として重要である。網膜を含む中枢神経系は全身組織の中で例外的に、脂肪酸β酸化能がないと言われてきた。代表者は網膜における脂肪酸β酸化系酵素群の網羅的な解析により、意外なことに網膜 Müller 細胞は、定説に反して脂肪酸β酸化能を有し、一方、神経細胞は脂

肪酸β酸化能を持たない可能性を示した。また、脂肪酸β酸化酵素の欠損症においては網膜色素変性症が出現することが知られており、脂質代謝異常が糖尿病性網膜症の一因であると推定されている。これらの疾患の病態解明においては、網膜における脂肪酸β酸化能の詳細な知識が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では Müller 細胞と網膜神経細胞の脂肪酸β酸化系能の詳細を解明し、2者の相互関係を脂肪酸代謝の視点から明らかにする。つまり、「Müller 細胞はエネルギー源として脂肪酸を代謝する。その代謝産物を網膜神経細胞に渡し養う。」この仮説を証明し、さらに脂肪酸β酸化が関与する可能性のある原因不明の網膜疾患の病態解明の基盤とすることを目的とする。「血液網膜関門の内側に位置している網膜という微小領域で、栄養代謝において実質細胞と支持細胞の2者の協力関係が成立している」ことを作業仮説として、それらの細胞における脂肪酸β酸化系の機能差が持つ意義を明らかにし、視機能を支えるエネルギー産生機構を解明したい。

3. 研究の方法

材料：初代培養細胞（網膜 Müller 細胞、網膜神経節細胞、大脳神経膠細胞、大脳神経細胞）

方法：網羅的代謝解析

(1) 抗体による酵素蛋白質の検出：代謝系全酵素の網羅的解析（抗体アレイ）

① 蛍光抗体法

② Western blot 法

(2) 遺伝子発現の検出：DNA microarray による網羅的な遺伝子発現の定量

(3) 代謝能の測定：タンデム MS による in vitro probe assay：ブドウ糖・遊離脂肪酸フリーの培地に基質であるカルニチンと脂肪酸を添加し一定時間培養した後、培養上清に含まれる脂肪酸の代謝産物をタンデム質量分析装置で解析して、代謝機能を測定する。

4. 研究成果

(1) Müller 細胞

① 初代培養系の確立：生後 2 日齢のラット網膜を用いて Müller 細胞の初代培養を行った。播種する細胞の密度によって培養される細胞の種類・形態が異なり、密度が高いと神経細胞と Müller 細胞が重層して生育した(図 1)。Müller 細胞のみの純粋培養を実現するために、ディッシュのコート・継代の有無等の検討を行い、Müller 細胞のマーカであるグルタミン酸合成酵素 (GS)、GFAP、vimentin の免疫染色で評価したところ、コートなしのディッシュに細胞を播種し、継代を 1 回行うことにより、それらのマーカが染色陽性のほぼ純粋な Müller 細胞の培養系を確立できた(図 2)。

