

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08900

研究課題名（和文）必須脂肪酸の脳内時空間的代謝経路の解明

研究課題名（英文）Spatiotemporal and metabolic route of essential fatty acid in the brain

研究代表者

柳田 圭介 (Yanagida, Keisuke)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・脂質生命科学研究部・上級研究員

研究者番号：00583882

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）：ドコサヘキサエン酸（DHA）やアラキドン酸（ARA）などの必須脂肪酸は特に脳に豊富に存在しその機能に極めて重要である。しかしその脳内輸送や分子形態を含む代謝の経路、その生理的意義などについては未解明であり、本研究では血管から脳実質に取り込まれた脂肪酸の脳内代謝経路を明らかにすることを目的とした。

研究の結果、脳血管内皮細胞に取り込まれたリゾホスファチジルコリン（LPC）はホスファチジルコリンに代謝されること、LPC以外の形態で脳実質に運ばれる脳内脂肪酸移行経路があることを明らかにした。さらにLPCの取り込みを起点とする脳血管内皮細胞特有の遺伝子発現調節機構の存在について新たに見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DHAやARAの脳への輸送機序やその生理的意義や必須脂肪酸の分子形態を含めた分子基盤の基礎的な理解は不足している。本研究結果により、これまで想定されていたリゾホスファチジルコリン（LPC）による脳への輸送経路とは独立した輸送機構の存在が示唆されたこと、LPCの取り込みが起点となる脳血管内皮細胞特有の遺伝子発現調節機構が同定されたことにより、今後のこの新規輸送経路の同定や遺伝子調節機構の詳細な解析を通じ、神経疾患や脳健康維持のための新しい治療/予防戦略への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA) are major fatty acids of membrane phospholipid in central nervous system. DHA and ARA are essential fatty acids that cannot be synthesized by mammals, therefore we have to uptake it from diet. However, the spatiotemporal and metabolic route of DHA and ARA into and in the brain as well as their biological significance are incompletely understood. In this study, we assessed the spatiotemporal and metabolic route of DHA/ARA in the brain.

In this study, we found that lysophosphatidylcholine (LPC) incorporated into brain endothelial cells was metabolized into phosphatidylcholine. Also, the results suggested that there is a potential delivery route of DHA/ARA independent of their LPC form. Furthermore, we identified a brain endothelium-specific transcriptional program that is triggered by LPC incorporation.

研究分野：脂質生化学

キーワード：ドコサヘキサエン酸 アラキドン酸 多価不飽和脂肪酸 脳機能障害 リピドミクス

1. 研究開始当初の背景

ドコサヘキサエン酸 (DHA) やアラキドン酸 (ARA) などの高度不飽和脂肪酸は体内合成ができないまたは合成量が限られているため、食事から摂取が必要な必須脂肪酸である。これらの脂肪酸は主に生体膜中のリン脂質に存在し、中でも脳に多く含まれる。DHA は脳機能に極めて重要な脂質であり、アルツハイマー病、双極性障害や統合失調症等の脳機能障害でその低下が確認されている。また数々の疫学や臨床試験により、DHA 摂取の脳機能維持/回復への有効性も実証されている。ARA も学習能力や記憶力、認知応答力を高める機能を有しており、その摂取により鬱状態や気力低下等にも効果的に働くとされている。さらに DHA や ARA はプロスタグランジンやレゾルビン等の生理活性脂質の前駆体であり、これらの脳における生理的/病的な意義についても精力的に研究が進められている。

一方、DHA や ARA の脳内輸送や分子形態を含む代謝の経路、その生理的意義などについての基礎的研究はなかなか進んでいない。過去の基礎研究の多くは細胞培養実験に基づくものであり、個体レベルの研究においても DHA/ARA 欠乏食や非特異的な関連遺伝子の改変マウスの使用が専らで、コンセンサスが取れ得ない状態であった。特に鍵となる脳内に輸送される脂肪酸の存在形態が未確定であったことが研究停滞の主要因の一つであった。

