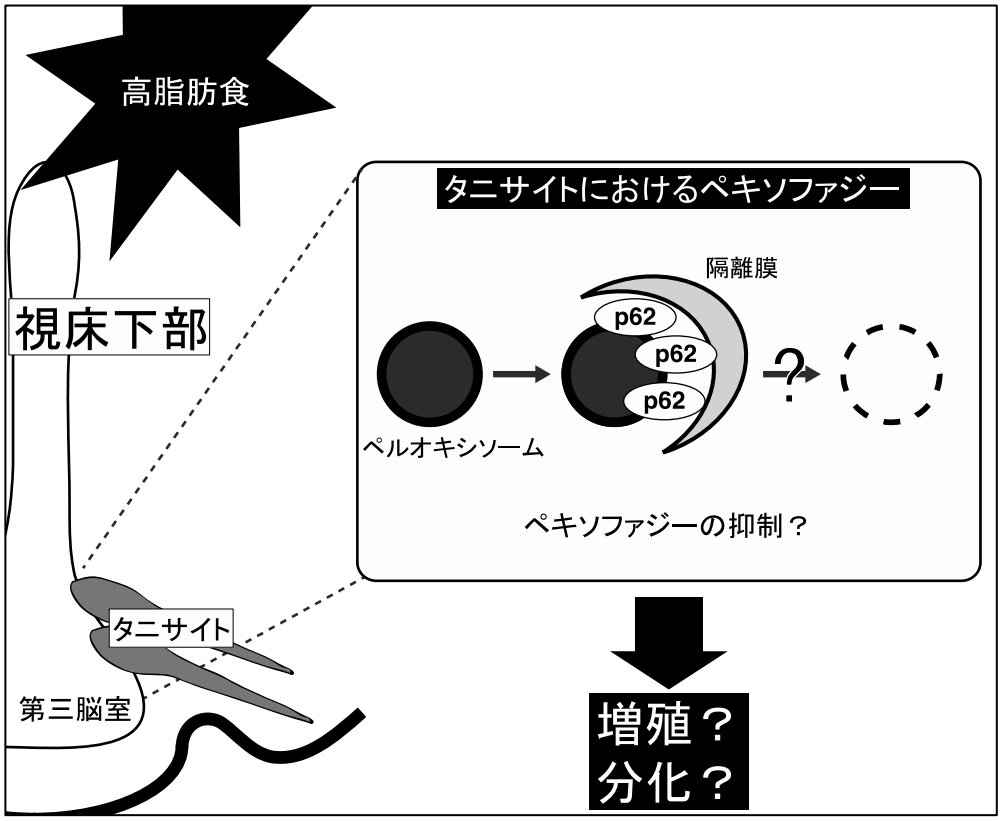
154　視床下部機能低下におけるペルオキシソームの役割	杉浦　歩

【目的】視床下部は個体代謝調節の中枢であるが、細胞内代謝の場であるオルガネラの視床下部における機能については未知な部分が多く残されている。本研究は、細胞内代謝の中心的オルガネラの一つであるペルオキシソームに着目し、視床下部機能低下に果たすペルオキシソームダイナミクスの役割と作用機構を解明することを目的とした。
【方法】1. 高脂肪食摂餌マウスの視床下部を免疫蛍光法、ウェスタンブロッティング法により解析した。2. 初代培養タニサイトをパルミチン酸添加培地で培養し、免疫蛍光法、ウェスタンブロッティング法により解析した。
【結果】高脂肪食摂餌マウス視床下部や、パルミチン酸添加培地で培養のタニサイトにおいて、ペキソファジーマーカーである p62 の蓄積とペルオキシソームとの共局在が観察された。

高脂肪食摂餌下の視床下部タニサイトにおけるペキソファジー



154. 視床下部機能低下におけるペルオキシソームの役割

杉浦　歩

神戸大学 大学院医学研究科 生化学・分子生物学講座 シグナル統合学分野
病態シグナル学部門

Key words：ペルオキシソーム，視床下部，タニサイト，高脂肪食，ペキソファジー

緒　言

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オルガネラである。細胞内代謝の中心的な役割を担い、細胞内・外の環境に応じ数や形、局在を変化させながら細胞内をダイナミックに動き回る。機能とダイナミクス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ダイナミクスが重要である。

視床下部は食事や睡眠、性行動など個体の恒常性調節の中枢である。視床下部の第三脳室に面した側壁は、上衣細胞やタニサイトと呼ばれるグリア様の細胞で構成されている。タニサイトは栄養素の感知に加え、自己増殖能や神経細胞への分化能といった神経幹細胞様の機能を持ち、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。しかし、糖や脂質の実際の代謝の場であるオルガネラの応答については未知な部分が多く残されている。

