

脳型脂肪酸結合蛋白質 (FABP7) は caveolin-1 の
発現を介して脂質ラフト機能を制御する

氏名 香川 慶輝

所属 山口大学大学院医学系研究科
システム統御医学系専攻
器官解剖学分野

平成 27 年 1 月

略語表

本文中の略語は以下に示す一覧表に従って用いた。

CCL7	chemokine (C-C motif) ligand 7
Cxcl5	C-X-C motif chemokine 5
DAPI	4',6-diamidino-2- phenylindole
db-cAMP	N,N-dibutyladenosine 3',5'-phosphoric acid
DHA	docosaheptaenoic acid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EPA	eicosapentaenoic acid
EEA-1	early endosome antigen-1
EGF	epidermal growth factor
FABP	fatty acid binding protein
FABP7-KO	FABP7-knock out (FABP7 遺伝子欠失)
FBS	fetal bovine serum
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GDNF	glial cell-line derived neurotrophic factor
GFR α 1	GDNF family receptor α -1
HRP	horseradish peroxidase
IL-6	interleukin-6
LPS	lipopolysaccharide
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MAPKs	mitogen-activated protein kinases

NF- κ B	nuclear factor-kappa B
PBS	phosphate buffered saline
PUFAs	polyunsaturated fatty acids
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TLR4	toll-like receptor 4

目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	3
3. 目的	8
4. 方法	10
4-1. 抗体	10
4-2. 実験動物及び飼育方法	11
4-3. 初代培養アストロサイトの作成	12
4-4. リガンドによる細胞刺激及び薬物添加	13
4-5. 細胞生存性試験	13
4-6. ELISA 法による TNF- α の定量	14
4-7. 定量 Real-time PCR 法	14
4-8. マイクロアレイ法	15
4-9. 脂質ラフト分画の抽出	15
4-10. ウェスタンブロット法	16
4-11. 免疫組織化学染色	17
4-12. コレステロール定量	17
4-13. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入	18
4-14. 統計処理	18
5. 結果	19
5-1. FABP7-KO アストロサイトにおける脂質ラフト関連受容体の 集積低下	19

5-2. FABP7-KO アストロサイトにおける細胞内シグナル活性及び サイトカインの産生低下	24
5-3. FABP7-KO アストロサイトにおける caveolin-1 発現の低下	27
5-4. FABP7-KO アストロサイトにおけるカベオソーム及び 脂質ラフト分画でのコレステロール量の低下	31
5-5. caveolin-1 過剰発現による FABP7-KO アストロサイト の脂質ラフト機能異常の改善	33
6. 考察	38
7. 結語	44
8. 謝辞	45
9. 参考文献	46

1. 要旨

脂肪酸結合蛋白質 (fatty acid-binding proteins: FABPs) は長鎖不飽和脂肪酸と結合し可溶化することで細胞内脂質動態を調節している。FABP7 は発達期の脳でアストロサイトに強く発現し、アストロサイトの脂質恒常性制御に関与していると考えられる。細胞膜上に存在する脂質ラフトは細胞外刺激に反応した受容体が集積する場で、それに伴う細胞内シグナル伝達の開始点として重要な役割を果たす。本研究では、アストロサイトの細胞膜における脂質ラフトの形成及び機能発現に FABP7 がどのように関与しているかに着目した。野生型に比べ、FABP7 遺伝子欠失 (FABP7-KO) アストロサイトでは lipopolysaccharide (LPS) 刺激後の toll-like receptor 4 (TLR4) の脂質ラフトへの移行とそれに続く細胞内シグナリング (mitogen-activated protein kinases (MAPKs)、nuclear factor-kappa B (NF- κ B)) 及び tumor necrosis factor- α (TNF- α) の産生が低下していた。また FABP7-KO アストロサイトでは glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) 添加による GDNF family receptor α -1 (GFR α 1) の脂質ラフトへの集積も減少していた。そこで FABP7-KO アストロサイトにおける脂質ラフト関連蛋白質の発現を転写及び蛋白質合成レベルで検討した結果、caveolin-1 の発現低下が認められた。また FABP7-KO アストロサイトでは脂質ラフト分画におけるコレステロール量が顕著に低下し、カベオソーム形成を示す caveolin-1 と初期エンドソームマーカー early endosome antigen-1 (EEA-1) の共局在にも減少が認められた。さらに、これら FABP7-KO アストロサイトに見られた変化は caveolin-1 の過剰発現を誘導することで改善した。以上の結果より、FABP7 が caveolin-1 の発現を介して脂質ラフト機能に影響を及ぼし、アストロサイトの外部刺激応答を調節しているこ

とが明らかになった。本研究結果は FABP7 および脂肪酸代謝が関与する中枢神経性疾患や癌の病態理解や新たな治療法開発に貢献するものと考える。

2. 研究の背景

脂質ラフトはコレステロール、スフィンゴ脂質、糖脂質に富んだマイクロドメインであり、低温下で低濃度界面活性剤に不溶性の特徴を持つ (Simons and Toomre 2000)。脂質ラフトは平面な構造をとる“平坦型脂質ラフト”と、フラスコ型の構造をとる“カベオラ”の2種類に大別される (Yamada 1955)。カベオラにはカベオリン (caveolin) と呼ばれる膜裏打ち蛋白質が特異的に存在する (Parolini et al. 1999; Rothberg et al. 1992)。カベオラにはキャビン (cavin) と呼ばれる蛋白質も存在しており (Bastiani et al. 2009; Izumi et al. 1997; Mineo et al. 1998; Vinten et al. 2001)、そのサブタイプの一つである cavin-1 は caveolin との相互作用によりカベオラ構造の維持に関与する (Harvey and Calaghan 2012; Voldstedlund et al. 2003) (Fig. 1)。

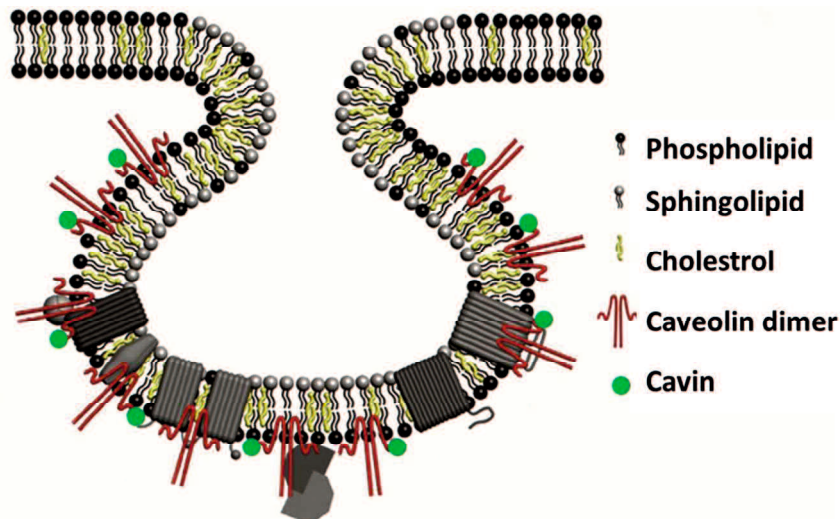


Fig.1. Structure of caveolae and its components Caveolae are specialised lipid rafts enriched in cholesterol and sphingolipids, characterised by the presence of caveolin and cavin proteins. Cartoon of a caveolae depicting the organisation of caveolin (red) and cavin (green) proteins. Figure taken from “Harvey et al. 2012” with modification.

細胞がリガンド刺激を受けると、多くの生理活性物質の受容体は脂質ラフトに集積し、細胞内に情報を伝達することが知られている。例えば、TLR4 はそのリガンドである LPS を受容すると脂質ラフトへ集積し、Toll/IL-1R (TIR) domain-containing adapter protein や TIR domain-containing adapter inducing IFN- β -related adapter molecule などとクラスターを形成することで細胞内シグナルに参与する MAPKs や NF- κ B を活性化する (Allen et al. 2007; Piao et al. 2013; Triantafilou et al. 2002) (Fig. 2)。

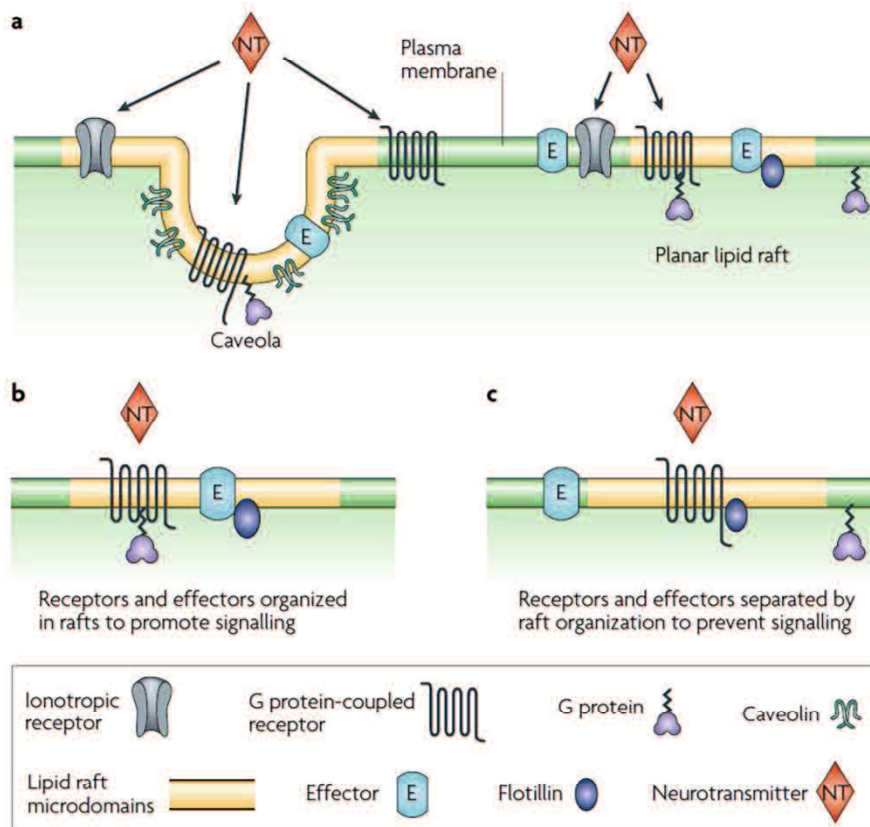


Fig.2. Membrane organization of transmitter signaling molecules The lipid raft signalling proposes that microdomains spatially organize signalling molecules at the membrane to promote kinetically interactions that are necessary for signal transduction. Alternatively, lipid raft microdomains inhibit interactions by separating signalling molecules, thereby dampening signalling responses. Figure taken form “Allen et al. 2007”.

他にも脂質ラフトは GDNF シグナリング (Tansey et al. 2000; Trupp et al. 1999)、epidermal growth factor (EGF) シグナリング (Hofman et al. 2008)、RAS シグナリング (Roy et al. 1999)、インスリンシグナリング (Mastick et al. 1995)、ヘッジホッグシグナリング (Incardona and Eaton 2000) などに関与する。このように細胞膜受容体の集積を介して細胞内シグナリングに関与する脂質ラフトの制御は、各種の外部刺激に対する細胞の応答に重大な影響を及ぼすものと考えられる。

アストロサイトは脳皮質で最も多いグリア細胞であり、神経栄養因子やサイトカインの産生、ニューロンの構造的支持、神経伝達物質の取り込みなどを調節することで周囲の神経細胞の恒常性を維持する役割を持つ (Benveniste 1998)。このようなアストロサイトの機能異常は様々な中枢神経疾患を引き起こし、例えば、多発性硬化症 (Cannella and Raine 1995)、アルツハイマー病 (Akiyama et al. 1993)、パーキンソン病 (Dong and Benveniste 2001) などの中枢神経疾患において、アストロサイト由来のサイトカインやケモカインの異常産生との関連性が報告されている。細胞にこのようなサイトカイン・ケモカインの産生を誘導する外部刺激は、それらを検知する膜受容体の脂質ラフトなど細胞膜マイクロドメインへの集積により細胞内に伝えられるので、アストロサイトの脂質ラフト機能を解析することは中枢神経疾患の病態メカニズムを理解するうえで重要である。

脂質ラフトの形成および機能には長鎖不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids: PUFAs) が深く関与していることが知られている (Williams et al. 2012)。これまでに、ドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid: DHA) やエイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid: EPA) などの n-3 系 PUFAs の投与が脂質ラフトの脂肪酸構成成分を変化させること (Schley et al. 2007)、また膜の透過性を変調させて脂質ラフト上での受容体クラスター形成を抑制すること (Lauritzen et al.

2000)、さらに炎症性サイトカインの産生 (Fan et al. 2004)、リンパ球の増殖 (Jolly et al. 1997)、細胞傷害性 T 細胞の活性化 (Arrington et al. 2001) をそれぞれ抑制することが報告されている。さらに n-3 系 PUFAs はリウマチ (Kremer et al. 1985)、喘息 (Arm et al. 1988)、多発性硬化症 (Weinstock-Guttman et al. 2005)、アルツハイマー病 (Vedin et al. 2012)、統合失調症 (Peet 2004) などの治療に効果を発揮することが明らかになっている。つまり、これらの病態の進行に、PUFAs により調節される脂質ラフト機能が関与していることが考えられるが、未だその詳細は明らかになっていない。

PUFAs は生体の恒常性維持のうえで必須の栄養素であり、細胞膜の構成成分や細胞活動のエネルギーとして重要である。しかし、水に不溶で、細胞内でその機能を発揮するためにはキャリアーを必要とする。脂肪酸結合蛋白質 (Fatty Acid Binding Protein: FABP) は、PUFAs を可溶化し、その細胞内動態を制御する分子量 14-15 kDa の分子ファミリーである。これまでの研究で、FABP は細胞膜の構成成分 (Jefferson et al. 1990)、細胞内シグナル伝達の活性 (Glatz et al. 1995)、ミトコンドリアにおける β 酸化やペルオキシソームにおける酸化反応 (Furuhashi and Hotamisligil 2008) の制御に関与する他、核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor の活性を制御することが明らかになっている (Wolfrum et al. 2001) (Fig.3)。FABP には 12 種類のサブタイプが存在し、その中の FABP7 (brain-typed FABP) は脳のアストロサイト (Owada et al. 1996) に強く発現する。これまでに統合失調症患者の脳で FABP7 の発現レベルが変化していることを明らかにし (Watanabe et al. 2007)、さらに FABP7 遺伝子欠失 (FABP7-KO) マウスが恐怖増加などの情動行動異常を示すことを見出した (Owada et al. 2006)。また、多発性硬化症 (Kipp et al. 2011)、アルツハイマー病及びパーキンソン病 (Teunissen et al. 2011) 患者の脳で FABP7 の発現レベルが変化

していることが明らかになっている。しかし、これら中枢神経疾患における FABP7 の役割は未だ不明なままである。

本研究では、アストロサイトにおける FABP7 と脂質ラフト機能との関連に着目し、FABP7-KO マウスのアストロサイトにおける外部刺激応答機能の変化と FABP7 欠損による脂質ラフトの形成及び機能変化に焦点を当てた解析を施行した。