近年脳への脂肪酸輸送機序の1つとして、リゾホスファチジルコリン (LPC) が特異的な輸送体により脳内に輸送されることが明らかとなった (Nguyen et al., *Nature*, 2014; Ben-Zvi et al., *Nature*, 2014)。また所属研究室は DHA 含有リン脂質生成酵素 LPLAT3 欠損マウスが脳内 DHA 含有リン脂質欠乏を示し、当該マウスが行動異常を呈することを明らかにした (未発表)。これら鍵となる分子群同定により、これまでブラックボックスであった必須脂肪酸の脳内時空間的代謝経路を明らかにする準備が整ったと考え、本研究課題の遂行にあたった。

2. 研究の目的

本研究は、上述のような鍵となる分子 (MFSD2A、LPLAT3、その他) の欠損マウス、ラベル体 LPC や所属教室の有するリポドミクス解析技術を駆使することにより、血管から脳に取り込まれる脂肪酸の脳内時空間的代謝経路を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 蛍光脂肪酸および重水素ラベルパルミチン酸を含有するリゾホスファチジルコリン (LPC) をマウスに血管内投与し、その脳内での空間的代謝経路を検証した。具体的には、LPC 投与後規定時間後に全身灌流後に脳を回収し、酵素法により分散、さらに FACS により血管内皮細胞とそれ以外の実質細胞を回収した。その回収細胞における蛍光脂肪酸や重水素ラベルパルミチン酸の含量等を GC-MS や LC-MS により検証した。さらに同様の実験を各種リゾリン脂質アシル転移酵素 (LPLAT) の欠損マウスや上述の MFSD2A 欠損マウスを用いて行なった。

(2) 上記のラベル脂肪酸 LPC 投与実験により、既報による想定とは異なり、脂肪酸が脳血管内皮細胞に蓄積するという結果が得られたため、MFSD2A 欠損マウスおよび血中 DHA 含有 LPC が激減する肝臓特異的 Agpat3 欠損マウスの脳血管内皮細胞および脳実質の DHA 含有リン脂質量について LC-MS により検証した。

(3) やはり既報による想定とは異なり、MFSD2A は脳実質というよりはむしろ脳血管内皮細胞への脂肪酸供給に寄与することが示唆されたため、MFSD2A 欠損マウス由来の脳血管内皮細胞を用いて RNA シーケンスおよび ATAC シーケンスを実施し、脳血管内皮細胞へ LPC の形態で脂肪酸を供給する生理的意義について検証を行なった。

4. 研究成果

(1) 蛍光脂肪酸および重水素ラベルパルミチン酸を含有 LPC のマウス投与実験を行なったところ、脂肪酸は主に脳血管内皮細胞に蓄積すること、さらにホスファチジルコリン (PC) の形態で存在することが明らかとなった。脳血管内皮細胞へのラベル体脂肪酸の蓄積は MFSD2A 欠損マウスにおいてほとんど認められなかったことから、実際に LPC の形態で脳血管内皮細胞へと取り込まれた後に PC へと代謝されていることが考えられた。また、4 種の LPLAT 欠損マウスにおいてこの LPC から PC への代謝が著しく減弱することが観察され、血管内皮細胞において LPLAT により酵素的に LPC から PC へと変換されることが明らかとなった。

一方で、脳血管内皮細胞以外にも LPC 由来の蛍光脂肪酸を蓄積する細胞集団が存在することも明らかとなった。脳血管内皮細胞に蓄積する脂肪酸とは対照的に、この細胞集団への脂肪酸の蓄積は MFSD2A 欠損マウスにおいても変動が認められなかったことから、MFSD2A 以外の LPC 輸送経路により、あるいは血中で別の脂質形態へと変換された後に取り込まれた可能性がある。この細胞集団を同定すべく、投与した蛍光脂肪酸を保持する細胞を FACS により回収し、RNA シークエンスを行なった。その結果、蛍光保持細胞は線維芽細胞に特徴的な遺伝子群が高発現していることが明らかとなった。したがって、血中の LPC に含まれる脂肪酸は、直接的あるいは間接的に脳線維芽細胞へと輸送され、その脂肪酸源となる可能性が新たに示唆された。

