

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17125

研究課題名（和文）プラズマローゲンを新たな軸とした精神疾患の前臨床研究 治療・病態・バイオマーカー

研究課題名（英文）Novel preclinical study of psychiatric disorders using plasmalogen

研究代表者

小川 眞太郎 (Ogawa, Shintaro)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 行動医学研究部・室長

研究者番号：00756984

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）：本課題はリン脂質の一種であるプラズマローゲンに着目し、精神疾患モデルラットを用いて検討を行なった前臨床研究である。その結果、ラットへのプラズマローゲンの投与は、脳脊髄液中のエタノールアミン濃度の上昇や、赤血球膜や血漿でのプラズマローゲン濃度の上昇、疾患モデルで低下した赤血球膜プラズマローゲン値の上昇を導いた。ラット前頭前野のエタノールアミン型プラズマローゲン量は、感覚運動ゲーティング機能や快楽行動と関連し、赤血球膜・血漿・脳扁桃体のエタノールアミン型プラズマローゲンも行動と関連した。PET撮像では、疾患モデルで脳の腹側被蓋野が賦活化し、プラズマローゲンの摂取がその変化を抑制する結果が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討では安定した動物モデルの作出が課題となり、将来的に改めて検討を継続する必要性が示された。その一方、脳脊髄液中のエタノールアミンと生体内でのプラズマローゲンの動態との関連が示唆されたことは、精神疾患の機序研究を進めるための大きな礎となりうる。また、経口で摂取したプラズマローゲンが生体内の組成に対して影響を及ぼすことから、栄養補助的な応用可能性も考えられる。さらに、生体中のプラズマローゲンの値が精神疾患に関連する指標のバイオマーカーとして有望である可能性や、プラズマローゲンの摂取がうつ病に関連する脳の変化に対して保護的に働くことから、精神疾患の治療法として有望である可能性も示された。

研究成果の概要（英文）：This preclinical study focuses on plasmalogens, a type of phospholipid, and employed animal models of psychiatric disorders. Administering plasmalogen-containing food significantly elevated ethanolamine levels in cerebrospinal fluid, increased plasmalogen values in both erythrocytic membranes and blood plasma, and reversed decreased plasmalogen levels in the erythrocytic membrane in rats from an animal model of psychiatric disorders. Additionally, ethanolamine plasmalogen values in the brain's frontal cortex significantly correlated with indexes of sensorimotor gating function and hedonic behaviors, as well as with ethanolamine plasmalogen levels in the erythrocytic membrane, blood plasma, and brain amygdala, which correlated with other behavioral indexes. PET imaging results showed that rats in the animal model of psychiatric disorders exhibited enhanced uptake of [18F]fluorodeoxyglucose in the ventral tegmental area, and administration of plasmalogens might prevent these alterations.

研究分野：生物学的精神医学

キーワード：プラズマローゲン エタノールアミン 精神疾患 バイオマーカー 18F-FDG PET 脳脊髄液 ラット 前臨床研究

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、一部のうつ病患者の脳脊髄液 (cerebrospinal fluid, CSF) 中で基本的な生体構成分子である「エタノールアミン」が著明に減少している事実を世界で初めて報告した (Ogawa et al. 2015)。さらに疾患特異性の検討を行なったところ、うつ病患者のみならず双極性障害や統合失調症患者でも CSF 中エタノールアミンの低下が認められた (in preparation)。この事実から、CSF エタノールアミンはうつ病のみならず精神疾患に広く関連する極めて重要な物質であることが示唆される。しかし、エタノールアミンがうつ病患者の CSF 中で低下する機序は不明であった。

そこで、エタノールアミンが結合するリン脂質の一種で脳に多量に存在し、中枢で重要な役割を担う分子「プラズマローゲン」が CSF エタノールアミンの低下および精神疾患の病態に関与する可能性を想定した。白質のミエリン鞘に含まれるエタノールアミン型グリセロリン脂質の内、70%がプラズマローゲンであり (Farooqui and Horrocks 2001)、プラズマローゲンがエタノールアミンと結合した「エタノールアミン型プラズマローゲン」が脳内には最も多量に存在する (O'Brien and Sampson 1965)。また、脳のエタノールアミン型リン脂質の内、白質の 80%および灰白質の 60%はエタノールアミン型プラズマローゲンである (Macala, Yu, and Ando 1983)。さらに、生体内でのプラズマローゲンの動態が様々な精神疾患において変化するという事実も報告されている (Wood et al. 2015; Ogawa et al. 2020)。以上から、研究者は CSF エタノールアミンの動態や精神疾患の病態に「プラズマローゲン」が関与するという仮説を立て、その仮説を検討するため、動物を用いた前臨床研究課題を計画した。