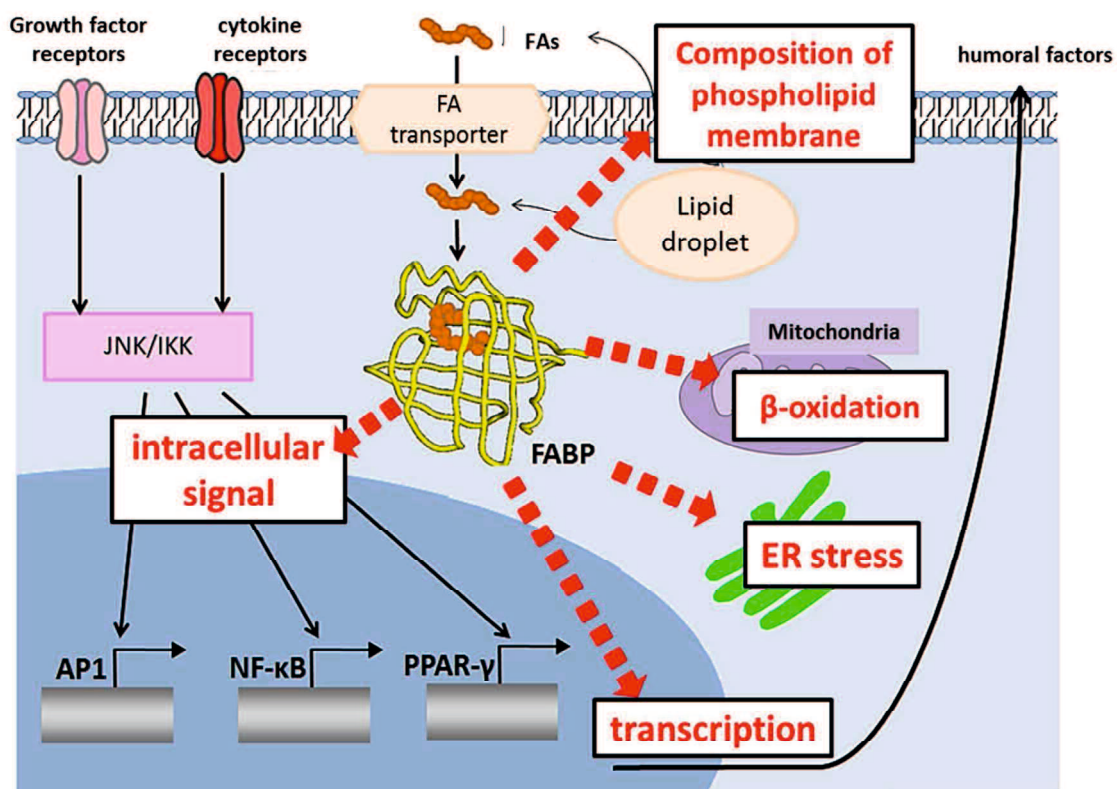


Fig. 3. Cellular functions of FABPs Scheme showing putative cellular functions of FABPs through trafficking of fatty acids to specific compartments in the cell such as membrane (composition of phospholipid); mitochondria (oxidation); endoplasmic reticulum (ER stress); cytosolic (intracellular signaling); nucleus (transcriptional regulation via several transcriptional factors).

3. 目的

本研究では、アストロサイトにおける FABP7 と脂質ラフト機能との関連性を明らかにし、その分子機構の詳細を追及することを目的とした。

具体的には、野生型及び FABP7-KO マウスより作成した初代培養アストロサイトを用いて、アストロサイトの外部刺激応答性への FABP7 の関与を検討した。まず LPS-TLR4 シグナル (TLR4 の脂質ラフトへの移行、細胞内シグナルの活性化、サイトカインの産生) (Fig. 4) をモデルとして用い、FABP7 の関与を検討した。次に、脂質ラフト機能における FABP7 の役割を脂質ラフト特異的タンパク質の発現を解析した。さらに脂質ラフトの機能及び形成に対する FABP7 の機能を検討するために、カベオソーム (カベオラを介したエンドソーム) と脂質ラフト分画中に含まれるコレステロール量を解析した。

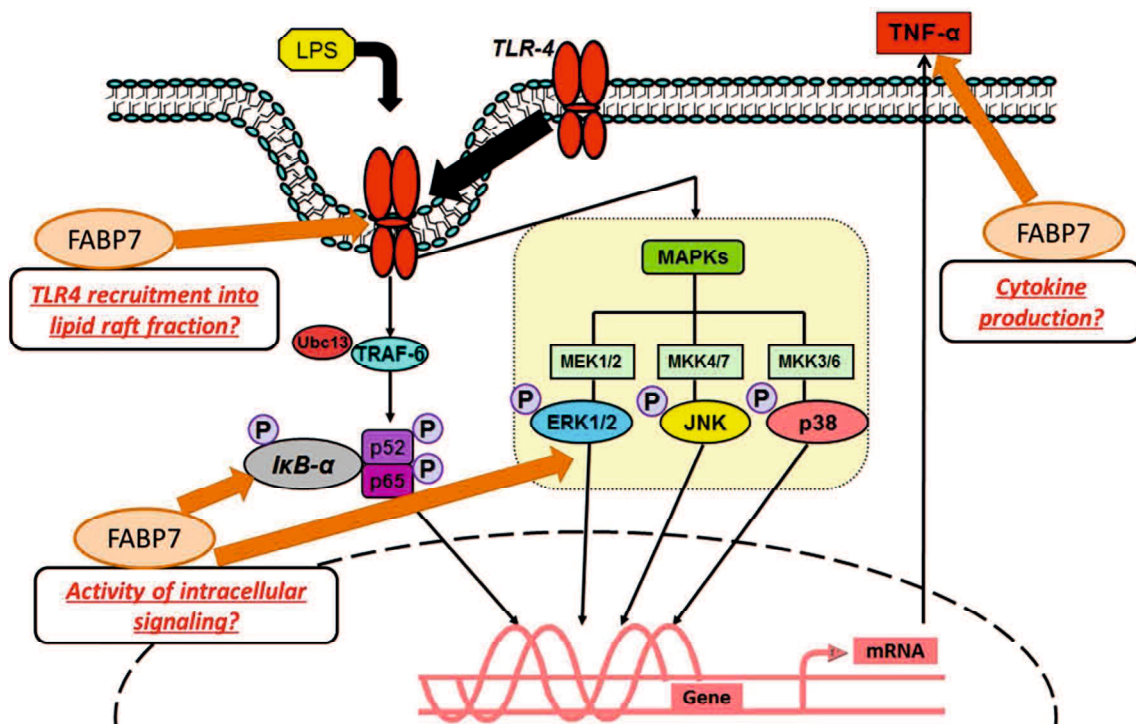


Fig. 4. LPS-TLR4 signaling Scheme shows well-known LPS-TLR4 signaling cascade. LPS induces TLR4 recruitment into lipid rafts (caveolae), activation of its downstream cascade including MAPKs and NF-κB signaling and production such as TNF-α. In this study, we focused whether FABP7 is involved in these cascades.

4. 方法

4-1. 抗体

免疫組織化学染色において、一次抗体として anti-mouse FABP7 抗体 (Abdelwahab et al. 2003)、anti-caveolin-1、glial fibrillary acidic protein (GFAP)抗体 (Cell Signaling Technology, MA, USA)、anti-cavin-1、cavin-3 抗体 (Abcam, Cambridge, England)、anti-early endosome antigen-1 (EEA-1) 抗体 (BD Transduction Laboratories, CA, USA) を使用した。二次抗体として goat anti-rabbit IgG-Alexa488、goat anti-guinea-pig IgG-Alexa 555、goat anti-rat IgG-Alexa568 (Life Technologies, CA, USA) を使用した。

ウェスタンブロット法において、一次抗体として anti- total-I κ B- α 、p38 MAPK、phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)、SAPK/JNK、phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)、p44/42MAPK (Erk1/2)、phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) 抗体 (Cell Signaling Technology, MA, USA)、anti-non-phospho-I κ B- α 、TLR4、GFR α 1、caveolin-1、flotillin-1、 β -actin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA)、anti-cavin-1、cavin-3 (Abcam, Cambridge, England) 抗体を使用した。二次抗体として horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat-anti rabbit IgG 抗体、HRP-conjugated goat anti-mouse IgG 抗体 (Merck Millipore, MA, USA) を使用した。各一次抗体の希釈倍率は別表に示す (Table 1)。

Experiment	Antibody	Species	Dilution	Reference or vendor
immunohistochemistry	anti-mouse FABP7	rabbit	0.5 µg/ml	Owada et al. 2006
	anti-mouse FABP7	guinea-pig	0.5 µg/ml	Owada et al. 2006
	anti-GFAP	rat	1:200	cell signaling technology
	anti-caveolin-1	rabbit	1:100	cell signaling technology
	anti-cavin-1	rabbit	1:100	Santa cruz
	anti-cavin-3	rabbit	1:100	Santa cruz
	anti-EEA-1	mouse	1:200	BD Transduction Laboratories
Western blotting	anti-mouse FABP7	rabbit	0.1 µg/ml	Owada et al. 2006
	anti-total IκB-α	rabbit	1:500	cell signaling technology
	anti-non-phospho-IκB-α	rabbit	1:500	Santa cruz
	anti-p38MAPK	rabbit	1:1000	cell signaling technology
	anti-phospho p38MAPK (Thr180/Tyr182)	rabbit	1:1000	cell signaling technology
	anti-Erk1/2	rabbit	1:1000	cell signaling technology
	anti-phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	rabbit	1:1000	cell signaling technology
	anti-SAPK/JNK	rabbit	1:1000	cell signaling technology
	anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	rabbit	1:500	cell signaling technology
	anti-TLR4	mouse	1:500	Santa cruz
	anti-GFRα-1	rabbit	1:500	Santa cruz
	anti-caveolin-1	rabbit	1:500	Santa cruz
	anti-cavin-1	rabbit	1:500	Abcam
	anti-cavin-3	rabbit	1:500	Abcam
	anti-flotillin-1	rabbit	1:500	Santa cruz
	anti-β-actin	mouse	1:5000	Santa cruz

Table.1 List of primary antibodies used in this study

4-2. 実験動物及び飼育方法

野生型として用いた C57BL/6J マウスは (株) 千代田開発より購入し、自家増殖させた。FABP7-KO マウスは山口大学大学院医学系研究科大和田教授より供与を受けた (Owada et al. 2006)。遺伝子型判定はマウス尻尾から 0.8 mg/ml protease K (Promega, WI, USA) を用いて DNA を抽出し、PCR 法で行った。用いたプライマーは common 5': aggcagcagcttctgctgag, wild 3': tgcagctccaggttgcgc, mutant 3' ggtcagcttgccgtaggtgg である。本実験で使用した動物は山口大学生命科学実験施設内のアイソラックで一定温度及び一定湿度の下、12 時間消灯、12 時間点灯の条件下で飼育した。本実験は日本学術会議が設定したガイドラインおよび山口大学医学部動物実験指針に従って行った。本実験開始にあたって、本学動物使用委員会の認可と大学内の倫理委員会の承認を受けた。

4-3. 初代培養アストロサイトの作成

野生型及び FABP7-KO マウスの大脳皮質より初代培養アストロサイトを Sharifi らの方法 (Sharifi et al. 2011)に従って培養した。具体的には、ピンセットで出生直後 (P0-1)マウスの皮膚と頭蓋骨を切開して脳組織を摘出した後、20 mM D-glucose、1%Penicillin-Streptomycin (Gibco, USA) を含んだ Hanks' balanced salt solutions (Sigma, USA) 中に移して硬膜、嗅球、海馬を剥離し、大脳皮質を分離した。分離した大脳皮質に 0.25% trypsin (Gibco) 溶液を添加し、37°Cで 10 分間インキュベートした。さらに 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, USA)、1% Penicillin-Streptomycin を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, USA) を添加し、ピペッティングにより細胞を分離した。細胞懸濁液を 100 μ m ナイロンメッシュ (Falcon, USA) で濾過した後、室温で 1300 rpm、5 分間の遠心による細胞洗浄を行い、再度 DMEM で細胞懸濁液を作成した。T75 フラスコ (Falcon) に 20×10^6 個の細胞を播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。フラスコ内の細胞がコンフルエントに達した時、Bio-Shaker (Taitec, USA) で 200 rpm/min、24 時間振とうし、メディウム交換により遊離したニューロン、マイクログリア、オリゴデンドロサイトを除去した。振とうの 2 日後、細胞を 0.05%trypsin 処理もよって剥離し、実験用のデッシュ及びプレートに細胞濃度 2×10^5 個/ml で播種した。その後、再び細胞がコンフルエントになった時点で、アストロサイトの純度が 95%以上あることを anti-GFAP 抗体による免疫組織化学染色で確認し、初代培養アストロサイトとして実験に使用した。実験誤差を最小限にするため、初代培養アストロサイトの作成行程全てにおいて両遺伝子群同時に行った。

4-4. リガンドによる細胞刺激及び薬物添加

リガンド刺激 24 時間前に初代培養アストロサイトの培養メディウムを 1% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin を加えた DMEM に置換した。リガンド刺激として LPS (*Escherichia coli* O111:B4 由来, Sigma-Aldrich Japan) と GDNF (Pepro Tech Inc. NJ, USA) を用いた。Semple らの方法を参考に、LPS は 10-10000 ng/ml の濃度で添加し、0~24 時間インキュベートした (Semple et al. 2010)。Pierchala らの方法を参考に、GDNF を 50 ng/ml の濃度で添加し 10 分間インキュベートした。

分化した (成熟した) アストロサイトを作製するために、Murphy らの方法に従って N,N-Dibutyladenosine 3',5'-phosphoric acid (db-cAMP, Sigma-Aldrich Japan) を 250 μ M の濃度で添加した。培養は 21 日間続け、3 日おきに db-cAMP を添加した (Murphy et al. 1997)。

カベオリン蛋白質の分解に対する FABP7 の関与を検討するために、Liao 及び Madeira らの方法に従い、細胞膜透過性のペプチドアルデヒドプロテアーゼ阻害剤 MG132 (Sigma-Aldrich Japan) を 5 μ M の濃度で添加し、24 時間インキュベートした。MG132 は最終濃度が 0.1% 以下となるように DMSO で溶解した (Liao et al. 2013; Madeira et al. 2011)。

4-5. 細胞生存性試験

アストロサイトにの生存及び細胞増殖を MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] 試験とトリパンブルー色素排除試験法により検討した。MTS 試験では CellTiter 96 Aqueous nonradioactive cell proliferation assay kit (Promega) を用いて行った。方法はキットの使用説明書に従った。測定は 490 nm の波長で Multi-Spectrophotometer (Viento[®]) を用いて行い、KC4TM version3.0 software で解析した。

4-6. ELISA 法による TNF- α の定量

LPS 刺激後のアストロサイト培養上清を採取し、1,000 rpm, 10 分間、4°C で遠心後、上清を採取して解析まで-20°Cで保存した。TNF- α ELISA kit (R&D system) を用いて TNF- α を測定した。方法はキット使用説明書に従った。測定は 490 nm の波長で Multi-Spectrophotometer (Viento[®]) を用いて行い、KC4TM version 3.0 software で解析した。