② 不死化細胞の作製：SV40 大型 T 遺伝子の導入により不死化細胞の作製を試みたが、十分な成果が得られなかったため、現在も継続

して実験中である。

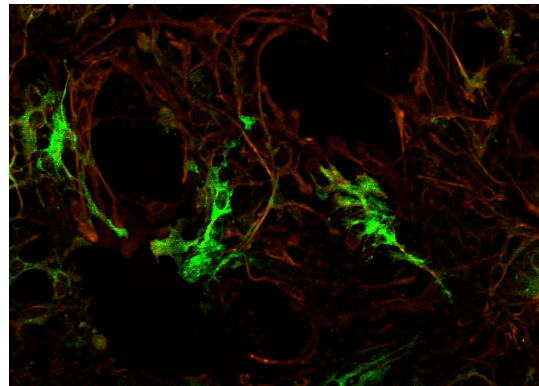


図 1) 高密度培養の Müller 細胞の免疫染色。緑：GS, 赤：GFAP

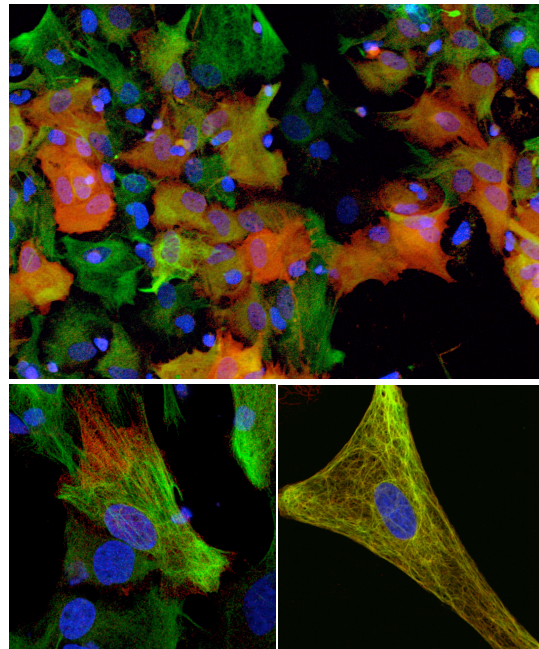


図 2) 低密度培養の Müller 細胞の免疫染色。上) 赤：GS, 緑：GFAP、左下) 赤：GS, 緑：GFAP、右下) 赤：Vimentin, 緑：GFAP

③ 蛍光抗体法：脂肪酸β酸化系酵素を蛍光抗体法で染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Müller 細胞のマーカとして GS を用いた。いずれの酵素も GS 陽性の Müller 細胞において陽性となり、培養 Müller 細胞に脂肪酸β酸化系酵素が局在することが確かめられた(図 3)。

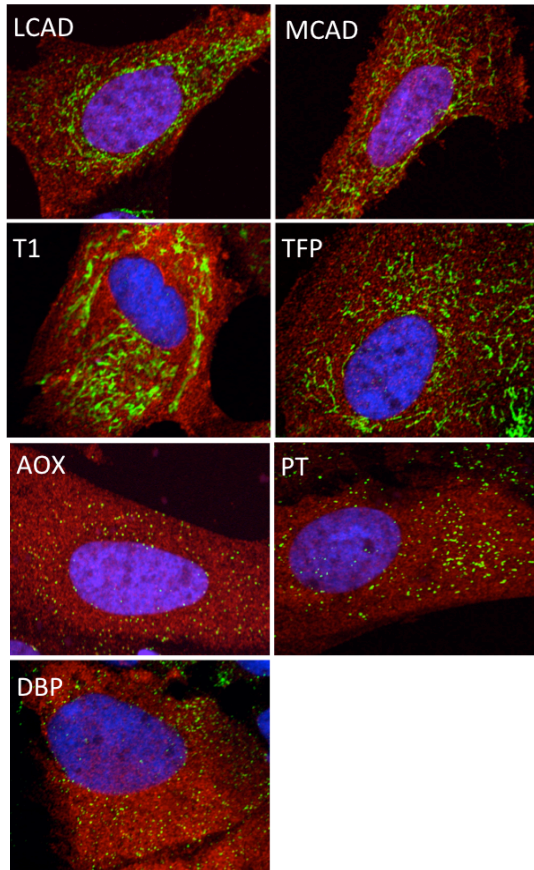


図3) 免疫染色した培養 Müller 細胞の共焦点レーザー顕微鏡像。

④ Western blot 法: 代表的な脂肪酸β酸化系酵素について Western blot を行った。シグナル濃度を対照の肝臓組織と比較すると、培養 Müller 細胞では蛋白発現量は肝臓の1/10程度であることが確かめられた(図4)。



図4) Western blot 法による酵素蛋白の検出。
L: 肝臓、泳動蛋白量: T1 0.1μg; AOX 0.5μg、
M: 培養 Müller 細胞、泳動蛋白量 2μg

(2) 網膜神経節細胞

① 初代培養系: 材料として初代培養を試みたが、網膜神経節細胞を選別する際に神経突起が切れてしまい、培養系へ移すことは困難であった。そのため、代替として大脳より採取した神経細胞と神経膠細胞の初代培養を

行い、実験を進めた。

(3) 大脳神経細胞、大脳神経膠細胞

① 初代培養系: 培養が困難であった網膜神経節細胞の代替として、初代培養系がすでに確立できていた胎生 19 日齢のラット海馬を用いて神経細胞の初代培養を行い、材料とした。神経細胞のマーカである MAP2 の免疫染色によりほぼ純粋な神経細胞の培養系であることを確認した。さらに網膜における神経膠細胞の比較対象として、初代培養系の確立していた大脳神経膠細胞を材料として実験を進めた。

