

機関番号：15201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 年度～2010 年度

課題番号：21790226

研究課題名（和文） DHA による認知機能向上作用における神経幹細胞の新生とアポトーシスの関係

研究課題名（英文） Effect of neurogenesis and apoptosis on DHA-improved memory function

研究代表者

片倉 賢紀 (KATAKURA MASANORI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：40383179

研究成果の概要（和文）：

ドコサヘキサエン酸（DHA）による記憶学習能力の向上作用には神経幹細胞の増殖や分化が関与していると考え、本研究では DHA が記憶の定着時に必要とされている神経幹細胞のアポトーシスに与える影響について検討した。ラットに DHA 投与により神経幹細胞の増殖が増加し、記憶・学習能力が改善した。培養神経幹細胞を用いた実験においても、DHA がニューロンへの分化のみならず増殖も促進させ、その作用機序の一部も明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We hypothesized that neurogenesis may involve in Docosahexaenoic acid (DHA)-enhanced learning and memory ability. In this study we tried to understand effect of memory formation on apoptosis of neural stem cells (NSCs). The numbers of newborn cells in the hippocampus were increased and improved learning ability by treatment of DHA for 8-weeks orally. These results indicate that DHA enhances neuronal differentiation from NSCs but also enhances proliferation of NSCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境生理（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：栄養生理学、ドコサヘキサエン酸、神経新生、記憶、学習能力

1. 研究開始当初の背景

（1）近年の疫学研究から、加齢に伴う認知機能の低下が魚介類や野菜の摂取量が多いほど抑制されることが明らかになっている。この中で、我々は魚介類特にうなぎやマグロに多く含まれている n-3 系多価不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸（DHA）に着目し研究を進めている。DHA は脳内に多く分布し、細胞膜の構成成分としてだけでなく、細胞内情報伝達物質としても重要である。生体内では前駆体からの生合成量が少ないことから必須脂肪酸の一つであり、食餌などによる供

給が必要である。

（2）動物実験で DHA により認知機能が改善することが明らかとなっている。老齢または若齢ラットに 8 週間 DHA を摂取させ、放射状迷路を用いて行動評価をした結果、DHA 投与群で対照群と比較してエラー数が低下した (Gamoh et al., 1999; 2001)。この結果は他の記憶学習野力を評価する行動実験においても明らかになっている。しかし、DHA が空間認知機能を向上させる機構については不明な点が多い。

（3）近年、成体脳内でも神経幹細胞が発見

され、さまざまな神経細胞に分化することが報告されている。さらに記憶に関与する海馬歯状回においても神経幹細胞が新生すること、これが記憶の形成に関与することが報告されている。我々は、DHAによる記憶、学習能力向上作用の一部に神経幹細胞が関与しているのではないかと考え研究を進めている。これまでの研究でラットにDHAを投与すると、海馬の神経幹細胞のニューロンへの分化が促進されること、この作用が、培養神経幹細胞でも起こることが明らかとなった(Kawakita et al., 2006)。しかし、この時点では詳細な機構については明らかになっていなかった。

(4) 記憶の保持・形成には神経幹細胞の増殖のみでなくアポトーシスも重要であると考えられている。水迷路を用いた行動実験試行中の海馬では、神経幹細胞の増殖が低下し、アポトーシスが亢進していること、また、脳室内にアポトーシスを抑制する物質を投与すると、海馬のアポトーシスが低下し、水中のプラットフォームを見つけるまでの時間が延長することが報告されている(Dupret et al., 2007)。

2. 研究の目的

食餌性のDHAが記憶定着時に起こる神経幹細胞の増殖・アポトーシスに与える影響についてラットを用いた *in vivo* および培養神経幹細胞を用いた *in vitro* 両方で検証した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

Wistar 系雄性ラット (6 週齢) 12 匹を体重が均等になるように 2 群に分けた。第 1 群には DHA (300 mg/kg 体重) を 1 日 1 回経口投与し、他群には 5% アラビアゴム水溶液を同量、8 週間投与した。8 週間投与終了 5 日前から、新規物質認識テストおよびプロモデオキシウリジン (BrdU, 50 mg/kg 体重) を投与した。BrdU 投与終了後から放射状 8 方迷路試験を 4 週間行った。