4-7. 定量 Real-time PCR 法

RNeasy plus Mini kit (Qiagen) を用いて細胞から total RNA を抽出した。方法はキットの使用説明書に従った。抽出された total RNA はデオキシリボヌクレアーゼ処理 (Promega)後、DU[®]640 spectrophotometer (Beckman coulterTM, USA) を用いて RNA の濃度、純度を測定した。逆転写は anchored-oligo(dt)₁₈ を用い、Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Suisse) を使用して行った。方法はキットの使用説明書に従った。定量 Real-time PCR は Applied Biosystems StepOnePlusTM real-time PCR system (Applied Biosystems, USA) を用いて行った。TaqMan[®] プローブ (Applied Biosystems) は glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): Mm03302249_g1, FABP7: Mm00445225_m1, TNF- α : Mm00443258_m1, TLR4: Mm00445273_m1, GFR α 1: Mm00439086_m1, caveolin-1: Mm00483057_m1, caveolin-2: Mm00516827_m1, cavin-1 (Ptrf): Mm00477266_m1, cavin-2 (Sdpr): Mm00507087_m1, cavin-3 (Prkcdpb): Mm00466330_g1, cavin-4 (Murc): Mm00471507_m1 and flotillin-1: Mm01275485_m1 を用いた。定量化は GAPDH の値から Ct 値 (cycle threshold) を補正し (この値を Δ Ct とする)、さらにコントロールの Δ Ct 値を目的のサンプルの Δ Ct 値と比較する $\Delta\Delta$ Ct 法で、Applied Biosystems StepOnePlusTM real-time PCR system software v2.0 (Applied

Biosystems) を用いて行った。

4-8. マイクロアレイ法

LPS 刺激による遺伝子発現の変化を網羅的に解析するためにマイクロアレイ法を行った。LPS (1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し、4 時間インキュベートした。野生型、FABP7-KO アストロサイト各 3 サンプルのうち、RNA integrity number (RIN) が 9.5 ポイント以上のサンプルのみを使用した。RIN は RNA6000 nano kit 及び Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, CA, USA) を用いて解析した。マイクロアレイ用チップは GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix) を用いた。Ambion® WT Expression kit (Life Technologies) 及び Affymetrix® GeneChip® WT Terminal Labeling kit (Affymetrix) を用いて 200 ng の total RNA を cDNA 合成した。検出は GeneChip® system (Affymetrix) で行い、Partek® Genomics Suite 6.5 (Partek, MO, USA) ソフトウェアを用いて解析した。

4-9. 脂質ラフト分画の抽出

Park ら及び Wong らの方法を参考に、ショ糖密度勾配遠心法でアストロサイトから脂質ラフト分画を抽出した (Park et al. 2009; Wong et al. 2009)。アストロサイト (約 8×10^6 個) をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄し、MEB buffer (20 mM 2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate (MES) (Sigma-Aldrich Japan), 150 mM NaCl, 1% Triton-X、protease inhibitor (Roche, Suisse), pH6.5) 1.5 ml を用いて細胞溶解液を作製した。作成した細胞溶解液を氷上で 10 回ダウンスホモジェナイズし、13 PET 超高速遠心用チューブ (HITACHI, Japan) に移した。80%スクロース/MEB buffer を等量加え、よく混和した後に 30%スクロース/MEB buffer を 5 ml 重層し、さらに 5%スクロース/MEB buffer を 3ml 重層した。P40ST ロー

ター (HITACHI) を用い、4°C、21 時間、40000 rpm で遠心した。均等勾配の溶液をチューブの上から 1 ml ずつ採取し各分画ごとに分けた。各分画に含まれる蛋白質はトリクロロ酢酸/アセトン沈殿法 (トリクロロ酢酸の最終濃度は 15%) で濃縮し、沈殿物を SDS-PAGE sample buffer で溶解した。作成したサンプルはウェスタンブロットで使用した。

脂質ラフト分画及び非脂質ラフト分画間での受容体の移行を検討するために、脂質ラフト分画 4~7 を混合したプール及び非脂質ラフト分画 8~11 を混合したプールを作製した。各プールの蛋白質濃度は BCA 法を用いて測定し、ウェスタンブロットで解析した。

4-10. ウェスタンブロット法

プロテアーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を含んだ SDS-PAGE sample buffer にて蛋白質を溶解した。BCA protein Assay Kit を使用し、蛋白質濃度を決定した。調製したサンプルは 10%又は 15% SDS-polyacrylamide ゲル上に展開し、Immobilon-P^{SQ} polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, USA) に転写した。メンブレンのブロッキングは 5% BSA (Wako, Japan) 及び 0.1% Tween-20 (Wako) を含んだ Tris-buffered saline を用い、室温、1 時間で行った。一次抗体には 4°Cで一晩反応させた。二次抗体は室温で 1 時間反応させた。検出は ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) を用いて行った。免疫反応物の定量解析には NIH image J 解析ソフトを用いた。

4-11. 免疫組織化学染色

アストロサイトを PBS で 2 度洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで 5 分間、室温で固定した。固定した細胞を室温で 0.1% Triton X-100/PBS に 30 分間反応させて抗体の浸透性を高め、非特異的免疫反応のブロッキングのために 5%正常ヤギ血清を加えて室温で 1 時間インキュベートした。一次抗体は 4°Cで一晩反応させた。その後、二次抗体を室温で 1 時間反応させた。核染色は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, life Technologies, CA, USA) を用いた。観察には共焦点レーザー走査顕微鏡 (Zeiss LSM510META, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を使用した。

Caveolin-1 の蛍光強度は Zen software (Carl Zeiss) を用いて解析した。細胞膜の蛍光強度を解析するために、無作為に長さ 40 μm の線を細胞上に引き、2 μm ごとの蛍光強度を計測した。細胞 1 つ当たり 10 本の線を引き、計 10 個の細胞を解析した。また caveolin-1 陽性且つ EEA-1 陽性の細胞内小胞の数を解析するため、Ippolito らの方法を参考に、NIH Image J を用いて Puncta analysis を行った。画像の取得条件及び解析条件は全て野生型アストロサイトに合わせてセットし、FABP7-KO アストロサイトを同じ条件で解析した。全ての方法は二重盲検法で行った。

4-12. コレステロール定量

細胞全体、脂質ラフト分画プール、非脂質ラフト分画プールそれぞれに含まれるコレステロールの量を、Head らの方法を参考に、Amplex[®] Red cholesterol assay (Life Technologies) を用いて解析した。得られたデータは BCA 法で解析した蛋白質質量で補正した。

4-13. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

FABP7-KO アストロサイトにおける、マウス FABP7 の再発現又はマウス caveolin-1 の過剰発現の誘導は、ウイルスベクターを用いて行った。ベクターは BLOCK-iT Inducible PolIII miR RNAi expression vector kit with EmGFP (Life Technologies) を用い、キットの使用方法を改良して行った。まず、アストロサイトの cDNA をテンプレートにし、マウス FABP7 cDNA 及びマウス caveolin-1 cDNA を PCR 法で増幅し、pDONR221 ベクターとライゲーション処理することで、pENTR™-mFABP7 (又は mCav-1) ベクターを作製した。さらにこのベクターに pENTR5/CMV promoter ベクターと pLenti6.4/R4R2/V5- DEST ベクターを組み合わせることで pLenti6.4/CMV/mFABP7 (又は mCav-1) ベクターを作製した。293FT 細胞を、10% FBS、1% penicillin-streptomycin、1% sodium pyruvate (Wako, Tokyo, Japan)、1% non-essential amino acids (Sigma Aldrich Japan) を含む DMEM にて培養し、Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を用いて pLenti6.4/CMV/mFABP7 (又は mCav-1) ベクターを遺伝子導入した。導入 72 時間後、培養上清を回収し、ウイルス価を Lenti-X p24 Rapid Titer Kit (Takara Bio Inc. Tokyo, Japan) を用いて測定し、遺伝子導入に使用するウイルス価を 1×10^5 pg/mL に調整し、アストロサイトに添加した。コントロールとして LacZ を発現するベクター (pLenti6.4/CMV/LacZ) を同時に作成し使用した。

4-14. 統計処理

全てのデータは平均値±標準誤差で算出した。2 群間の比較は student's t-test、さらに多群間の比較は一元配置分散分析 one-way ANOVA 後にチューキーの検定 (Tukey's test) を行い、危険率 5% 未満をもって統計上有意差有りと判定した。

5. 結果

5-1. FABP7-KO アストロサイトにおける脂質ラフト関連受容体の集積低下

これまでに LPS 刺激は TLR4 の脂質ラフトへの移行を誘発し、細胞内シグナルが開始されること (Wong et al. 2009)、その過程が n-3 系不飽和脂肪酸によって抑制されること (Lee et al. 2003; Wong et al. 2009) が報告されている。そこでアストロサイトでの LPS 刺激後の TLR4 の脂質ラフト移行に FABP7 が関与するかどうかを検討した。まず、アストロサイトの FABP7 の発現レベル及び局在が LPS 刺激で影響を受けないことを確認した (Fig. 5A, B)。FABP7-KO アストロサイトでは LPS 刺激 10 分後での TLR4 の脂質ラフトへの集積が野生型に比べ顕著に減少していたが (Fig. 5D, E)、野生型及び FABP7-KO アストロサイト間で TLR4 蛋白質の発現レベルに変化は見られなかった (Fig. 5C)。平坦型脂質ラフトのマーカである flotillin-1 の発現について野生型及び FABP7-KO アストロサイト間での違いも見られず、脂質ラフト分画 (fraction 4~7) に含まれる量についても LPS 刺激前、刺激後での変化は見られなかった (Fig. 5D, F)。一方、TLR4 の非脂質ラフト分画 (fraction 8-11) から脂質ラフト分画への移行を検討するために、両分画プールに含まれる TLR4 量をウェスタンブロット法で解析した結果、FABP7-KO アストロサイトでは LPS 刺激後の TLR4 の脂質ラフト分画への移行が野生型に比べて減少していた (Fig. 5G, H, I)。

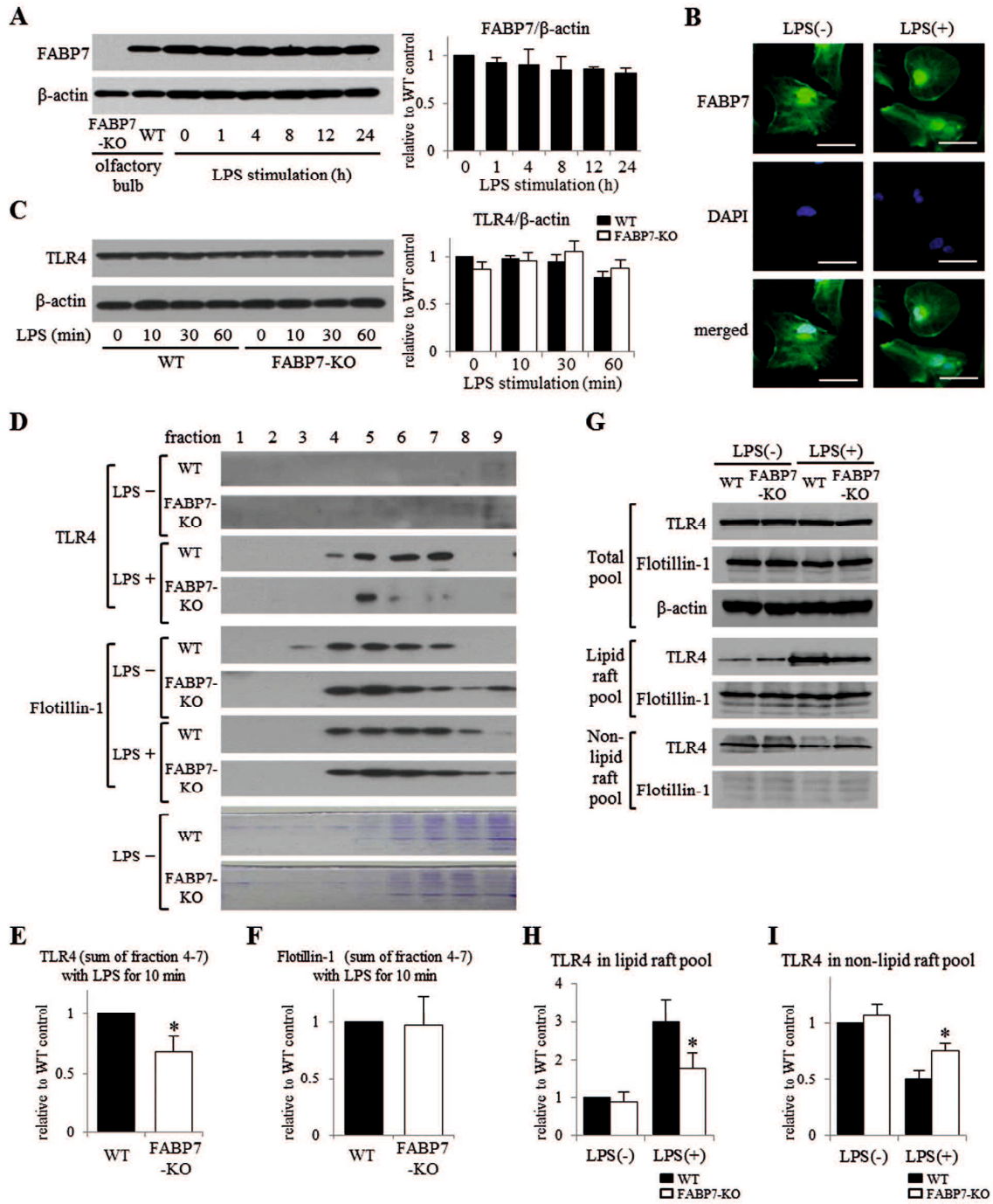


Fig. 5. FABP7-deficiency in astrocytes decreased the recruitment of TLR4 into lipid raft fractions after LPS stimulation.

