

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790234

研究課題名(和文) 記憶・学習における情報伝達物質としての脂質の役割：神経幹細胞に対する影響について

研究課題名(英文) Polyunsaturated fatty acids: role as a mediator in learning and memory

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：記憶・学習における情報伝達物質としての多価不飽和脂肪酸の役割を解明するために研究を行った。-3多価不飽和脂肪酸を投与したラットの海馬では脳由来神経栄養因子の増加とともに、記憶学習能の向上が認められた。神経幹細胞からニューロンへの分化はドコサヘキサエン酸だけでなくエイコサペンタエン酸でも促進された。しかし、その機構は両者で異なる様式であった。遊離多価不飽和脂肪酸受容体GPR40作動薬により、神経幹細胞からニューロンおよびアストロサイトへの分化が促進された。これらの結果より、-3多価不飽和脂肪酸は記憶学習能の向上に神経幹細胞の分化促進を介して作用すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Polyunsaturated fatty acids are essential for the growth and functional development of the brain. The present study aimed to examine the role of polyunsaturated fatty acids as mediator on the learning and memory functions. Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve learning memory by increasing brain-derived neurotrophic factor and docosahexaenoic acid-derived metabolites in the hippocampus. Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid could be induced neuronal differentiation of cultured neural stem cells via different mechanisms. Free fatty acid-activated G protein-coupled receptor 40 activation enhanced neuronal and glial differentiation. These results indicate that Omega-3 polyunsaturated fatty acids could be involved to improve learning and memory functions via neurogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：多価不飽和脂肪酸 神経新生 ドコサヘキサエン酸 エイコサペンタエン酸 遊離脂肪酸受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳はその重量の約 40% は脂質である。その脂質の中にはドコサヘキサエン酸 (DHA) やアラキドン酸 (ARA) などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が多く含まれる。PUFA は脳の発達や機能維持に重要であるが、脳内での生合成量は少なく、食餌などからの摂取が必要である。また、脳内で PUFA は細胞膜の成分となるだけでなく、PUFA 未変化体または細胞内で代謝され生成するプロスタグランジン類やプロテクチンは、情報伝達物質として働き、神経細胞の保護、神経細胞の成熟や細胞死などに関与している。PUFA 摂取の過不足は、脳の細胞膜の脂肪酸組成を変化させる。この変化は、脳の正常機能に影響を与えると同時に、神経変性疾患や精神疾患の発症との関連が指摘されている。我々は、DHA 投与により老齢ラットやアルツハイマー病モデルラットの記憶・学習能は改善されることを明らかにしてきた (Gamoh et al., 2001; Hashimoto et al., 2005)。

(2) 神経幹細胞は胎児のみならず成体の脳内にも見出されており、脳機能の発達・維持に重要である。特に海馬における神経幹細胞の増殖や分化は、記憶の保持・形成に必要不可欠である。我々は、PUFA による記憶・学習能向上には、神経幹細胞の増殖や分化の促進が関与し、その中で PUFA は情報伝達物質として作用していると考えた。

PUFA およびその代謝物は、神経幹細胞の増殖・分化に影響を与えることが報告されている。我々は世界に先駆けて、神経幹細胞のニューロンへの分化を DHA が促進させることを明らかにした (Kawakita et al., 2006)。その後、マウス、サルを用いた研究においても証明された (Chengwei et al., 2009; Ma et al., 2007)。また、ARA 投与は神経幹細胞の増殖を介して統合失調症モデル動物の症状を改善させることも報告された (Maekawa et al., 2009)。さらに、ARA 由来のプロスタグランジン類は神経幹細胞の増殖を促進させることも報告されている (Katura et al., 2010; Yushak et al., 2010)。我々は DHA による神経幹細胞のニューロンへの分化促進作用機序として、DHA は、神経幹細胞の増殖を促進し分化を抑制する転写因子 Hes1 の発現量を低下させ、細胞周期の G1 期から S 期への移行を阻害する p21 や p27 の発現量を増加させ、細胞周期を G1 - S 期で停止させることを明らかにした (Katakura et al., 2009)。その他にも多くの細胞内情報伝達機構が神経幹細胞の増殖や分化の制御に関与している (Mu et al., 2010)。しかし、これらの機構に対する PUFA の影響についての報告はない。