(2) 行動評価

① 新奇物質認識試験

30 cm X 30 cm のケージの中に形・色が同じ物体を置き、ラットを 5 分間自由行動させた。ラットを元のケージに戻し、30 分後、物体の一つを形の異なるものと交換し、ラットを再びケージの中に入れた。新奇物質探索試験では、総探索時間における新奇物体への探索時間の割合を求めた。

② 放射状八方迷路

8 方向の走路のうち 4 つに報酬餌を置き、ラットが周囲の景色を認識してその 4 つの場所を覚えるのを評価する方法で、短期記憶および、長期記憶両方が評価できる。

(3) 免疫組織染色

行動実験終了後、ラットを 12 時間絶食させ、ネンブタールで麻酔後、心臓から 4 % パラホルムアルデヒドを用いて還流し固定した後、脳を摘出した。脳は凍結後薄切 (40 μ m) し、免疫組織染色を行った。切片は、1 M 塩酸中、70°C で 30 分間加温後、ホウ酸緩衝液で洗浄し、3% 正常ヤギ血清溶液中室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後、抗 BrdU 抗体および抗 NeuN 抗体混合液中 4°C で一晩反応させた。洗浄後、蛍光標識抗体溶液中室温で 1 時間反応させた。洗浄後に、切片をスライドグラスに貼り付け 80% グリセロールで封入後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(4) 神経幹細胞を用いた実験

① 神経幹細胞の回収

ラット胎児 (14.5 日) の前脳を摘出後、繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 存在下、ニューロスフェア法により培養した。ニューロスフェアを回収・分散後実験に供した。

② 神経幹細胞の増殖に対する DHA の影響

FGF 存在下で培地に異なる濃度の DHA、オレイン酸 (OA) または 0.05% BSA (コントロール) を混合し、神経幹細胞を 4 日間培養した。4 日後、MTT を培地に添加し、37°C で 3 時間培養した。DMSO を添加し、MTT が生細胞によって代謝されて生成するホルマザンを溶解し、550 nm の吸光度を測定した。

③ 神経幹細胞の分化に対する DHA の影響

回収した神経幹細胞をポリ L オルニチンでコーティングした培養容器に FGF 非存在下で異なる濃度の DHA を添加した培地中で培養した。4 または 7 日後に細胞を PCR、ウエスタンブロットティング、免疫染色を行った。

④ PCR による mRNA の測定

培養した細胞は PBS で洗浄後、isogen (和光株式会社) を用い、添付されている説明に従い total RNA を回収した。Total RNA は QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen 社) を用いて cDNA を調製後、QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen 社)、遺伝子特異的なプライマー (Hes1, 6, NeuN, MAP2, p21, p27, GAPDH) を用いてリアルタイム PCR (ABI prism 7000 sequence detection system, Applied Biosystems 社) を行った。

⑤ 免疫染色

培養した細胞は、4 % パラホルムアルデヒドを用いて固定後、10% 正常ヤギ血清中で 1 時間ブロッキングを行い、抗体 (Tuj-1, MAP2, GFAP) 溶液中で 1 晩反応させた。洗浄後、蛍光標識した 2 次抗体溶液で反応させ、洗浄後、80% グリセロール中に保存した。共焦点レーザー顕微鏡でランダムに選択した 9 つの領域について全細胞、各抗体陽性細胞数を計数し、その割合を算出した。

⑥ ウエスタンブロットティング

培養した細胞を PBS で洗浄後、プロテアーゼ阻害剤を添加した溶解緩衝液 (Roche 社) で

細胞を溶解し、遠心後の上清を用いた。20 μg のタンパク質を SDS-PAGE にてタンパク質を分離後、PVDF 膜に転写 (100 v, 90 min) した。膜は 5% スキムミルクでブロッッキング後、一次抗体 (Tuj-1, MAP2, GFAP) で一晚反応後、洗浄し 2 次抗体と反応させた。洗浄後、検出試薬 (ECL Plus Western Blotting, GEヘルスケア社) と反応させ、検出した。

⑦細胞周期の測定

細胞を回収する 3 時間前に BrdU を培地に添加した。細胞は回収後、BrdU flow kit (BD社) を用いて細胞の固定、蛍光標識 1 次抗体との反応、7-アミノアクチノマイシン D

(7-AAD) による DNA の染色を行い、フローサイトメーター (BD FACSCalibur) を用いて細胞を分離した。横軸に 7-AAD の蛍光強度 (DNA 量)、縦軸に FITC-BrdU 蛍光強度 (BrdU 標識量) 示した図から、各細胞周期の細胞数を算出した。