(A) Protein level of FABP7 in astrocytes in the presence or absence of LPS was evaluated by Western blotting. Astrocytes were stimulated with LPS (1,000 ng/mL) for 0, 1, 4, 8, 12 and 24 h. Total proteins from WT and FABP7-KO olfactory bulb were used as a positive and a negative control, respectively. Band density was analyzed using NIH-Image J. β -actin was used as loading control. (B) Localization of FABP7 in astrocytes before and after LPS stimulation for 10 min was examined by immunofluorescence staining. (FABP7 (green), nucleus (blue)), scale bar: 50 μ m (C) Protein level of TLR4 in astrocytes in the presence or absence of LPS was evaluated by Western blotting. (D) Recruitment of TLR4 and accumulation of flotillin-1 to lipid raft fractions 10 min after LPS stimulation were measured by Western blotting. The 9 fractions from the top of gradient were shown. Coomassie brilliant blue staining showed that the proteins of lipid raft fractions from WT and FABP7-KO astrocytes were equally isolated and loaded in SDS-PAGE. (E, F) The sum of fraction 4-7 density of TLR4 and flotillin-1 were analyzed using NIH-Image J. (G) The levels of TLR4 and flotillin-1 in total pool, lipid raft fraction pool and non-lipid raft fraction pool with or without LPS stimulation for 10 min were measured by Western blotting. (H, I) Band density of TLR4 protein levels in lipid raft pool and non-lipid raft pool was analyzed using NIH-Image J. Data shown are the means \pm s.e.m. and representative of 3 independent experiments. * p <0.05; Student's t-test versus WT astrocytes

次に他の受容体のリガンド誘発性集積に対する FABP7 欠損の影響を検討するために、脂質ラフト分画に含まれる $GFR\alpha 1$ の量的変化を検討した。総蛋白質中の $GFR\alpha 1$ の発現レベルは野生型及び FABP7-KO アストロサイト間での差は見られなかった (Fig. 6C)。FABP7-KO アストロサイトでは GDNF 添加後の脂質ラフト分画に含まれる $GFR\alpha 1$ が野生型に比べ有意に減少していた (Fig. 6A, B)。さらに脂質ラフト分画プールと非脂質ラフト分画プールを比較した結果においても、GDNF 添加後の $GFR\alpha 1$ の非脂質ラフト領域から脂質ラフトへの移行が FABP7-KO アストロサイトでは野生型に比べ減少していた (Fig. 6C, D, E)。以上より、FABP7-KO アストロサイトでは、リガンドによる細胞膜受容体の脂質ラフトへの集積が低下していることが示された。

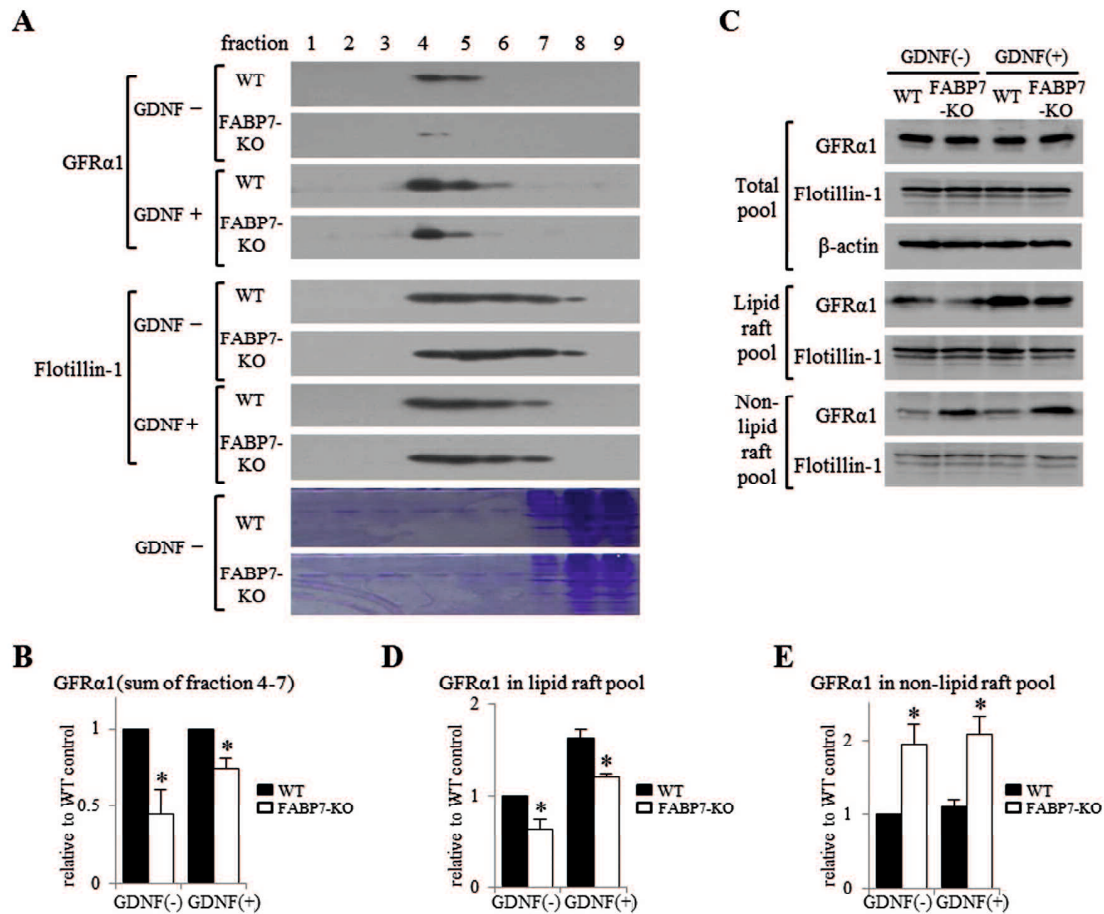


Fig.6. FABP7-deficiency in astrocytes decreased the accumulation of GFR α 1 in lipid raft fractions after GDNF treatment. (A) Accumulation of GFR α 1 in lipid raft fractions 10 min after GDNF treatment (50 ng/ml) was evaluated by Western blotting. Coomassie brilliant blue staining showed that the proteins of lipid raft fractions from WT and FABP7-KO astrocytes were equally isolated and loaded in SDS-PAGE. (B) The sum of fraction 4-7 density of GFR α 1 before and after GDNF treatment were analyzed using NIH-Image J. (C) The levels of GFR α 1 and flotillin-1 in total pool, lipid raft fraction pool and non-lipid raft fraction pool with or without GDNF treatment for 10 min were evaluated by Western blotting. (D, E) Band density of GFR α 1 protein level in lipid raft pool and non-lipid raft pool was analyzed using NIH-Image J. Data shown are the means \pm s.e.m. and representative of 3 independent experiments. * $p < 0.05$; Student's t-test versus WT astrocytes

5-2. FABP7-KO アストロサイトにおける細胞内シグナル活性及びサイトカインの産生低下

FABP7-KO アストロサイトでリガンド結合による受容体の脂質ラフトへの集積が減少していたことから、LPS 誘発 TLR 4 シグナルの下流にある NF- κ B や MAPKs の活性化について検討した。抗リン酸化 MAPKs (ERK1/2 (ERK)、p38MAPK (p38)、SAPK/JNK (JNK)) 抗体を用いたウェスタンブロット解析では、FABP7-KO アストロサイトでは野生型に比べ LPS 刺激後 30 分での ERK、p38、JNK のリン酸化が減少していた (Fig. 7A)。また非リン酸化 I κ B- α を認識する抗体を用いたウェスタンブロット解析では、FABP7-KO アストロサイトでは野生型に比べ LPS 刺激後 30 分での非リン酸化 I κ B- α が有意に増加していた (Fig. 7A)。一方で、全 I κ B- α レベル (非リン酸化 I κ B- α 及びリン酸化 I κ B- α 両方) に関しては、野生型及び FABP7-KO アストロサイト間の差が見られなかった (Fig. 7A)。以上より、FABP7-KO アストロサイトでは野生型に比べ NF- κ B シグナルが低下していることが示された。

次に NF- κ B や MAPKs シグナルの下流にある遺伝子発現の網羅的解析を目的としてマイクロアレイを施行した。LPS 刺激 4 時間後のアストロサイトから分泌されるサイトカインやケモカイン (TNF- α , interleukin-6 (IL-6)、chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7)、C-X-C motif chemokine 5 (Cxcl5)、monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)) の遺伝子発現が FABP7-KO アストロサイトでは野生型に比べ有意に低下していた (Fig. 7B)。さらに LPS 刺激後 TNF- α mRNA を定量 Real-time PCR 法により、培養上清中の TNF- α の量を ELISA 法により、それぞれ解析した結果、TNF- α の遺伝子発現及び分泌が FABP7-KO アストロサイトでは野生型に比べ低下していることが示された (Fig. 7C, D, E)。アストロサイトに対する LPS の細胞毒性及び刺激後の細胞増殖を検定するために MTS 法及びト

リパンブルー色素排除試験法を行ったが、野生型及び FABP7-KO アストロサイト共に細胞数に変動は見られなかった (Fig. 8)。

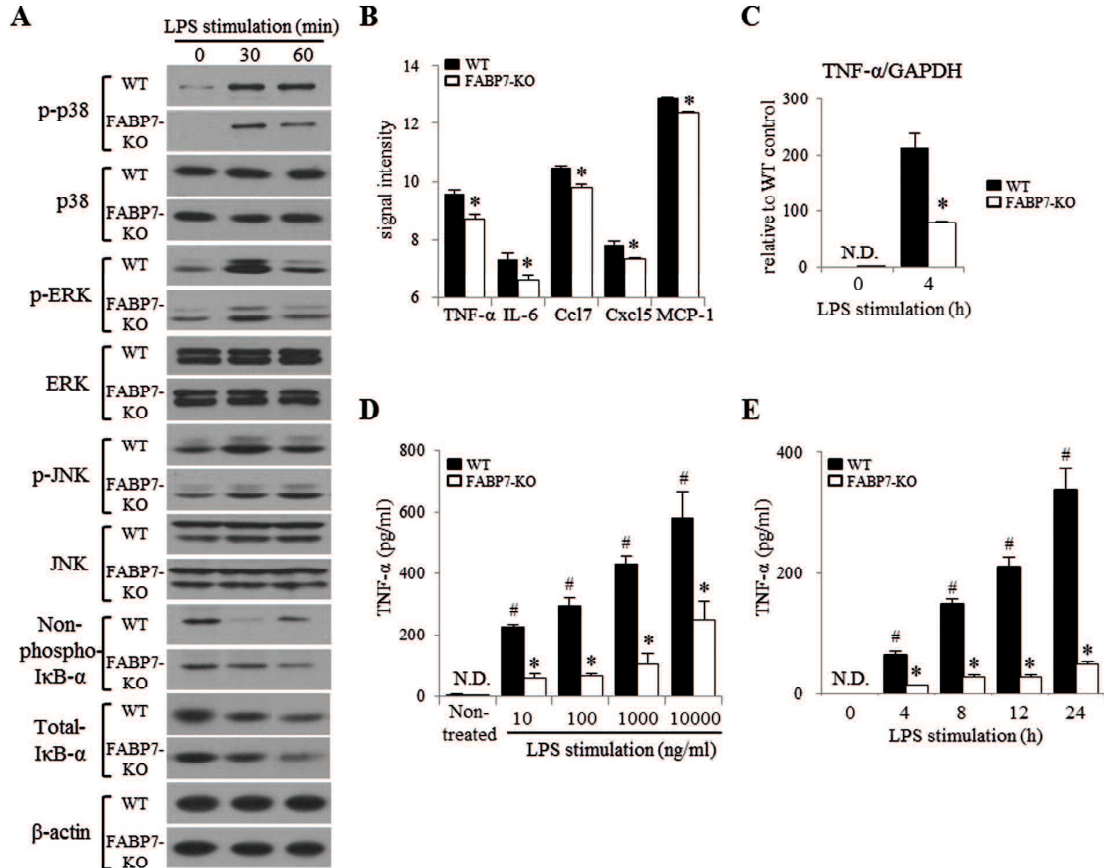


Fig. 7. FABP7-deficiency in astrocytes decreased the activity of MAPKs (p38, ERK1/2, JNK) and NF- κ B, and TNF- α production after LPS stimulation. (A) Induction of phosphorylation of p38MAPK, ERK1/2, SAPK/JNK and I κ B- α after LPS stimulation (1,000 ng/mL) was examined by Western blotting. The non-phospho-I κ B- α antibody detected just non-phospho-protein and total I κ B- α antibody detected both phospho- and non-phospho-I κ B- α . The p38MAPK, ERK1/2, and SAPK/JNK antibodies detected total protein. (B) Gene expression of TNF- α , IL-6, Ccl17, Cxcl5 and MCP1 4 h after LPS stimulation was examined by microarray analysis. (C) Gene expression of TNF- α was examined by qPCR. (D, E) Production of TNF- α after LPS stimulation was measured by ELISA. (D) Astrocytes were stimulated with LPS for 24 h. (E) Astrocytes were stimulated with LPS (1,000 ng/ml). Data shown are the means \pm s.e.m. and representative of 3 independent experiments. # $p < 0.05$; one-way ANOVA versus non-treated WT astrocytes, * < 0.05 ; Student's t-test versus WT astrocytes

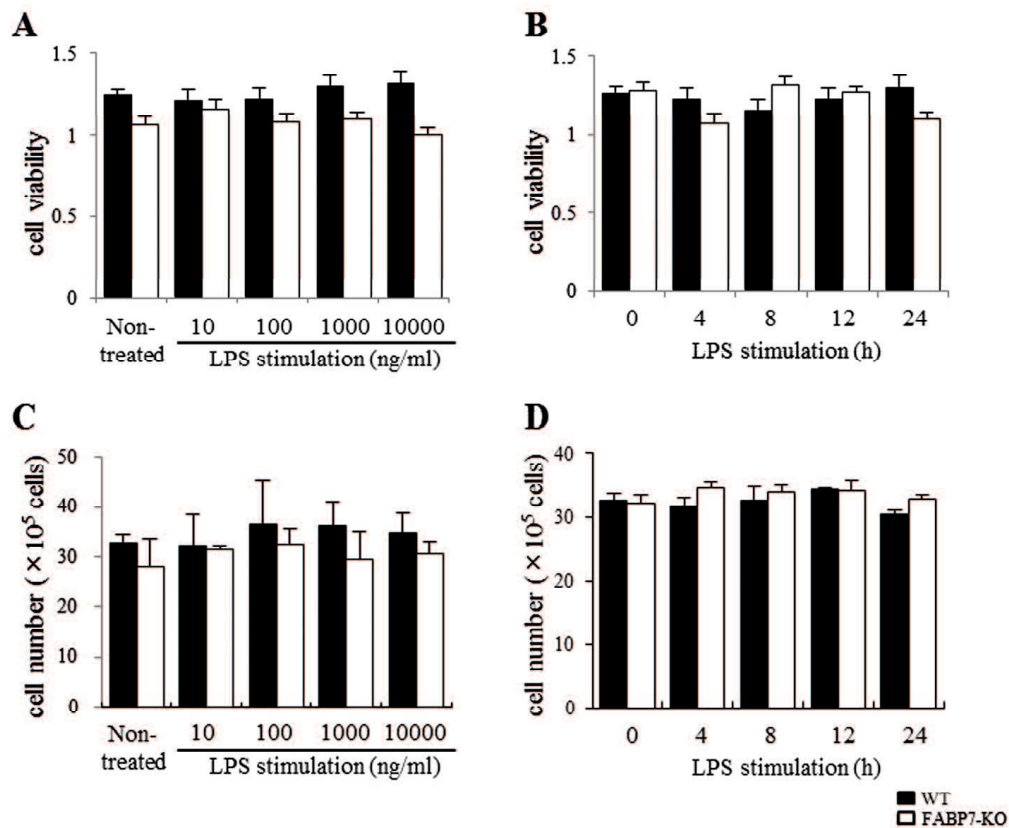


Fig. 8. Cell viability did not change after LPS stimulation between WT and FABP7-KO astrocytes. To evaluate the cell viability of WT and FABP7-KO astrocytes after LPS stimulation, the MTS assay (A, B) and trypan blue exclusion test (C, D) were performed. (A, C) Astrocytes were stimulated for 24 h with LPS (0, 10, 100, 1000 and 10000 ng/ml). (B, D) Astrocytes were stimulated with LPS (1,000 ng/ml) for 0, 4, 8, 12 and 24 h.

