

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700393

研究課題名（和文） コレステロール代謝物による新しいシナプス機能調整メカニズムの解明

研究課題名（英文） Cholesterol metabolite-dependent regulation of synaptic development

研究代表者

鈴木 辰吾（SUZUKI SHINGO）

香川大学・医学部・助教

研究者番号：50451430

研究成果の概要（和文）：

脳由来神経栄養因子（BDNF）依存的に中枢神経細胞で合成が促進される24ヒドロキシコレステロール（24HC）の作用解析を行った。24HCは、BDNFによる神経細胞の形態変化やシナプス成熟の誘導の過程には関与せず、フィードバックシグナルとしてBDNFの作用を抑制する働きを持つことが明らかになった。また、これらの抑制はアストロサイトによる24HCの分解によって解除されるという新しいフィードバック系である可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Our previous study found that BDNF induced the synthesis of 24-hydroxycholesterol (24HC). However the roles of 24HC on CNS are not known. To better understand, we here investigate the effect of 24HC on primary neurons or astrocytes. The results indicated a possibility that, while 24HC was not involved in the BDNF-dependent effect on synapse development and dendritic morphology, 24HC did transduce the feedback signal to suppress the effect of BDNF.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：神経化学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：BDNF、コレステロール、ヒドロキシコレステロール、神経細胞、シナプス

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、脳機能に関わる蛋白質は多数同

定されているが、その中でも脳由来神経栄養因子 (BDNF) はその発現量の生理的な変化が脳機能に大きな影響を与える極めて重要な蛋白質と言える。BDNF の特筆すべき作用は、シナプス形成や機能の亢進であることから、BDNF は神経ネットワークの形成と強化を調整する因子と言える。一方、BDNF の機能低下はさまざまな脳神経疾患に関連し、BDNF の作用メカニズムの解明はさまざまな脳神経疾患を改善につながる可能性が考えられる。しかし現在のところ、BDNF の作用メカニズムは十分に解明されていない。

(2) 我々はこれまでシナプス機能を調整する脳由来神経栄養因子 (BDNF) と脂質のコレステロールとの関連性を研究してきた (Suzuki et.al., J Neurosci, 2007; Takemoto-Kimura et.al., Neuron, 2007; Suzuki et.al., J Cell Biol, 2004; Guirland et.al., Neuron, 2004)。その中で、BDNF によるニューロンのコレステロール合成がシナプスの成熟に重要であることを報告した。さらに、シナプス機能を調整する脂質が十分に探索されていないことに着眼し、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) を用いた脂質メタボローム解析を立ち上げ、BDNF 刺激に応答する脂質を詳細に解析した。その結果、コレステロールの代謝物である 24 ヒドロキシコレステロール (24HC) が、BDNF 依存的にニューロンで増加し、培地中へ放出されることを見出した。

## 2. 研究の目的

BDNF がシナプス形成を誘導する際、神経細胞において、24HC が合成されることから、24HC の生理作用についての探索と解析を行った。特に、24HC の増加の機構とその生理作用、さらに BDNF との関連を分子レベルで解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 24HCが増加するメカニズムの解析

24HC 合成酵素の発現解析をウエスタンブロット法により、合成阻害剤による神経細胞の脂質成分への影響を GC/MS による脂質メタボローム解析によって実施した。

### (2) BDNFによる神経細胞の形態変化と 24HC 合成阻害

大脳皮質及び線条体由来初代培養神経細胞を用いて、BDNF による神経細胞の形態変化を免疫染色法により解析した。24HC の合成阻害を行うことにより、24HC 産生と BDNF によって誘導される神経細胞の形態変化との関連を調べた。

### (3) BDNFによるプレシナプスの発達促進と 24HCの合成阻害

大脳皮質由来初代培養神経細胞を用いて、BDNF による神経細胞のプレシナプス形成をプレシナプスマーカーであるシナプトフィジンを指標にして、ウエスタンブロットによって解析した。そして、24HC の合成阻害を行うことによって、24HC 産生と BDNF によって誘導されるプレシナプスの形成との関連を調べた。

### (4) 24HCの神経細胞及びアストロサイトにおけるコレステロール合成への影響

大脳皮質由来初代培養神経細胞及びアストロサイトを用いて、24HC がこれらの細胞のコレステロール合成に対する影響を調べた。

### (5) 神経細胞とアストロサイトにおける 24HCの代謝活性の違い

大脳皮質由来初代培養神経細胞とアストロサイトにそれぞれ 24HC を添加し、一定時間後に培地中に存在している 24HC の量を GC/MS によって定量化することで、それぞれの細胞における 24HC の代謝活性の違いを検討した。

### (6) BDNF依存的なプレシナプスの成熟にお

## ける過剰な 24HC の影響

大脳皮質由来初代培養神経細胞を用いて、24HC の BDNF 依存的なシナプス形成への影響を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 24HC が増加するメカニズムの解析

BDNF を培養神経細胞に添加することによって、24HC の合成酵素である CYP46 の発現が増強されることが明らかになった。さらに CYP46 の合成阻害剤を投与することにより、BDNF による 24HC の増加が抑制されることが明らかになった。これらの結果から、BDNF による 24HC の増加は、CYP46 の発現誘導を介した合成の促進であることが見出された。