4. 研究成果

(1) DHA によるラットの認知機能の改善
DHA を 8 週間投与した群では新奇物質を探索した時間がコントロール群よりも 20% 長かった。この試験は物体の形状の記憶を反映していることから、DHA 投与によって記憶能力が向上したことを示している。また、その後に行った放射状 8 方迷路試験において、3 ブロック (18 試行) から DHA 投与により有意に作業記憶エラー数がコントロール群と比較して有意に低下した。この結果はこれまで行われた結果と一致していた (Gamoh et al 2001)。

(2) 海馬歯状回の新生細胞の増殖・分化に対する DHA の影響

DHA を 8 週間投与した群ではコントロール群と比較して海馬歯状回の BrdU 陽性細胞数が有意に増加していた (図 1)。また、BrdU 投与 4 週間後では、海馬歯状回の BrdU/NeuN 陽性細胞 (新生細胞がニューロンへ分化した細胞)

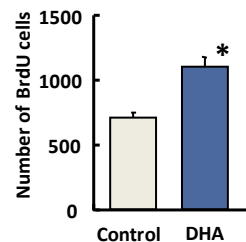
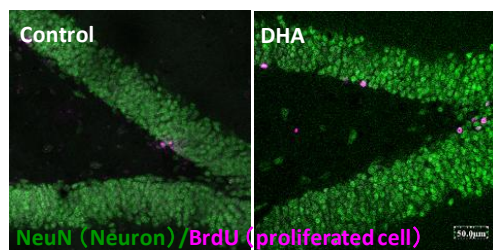


図 1、DHA4 週間投与後、海馬歯状回の BrdU 陽性細胞数が増加した。*, $P < 0.05$ ($n = 3$)

が DHA 投与群でコントロール群と比較して有意に増加していた。

BrdU 陽性細胞は BrdU を投与している間に新生した細胞を示していることから、DHA によって脳内の細胞増殖が促進され、さらにそれがニューロンになる割合が高いことを示している。これまでの報告では DHA によって新生細胞がニューロンに分化する割合が高くなることは報告されていたが、神経細胞数も増加させることは報告されていなかった。今後、グリア細胞、未熟ニューロン、オリゴデンドロサイト特異的な抗体を用いて、新生した細胞がどのような細胞に分化するのかを検討する予定である。

(3) 培養神経幹細胞に対する DHA の影響

①神経幹細胞の増殖に対する影響

先の動物実験において、DHA が脳内の新生細胞数を増加させることが明らかになった。そこで培養神経幹細胞の増殖に対する DHA の影響を検討した。DHA は濃度依存的に神経幹細胞の増殖を促進させた (図 2)。

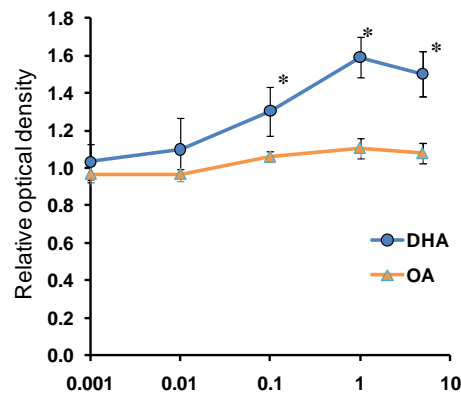


図 2、DHA または OA (1 μM) 処置 4 日後、MTT 法により生細胞数を計測した。

*, $P < 0.05$ ($n = 6$)

またフローサイトメーターを用いた解析の結果、DHA 投与によって S 期の細胞の割合が 10% 増加し、G1/G0 期の細胞の割合が 8% 低下したことから、DHA は細胞周期に影響を与えることによって、神経幹細胞の増殖を促進すると考えられる。さらに、OA 群では増殖が認められないことから、DHA による作用は細胞が脂肪酸をエネルギー源として利用し、増殖を促進させているのではないことを示しており、DHA が何らかの形で増殖を促進していると考えられる。この詳細な機構については現在検討中である。

②神経幹細胞の分化に対する影響

次に DHA の神経幹細胞の分化に対する影響について検討した。図 3 に示したように DHA によって Tuj1 陽性細胞が増加した。この結果はウエスタンブロットにより確認した。また、GFAP 陽性細胞数、GFAP タンパク質量は DHA の影響を受けなかった。このことから、DHA は神経幹細胞のニューロンへの分化を促進することを示している。グリアへの分化の割合