2. 研究の目的

本課題では、動物 (ラット) を用いて以下を検討する。

『プラズマローゲンと CSF エタノールアミン及び精神疾患病態機序との関連』

多様な精神疾患様行動を誘発する社会的隔離ストレス (social isolation) 負荷モデル (Fone and Porkess 2008) を用い検討する。本課題では、精神疾患動物モデルとしてリポポリサッカリド (lipopolysaccharide, LPS) 投与モデルも併用する (Custódio et al. 2013)。0.1%重量のプラズマローゲンを添加した飼料と対照飼料を投与したラットにて、CSF エタノールアミン濃度を群間比較し、さらに CSF エタノールアミン濃度と赤血球膜・血漿・脳組織中でのプラズマローゲン濃度との相関を検討することによって生体内での両分子の関連を検討する。

『プラズマローゲン摂取の新たな精神疾患治療法としての可能性』

プラズマローゲン添加飼料を慢性投与したラットにて行動の変容が見られるかを検討する。また、先行研究において、ケタミンの投与や電気けいれん療法の施術がうつ病患者の脳部位で糖取込みを変化させること (Chen et al. 2018; Suwa et al. 2012)、マウスの脳海馬で SSRI の投与が糖取込みを亢進させること (Jang et al. 2009) などの報告があることから、ラット群間における脳部位の活性化変化を検討するため [18F]fluorodeoxyglucose (FDG) をトレーサーとした positron emission tomography (PET) 撮像実施する。各脳部位での 18F-FDG 集積量を実験群と対照群間で比較し、脳部位ごとの糖の取込みを定量・解析する。

『生体内プラズマローゲンの新規精神疾患バイオマーカーとしての可能性』

プラズマローゲン添加飼料を慢性投与したラットで精神疾患関連行動の結果と生体内プラズマローゲン値の相関を検討する。また、精神疾患動物モデル群と対照群とで生体内プラズマローゲン値を群間比較する。以上により生体内プラズマローゲンの精神疾患の中間表現型に関連するバイオマーカーとしての可能性を検討する。

3. 研究の方法

動物

F344 系雄性ラットを用いる (日本クレア・日本エスエルシーより購入)。動物実験については研

研究者が所属する国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター小型実験動物倫理委員会に計画の承認を受け、また、委員会の定めた実験・研究に関する倫理指針に従った。PET 研究は同センター 動物画像解析研究推進委員会に計画の承認を得て実施した。

試料中のアミノ酸関連分子およびリン脂質測定の測定

エタノールアミンを含む試料中のアミノ酸解関連分子の解析には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 装置(日本分光,東京)を用いた。ラットの赤血球膜および血漿、脳組織などの試料は、解析のために研究協力機関の株式会社レオロジー機能食品研究所(福岡)に送付し、試料中のリン脂質(プラズマローゲン含む)組成の測定は同社にて HPLC 装置により行なわれた。

対照飼料およびプラズマローゲン添加飼料の作成、および投与期間

AIN-93M 精製試料(オリエンタル酵母工業,東京)を対照(ベース)飼料とし、プラズマローゲン添加飼料はベース試料に 0.1%重量のプラズマローゲンを添加して作成した。プラズマローゲンは研究協力機関であるプラズマローゲン研究会(福岡)より提供を受け、特殊飼料の作成はオリエンタル酵母工業に依頼した。実験 1 では 4 週間、実験 2 では 6 週間の投与を行なった。

社会的隔離 (social isolation) モデル

うつ様行動を始め、不安様行動や社会的探索行動の低下、感覚運動ゲーティング機能の低下、記憶障害など、多様な精神疾患様行動を誘発するとされる (Fone and Porkess 2008)。具体的な方法としては、3 週齢で搬入した動物をケージに個別飼育とし、他個体の姿・動きが動物の視野に入れないよう、ケージの間に衝立を立てて飼育した。(実験 1)

リポポリサッカリド (lipopolysaccharide, LPS) 投与モデル

大腸菌 O111:B4 株由来の LPS を用いた (Sigma-Aldrich, MO, US)。実験 1 では 7 日間の LPS の連続投与を行なった。続く実験 2 では、より確度の高いモデルの作出を意図し、複数の先行研究 (Wakabayashi et al. 2012; Kubera et al. 2013; Rodrigues et al. 2018) の方法を応用し、3 日に 1 度の投与を計 5 回、各 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8 mg/kg B.W.の用量にて投与を行なった。