5-3. FABP7-KO アストロサイトにおける caveolin-1 発現の低下

Caveolin、cavin、flotillin-1 は脂質ラフト(カベオラ) の形成と機能において必須の蛋白質である (Bucci et al. 2000; Mundy et al. 2012)。そこでアストロサイトに豊富に発現する分子を検索するために、caveolin-1、2、cavin-1、2、3、4、flotillin-1 の遺伝子発現を定量 real-time PCR で検討した。これらの中で caveolin-1、cavin-3、flotillin-1 の発現が相対的に高いことが分かった (Table 2)。

	WT non-treated		FABP7-KO non-treated		WT LPS stimulation(4h)		FABP7-KO LPS stimulation (4h)	
	Ct	RQ	Ct	RQ	Ct	RQ	Ct	RQ
caveolin-1	30.95±0.03	1.00±0.03	32.30±0.13	0.40±0.04*	27.61±0.05	0.77±0.06	28.78±0.16	0.30±0.05*
caveolin-2	28.66±0.11	1.00±0.07	28.98±0.06	0.81±0.11	24.76±0.05	1.13±0.10	24.62±0.01	1.08±0.20
cavin-1	34.72±0.35	1.00±0.23	35.27±0.26	0.70±0.12	32.35±0.23	0.39±0.44	32.08±0.33	0.41±0.11
cavin-2	35.19±0.19	1.00±0.12	34.83±0.20	1.31±0.17	31.06±0.25	1.32±0.24	31.87±0.31	0.66±0.16
cavin-3	26.68±0.09	1.00±0.06	26.84±0.05	0.91±0.05	22.41±0.02	1.46±0.12	22.59±0.01	1.12±0.16
cavin-4	35.29±0.09	1.00±0.48	35.63±1.33	0.80±1.03	31.27±0.50	1.22±0.48	31.72±0.97	0.78±0.08
flotillin-1	25.98±0.06	1.00±0.04	26.17±0.05	0.89±0.05	22.23±0.07	0.89±0.05	22.37±0.06	0.80±0.12

Table 2. The mRNA expression of caveolin-1, but not caveolin-2, cavin-1, 2, 3, 4 or flotillin-1 was decreased in FABP7-KO astrocytes before and after LPS stimulation.

The mRNA expression of caveolae-related molecules in WT and FABP7-KO astrocytes before and after LPS stimulation for 4 h was evaluated by qPCR. Data shown are the means±s.e.m. and representative of 3 independent experiments. *p<0.05; Student's t-test versus WT astrocytes

野生型及びFABP7-KOアストロサイトにおける caveolin-1、cavin-1、cavin-3、flotillin-1 の発現レベルをウェスタンブロットで検討すると、興味深いことに FABP7-KO アストロサイトでは、caveolin-1 の発現が LPS 刺激前、刺激後共に減少していたが、他の cavin-1、cavin-3、flotillin-1 の発現に差が見られなかった (Fig. 9A)。遺伝子レベルでも、FABP7-KO アストロサイトでは caveolin-1 の発現のみが野生型に比べ低下していた (Fig. 9B)。

一方で、細胞内 caveolin-1 量は、蛋白質分解の影響を受け易いと報告されている (Hayer et al. 2010b)。そこで FABP7-KO アストロサイトで検出された caveolin-1 の発現低下に蛋白質分解機構の変動が関与しているかどうかを検討するため、MG132 処置後のアストロサイトにおける caveolin-1 の量的変動をウェスタンブロットで解析した。MG132 処置によって FABP7-KO アストロサイトの caveolin-1 レベルが野生型と同等の発現レベルに復した (Fig. 9C)。FABP7-KO アストロサイトでの caveolin-1 の発現レベルの低下は、遺伝子発現低下ばかりではなく、部分的に蛋白質分解の亢進によることが示唆された。

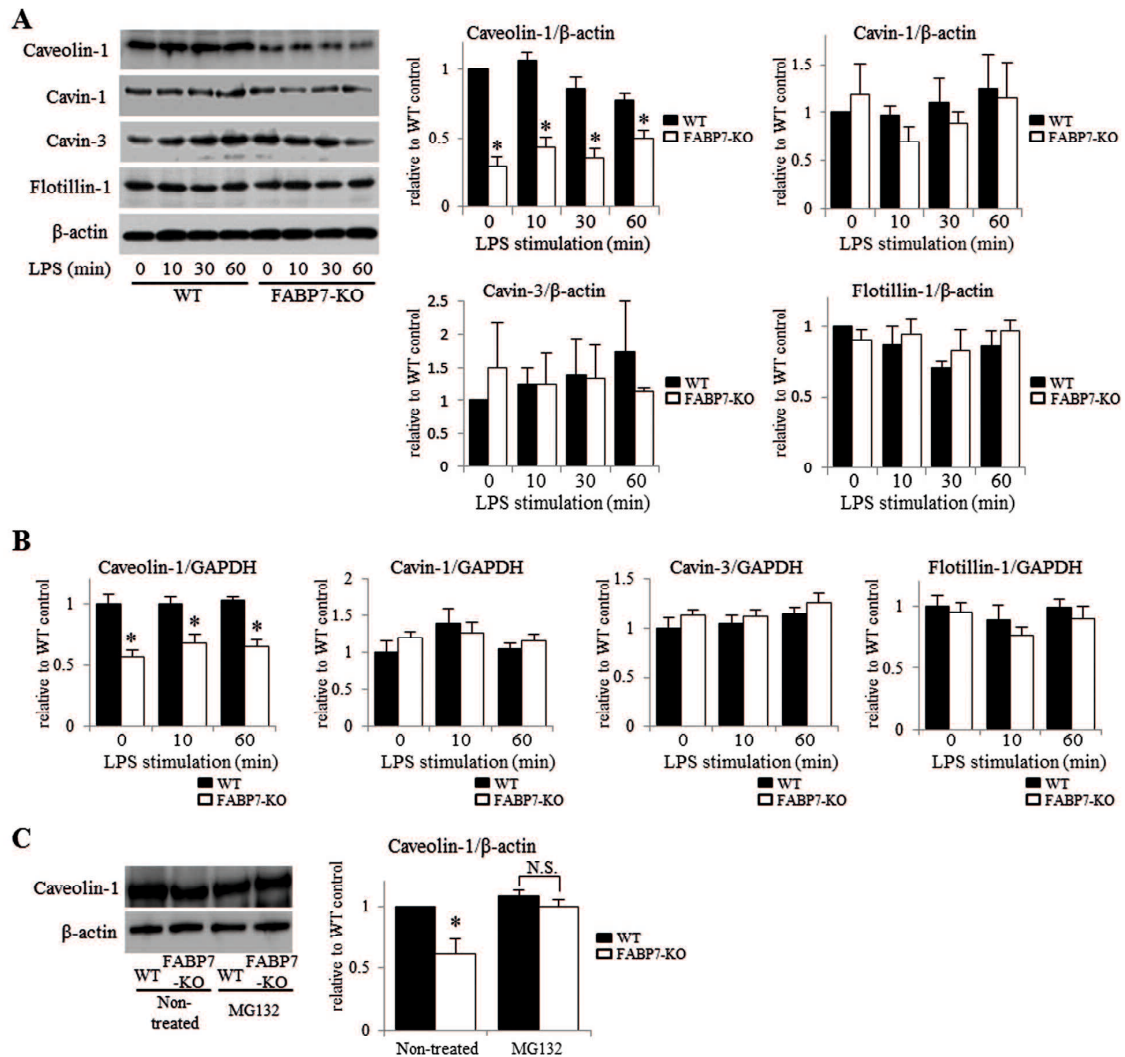


Fig. 9. FABP7-deficiency in astrocytes decreased the expression of caveolin-1.

(A) Protein levels of caveolin-1, cavin-1, 3 and flotillin-1 with or without LPS stimulation (1,000 ng/mL) in total cell lysates were measured by Western blotting. Band density was analyzed using NIH-Image J. (B) Gene expression of caveolin-1, cavin-1, cavin-3 and flotillin-1 after LPS stimulation was examined by qPCR. (C) The level of caveolin-1 after treatment of MG132 (5 μ M) for 24 h was evaluated by Western blotting. Band density was analyzed using NIH-Image J. Data shown are the means \pm s.e.m. and representative of 3 independent experiments. * <0.05 ; Student's t-test versus non-treated WT astrocytes

最後に、脂質ラフト分画に集積した caveolin-1、cavin-1、cavin-3 をウェスタンブロット法で定量すると、全蛋白質を用いた定量結果と同様に、caveolin-1 の発現のみが野生型に比べ FABP7-KO アストロサイトで低下していることが確認された。(Fig. 10A, B, C, D, E, F)。

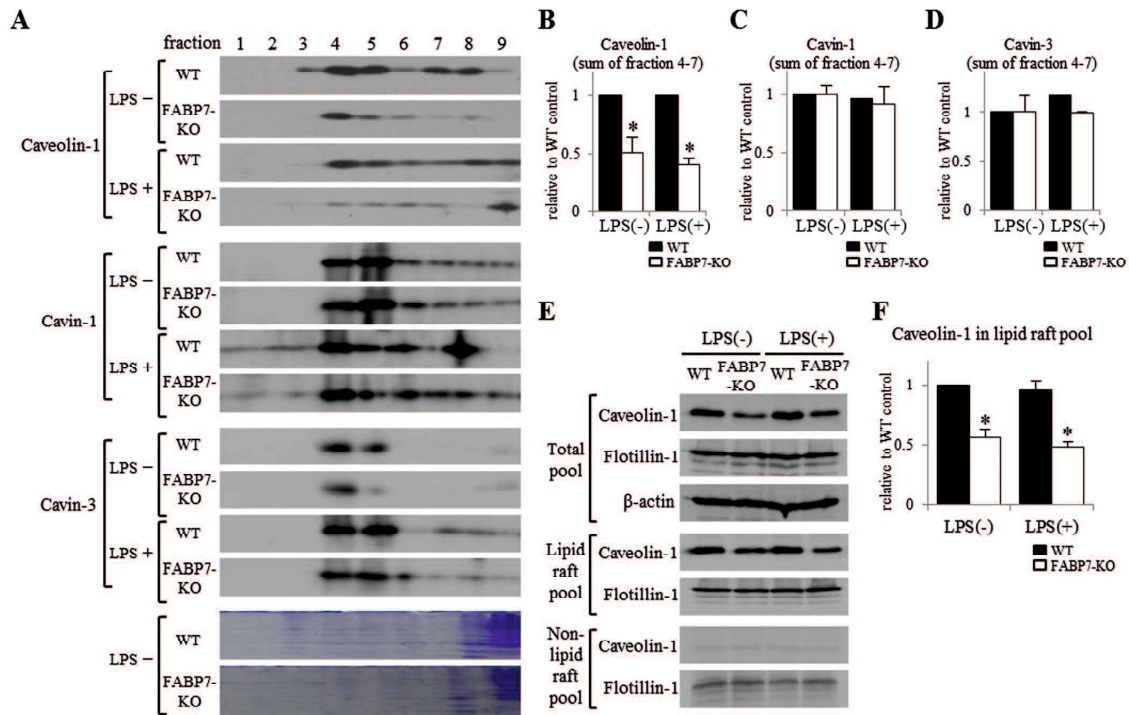


Fig. 10. FABP7-deficiency in astrocytes decreased the accumulation of caveolin-1 in lipid raft fractions. (A) Accumulation of caveolin-1, cavin-1, 3 and flotillin-1 with or without LPS stimulation for 10 min in lipid raft fractions was measured by Western blotting. Coomassie brilliant blue staining showed that the proteins of lipid raft fractions from WT and FABP7-KO astrocytes were equally isolated and loaded in SDS-PAGE. (B, C, D) The sum of fraction 4-7 density of caveolin-1 (B), cavin-1 (C) and cavin-3 (D) were analyzed using NIH-Image J. (E) The levels of caveolin-1 and flotillin-1 in total pool, lipid raft fraction pool and non-lipid raft fraction pool with or without LPS stimulation for 10 min were evaluated by Western blotting. (F) Band density of caveolin-1 protein levels was analyzed using NIH-Image J. Data shown are the means \pm s.e.m. and representative of 3 independent experiments. * $p < 0.05$; Student's t-test versus WT astrocytes

5-4. FABP7-KO アストロサイトにおけるカベオソーム及び脂質ラフト分画でのコレステロール量の低下

脂質ラフトの中の一つであるカベオラは受容体の細胞内移動のプラットフォームとして機能し、caveolin-1 はカベオソーム形成（細胞内に移動したカベオラ小胞）に重要な役割を果たす (Mundy et al. 2012)。はじめに、FABP7-KO アストロサイトにおける caveolin-1 発現の減少がカベオソーム形成に影響を与えているかどうかを検討した。免疫染色の結果、FABP7-KO アストロサイトでは細胞膜、細胞質共に caveolin-1 の局在を示す蛍光強度が野生型に比べ顕著に減少していた (Fig. 11A, B)。一方で cavin-1, cavin-3 には変化が見られなかった (Fig. 11A)。また、カベオソーム形成を示す caveolin-1 と初期エンドソームのマーカーである EEA-1 の共局在 (カベオラ小胞) (Li et al. 2013) が FABP7-KO アストロサイトで顕著に減少していた (Fig. 11C, D, E)。これらの結果により FABP7-KO アストロサイトでの caveolin-1 発現低下による脂質ラフト機能の低下とエンドサイトーシス機能の変化が示された。

脂質ラフト分画のコレステロール量は caveolin-1 の発現レベルと相関することが報告されているので (Head et al. 2011)、野生型及び FABP7-KO アストロサイトの細胞全体のコレステロール量または脂質ラフト分画プール、非脂質ラフト分画プールに含まれるコレステロール量を測定した。細胞全体のコレステロール量は両者で差が見られなかったが (Fig. 11H)、脂質ラフト分画プールのコレステロール量は FABP7-KO アストロサイトで有意な低下が見られた (Fig. 11F)。一方で、非脂質ラフト分画プールにおけるコレステロール量は、野生型に比べ FABP7-KO アストロサイトの方が高値を示した (Fig. 11G)。以上の結果より、FABP7-KO アストロサイトでは caveolin-1 の低下と細胞膜上のコレステロール低下によって脂質ラフト形成とエンドサイトーシスに変調が生じていることが示