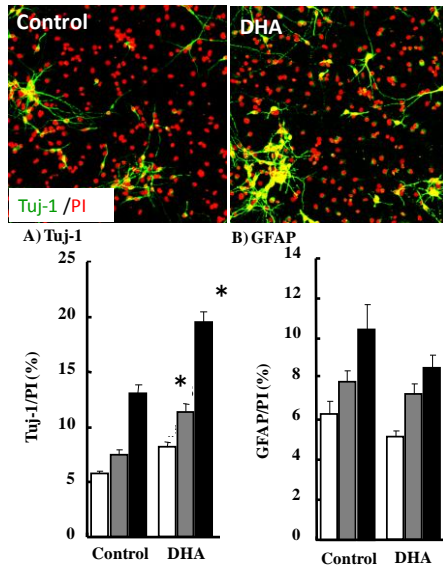


図3、DHA (1 μ M) 7日間処置後、細胞をTuj1、GFAP、PIで染色した。Tuj1陽性細胞数はDHA処置後有意に増加した。*, $P < 0.05$ (n=3)

合がコントロール群と差が認められなかったことからDHAは神経幹細胞の分化すべてを促進させるわけではなく、ニューロンへの分化を特異的に促進させると考えられる。

③bHLH 転写因子の発現量に対する DHA の影響

DHAによって神経幹細胞からニューロンへの分化が促進される機構を解明するために、bHLH転写因子のmRNA発現量を測定した。bHLH転写因子には神経幹細胞の増殖を促進させる因子(Hes1)とニューロンへの分化を促進させる因子(Mash1、NeuroD)があり、お互いの発現量のバランスによって神経幹細胞の運命を決定している因子である。DHAによってHes1 mRNAの発現量は有意に低下し、NeuroDの発現量は有意に増加していた。また、bHLH転写因子の下流遺伝子の一つであるMAP2のmRNA発現量はDHA処置によってコントロール群よりも高かった(図4)。さらに、Hes1の抑制を受け、細胞周期を抑制することが知られているp21、p27の発現量もDHA処置によって増加していた。

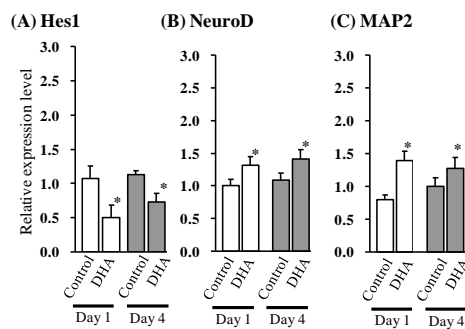


図4、DHA (1 μ M) 処置1、4日後、Hes1 (A)、NeuroD (B)、MAP2 (C) mRNA発現量を測定した。*, $P < 0.05$ (n=6)

この条件下で細胞周期を計測した結果DHA処

置群ではG0/G1期の細胞の割合が増加し、S期の細胞数が減少していた(図5)。

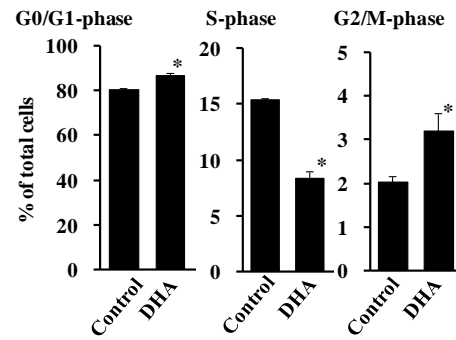


図5、DHA (1 μ M) 24時間処置後、G0/G1期細胞の割合が増加し、S期細胞の割合が有意に低下した。*, $P < 0.05$ (n=3)

以上の結果から、DHAはHes1の発現量を低下、NeuroDの発現量を増加させることによってニューロン特異的な遺伝子MAP2の発現量を増加させると考えられる。また、p21やp27など細胞周期を抑制する遺伝子の転写を促進させることによって細胞周期を阻害し、分化を促進させると考えられる。今後は、bHLH転写因子やp21、p27発現量の変化が個体内でも認められるかについて検討する予定である。

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6件)

① M. Hashimoto, M. Katakura, H. M. Shahdat, A. Rahman, T. Shimada, and O. Shido, Docosahexaenoic acid withstands the $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *J Nutr Biochem*. 2011. 22(1):22-9.