動物の群構成と手続き

【実験 1】 社会的隔離モデル：3 週齢～10 週齢：CC 群 (n = 18), 対照飼料 + 通常飼育環境; CI 群 (n = 19), 対照飼料 + 社会的隔離飼育; PI 群 (n = 19), 0.1%プラズマローゲン添加飼料 + 社会的隔離飼育。搬入後 3 週間馴化ののち 4 週間の飼料投与期間、期間の最後に行動試験を実施。

【実験 2】 LPS 投与モデル (1)：7 週齢～12 週齢：CS 群 (n = 5), 対照飼料 + 生理食塩水投与; CL 群 (n = 5), 対照飼料 + LPS 投与; PS 群 (n = 5), 0.1%プラズマローゲン添加飼料 + 生理食塩水投与; PL 群 (n = 5), 0.1%プラズマローゲン添加飼料 + LPS 投与。1 週間馴化 + 4 週間の飼料投与期間。期間の最後に LPS 投与と行動試験を実施。

【実験 3】 LPS 投与モデル (2)：4 週齢～12 週齢：CS 群 (n = 16), 対照飼料 + 生理食塩水投与; CL 群 (n = 16), 対照飼料 + LPS 投与; PL 群 (n = 16), 0.1%プラズマローゲン添加飼料 + LPS 投与。2 週間馴化 + 6 週間の飼料投与期間。期間の後半で LPS 投与と行動試験を実施。

行動試験

本課題では以下の行動試験を実施した。高架式十字迷路試験(不安様行動の評価); オープンフィールド試験(不安様行動の評価); 明暗箱試験(不安様行動測定); 恐怖条件付け試験(トラウマ的出来事に対する恐怖記憶の形成と保持についての評価); ショ糖嗜好性試験(うつ様行動[無快楽: アンヘドニア]の評価); 新奇環境摂食抑制試験(うつ様行動の評価); 強制水泳試験(うつ様行動[学習性絶望]の評価); プレパルス抑制試験(感覚運動ゲーティング機能の評価)

18F-FDG PET 撮像

動物用 PET 装置は Clairvivo PET を使用した(島津製作所, 京都)。専用施設にて放射性トレーサー 18F-FDG を用いた撮像を行なった。トレーサー投与量は約 50~60 MBq(メガベクレル)とした。トレーサー投与後ラットは一旦覚醒させ、再度の麻酔ののち、投与開始後 45 分~60 分の 15 分間に撮像を行なった。撮像データの解析は Small Animal Molecular Imaging Toolbox (SAMIT) (Vállez Garcia et al. 2015) を使用した。全脳をレファレンスとして補正した standardized uptake value (SUV) 画像を作成し、VOI (volume of interest) 解析を実施した。

統計解析

統計的有意水準は $P < 0.05$ (両側検定) と定め、ソフトウェアは IBM SPSS Statistics ver. 25 (IBM, NY, US) を用いた。2 群間の比較は等分散性を仮定しない Welch の t 検定を用い、複数群間での検定には分散分析 + 等分散性を仮定しない Games-Howell 法を用いた。グループ全体を統合してのノンパラメトリック偏相関解析においては、グループのダミー変数を統制変数として用い、SPSS におけるシNTAX 機能により解析を行なった。

4. 研究成果

(1)【実験】社会的隔離 (Social isolation) モデル動物での検討

社会的隔離モデルでの当初の予備的实施で、赤血球膜・血漿・脳組織中でのリン脂質の組成について解析を行なった。その結果、社会的隔離環境に置かれた動物では、対照環境の動物と比較して赤血球膜上のホスファチジルコリンの濃度の有意な低下が認められた ($p = 0.017-0.049$)。

しかし、そののちさらに続けて N 数を追加しながら行動試験を進めたところ、最終的な全群の解析においては群間での行動試験について有意な差違が認められない結果となった。本検討から、今回行なった isolation の操作によって動物生体内における一部のリン脂質動態へ影響を及ぼす可能性が考えられた一方で、社会的隔離操作そのものが行動を司る脳内分子基盤へ及ぼす影響については限定的なものに留まることが示唆された。以上の結果を踏まえ、次に研究者は異なる動物モデルを併用して研究を継続することを計画した。

(2)【実験】LPS 投与モデルを用いての検討 (1)

多くの先行研究で用いられており、多様な精神疾患様行動の表現型を示す LPS 投与モデルを本課題での動物モデルとして併用することを計画し、実験として検討を行なった。