された。

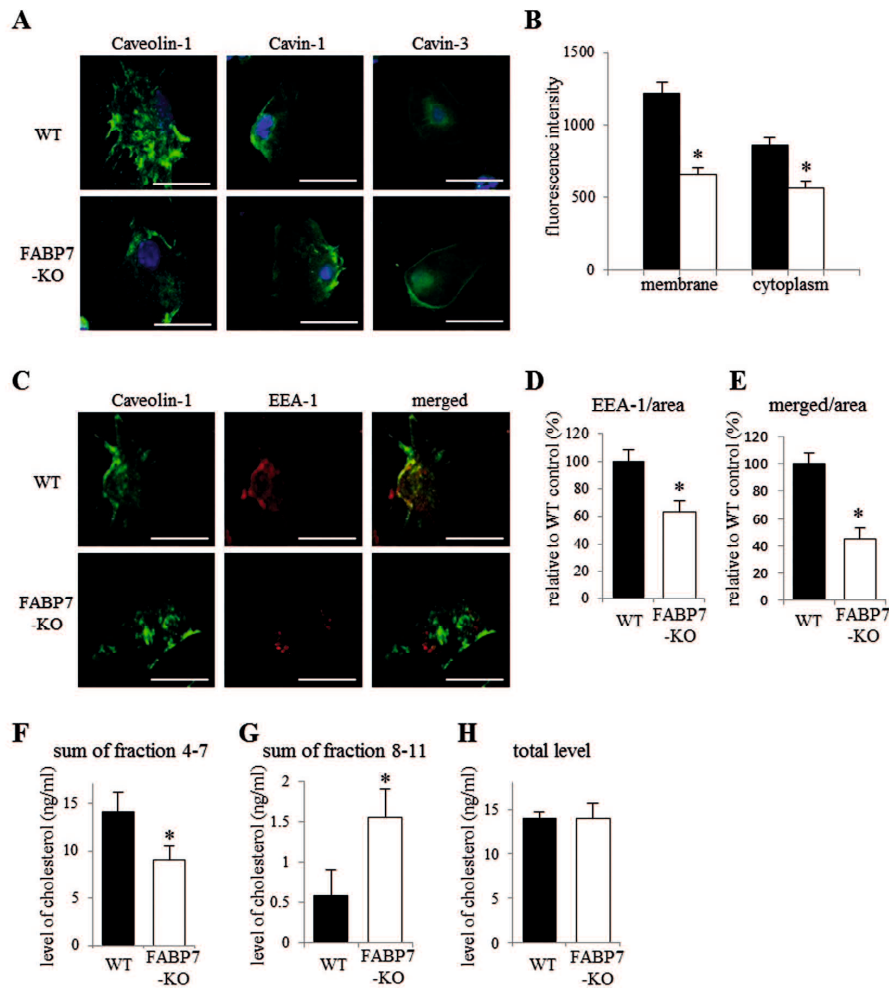


Fig. 11. FABP7-deficiency in astrocytes affected the caveolin-1-positive early endosome and the levels of cholesterol in lipid raft fractions. (A) The localization and expression of caveolin-1, cavin-1 and cavin-3 were evaluated by immunofluorescence staining. scale bar: 50 μ m (B) Fluorescence intensity of caveolin-1 in the membrane and cytoplasm was evaluated by Zen software. (C) The expression of EEA-1 and co-localization of EEA-1 with caveolin-1 were evaluated by immunofluorescence staining (caveolin-1 (green), EEA-1 (red)). scale bar: 50 μ m (D, E) The levels of EEA-1-positive compartments and co-localization of EEA-1 with caveolin-1 were analyzed using puncta analyzer. (F, G, H) The levels of cholesterol in lipid raft (fraction 4-7), in non-lipid raft (fraction 8-11) and in total cells were evaluated. Data shown are the means \pm s.e.m. and representative of 3 independent experiments. * <0.05 ; Student's t-test versus WT astrocytes

5-5. Caveolin-1 過剰発現による FABP7-KO アストロサイトの脂質ラフト機能異常の改善

ここまでの結果から、アストロサイトでの FABP7 の欠損が caveolin-1 の発現低下及び脂質ラフト機能の変調を誘導することが示された。そこで FABP7-KO アストロサイトに見られる脂質ラフトの機能変化が caveolin-1 の低下によることを確認するために、以下の実験を行った。まず、FABP7-KO アストロサイトに FABP7 を再発現すると、caveolin-1 の発現が遺伝子及び蛋白質レベルで回復し (Fig. 12A)、免疫染色によってそれが細胞膜に存在する caveolin-1 量の増加に結び付くことが確認された (Fig. 12B)。さらに caveolin-1 を過剰発現させた FABP7-KO アストロサイトでは、脂質ラフト分画に含まれる caveolin-1 が増加するとともに、LPS 刺激後の TLR4 の脂質ラフト分画への集積及び TNF- α の産生が増加した (Fig. 12C)。以上の結果により、FABP7-KO アストロサイトに見られる脂質ラフトの機能変調が caveolin-1 の低下によることが裏付けられた。

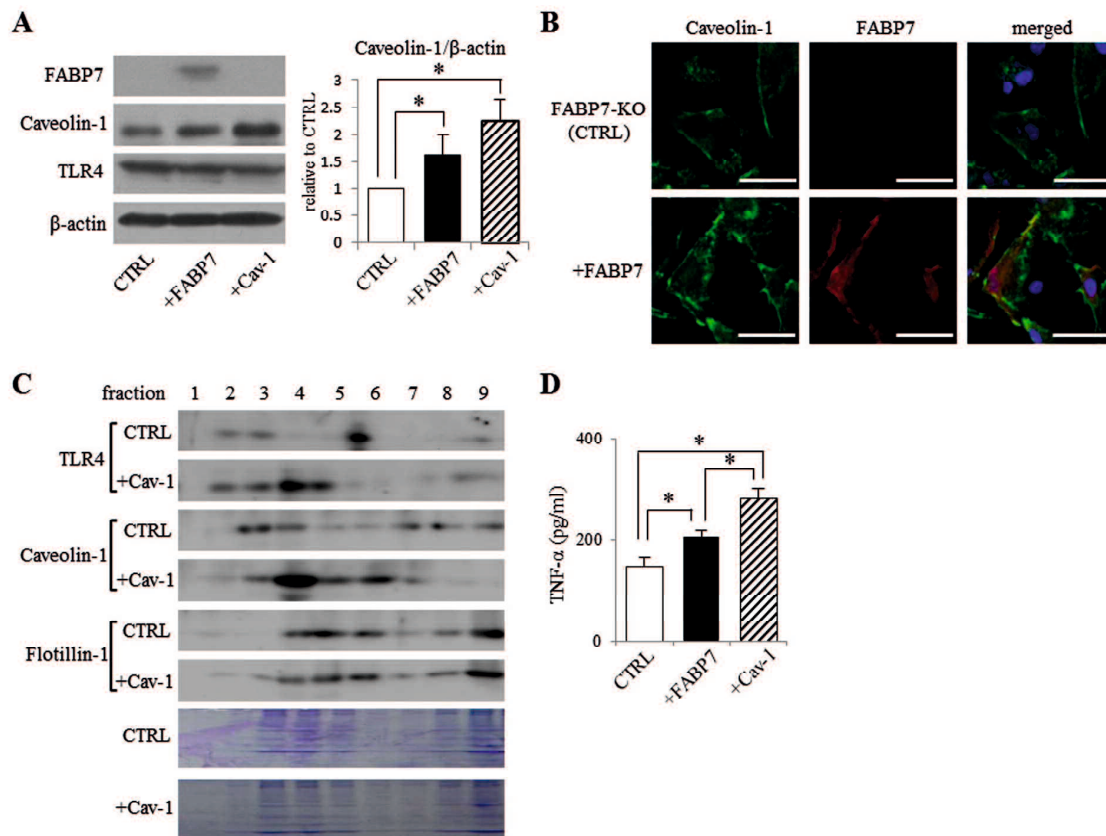


Fig. 12. Rescue expression of caveolin-1 in FABP7-KO astrocytes improved TLR4 recruitment into lipid raft fractions and TNF- α production after LPS treatment.

(A) The levels of FABP7, caveolin-1 and TLR4 in FABP7-reexpressed- and caveolin-1-transfected-FABP7-KO astrocytes were evaluated by Western blotting. LacZ-expressed FABP7-KO astrocyte (CTRL) was used as control. Band density of caveolin-1 protein level was analyzed using NIH-Image J. (B) The localization and expression of caveolin-1 in FABP7-reexpressed FABP7-KO astrocytes were evaluated by immunofluorescence staining. scale bar: 50 μ m (C) Recruitment of TLR4 and levels of caveolin-1 and flotillin-1 in lipid raft fractions 10 min after LPS stimulation in caveolin-1-transfected FABP7-KO astrocytes were measured by Western blotting. Coomassie brilliant blue staining showed that the proteins of lipid raft fractions from caveolin-1-transfected FABP7-KO and CTRL were equally isolated and loaded in SDS-PAGE. (D) Production of TNF- α after LPS stimulation in FABP7-reexpressed- and caveolin-1-transfected FABP7-KO astrocytes was measured by ELISA. Data shown are the means \pm s.e.m. and representative of 3 independent experiments. * <0.05 ; Student's t-test versus LacZ-expressed FABP7-KO astrocytes

アストロサイトは、幼若で増殖が活発な状態と、成熟・分化した状態では、細胞の脂肪酸構成 (Murphy et al. 1997) や外部刺激応答性 (Baskin et al. 1997) が異なることが報告されている。そこで最後に、アストロサイトの培養期間や分化状態が、解析結果におよぼす影響について検証した。長期培養を行った場合、さらに db-cAMP 投与により分化を促した場合ともに、野生型及び FABP7-KO アストロサイト間に形態の違いは認められなかった (Fig. 13)。一方で、幼弱なアストロサイトに比べ、長期培養や分化誘導を行ったアストロサイトでは、FABP7、caveolin-1 の発現や LPS 刺激後の TNF- α の発現が著明に低下していた (Fig. 14)。さらに、幼弱な野生型及び FABP7-KO アストロサイト間で見られた caveolin-1 の発現や LPS 刺激後の TNF- α の発現の違いが、長期培養や分化誘導を行ったアストロサイトでは見られなかった (Fig. 14)。

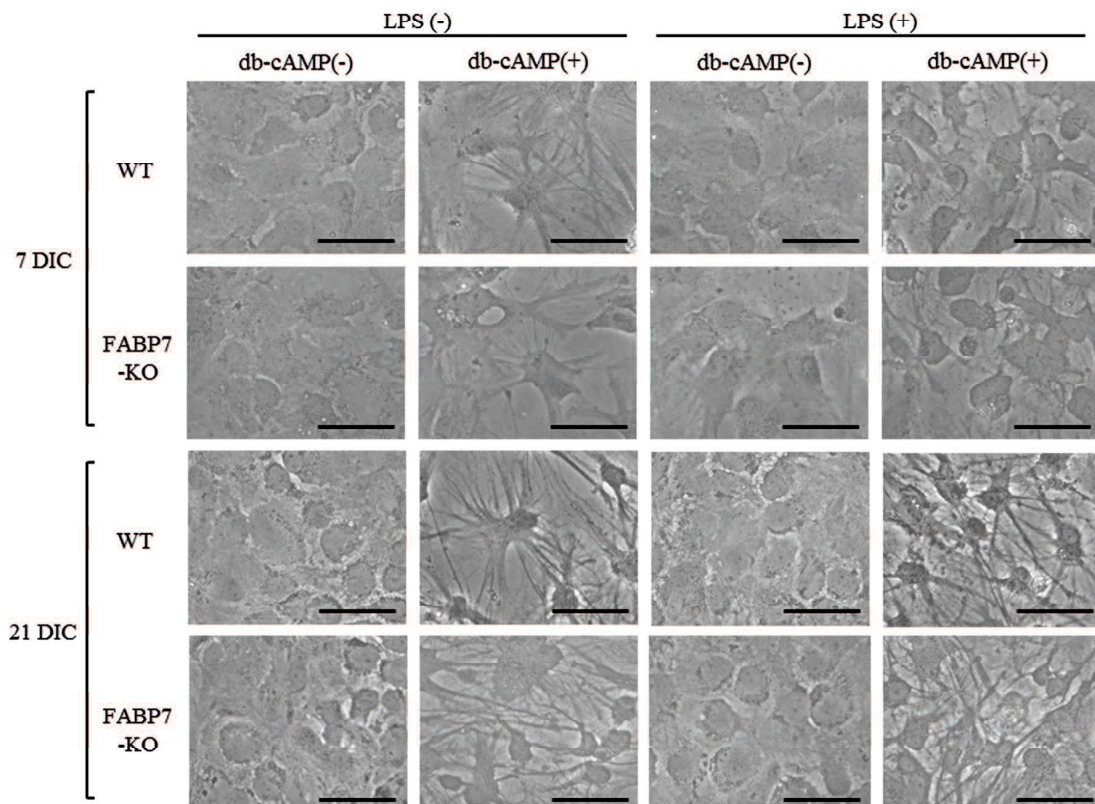


Fig. 13. *There was no obvious morphological change before or after LPS stimulation between WT and FABP7-KO astrocytes cultured for 7 days or 21 days even though treated with db-cAMP.* Morphology of primary cultured astrocytes was observed by phase-contrast microscopy. Astrocytes were treated with db-cAMP (250 μ M) for 7 days (7 DIC) or 21 days (21 DIC) after passage. At 7 DIC and 21 DIC, astrocytes were stimulated with LPS (1,000 ng/ml) for 4 h. scale bar: 100 μ m

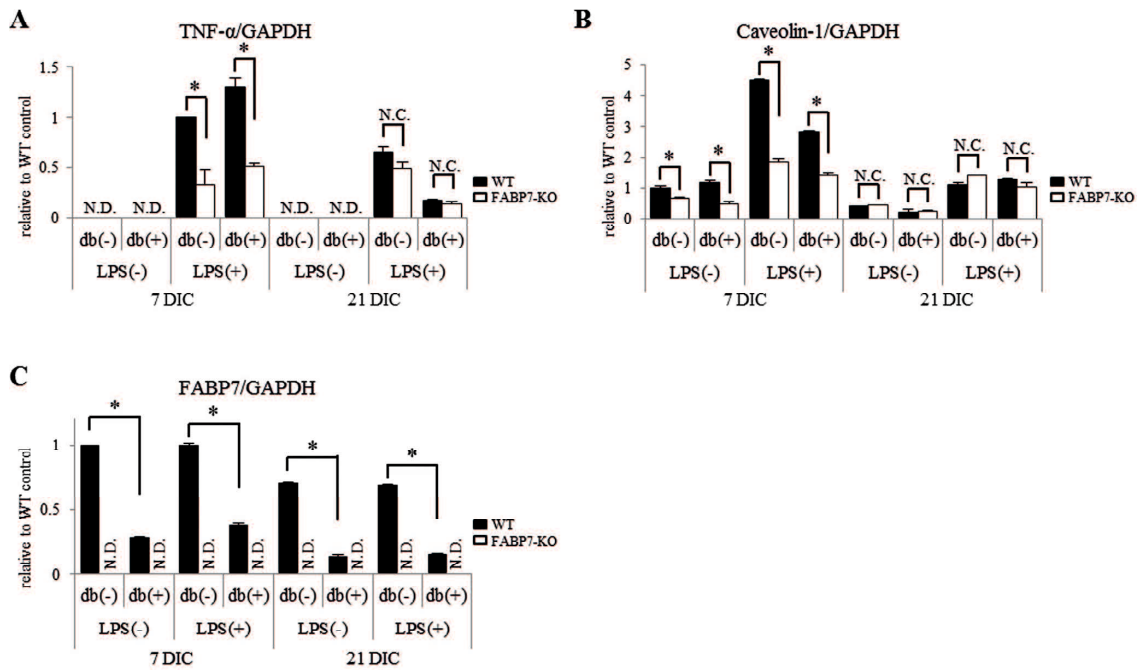


Fig. 14. The mRNA expression of TNF- α , caveolin-1 and FABP7 was decreased in WT astrocytes at DIC 21 compared with at DIC 7, and the difference in TNF- α and caveolin-1 levels between WT and FABP7-KO astrocytes was not detectable at DIC 21. The mRNA expression of TNF- α (A), caveolin-1 (B) and FABP7 (C) was measured by qPCR. Astrocytes were treated with db-cAMP (250 μ M) for DIC 7 or DIC 21 after passage. At 7 DIC and 21 DIC, astrocytes were stimulated with LPS (1,000 ng/ml) for 4 h. Data shown are the means \pm s.e.m. and representative of 3 independent experiments.