② M. Katakura, M. Hashimoto, H. M. Shahdat, S. Gamoh, T. Okui, K. Matsuzaki, and O. Shido, Docosahexaenoic acid promotes neuronal differentiation by regulating basic helix-loop-helix transcription factors and cell cycle in neural stem cells. *Neuroscience*, 2009. 160(3): 651-60.

③ K. B. Himi, M. Hashimoto, M. Katakura, A. M. Haque, Y. Hara, and O. Shido, Long-term administration of green tea catechins increases antioxidative actions and enhances neurogenesis in the hippocampus of rats. *Cur Top Nutraceutical Res*. 2009. 7(3/4): 131-140.

④ K. Matsuzaki, M. Katakura, T. Hara, G. Li, M. Hashimoto, and O. Shido, Proliferation of neuronal progenitor cells and neuronal differentiation in the hypothalamus are enhanced in heat-acclimated rats. *Pflügers Arch*, 2009. 458(4): 661-73.

⑤ S. Hossain, M. Hashimoto, M. Katakura, K. Miwa, T. Shimada, and O. Shido, Mechanism of docosahexaenoic acid-induced inhibition of in vitro $A\beta_{1-42}$ fibrillation and $A\beta_{1-42}$ -induced toxicity in SH-SY5Y cells. *J Neurochem*, 2009. 111(2): 568-79.

⑥ M. Hashimoto, H. M. Shahdat, M. Katakura, Y. Tanabe, S. Gamoh, K. Miwa, T. Shimada, and O. Shido, Effects of docosahexaenoic acid on in vitro amyloid β peptide 25-35 fibrillation. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1791(4): 289-96.

[学会発表] (計 21 件)

① Masanori Katakura, Michio Hashimoto, Toshiyuki Okui, and Osamu Shido, Effect of polyunsaturated fatty acids on the cell cycle and the expression of bHLH transcriptional factors in neural stem cells, 9th Conference of the international society for the study of fatty acids and lipid (ISSFAL), 2010 年 5 月 31 日、マーストリヒト (オランダ)

② 片倉 賢紀、橋本 道男、兔沢 隆一、常松 志穂、紫藤 治、 ω -3 系多価不飽和脂肪酸によるメタボリックシンドロームモデルラット SHR.Cg-Leprcp/NDmcr の血圧・血清脂質改善作用、第 64 回日本栄養・食糧学会、2010 年 5 月 22 日、徳島

③ 片倉 賢紀、橋本 道男、紫藤 治、n-3 多価不飽和脂肪酸による神経幹細胞の増殖・分化促進機構の解明、第 64 回日本栄養・食糧学会、2010 年 5 月 21 日、徳島

④ 橋本 道男、ホサイン シャハダト、片倉 賢紀、n-3 系脂肪酸によるアルツハイマー型認知症予防・改善効果、第 83 回日本薬理学学会、2010 年 3 月 17 日、大阪

⑤ 橋本 道男、ホサイン シャハダト、片倉 賢紀、ドコサヘキサエン酸 (DHA) と認知・記憶機能-認知症への介入試験の科学的根拠と作用メカニズム、第 13 回日本病態栄養学会年次学術集会、2010 年 1 月 9 日、京都

⑥ 松崎 健太郎、片倉 賢紀、原 俊子、李

光華、橋本 道男、紫藤 治、ラット視床下部における暑熱暴露による神経新生の加齢変化、第 61 回日本生理学会中国四国地方会、2009 年 11 月 21 日、山口

⑦ 橋本 道男、Hossain M Shahdat、片倉 賢紀、紫藤 治、脳脂質の主要な構成脂肪酸であるドコサヘキサエン酸は、vivo と vitro の両実験系においてアミロイド β タンパク凝集を阻害する、第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 17 日、名古屋

⑧ 片倉 賢紀、橋本 道男、Hossain M Shahdat、蒲生 修治、奥井 俊之、紫藤 治、神経幹細胞における Hes1 と p27 発現量のドコサヘキサエン酸による調節、第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 17 日、名古屋

⑨ 橋本 道男、蒲生 修治、柳本 賢一、片倉 賢紀、Haque Md Abdul、紫藤 治、オキアミリン脂質の長期投与によるラット空間認知機能改善効果、日本油化学会第 48 回年会、2009 年 9 月 12 日、名古屋