本研究課題では高脂肪食摂餌マウスを視床下部機能低下モデルとし、タニサイトを中心にペルオキシソームを解析することにより視床下部の機能低下に果たすペルオキシソームダイナミクスの役割と作用機構を解明することを試みた。

方　法

1.　実験マウス

6 週齢のオスマウス（C57BL/6）を日本クレア株式会社から購入し、8 週齢から高脂肪食（HD1245、リサーチダイエット社）とそのコントロール食（D124501、同）の給餌を開始した。高脂肪食給餌後のマウスを灌流固定し、脳凍結切片を冠状断で作製し、免疫蛍光法により視床下部におけるペルオキシソームを解析した。同マウスより脳を摘出し、嗅球、大脳皮質、海馬、視床下部、小脳に分け、ウェスタンブロッティング法により各部位におけるペルオキシソームタンパク質レベルを解析した。

2. 初代培養タニサイト

10 日齢のマウス（C57BL/6）より視床下部を摘出し、初代培養タニサイトを単離、培養した［1］。タニサイトをパルミチン酸や溶媒コントロールであるエタノール添加培地中で培養し、免疫蛍光法やウェスタンブロッティング法などによりペルオキシソームを解析した。

結　果

1. 高脂肪食摂餌下における視床下部ペルオキシソームの解析

げっ歯類などを使った研究で高脂肪食摂餌下における視床下部タニサイトの変化が多数報告されており、その影響は短期間と長期間で異なる。短期間（4 週間）ではタニサイトの増殖が促され［2］、長期間（8～16 週間）では逆に抑制される［3］。本研究では、高脂肪食を 4、8、16 週間摂餌したマウスの視床下部におけるペルオキシソームの解析を行った。

まずはじめに、高脂肪食を摂餌したマウスから脳凍結切片を作製し、免疫蛍光染色法によりペルオキシソームを解析したが、摂餌期間に関わらず数や形態に顕著な変化は観察されなかった。高脂肪食摂餌により誘導されるストレスの一つに酸化ストレスがある。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ルオキシソーム特異的オートファジー（ペキソファジー）で分解される。次にペルオキシソームの分解を検討するために、p62/SQSTM1 とペルオキシソーム膜タンパク質である PMP70 の共染色を行った。p62 は選択的オートファファジーにおける基質と隔離膜（オートファゴソーム）のアダプタータンパク質で、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。短期間の摂餌では顕著な変化は観察されなかったが、高脂肪食を 16 週間摂餌したマウスでは p62 の点状のシグナルが多く観察され、その一部が PMP70 と共局在を示した（図 1a、矢頭）。さらに、この共局在はタニサイトマーカーである Nestin 陽性の細胞で観察された。一方、p62 やペルオキシソームタンパク質量の変化は視床下部全域より調製したホモジネートを用いたウェスタンブロッティングでは観察されなかった（図 1b）。これらの結果は PMP70 と p62 の共局在は視床下部全体の応答ではなく、タニサイトなど一部の細胞の応答であることを示唆している。高脂肪食摂餌下においてオートファジーが抑制されることも報告されていることから［4］、PMP70 と p62 の共局在はオートファジーの過程が抑制された結果である可能性もあるが、ペキソファジーが亢進・抑制されたかを結論づけるためには、さらなる実験が必要である。