6. 考察

本研究では、FABP7-KO アストロサイトにおいて、LPS 刺激後の TLR4 の脂質ラフトへの移行、細胞内シグナリング (MAPKs、NF- κ B) 活性化、および TNF- α 産生という一連の過程がいずれも低下していることが明らかになった。さらに、この刺激応答の低下が、脂質ラフトの重要な構成蛋白質である caveolin-1 の発現低下によって引き起こされている可能性が示された。神経系の主要な構成細胞であるアストロサイトの外部環境応答において、FABP7 は脂質ラフト形成と機能の調節を介して重要な役割を担い、脳の発達や神経精神疾患に深く関与していることが考えられる (Fig. 15)。

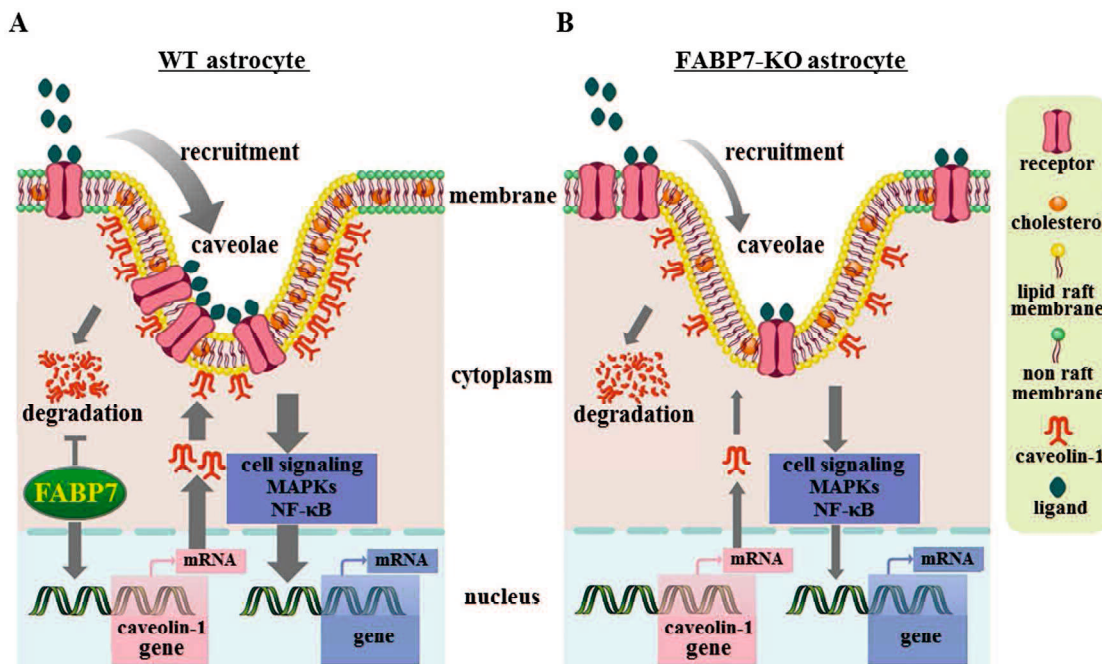


Fig.15. Schematic illustration depicting the putative functions of FABP7 in the astrocytes (A) In WT astrocyte, FABP7 regulates the caveolin-1 gene expression. The receptors recruit into lipid rafts in response to the stimuli, and the downstream signaling is initiated. FABP7 suppresses the degradation of caveolin-1. **(B)** In FABP7-KO astrocyte, the decreased expression of caveolin-1 impaired lipid raft function and its downstream signaling.

細胞膜におけるリガンド依存性の受容体の活性化は、主に脂質ラフト上で制御されていることが知られている (Pelkmans and Zerial 2005)。Caveolin-1 は脂質ラフトの一つであるカベオラの裏打ち蛋白質であり、カベオラの機能制御に深く関与する重要な構成要素である (Parolini et al. 1999; Simons and Toomre 2000)。近年、さらなるカベオラの重要な構成成分としてキャビンファミリーが報告されたが、その一つである Cavin-1 は caveolin-1 との相互作用を介して大きな複合体を形成し (Hayer et al. 2010a)、カベオラの細胞質側に局在してカベオラを形成することが明らかにされている (Voldstedlund et al. 2003)。そこで本研究では、LPS 刺激による TLR4 の脂質ラフトへの移行が FABP7-KO アストロサイトで減少した原因として、FABP7-KO アストロサイトではカベオリンやキャビンなどの脂質ラフト構成蛋白質の量や局在に変化が生じているのではないかと推測した。アストロサイトにおける脂質ラフト構成蛋白質の発現を解析した結果、興味深いことに caveolin-1 が FABP7-KO アストロサイトにおいて遺伝子レベル及び蛋白質レベルで減少していることが明らかになった。さらに FABP7-KO アストロサイトではリガンド誘発細胞内シグナリングの低下によるサイトカイン産生の低下に加え、カベオソーム形成が低下していることが明らかになった。caveolin-1 遺伝子欠損による脂質ラフト機能の異常についての研究は多く、ヒトの血管内皮細胞の caveolin-1 ノックダウンにより TNF 受容体の脂質ラフト移行が減少すること (D'Alessio et al. 2012)、Caveolin-1 遺伝子欠損マウスの肺では LPS 投与による NF- κ B シグナリング抑制と inducible nitric oxide synthase 及び intracellular adhesion molecule-1 の産生が低下すること (Garrean et al. 2006) が報告されている。逆に、線維芽細胞に caveolin-1 を過剰発現させると TGF- β /smad1 シグナル活性が増加すること (Haines et al. 2012)、ニューロンに caveolin-1 を過剰発現させるとシナプスの数が増え、brain-derived neurotrophic factor シグナリン

グの活性が亢進すること (Head et al. 2011) が報告されている。また、MCF7 細胞での caveolin-1 発現抑制は、刺激による IL-1 β 受容体のエンドサイトーシスを減少させることが報告されている (Martinez-Perez et al. 2005)。これらの報告を考え合わせると、今回の研究で明らかになった FABP7-KO アストロサイトでの受容体のリガンド依存脂質ラフト移行やカベオソームの減少は caveolin-1 の発現低下によるものではないかと考えられた。そこで、脂質ラフト形成への FABP7 の直接的関与を明確にするために FABP7-KO アストロサイトにおける FABP7 の再発現実験を行った。その結果、FABP7 を再発現させることにより、細胞膜に存在する caveolin-1 量が増加し、さらに caveolin-1 を過剰発現させた FABP7-KO アストロサイトでは脂質ラフト分画に含まれる caveolin-1 が増加し、同時に LPS 刺激後の TLR4 の脂質ラフト分画への集積及び TNF- α の産生が増加した。

これまでに PUFAs と脂質ラフト機能の関連についての研究が幾つか行われており、n-3 系 PUFAs 添加による細胞膜の脂肪酸構成及び膜透過性の変化 (Schley et al. 2007)、n-3 系 PUFAs の添加による脂質ラフト上での受容体クラスター形成の抑制とそれに続く細胞内シグナル活性の低下 (Lauritzen et al. 2000) が報告されている。今回の研究では FABP7 の持つアストロサイトでの役割を明らかにするために初代培養アストロサイトを用いた。初代培養アストロサイトは分裂増殖が盛んで、形態的にも比較的未熟なアストロサイトである。未熟なアストロサイトと分化した (成熟した) アストロサイトでは細胞の脂肪酸構成 (Murphy et al. 1997) や外部刺激応答性 (Baskin et al. 1997) が異なることが報告されている。そこで、先述の初代培養アストロサイト (未熟なアストロサイト) の他に、長期培養や db-cAMP により分化させた初代培養アストロサイトを作製し、これらの細胞で FABP7 が caveolin-1 の発現及び LPS 刺激後の TNF- α の発現に関わるかどうかを検討した。その結果、分化したアストロサイトでは未熟なアス

トロサイトに比べ caveolin-1 の発現及び LPS 刺激後の TNF- α の発現が低下していることが明らかになった。さらに、幼弱な野生型及び FABP7-KO アストロサイト間で見られた caveolin-1 の発現や LPS 刺激後の TNF- α の発現における有意な差も成熟アストロサイトでは見られなかった。従って、FABP7 は成熟アストロサイトよりも未熟なアストロサイトにおいて脂質ラフト機能の制御に関与していると考えられる。FABP7 が成熟期脳よりも胎生期から幼若期脳で高い発現を示す (Owada et al. 1996) ことから、アストロサイトに発現する FABP7 の脂質ラフトを介した細胞内シグナルの制御は、神経系の発達過程で、より高い重要性を持っている可能性が考えられる。今後 FABP7 による脂質ラフト機能制御と脳の発達について、より詳細な解析をする必要がある。

一般的に活性化アストロサイト (反応性アストロサイトとも呼ばれる) は比較的幼弱で、活発に分裂増殖し、炎症性サイトカインや神経成長因子を含む様々なメディエーターを放出する。これまでに、アルツハイマー病 (Wyss-Coray et al. 2003)、ハンチントン病 (Bradford et al. 2010)、パーキンソン病 (Chen et al. 2009)、筋萎縮性側索硬化症 (Nagai et al. 2007) といったヒトの神経炎症性疾患や神経変性疾患では活性化アストロサイトが重要な役割を果たすと考えられており、特に TNF- α や MCP-1 などのサイトカインは多発性硬化症 (Van Der Voorn et al. 1999) やパーキンソン病 (Niranjan et al. 2012) では、それらの発症や病態の進行に深く関与している。つまり、アストロサイトの FABP7 による脂質ラフトの機能の制御はこうした神経変性の病態において深く関与している可能性がある。今後、アストロサイトの脂質ラフト異常と神経変性疾患の病態との関連について FABP7-KO マウスをモデルに用いた解析が期待される。

精神疾患患者由来の試料を用いたゲノムワイド関連解析によって、FABP7 は統合失調症や自閉症などのヒト精神疾患の病因と関わりがあることが示され

ている (Iwayama et al. 2010; Maekawa et al. 2010; Watanabe et al. 2007)。一方で、統合失調症での患者では、グルタミン酸トランスポーター1 の遺伝子発現がアストロサイトで 2.5 倍以上増加していることが報告されている (Matute et al. 2005)。しかし、統合失調症に関しても様々な受容体の活性との関連が報告されている中で、アストロサイトの脂質ラフトと統合失調症の関連性に関する知見は無い。興味深いことに、本研究で注目した caveolin-1 を欠損する caveolin-1-KO マウスでは統合失調症の中間表現型の一つであるプレパルス抑制 (PPI) が障害されていることが報告されている (Allen et al. 2011)。そのような caveolin-1-KO マウスとの表現型の類似性は、本研究で明らかとなった FABP7-KO マウスの caveolin-1 発現低下によって説明できると考えられ、FABP7 による脂質ラフト機能の制御がアストロサイトによる神経可塑性に影響を及ぼし、統合失調症や自閉症の病態に深く関与することを示唆している。

脂質ラフトの機能及びその関連蛋白質がグリオーマを含む腫瘍の生物学的特性に関与することはよく知られている。例えば、グリオーマ細胞の走化性には脂質ラフトへの transient receptor potential canonical チャネルの集積が必須であり (Bomben et al. 2011)、一方で脂質ラフトにおける caveolin-1 と connexin43 の相互作用がグリオーマ細胞の浸潤を促進すること (Strale et al. 2012) が報告されている。また、FABP7 がグリオブラストーマに強い発現を示し、その分化増殖や浸潤を制御することが報告されている (De Rosa et al. 2012; Mita et al. 2010) ほか、悪性黒色腫 (Slipicevic et al. 2008) やグリオーマ (Kaloshi et al. 2007) では FABP7 の発現レベルとの患者予後に非常に強い相関が見られる。このように、FABP7 による脂質ラフトの活性および下流シグナル伝達制御の破たんが、腫瘍化や腫瘍増殖の原因となっている可能性は高い。FABP7 による caveolin-1 の発現制御メカニズムに関する詳細な研究により、グリオーマをはじめとする癌細胞

の生物学特性についての新たな理解が進むことが期待される。

7. 結語

本研究では、FABP7による脂質ラフトを介したアストロサイト機能の新たな調節機構を示した。FABP7によるアストロサイトの外部刺激応答制御メカニズムの解明は、神経発達のみならず、神経炎症性疾患や精神疾患、さらにはグリオーマをはじめとする悪性腫瘍の病態理解や、新たな疾患予防や治療戦略を立てるうえで、重要であると確信している。

8. 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました山口大学大学院医学系研究科器官解剖学教授 大和田 祐二先生に深謝いたします。

また脂質ラフト分画の採取法を御指導してくださいました山口大学医学系研究科生体機能分子制御学教授 小林 誠先生、同分野准教授 岸 博子先生、マイクロアレイを施行してくださいました山口大学大学院医学系研究科医化学分野 中井 彰先生、同分野学術研究員 高木 栄一先生に心より深く感謝いたします。

また本研究を遂行するに当たり貴重な御意見、御情報を受け賜りました名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞学分野 藤本 豊士先生、群馬大学大学院医学系研究科生体構造学 向後 寛先生、理化学研究所分子精神科学研究チーム 吉川 武男先生に心より深く感謝いたします。

最後に、本研究を遂行するに当たり、終始実験手法や結果並びに本論文に対する貴重な御助言と御協力を頂きました山口大学大学院医学系研究科器官解剖学分野准教授 澤田 知夫先生、同分野教室員の皆様に心より深く感謝いたします。

9. 参考文献

- Abdelwahab SA, Owada Y, Kitanaka N, Iwasa H, Sakagami H, Kondo H. 2003. Localization of brain-type fatty acid-binding protein in Kupffer cells of mice and its transient decrease in response to lipopolysaccharide. *Histochem Cell Biol* 119(6):469-75.
- Akiyama H, Kawamata T, Yamada T, Tooyama I, Ishii T, McGeer PL. 1993. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 by a subset of astrocytes in Alzheimer disease and some other degenerative neurological disorders. *Acta Neuropathol* 85(6):628-34.
- Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM. 2007. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci* 8(2):128-40.
- Allen JA, Yadav PN, Setola V, Farrell M, Roth BL. 2011. Schizophrenia risk gene CAV1 is both pro-psychotic and required for atypical antipsychotic drug actions in vivo. *Transl Psychiatry* 1:e33.
- Arm JP, Horton CE, Mencia-Huerta JM, House F, Eiser NM, Clark TJ, Spur BW, Lee TH. 1988. Effect of dietary supplementation with fish oil lipids on mild asthma. *Thorax* 43(2):84-92.
- Arrington JL, Chapkin RS, Switzer KC, Morris JS, McMurray DN. 2001. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids modulate purified murine T-cell subset activation. *Clin Exp Immunol* 125(3):499-507.
- Baskin F, Smith GM, Fosmire JA, Rosenberg RN. 1997. Altered apolipoprotein E secretion in cytokine treated human astrocyte cultures. *J Neurol Sci* 148(1):15-8.
- Bastiani M, Liu L, Hill MM, Jedrychowski MP, Nixon SJ, Lo HP, Abankwa D, Luetterforst R, Fernandez-Rojo M, Breen MR and others. 2009. MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes. *J Cell Biol* 185(7):1259-73.