⑩ 橋本 道男、片倉 賢紀、並河 徹、土倉 覚、大丸 智里、紫藤 治、メタボリックシンドロームモデルラット (SHR.Cg-Leprcp/NDmcr) を用いた水素豊富水の機能性の検証、第 45 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、2009 年 9 月 5 日、東京

⑪ 片倉 賢紀、橋本 道男、兔沢 隆一、常松 志穂、紫藤 治、メタボリックシンドロームモデルラット SHR.Cg-Leprcp/NDmcr の血圧・血清脂質に対する n-3 系脂肪酸の効果、第 45 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、2009 年 9 月 5 日、東京

⑫ 橋本 道男、栗野 貴子、加藤 節司、田邊 洋子、片倉 賢紀、白根 信彦、竹下 正幸、森田 栄伸、エゴマ種子由来 α -リノレン酸強化鶏卵のヒト介入試験、日本脂質栄養学会第 18 回大会、2009 年 9 月 4 日、東京

⑬ 栗野 貴子、橋本 道男、片倉 賢紀、白根 信彦、竹下 正幸、エゴマ種子由来 α -リノレン酸強化鶏卵の脂肪酸組成と加熱による脂肪酸含量の変化、日本脂質栄養学会第 18 回大会、2009 年 9 月 4 日、東京

⑭ 奥井 俊之、橋本 道男、片倉 賢紀、紫藤 治、神経幹細胞のニューロン分化に及ぼす 9-cis, 11-trans-共役リノール酸の影響、日本脂質栄養学会第 18 回大会、2009 年 9 月 4 日、東京

⑮ 片倉 賢紀、奥井 俊之、橋本 道男、紫

藤 治、神経幹細胞における Hes1 と p27 発現量のドコサヘキサエン酸による調節、日本脂質栄養学会第 18 回大会、2009 年 9 月 4 日、東京

⑩ Masanori Katakura, Michio Hashimoto, Shuji Gamoh, Toshiyuki Okui, Kentaro Matsuzaki, Osamu Shido、Effects of polyunsaturated fatty acids on the cell cycle and the expression of bHLH transcriptional factors in neural stem cells、第 36 回 国際生理学会世界 大会 (IUPS2009)、2009 年 7 月 28 日、京都

⑪ Michio Hashimoto, Shahadat Md Hossain, Masanori Katakura, Yoko Tanabe, Toshio Shimada, Osamu Shido、Docosahexaenoic acid improves behavioral impairment in amyloid beta infusion rats, by decreasing abeta fibrillation、第 36 回 国際生理学会世界 大会 (IUPS2009)、2009 年 7 月 28 日、京都

⑫ Kentaro Matsuzaki, Masanori Katakura, Toshiko Hara, Guanghua Li and Osamu Shido POSSIBLE CENTRAL MECHANISM OF LONG-TERM HEAT ACCLIMATION, The 3rd International Symposium on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation 2009, 2009 年 7 月 24 日, 島根

⑬ Kentaro Matsuzaki, Masanori Katakura, Toshiko Hara, Guanghua Li and Osamu Shido AGE-DEPENDENT CHANGES OF PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF PROGENITOR CELLS IN THE HYPOTHALAMUS OF HEAT-EXPOSED RATS, The 3rd International Symposium on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation 2009, 2009 年 7 月 24 日, 島根

⑭ Michio Hashimoto, Hossain Md. Shahdat, Masanori Katakura, Osamu Shido、Inhibiting effect of docosahexaenoic acid on the amyloid beta peptide fibrillation、International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD2009)、2009 年 7 月 12 日、(ウィーン) オーストリア

⑮ Ichie Matsumoto, Kazuya Yamashita, Ayako Matsuoka, Kazumi Tahara, Masanori Katakura, Setsushi Kato, Michio Hashimoto、Docosahexaenoic acid and cognition in elderly people living in community: A four-year-follow-up study.、International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD2009)、2009 年 7 月 12 日、(ウィーン) オーストリア

〔図書〕 (計 1 件)

① M. Hashimoto, S. Hossain, M. Katakura, Docosahexaenoic acid and cognitive dysfunction., V.R. Preedy et al. (eds.), Handbook of Behavior, Food and Nutrition, Springer Science, New York. 2010. (in press)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.staffsearch.shimane-u.ac.jp/kenkyu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片倉 賢紀 (KATAKURA MASANORI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号 : 40383179