② 蛍光抗体法: 脂肪酸β酸化系酵素を蛍光抗体法で免疫染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。神経細胞のマーカとして MAP2、神経膠細胞のマーカとして GFAP を用いた。神経膠細胞においては全ての酵素について染色陽性であったが(図5)、神経細胞は染色陰性であった(図6)。

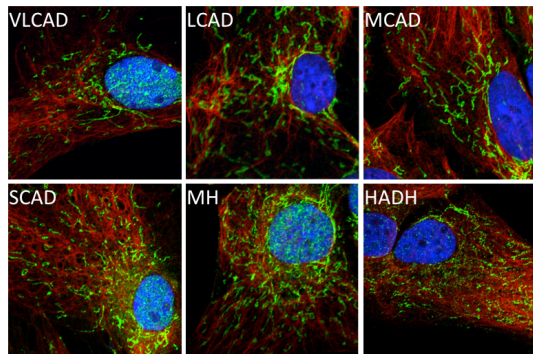


図5) 免疫染色した培養神経膠細胞の共焦点レーザー顕微鏡像。

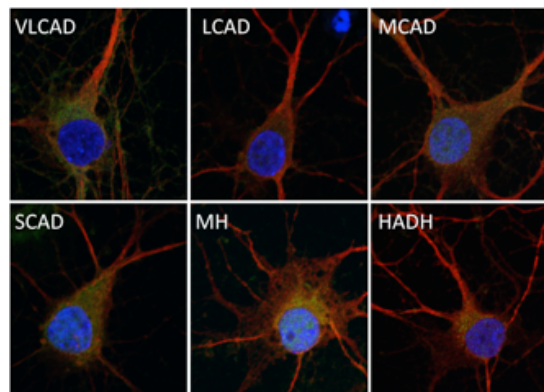


図6) 免疫染色した培養神経細胞の共焦点レーザー顕微鏡像。

③ Western blot 法: 脂肪酸β酸化系酵素について Western blot を行い、定量的に解析した。対照の肝臓組織と比較すると、神経膠細胞では蛋白発現量は肝臓の 1/10 程度、神経細胞では 1/20 程度であることが確かめられた (図 7)。

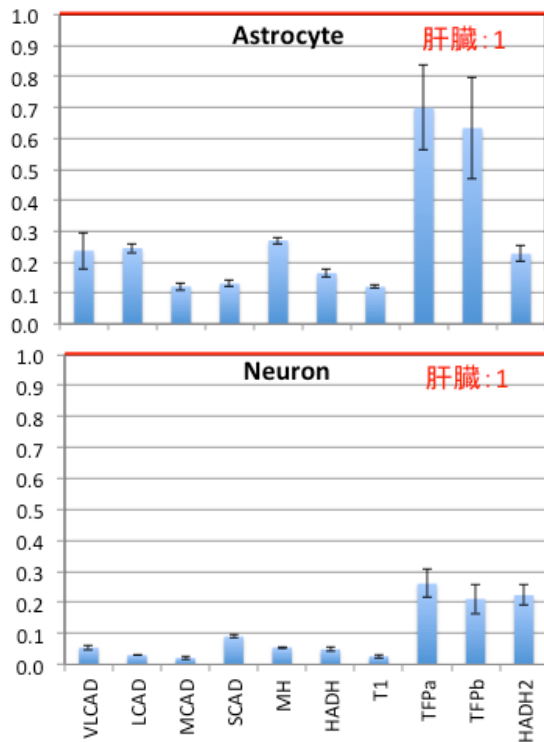


図 7) 定量的 Western blot 法による酵素蛋白の検出。肝臓を 1 としたときの酵素蛋白発現量。上: 神経膠細胞、下: 神経細胞。

④ DNA microarray: 脂肪酸β酸化系酵素の遺伝子発現を網羅的に調べた。対照の肝臓組織と比較すると、遺伝子発現量は神経膠細胞では肝臓の 1/10 程度、神経細胞では 1/20 程度であることが確かめられた (図 8)。