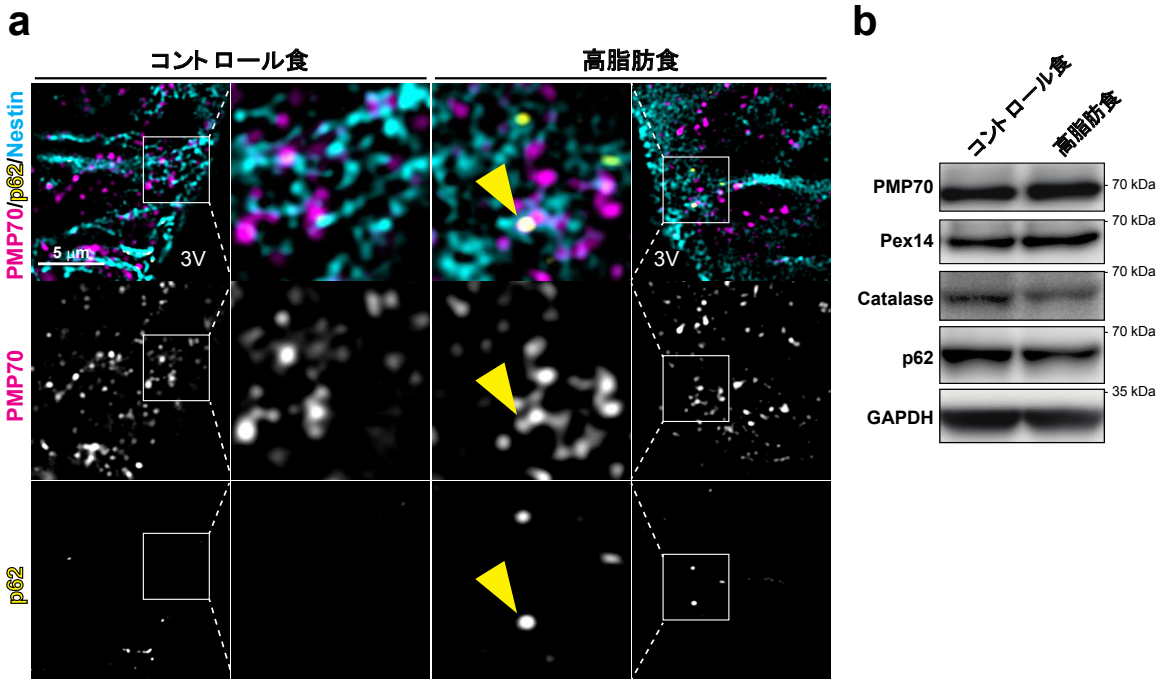


図 1. 高脂肪食摂餌下のタニサイトにおけるペルオキシソーム

a) コントロール食、高脂肪食を 16 週間摂餌したマウスの脳凍結切片（冠状断）を抗 PMP70、抗 p62、抗 Nestin 抗体で免疫蛍光染色した。矢頭は PMP70 と p62 の共局在を示す。3V：第三脳室。

b) 視床下部のホモジネート 5μg を上記に示す抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析。PMP70、Pex14：ペルオキシソーム膜タンパク質。Catalase：ペルオキシソーム内腔タンパク質。p62：ペキソファジーマーカー。GAPDH：ローディングコントロール。

2. 初代培養タニサイトにおけるペルオキシソームの解析

タニサイトは第三脳室中の脳脊髄液成分を感知し応答することにより個体恒常性維持に機能している。高脂肪食が脳脊髄液に及ぼす変化の一つに遊離脂肪酸であるパルミチン酸の濃度が上昇し、代謝障害や小胞体ストレス、炎症などの細胞毒性を発揮することが報告されているが［5］、タニサイトに対する作用は不明である。上記の高脂肪食摂餌マウスの結果がパルミチン酸のタニサイトへの影響かを調べるために、初代培養タニサイトをパルミチン酸添加培地で培養し、ペルオキシソームを免疫蛍光染色法により観察した。ペルオキシソームの形態や数、局在に顕著な変化は観察されなかったが、細胞体において p62 陽性構造の増加が観察され、一部のペルオキシソームと共局在を示した（図 2a、矢頭）。一方、生化学的な解析により、ペルオキシソームタンパク質に顕著な差は観察されなかったが、p62 の蓄積が観察された（図 2b）。パルミチン酸の培養細胞中のオートファジーに対する影響も複数の報告がされており、細胞種や処理条件により促進的にも抑制的にも作用する。本研究の結果より、パルミチン酸は初代培養タニサイトにおけるペキソファジーに対して抑制的に働いていることを示唆しているが、その特異性や生理的意義の解明にはさらなる実験が必要である。

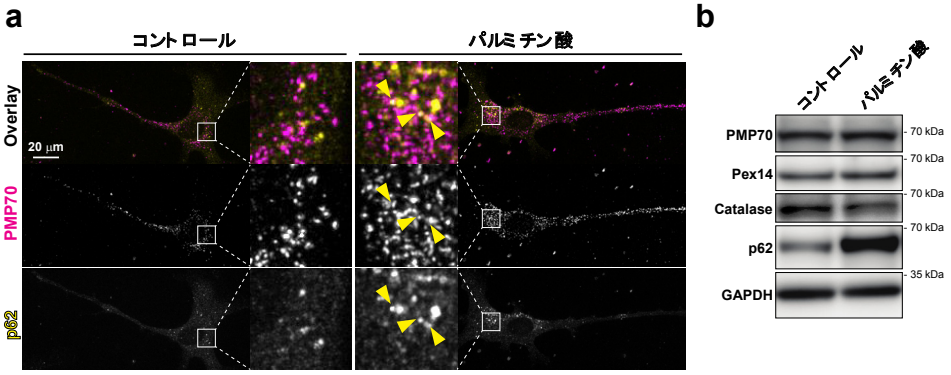


図 2. パルミチン酸添加培養下における初代培養タニサイトのペルオキシソーム

a) 初代培養タニサイトを溶媒であるエタノール（コントロール）あるいは 100 μM パルミチン酸で 16 時間処理し、上記の抗体を用いて免疫蛍光染色した。矢頭は PMP70 と p62 の共局在を示す。

b) タニサイトのホモジネート 10 μg を上記に示す抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。