CSF 中でのアミノ酸関連分子であるエタノールアミンの濃度は、対照飼料投与群に比べてプラズマローゲン添加飼料投与群において有意に上昇していた ($p = 0.012$)。赤血球膜・血漿・脳組織中におけるリン脂質の解析の結果、LPS の投与は有意に赤血球膜上のエタノールアミン型プラズマローゲン濃度を低下させ ($p = 0.0018$)、LPS + プラズマローゲン添加飼料を投与された群では、対照飼料 + LPS 投与群よりも赤血球膜上のエタノールアミン型プラズマローゲン量が有意に上昇することが明らかとなった ($p = 0.00043$)。そのほか、赤血球膜状のホスファチジルセリンの濃度は LPS 投与において低下した ($p = 0.022$)。なお、血漿中でのエタノールアミン型プラズマローゲンについては、対照飼料 + LPS 投与群に比べて、プラズマローゲン添加飼料 + LPS 非投与 (生理食塩水投与) 群において有意に高い値となった ($p = 0.021$)。

続いて、CSF 中エタノールアミン濃度と血中・脳組織における各リン脂質濃度との相関解析を行なった。CSF 中のエタノールアミン濃度は、赤血球膜上のホスファチジルイノシトール濃度 ($r_s = 0.52, p = 0.031$) と有意に正の相関を示し、脳前頭前野における組織中のエタノールアミン型プラズマローゲン濃度とは有意傾向を伴い中程度の正の相関を示した ($r_s = 0.47, p = 0.059$)。以上の結果は、CSF 中エタノールアミン濃度と組織中におけるリン脂質動態との関連を示唆するものである可能性がある。

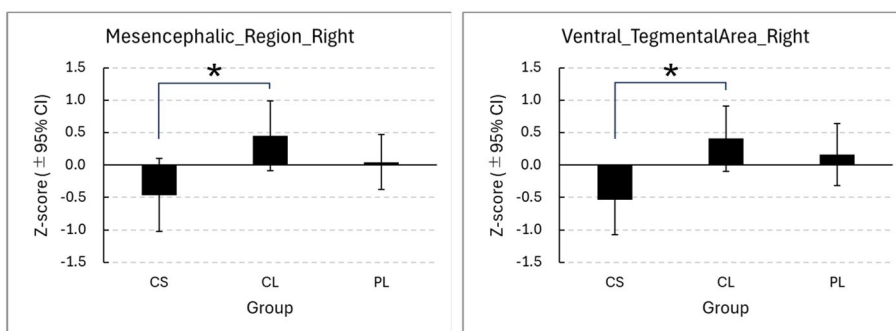
さらに、探索的な追加検討として各生体試料・組織中におけるエタノールアミン型プラズマローゲン濃度と行動試験結果との相関解析を行なった。その結果、前頭前野領域におけるエタノールアミン型プラズマローゲンの濃度はプレパルス抑制試験の抑制率と有意に負の相関を示した ($r_s = -0.50, p = 0.042$)。これは、エタノールアミン型プラズマローゲン濃度が高値であると感覚運動ゲーティング機能が低下するという結果であり、すなわち、先行研究で示されている統合失調症・双極性障害患者の死後脳前頭前野におけるプラズマローゲン濃度の上昇 (Wood and Holderman 2015) と符合する結果である。この前頭前野におけるプラズマローゲン濃度は、同時に、シヨ糖嗜好性試験におけるスクロス水選好率と有意に正の相関を示す結果も示しており ($r_s = 0.62, p = 0.0073$)、情動関連行動あるいは精神疾患関連行動と前頭前野のエタノールアミン型プラズマローゲンの動態とが密接に関連する可能性が示唆された。プレパルス抑制試験における抑制率は、ほかにも脳の扁桃体組織中 ($r_s = -0.50, p = 0.043$) および赤血球膜上 ($r_s = -0.50, p = 0.043$) のエタノールアミン型プラズマローゲン濃度と有意に負の相関を示した。また、血漿におけるエタノールアミン型プラズマローゲン濃度は、強制水泳試験における遊泳時間 / 不動時間とそれぞれ負 ($r_s = -0.66, p = 0.0041$) / 正 ($r_s = 0.63, p = 0.0063$) の相関を示し、すなわち血漿中のプラズマローゲン濃度が高いほど遊泳時間が短く不動時間が長いことが示された。これは、血漿中のエタノールアミン型プラズマローゲンの動きは、他の組織や血球膜などとはまた異なる動きを示すものである可能性を示唆している。以上の結果は、生体の各組織におけるプラズマローゲンのバイオマーカーとしての有用性を示唆するものであると考えられる。

(3)【実験】LPS 投与モデルを用いての検討 (2)