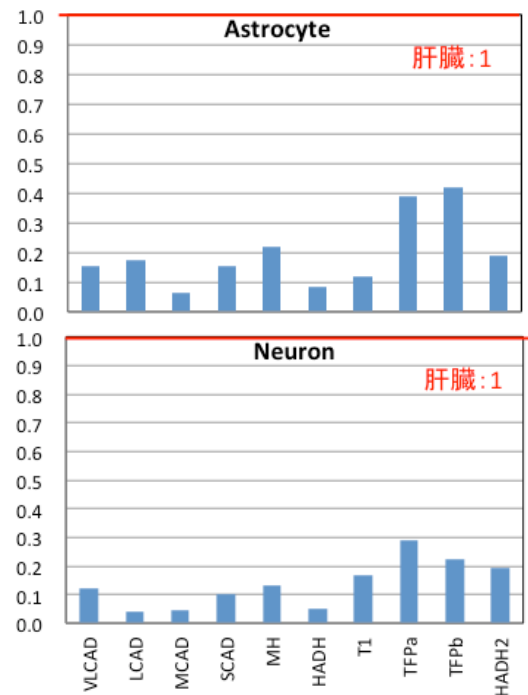


図 8) DNA microarray による酵素蛋白遺伝子発現の検出。肝臓を 1 としたときの遺伝子発現量。上: 神経膠細胞、下: 神経細胞。

⑤ in vitro probe assay: パルミチン酸 (C16) を添加した培地中で 96 時間培養した後、培養上清に含まれる脂肪酸の代謝産物濃度を測定した。神経膠細胞、神経細胞ともに添加した脂肪酸がアセチルカルニチン (C2) に代謝されていることから、両者が脂肪酸β酸化能を持つことが示された (図 9)。

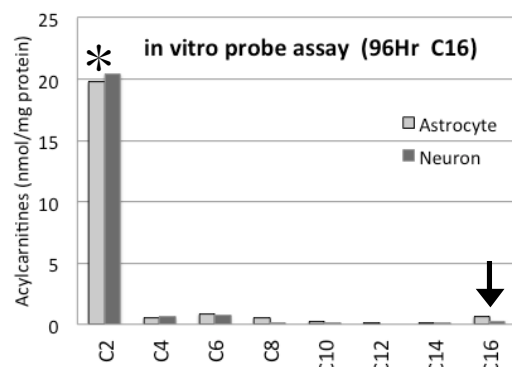


図 9) in vitro probe assay による培地中アセチルカルニチン濃度の測定。添加したパルミトイルカルニチン (矢印) がアセチルカルニチン (*) に代謝されている。

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 Takao K, Atsuzawa K 他 27 人中 13 番目、
Deficiency of Schnurri-2, an MHC Enhancer
Binding Protein, Induces Mild Chronic
Inflammation in the Brain and Confers
Molecular, Neuronal, and Behavioral
Phenotypes Related to Schizophrenia.
Neuropsychopharmacology. 2013, in press.
査読有. DOI: 10.1038/npp.2013.38
- ② Osuka K, Atsuzawa K 他 8 人中 4 番目、
Activation of Ras/MEK/ERK signaling in
chronic subdural hematoma outer membranes.
Brain Res. 2012 ;1489:98-103.査読有.
DOI: 10.1016/j.brainres.2012.10.013

[学会発表] (計 8 件)

- ① 厚沢季美江 他、ミトコンドリア脂肪酸 β
酸化系酵素の初代培養細胞における免疫組
織化学と in vitro probe assay による解
析、第 118 回日本解剖学会全国学術集会、
2013 年 3 月 28 日、高松
- ② 厚沢季美江 他、培養網膜ミューラー細胞の
免疫組織化学、第 72 回日本解剖学会中部支
部学術集会、2012 年 10 月 13 日、岐阜
- ③ 厚沢季美江、追加発言：ミトコンドリア
の臓器差-網膜の免疫組織化学- (シンポジ
ウム)、第 117 回日本解剖学会全国学術集会、
2012 年 3 月 26 日、甲府
- ④ 厚沢季美江 他、組織内「微小環境栄養学」
-網膜におけるミトコンドリア脂肪酸 β 酸
化系酵素の免疫組織化学的局在- 第 71 回
日本解剖学会中部支部学術集会、2011 年 10
月 16 日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

厚沢季美江 (ATSUZAWA KIMIE)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：60387727