Benveniste EN. 1998. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 9(3-4):259-75.

Bomben VC, Turner KL, Barclay TT, Sontheimer H. 2011. Transient receptor potential canonical channels are essential for chemotactic migration of human malignant gliomas. *J Cell Physiol* 226(7):1879-88.

Bradford J, Shin JY, Roberts M, Wang CE, Sheng G, Li S, Li XJ. 2010. Mutant huntingtin in glial cells exacerbates neurological symptoms of Huntington disease mice. *J Biol Chem* 285(14):10653-61.

Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, Sessa WC. 2000. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* 6(12):1362-7.

Cannella B, Raine CS. 1995. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 37(4):424-35.

Chen PC, Vargas MR, Pani AK, Smeyne RJ, Johnson DA, Kan YW, Johnson JA. 2009. Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(8):2933-8.

D'Alessio A, Esposito B, Giampietri C, Ziparo E, Pober JS, Filippini A. 2012. Plasma membrane microdomains regulate TACE-dependent TNFR1 shedding in human endothelial cells. *J Cell Mol Med* 16(3):627-36.

De Rosa A, Pellegatta S, Rossi M, Tunici P, Magnoni L, Speranza MC, Malusa F, Miragliotta V, Mori E, Finocchiaro G and others. 2012. A Radial Glia Gene Marker, Fatty Acid Binding Protein 7 (FABP7), Is Involved in Proliferation and Invasion of Glioblastoma Cells. *PLoS One* 7(12):e52113.

Dong Y, Benveniste EN. 2001. Immune function of astrocytes. *Glia* 36(2):180-90.

Fan YY, Ly LH, Barhoumi R, McMurray DN, Chapkin RS. 2004. Dietary docosahexaenoic acid suppresses T cell protein kinase C theta lipid raft recruitment and IL-2 production. *J Immunol* 173(10):6151-60.

- Furuhashi M, Hotamisligil GS. 2008. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 7(6):489-503.
- Garrean S, Gao XP, Brovkovych V, Shimizu J, Zhao YY, Vogel SM, Malik AB. 2006. Caveolin-1 regulates NF-kappaB activation and lung inflammatory response to sepsis induced by lipopolysaccharide. *J Immunol* 177(7):4853-60.
- Glatz JF, Borchers T, Spener F, van der Vusse GJ. 1995. Fatty acids in cell signalling: modulation by lipid binding proteins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 52(2-3):121-7.
- Haines P, Hant FN, Lafyatis R, Trojanowska M, Bujor AM. 2012. Elevated expression of cav-1 in a subset of SSc fibroblasts contributes to constitutive Alk1/Smad1 activation. *J Cell Mol Med* 16(9):2238-46.
- Harvey RD, Calaghan SC. 2012. Caveolae create local signalling domains through their distinct protein content, lipid profile and morphology. *J Mol Cell Cardiol* 52(2):366-75.
- Hayer A, Stoeber M, Bissig C, Helenius A. 2010a. Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic* 11(3):361-82.
- Hayer A, Stoeber M, Ritz D, Engel S, Meyer HH, Helenius A. 2010b. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J Cell Biol* 191(3):615-29.
- Head BP, Hu Y, Finley JC, Saldana MD, Bonds JA, Miyanochara A, Niesman IR, Ali SS, Murray F, Insel PA and others. 2011. Neuron-targeted caveolin-1 protein enhances signaling and promotes arborization of primary neurons. *J Biol Chem* 286(38):33310-21.
- Hofman EG, Ruonala MO, Bader AN, van den Heuvel D, Voortman J, Roovers RC, Verkleij AJ, Gerritsen HC, van Bergen En Henegouwen PM. 2008. EGF induces coalescence of different lipid rafts. *J Cell Sci* 121(Pt 15):2519-28.
- Incardona JP, Eaton S. 2000. Cholesterol in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 12(2):193-203.

Iwayama Y, Hattori E, Maekawa M, Yamada K, Toyota T, Ohnishi T, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Kikuchi M and others. 2010. Association analyses between brain-expressed fatty-acid binding protein (FABP) genes and schizophrenia and bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B(2):484-93.

Izumi Y, Hirai S, Tamai Y, Fujise-Matsuoka A, Nishimura Y, Ohno S. 1997. A protein kinase Cdelta-binding protein SRBC whose expression is induced by serum starvation. *J Biol Chem* 272(11):7381-9.

Jefferson JR, Powell DM, Rymaszewski Z, Kukowska-Latallo J, Lowe JB, Schroeder F. 1990. Altered membrane structure in transfected mouse L-cell fibroblasts expressing rat liver fatty acid-binding protein. *J Biol Chem* 265(19):11062-8.

Jolly CA, Jiang YH, Chapkin RS, McMurray DN. 1997. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion, and the formation of diacylglycerol and ceramide. *J Nutr* 127(1):37-43.

Kaloshi G, Mokhtari K, Carpentier C, Taillibert S, Lejeune J, Marie Y, Delattre JY, Godbout R, Sanson M. 2007. FABP7 expression in glioblastomas: relation to prognosis, invasion and EGFR status. *J Neurooncol* 84(3):245-8.

Kipp M, Gingele S, Pott F, Clarner T, van der Valk P, Denecke B, Gan L, Siffrin V, Zipp F, Dreher W and others. 2011. BLBP-expression in astrocytes during experimental demyelination and in human multiple sclerosis lesions. *Brain Behav Immun* 25(8):1554-68.

Kremer JM, Bigauoette J, Michalek AV, Timchalk MA, Lininger L, Rynes RI, Huyck C, Zieminski J, Bartholomew LE. 1985. Effects of manipulation of dietary fatty acids on clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Lancet* 1(8422):184-7.

Lauritzen I, Blondeau N, Heurteaux C, Widmann C, Romey G, Lazdunski M. 2000. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J* 19(8):1784-93.

- Lee JY, Ye J, Gao Z, Youn HS, Lee WH, Zhao L, Sizemore N, Hwang DH. 2003. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 278(39):37041-51.
- Li J, Geng S, Liu X, Liu H, Jin H, Liu CG, Wang B. 2013. DNA and protein co-administration induces tolerogenic dendritic cells through DC-SIGN mediated negative signals. *Hum Vaccin Immunother* 9(10):2237-45.
- Liao PC, Chao LK, Chou JC, Dong WC, Lin CN, Lin CY, Chen A, Ka SM, Ho CL, Hua KF. 2013. Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate-mediated signal transduction in the regulation of NLRP3 protein expression and caspase-1-mediated interleukin-1beta secretion. *Inflamm Res* 62(1):89-96.
- Madeira A, Yang J, Zhang X, Vikeved E, Nilsson A, Andren PE, Svenningsson P. 2011. Caveolin-1 interacts with alpha-synuclein and mediates toxic actions of cellular alpha-synuclein overexpression. *Neurochem Int* 59(2):280-9.
- Maekawa M, Iwayama Y, Arai R, Nakamura K, Ohnishi T, Toyota T, Tsujii M, Okazaki Y, Osumi N, Owada Y and others. 2010. Polymorphism screening of brain-expressed FABP7, 5 and 3 genes and association studies in autism and schizophrenia in Japanese subjects. *J Hum Genet* 55(2):127-30.
- Martinez-Perez F, Zinker S, Aguilar G, Valdes J, Arechiga H. 2005. Circadian oscillations of RPCH gene expression in the eyestalk of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Peptides* 26(12):2434-44.
- Mastick CC, Brady MJ, Saltiel AR. 1995. Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin. *J Cell Biol* 129(6):1523-31.
- Matute C, Melone M, Vallejo-Illarramendi A, Conti F. 2005. Increased expression of the astrocytic glutamate transporter GLT-1 in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Glia* 49(3):451-5.
- Mineo C, Ying YS, Chapline C, Jaken S, Anderson RG. 1998. Targeting of protein kinase Calpha to caveolae. *J Cell Biol* 141(3):601-10.

Mita R, Beaulieu MJ, Field C, Godbout R. 2010. Brain fatty acid-binding protein and omega-3/omega-6 fatty acids: mechanistic insight into malignant glioma cell migration. *J Biol Chem* 285(47):37005-15.

Mundy DI, Li WP, Luby-Phelps K, Anderson RG. 2012. Caveolin targeting to late endosome/lysosomal membranes is induced by perturbations of lysosomal pH and cholesterol content. *Mol Biol Cell* 23(5):864-80.

Murphy EJ, Rosenberger TA, Horrocks LA. 1997. Effects of maturation on the phospholipid and phospholipid fatty acid compositions in primary rat cortical astrocyte cell cultures. *Neurochem Res* 22(10):1205-13.

Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S. 2007. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10(5):615-22.

Niranjan R, Rajasekar N, Nath C, Shukla R. 2012. The effect of guggulipid and nimesulide on MPTP-induced mediators of neuroinflammation in rat astrocytoma cells, C6. *Chem Biol Interact* 200(2-3):73-83.

Owada Y, Abdelwahab SA, Kitanaka N, Sakagami H, Takano H, Sugitani Y, Sugawara M, Kawashima H, Kiso Y, Mobarakeh JI and others. 2006. Altered emotional behavioral responses in mice lacking brain-type fatty acid-binding protein gene. *Eur J Neurosci* 24(1):175-87.

Owada Y, Yoshimoto T, Kondo H. 1996. Spatio-temporally differential expression of genes for three members of fatty acid binding proteins in developing and mature rat brains. *J Chem Neuroanat* 12(2):113-22.

Park SJ, Kim HY, Kim H, Park SM, Joe EH, Jou I, Choi YH. 2009. Oxidative stress induces lipid-raft-mediated activation of Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 2 in astrocytes. *Free Radic Biol Med* 46(12):1694-702.

Parolini I, Sargiacomo M, Galbiati F, Rizzo G, Grignani F, Engelman JA, Okamoto T, Ikezu T, Scherer PE, Mora R and others. 1999. Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. *J Biol Chem* 274(36):25718-25.

Peet M. 2004. Nutrition and schizophrenia: beyond omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70(4):417-22.

Pelkmans L, Zerial M. 2005. Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* 436(7047):128-33.

Piao W, Vogel SN, Toshchakov VY. 2013. Inhibition of TLR4 signaling by TRAM-derived decoy peptides in vitro and in vivo. *J Immunol* 190(5):2263-72.

Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68(4):673-82.

Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF, Parton RG. 1999. Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* 1(2):98-105.

Schley PD, Brindley DN, Field CJ. 2007. (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J Nutr* 137(3):548-53.

Semple BD, Frugier T, Morganti-Kossmann MC. 2010. CCL2 modulates cytokine production in cultured mouse astrocytes. *J Neuroinflammation* 7:67.

Sharifi K, Morihito Y, Maekawa M, Yasumoto Y, Hoshi H, Adachi Y, Sawada T, Tokuda N, Kondo H, Yoshikawa T and others. 2011. FABP7 expression in normal and stab-injured brain cortex and its role in astrocyte proliferation. *Histochem Cell Biol* 136(5):501-13.

Simons K, Toomre D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1):31-9.

Slipicevic A, Jorgensen K, Skrede M, Rosnes AK, Troen G, Davidson B, Florenes VA. 2008. The fatty acid binding protein 7 (FABP7) is involved in proliferation and invasion of melanoma cells. *BMC Cancer* 8:276.

Strale PO, Clarhaut J, Lamiche C, Cronier L, Mesnil M, Defamie N. 2012. Down-regulation of Connexin43 expression reveals the involvement of caveolin-1 containing lipid rafts in human U251 glioblastoma cell invasion. *Mol Carcinog* 51(11):845-60.

Tansey MG, Baloh RH, Milbrandt J, Johnson EM, Jr. 2000. GFRalpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron* 25(3):611-23.

Teunissen CE, Veerhuis R, De Vente J, Verhey FR, Vreeling F, van Boxtel MP, Glatz JF, Pelsers MA. 2011. Brain-specific fatty acid-binding protein is elevated in serum of patients with dementia-related diseases. *Eur J Neurol* 18(6):865-71.

Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K. 2002. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci* 115(Pt 12):2603-11.

Trupp M, Scott R, Whittemore SR, Ibanez CF. 1999. Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells. *J Biol Chem* 274(30):20885-94.

Van Der Voorn P, Tekstra J, Beelen RH, Tensen CP, Van Der Valk P, De Groot CJ. 1999. Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 154(1):45-51.

Vedin I, Cederholm T, Freund-Levi Y, Basun H, Garlind A, Irving GF, Eriksdotter-Jonhagen M, Wahlund LO, Dahlman I, Palmblad J. 2012. Effects of DHA-rich n-3 fatty acid supplementation on gene expression in blood mononuclear leukocytes: the OmegAD study. *PLoS One* 7(4):e35425.

Vinten J, Voldstedlund M, Clausen H, Christiansen K, Carlsen J, Trantum-Jensen J. 2001. A 60-kDa protein abundant in adipocyte caveolae. *Cell Tissue Res* 305(1):99-106.

Voldstedlund M, Thuneberg L, Trandum-Jensen J, Vinten J, Christensen EI. 2003. Caveolae, caveolin and cav-p60 in smooth muscle and renin-producing cells in the rat kidney. *Acta Physiol Scand* 179(2):179-88.

Watanabe A, Toyota T, Owada Y, Hayashi T, Iwayama Y, Matsumata M, Ishitsuka Y, Nakaya A, Maekawa M, Ohnishi T and others. 2007. *Fabp7* maps to a quantitative trait locus for a schizophrenia endophenotype. *PLoS Biol* 5(11):e297.

Weinstock-Guttman B, Baier M, Park Y, Feichter J, Lee-Kwen P, Gallagher E, Venkatraman J, Meksawan K, Deinehert S, Pendergast D and others. 2005. Low fat dietary intervention with omega-3 fatty acid supplementation in multiple sclerosis patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73(5):397-404.

Williams JA, Batten SE, Harris M, Rockett BD, Shaikh SR, Stillwell W, Wassall SR. 2012. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids segregate differently between raft and nonraft domains. *Biophys J* 103(2):228-37.

Wolfrum C, Borrmann CM, Borchers T, Spener F. 2001. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5):2323-8.

Wong SW, Kwon MJ, Choi AM, Kim HP, Nakahira K, Hwang DH. 2009. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J Biol Chem* 284(40):27384-92.

Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J. 2003. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9(4):453-7.

Yamada E. 1955. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1(5):445-58.