以上から LPS モデルは有望であると判断し、さらなる研究を進めた。以下に LPS モデルを用いた実験の検討における結果を示す。本検討においては、プラズマローゲンの精神神経機能障

害に対する改善効果を観察することが主な目的であったため、動物実験の適正化における 3R の原則の観点から、PS 群 (0.1% プラズマローゲン添加飼料 + 生理食塩水投与群) は設定せずに検討を行なった。動物の行動試験の結果、しかしながら、最終的に群間での有意な解析結果の差違を認めることはできなかった。

次に、これらの動物を用いての 18F-FDG PET 撮像を行なった。撮像データの解析は、空間標準化の支障が認められたラットを除外した全 47 サンプルで実施した。解析の結果、右側の中脳領域 (mesencephalic region) および、右側の腹側被蓋野 (ventral tegmental area, VTA) において、有意な SUV の群間差が認められた (図, adjusted $p = 0.020-0.028$)。



【CS】 対照飼料 + 生理食塩水投与群; 【CL】 対照飼料 + LPS 投与群; 【PL】 0.1% プラズマローゲン添加飼料 + LPS 投与群 (* adjusted $p < 0.05$)

LPS の投与によって VTA での糖取り込みの亢進が認められたことは非常に興味深い。ドーパミン神経系の起始領域である VTA や VTA から投射する側坐核 (nucleus accumbens, NAc) といった

中脳～側坐核経路については、多くの先行報告によりうつ病やうつ病様行動動物モデルとの関連が示唆されている (Abdallah et al. 2017; Eisch et al. 2003)。そして、海馬など他の脳部位とは対照的に NAc や VTA-Nac 経路においてはうつ病やうつ病様行動動物モデルにおける賦活化が報告されている。例として、ラットの VTA に BDNF の投与を行なうと強制水泳試験における不動時間発生までの潜時が有意に短縮するという報告がある (Eisch et al. 2003)。以上から、LPS の投与は VTA 経路の賦活化といううつ病の病態と共通する表現型をもたらすことが示されたと考える。また今回の結果からは、対照飼料 + LPS 投与群では対照飼料 + 生理食塩水投与群と比較して VTA の SUV 値が有意に高値となった一方で、プラズマローゲン添加飼料 + LPS 投与群との間には有意な差違は認められなかった。このことは、プラズマローゲンが何らかの機序によって LPS の投与による脳内シグナルの変化に対して拮抗的に作用していることを示唆するものであるとも考えられる。

(4) まとめと結論

本課題の結果、ラットへのプラズマローゲン添加飼料の投与は、有意に脳脊髄液中のエタノールアミンの濃度を上昇させることや、赤血球膜および血漿でのプラズマローゲン濃度を上昇させること、そして LPS 投与で低下した赤血球膜のプラズマローゲン値を改善させる効果が示された。今回の検討では行動に対するプラズマローゲン添加飼料の改善効果が認められなかったものの、これは動物モデル作出における課題が要因として考えられ、将来的な研究として改めて検討を継続する必要性が本課題の遂行を通じて明らかとなった。他方、行動との関連では、前頭前野のエタノールアミン型プラズマローゲン量と感覚運動ゲーティング機能との負の関連や、スクロース水選好率との正の関連、および赤血球膜や血漿、脳扁桃体のエタノールアミン型プラズマローゲンと行動との関連などの結果が示された。さらに 18F-FDG PET の検討結果からは、LPS 投与による VTA の賦活化が明らかとなるとともに、プラズマローゲンの摂取が LPS によってもたらされる脳内の領野活性の変化に対して保護的に働く可能性が示唆された。

本研究によって脳脊髄液中のエタノールアミンと生体内でのプラズマローゲンの動態との関連が示唆されたことは、精神疾患の機序研究を進めるための大きな礎となりうる。また、経口で摂取したプラズマローゲンが生体内の組成に対して影響を及ぼすことから、栄養補助的な応用の可能性も考えられる。さらに、生体内のプラズマローゲンの値が精神疾患に関連する指標のバイオマーカーとして有望である可能性や、プラズマローゲンの摂取がうつ病に関連する脳の変化に対して保護的に働くことから精神疾患の治療法として有望である可能性も示された。今後の発展的な検討やヒトでの応用に向けて、より確かなエビデンスを構築し意義を明らかにするためのさらなる研究が必要と考えられる。

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
研究協力者	藤野 武彦 (Fujino Takehiko)	一般社団法人プラズマローゲン研究会	
研究協力者	馬渡 志郎 (Mawatari Shiro)	株式会社レオロジー機能食品研究所	
研究協力者	小倉 淳 (Ogura Jun)	国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター	

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