#### (2) BDNF による神経細胞の形態変化と 24HC 合成阻害

BDNF は神経細胞の形態変化を誘導する。その指標として樹状突起数の増加を誘導することが知られている。そこで、24HC の合成がこの BDNF による樹状突起数の変化に関与するのかを 24HC の合成阻害剤を用いて検討した。その結果、24HC の合成を阻害しても、BDNF による樹状突起数の増加は全く影響されなかった。これらは大脳皮質由来初代培養神経細胞及び線条体由来初代培養神経細胞のいずれにおいても同様の結果であった。以上の結果より、BDNF による神経細胞の形態変化の誘導に 24HC の合成は関与しないと考えられた。

#### (3) BDNF によるプレシナプスの発達促進と 24HC の合成阻害

BDNF による神経細胞の形態変化の誘導に加えて、BDNF によるプレシナプスの形成に対する 24HC 合成阻害の影響を調べた。発達過程の大脳皮質神経細胞に BDNF を投与するとプレシナプスマーカーのシナプトフィジンが増加するが、24HC 合成阻害剤の添加はこれ

らを全く阻害しなかった。以上の結果は、BDNF によるプレシナプスの形成促進作用に 24HC の合成が関与しない可能性を示している。

#### (4) 24HC の神経細胞及びアストロサイトにおけるコレステロール合成への影響

24HC の類縁物質である 25 ヒドロキシコレステロールや 27 ヒドロキシコレステロールが培養細胞のコレステロール合成を阻害する可能性が報告されている。そこで 24HC にも同様の作用がある可能性が考えられたため、培養神経細胞と培養アストロサイトにおけるコレステロール合成系に対する 24HC の影響を解析した。その結果、3 $\mu$ M 以上の 24HC は神経細胞のコレステロール合成を有意に阻害することが確認された。一方、アストロサイトに対してはそのような作用がないことが確認できた。これらの結果から、BDNF によって合成された 24HC がフィードバックシグナルとして自身のコレステロール合成系を阻害する可能性が示唆された。

#### (5) 神経細胞とアストロサイトにおける 24HC の代謝活性の違い

神経細胞とアストロサイトにおける 24HC の代謝の違いを検討するために、それぞれの培養細胞に 24HC を添加し、3 日後にその培地に残存する 24HC の量を GC/MS により解析した。その結果、神経細胞の培養系では約 60% の 24HC が残存していた一方、アストロサイトの培養系では 24HC が 10% 以下にまで減少していた。これらの結果から、24HC は主にアストロサイトによって分解されることが示された。

#### (6) BDNF 依存的なプレシナプスの成熟における過剰な 24HC の影響

24HC がアストロサイトによって十分に分解されないまたは脳より排出されない場合を想定し、10 $\mu$ M の 24HC を培養神経細胞に投

与する実験を行った。その結果、24HC によって BDNF による神経細胞のプレシナプスの成熟が抑制されることが明らかになった。この結果は、過剰に生産された 24HC がアストロサイトにより、代謝または脳実質から血管系へ排出されない場合、神経細胞自身に作用し、プレシナプスの成熟を抑制する可能性が示唆された。

以上の結果より、BDNF によって産生された 24HC はフィードバックシグナルとして BDNF の作用を抑制する働きを持ち、これらの抑制はアストロサイトによる 24HC の分解によって解除される可能性が考えられた。これらは脂質合成系を介した新しいフィードバック系であると考えられる。

#### 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 5 件)

① Liu JQ, Miki T, Warita K, Ohta K, Suzuki S, Yakura T, Tamai M, Matsumoto Y, Takeuchi Y. Reassessment of secretion manner from neurosecretory terminals in the rat posterior pituitary. *Current Neurobiology* 2011 Oct;2(2):89-91 査読あり

② Wang ZY, Miki T, Ding Y, Wang SJ, Gao YH, Wang XL, Wang YH, Yokoyama T, Warita K, Ohta K, Suzuki S, Ohnishi T, Obama T, Bedi KS, Takeuchi Y, Shan BE. A high cholesterol diet given to apolipoprotein E-knockout mice has a differential effect on the various neurotrophin systems in the hippocampus. *Metab Brain Dis.* 2011 Sep;26(3):185-94. 査読あり

③ Koshimizu H, Suzuki S, Araki T, Yamada

M, Kojima M, Hatanaka H. BIT/SHPS-1 promotes antiapoptotic effect of BDNF on low potassium-induced cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Cell Mol Neurobiol.* 2011 Oct;31(7):1027-32. 査読あり

④ Sato Y, Suzuki S, Kitabatake M, Hara T, Kojima M. Generation of TrkA/TrkB Chimeric Receptor Constructs Reveals Molecular Mechanisms Underlying BDNF-Induced Dendritic Outgrowth in Hippocampal Neurons. *Cell Mol Neurobiol.* 2011 May;31(4):605-14. 査読あり

⑤ Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H. BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol and Histopathol.* 25(2):237-58. (2010) 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

① 鈴木辰吾「BDNF によるニューロンのコレステロール合成誘導とプレシナプス成熟のメカニズム」日本解剖学会第 66 回中国・四国支部学術集会 徳島市 2011.11.13 口頭発表

② 鈴木辰吾「BDNF によるニューロンのコレステロール合成誘導とプレシナプス蛋白質のラフトへの移動」、日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会、福岡市、2011.5.18 シンポジウム

③ S.Suzuki, H. Qiu, T. Kasama, C. Itami, K. Kiyosue, M. Kojima, K. Tanaka. 「BDNF regulated Cholesterol homeostasis in CNS

neurons」 Helsinki, Finland, June 2010,  
NGF 2010 meeting "Neurotrophic Factors in  
Health and Disease" ポスター発表

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 辰吾 (SUZUKI SHINGO)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：50451430