(2) 野生型および MFSD2A 欠損マウスの脳 DHA 含有リン脂質量を LC-MS により検討した結果、欠損マウスにおいて確かに DHA 含有リン脂質量は低下するもののその低下率は 10%程度とかなり限局的であった。一方で、FACS 法により回収した脳血管内皮細胞においては、MFSD2A 欠損マウスにおいて DHA 含有リン脂質に著しい低下が認められた。これをさらに別角度により検証するために、すでに血中 DHA 含有 LPC の激減を認めていた肝臓特異的 LPLAT3 欠損マウスを活用した。本欠損マウスにおいても同様に脳血管内皮細胞における DHA 含有リン脂質に著しい低下が認められ、一方で脳実質の DHA 含有リン脂質量の低下は限定的であった。以上の結果より、MFSD2A による LPC 形態での脂質輸送システムは脳実質というよりはむしろ脳血管内皮細胞への脂肪酸供給に寄与することが示唆された

(3) 野生型および MFSD2A 欠損マウスより脳血管内皮細胞を FACS により回収し RNA シークエンスを行なった。欠損マウスにおいて発現変動を認める遺伝子が数多く検出されたが、その中でも特に 5 つの遺伝子については 10 倍以上の発現低下が認められた。さらにこれらの遺伝子発現変動の背景にあるクロマチン状態について検証すべく、オープンクロマチン解析 (ATAC シークエンス) を同様に FACS により回収した脳血管内皮細胞にて実施した。その結果、MFSD2A 欠損マウス由来の脳血管内皮細胞ではこれら 5 つの遺伝子の転写開始地点付近およびその周囲において、クロマチンが如実に閉じていることが確認された。さらにタモキシフェン誘導型の血管内皮特異的 MFSD2A 欠損マウスを用いて、MFSD2A 欠損後からこれら 5 つの標的遺伝子発現の低下に要する時間を検証したところ、投与後 48 時間には大幅な発現低下が認められた。したがって、LPC の取り込みを起点とする脳血管内皮細胞特有かつダイナミックな遺伝子発現調節機構の存在が新たに見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nagata Katsuyuki, Kakizaki Yuusuke, Yanagida Keisuke, Arai Tetsuya, Nakano Kenta, Hamano Fumie, Goto Motohito, Okamura Tadashi, Shimizu Takao, Shindou Hideo	4. 巻 663
2. 論文標題 Dietary omega-3 fatty acid does not improve male infertility caused by lysophospholipid acyltransferase 3 (LPLAT3/AGPAT3) deficiency	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 179 ~ 185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.04.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yanagida Keisuke, Shimizu Takao	4. 巻 246
2. 論文標題 Lysophosphatidic acid, a simple phospholipid with myriad functions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 108421 ~ 108421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pharmthera.2023.108421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miyasato Sosuke, Iwata Kurumi, Mura Reika, Nakamura Shou, Yanagida Keisuke, Shindou Hideo, Nagata Yosuke, Kawahara Masahiro, Yamaguchi Satoshi, Aoki Junken, Inoue Asuka, Nagamune Teruyuki, Shimizu Takao, Nakamura Motonao	4. 巻 37
2. 論文標題 Constitutively active GPR43 is crucial for proper leukocyte differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202201591R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yanagida Keisuke, Masago Kayo, Yasuda Daisuke, Hamano Fumie, Kurikawa Yoshitaka, Shimizu Takao, Ishii Satoshi	4. 巻 32
2. 論文標題 Cell-trafficking impairment in disease-associated LPA6 missense mutants and a potential pharmacoperone therapy for autosomal recessive woolly hair/hypotrichosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 825 ~ 834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddac244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakakibara Moe, Sumida Hayakazu, Yanagida Keisuke, Miyasato Sosuke, Nakamura Motonao, Sato Shinichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Bitter taste receptor T2R38 is expressed on skin-infiltrating lymphocytes and regulates lymphocyte migration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-15999-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Valentine WJ, Yanagida K, Kawana H, Kono N, Noda NN, Aoki J, Shindou H	4. 巻 298