考　察

これまでの多くのペルオキシソームダイナミクスの研究は出芽酵母や株化培養細胞を用いたもので、哺乳類の生体内における実際の挙動は未知の部分が多く残されている 。本研究では高脂肪食摂餌マウスを*in vivo*、パルミチン酸処理した初代培養タニサイトを*in vitro*モデルとして、視床下部機能低下におけるペルオキシソームを解析した。数や形態に顕著な変化は観察されなかったが、*in vivo*、*in vitro*双方のモデルにおいてペキソファジーマーカーであるp62との共局在が観察された。これらの結果は高脂肪食摂餌下において脳脊髄液中のパルミチン酸濃度が上昇した結果、タニサイトでのペキソファジーが抑制されたことを示唆している。しかし、PMP70と共局在を示さないp62も観察されることから、ペキソファジーの特異性については明らかではない。また、このような応答がタニサイトの自己増殖や分化能に与える影響など生理的意義を理解するためにはさらなる実験が必要である。ペルオキシソームの代謝回転の大部分はペキソファジーを介したものであると考えられているが、生体内の直接的な証拠は未だに乏しい。例えば、CHO細胞（ハムスター卵巣由来）を用いた実験ではペルオキシソームの半減期はおおよそ2日とされているが［6］、生体内や初代培養系におけるペルオキシソームの半減期はほとんど不明のままである。本研究での観察結果は、視床下部タニサイトにおいてもペキソファジーによってペルオキシソームが代謝回転されていることを示唆している。しかし、この結果が恒常的な分解、あるいは傷害ペルオキシソームの除去のためのペキソファジーかどうかを明らかにするためにはさらなる解析が必要とされる。今後は電子顕微鏡などによる詳細な形態学的解析に加え、脂質酸化などのペルオキシソームの機能解析を行う。また、タニサイト初代培養系を用いたペルオキシソーム動態関連遺伝子の発現抑制実験などにより、ペルオキシソーム動態異常下でのタニサイトの増殖や分化能を解析し、視床下部機能低下におけるペルオキシソームの役割のさらなる解明を目指す。

共同研究者・謝辞

異動間もない状況で新たな実験系を導入し本研究課題を遂行するにあたり、多大なご支援をいただいた貴財団には改めて深く御礼申し上げたい。

文　献

1） De Francesco PN, Castrogiovanni D, Uriarte M, Frassa V, Agosti F, Raingo J, Perello M. A simple strategy for culturing morphologically-conserved rat hypothalamic tanycytes. Cell Tissue Res. 2017 Aug;369(2):369-380. Epub 2017 Apr 17. PMID: 28413862 DOI:10.1007/s00441-017-2608-x

2） Lee DA, Bedont JL, Pak T, Wang H, Song J, Miranda-Angulo A, Takiar V, Charubhumi V, Balordi F, Takebayashi H, Aja S, Ford E, Fishell G, Blackshaw S. Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. Nat Neurosci. 2012 Mar 25;15(5):700-2. PMID: 22446882 DOI: 10.1038/nn.3079

3） Li J, Tang Y, Cai D. IKK β /NF- κ B disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. Nat Cell Biol. 2012 Oct;14(10):999-1012. Epub 2012 Sep 2. PMID: 22940906 DOI: 10.1038/ncb2562

4） Meng Q, Cai D. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the I κ B kinase β (IKK β)/NF- κ B pathway. J Biol Chem. 2011 Sep 16;286(37):32324-32. Epub 2011 Jul 22. PMID:21784844 DOI: 10.1074/jbc.M111.254417

5） Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Baskin DG, Heinecke JW, Woods SC, Schwartz MW, Niswender KD. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 May;296(5):E1003-12. Epub 2008 Dec 30. PMID: 19116375 DOI: 10.1152/ajpendo.90377.2008

6） Huybrechts SJ, Van Veldhoven PP, Brees C, Mannaerts GP, Los GV, Fransen M. Peroxisome dynamics in cultured mammalian cells. Traffic. 2009 Nov;10(11):1722-33. Epub 2009 Aug 4. PMID: 19719477 DOI: 10.1111/j.1600-0854.2009.00970.x