2. 論文標題 Update and nomenclature proposal for mammalian lysophospholipid acyltransferases, which create membrane phospholipid diversity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101470 ~ 101470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawai H, Osawa Y, Matsuda M, Tsunoda T, Yanagida K, Hishikawa D, Okawara M, Sakamoto Y, Shimagaki T, Tsutsui Y, Yoshida Y, Yoshikawa S, Hashi K, Doi H, Mori T, Yamazoe T, Yoshio S, Sugiyama M, Okuzaki D, Komatsu H, Inui A, Tamura-Nakano M, Oyama C, Shindou H, Kusano H, Kage M, Ikegami T, Yanaga K, Kanto T	4. 巻 -
2. 論文標題 Sphingosine 1 phosphate promotes tumor development and liver fibrosis in mouse model of congestive hepatopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.32256	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanagida Keisuke, Engelbrecht Eric, Niaudet Colin, Jung Bongnam, Gaengel Konstantin, Holton Kristina, Swendeman Steven, Liu Catherine H., Levesque Michel V., Kuo Andrew, Fu Zhongjie, Smith Lois E.H., Betsholtz Christer, Hla Timothy	4. 巻 52
2. 論文標題 Sphingosine 1-Phosphate Receptor Signaling Establishes AP-1 Gradients to Allow for Retinal Endothelial Cell Specialization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 779 ~ 793.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2020.01.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Geng Xin, Yanagida Keisuke, Akwii Racheal G., Choi Dongwon, Chen Lijuan, Ho YenChun, Cha Boksik, Mahamud Md. Riaj, Berman de Ruiz Karen, Ichise Hirotake, Chen Hong, Wythe Joshua, Mikelis Constantinos M., Hla Timothy, Srinivasan R. Sathish	4. 巻 5
2. 論文標題 S1PR1 regulates the quiescence of lymphatic vessels by inhibiting laminar shear stress-dependent VEGF-C signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e137652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.137652	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hishikawa Daisuke, Yanagida Keisuke, Nagata Katsuyuki, Kanatani Ayumi, Iizuka Yoshiko, Hamano Fumie, Yasuda Megumi, Okamura Tadashi, Shindou Hideo, Shimizu Takao	4. 巻 23
2. 論文標題 Hepatic Levels of DHA-Containing Phospholipids Instruct SREBP1-Mediated Synthesis and Systemic Delivery of Polyunsaturated Fatty Acids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101495 ~ 101495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yanagida Keisuke, Valentine William J.	4. 巻 1274
2. 論文標題 Druggable Lysophospholipid Signaling Pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 137 ~ 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-50621-6_7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 柳田圭介, 叶谷愛弓, 菱川大介, 清水孝雄, 進藤英雄
2. 発表標題 遺伝子改変マウスにより迫る脳発達期ドコサヘキサエン酸の意義
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度大会, シンポジウム「非古典的栄養感知による恒常性制御」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keisuke Yanagida
2. 発表標題 S1P-dependent transcriptional switch between physiological and pathological angiogenesis
3. 学会等名 FASEB Summer Research Conference, The Lysophospholipid and Related Mediators Conference: From Bench to Clinic (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳田圭介
2. 発表標題 リゾリン脂質メディエーターの生理機能解明
3. 学会等名 第93回 日本生化学会 (2020年度日本生化学会奨励賞受賞講演) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳田圭介
2. 発表標題 血管新生/成熟の協調的進行をもたらすスフィンゴシン1リン酸シグナリング
3. 学会等名 第93回 日本生化学会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------