2. 研究の目的

PUFA 特に ω -3PUFA による記憶・学習能を向上させる機構解明のために、そこに関与する代謝物、成長因子や受容体を特定することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ω -3PUFA によるラットの認知機能の改善効果

雄性ラット (6 週齢) を体重が均等になるように 3 群に分けた。第 1 群には ω -3PUFA (300 mg/kg 体重) 第 2 群には EPA (300 mg/kg 体重) 第 3 群には 5% アラビアゴム水溶液を 1 日 1 回 13 週間経口投与した。7 週間投与終了後から放射状八方迷路試験を 4 週間行い認知機能を測定した。

(2) 放射状八方迷路

八方向の走路のうち 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 つの場所を記憶できるかを評価する方法で、短期記憶 (作業記憶エラー数) および、長期記憶 (参照記憶エラー数) 両方を評価した。

(3) 脳内 PUFA 代謝物の測定

試料はメタノールと混合し、一晚 -30°C にて保存後、遠心分離により除タンパクした。遠心上清に内部標準物質、蒸留水を加えたのち 0.1 M HCl を用いて pH 4 付近となるように調製し、固相抽出カラムを用いて PUFA 代謝物を分離・精製した。回収した試料は窒素流下で濃縮し、少量の移動相に溶解し、測定試料とした。高速液体クロマトグラフ - トリプル四重極型質量分析計 (HPLC-MS/MS, TSQ Quantum Access MAX, Thermo Fisher Scientific 社) を用いて定量した。

(4) 神経幹細胞を用いた実験

神経幹細胞の培養

ラット胎児 (14.5 日) の前脳を摘出後、線維芽細胞増殖因子 (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。

神経幹細胞の増殖に対する PUFA の影響
FGF 存在下で培地に異なる濃度の PUFA、0.05% BSA (コントロール) 阻害剤を混合し、神経幹細胞を 4 日間培養した。4 日後、MTS (Promega 社) を培地に添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 3 時間培養した。MTS が生細胞によって代謝されて生成するホルマゼンを、490 nm の吸光度で測定した。

神経幹細胞の分化に対する PUFA 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 PUFA または阻害剤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、ウエスタンブロッティング、免疫染色を行った。

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。

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, GPR40)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7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。

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)を示した図から、各細胞周期の細胞数を算出した。

4. 研究成果

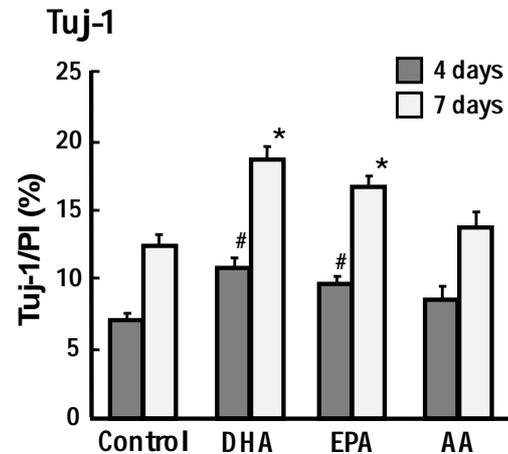
(1) ω -3PUFAによるラットの認知機能の改善効果(Neurochemical Research, 38, 2124-2135, 2013.)

メタボリックシンドロームモデルラット(SHRcp)に ω -3PUFAを投与後、認知機能を放射状迷路により評価した。EPA単独よりもEPAとDHAを混合した場合でより参照記憶エラー数(長期記憶の指標)の低下が認められた。記憶学習と関係の深い海馬の過酸化脂質量、活性酸素種量はEPA単独、EPA/DHA混合両者ともにコントロール群と比較して有意に低下していた。しかし、神経細胞の生存・成長・シナプスの機能亢進などの神経細胞の成長を調節する脳由来神経栄養因子(BDNF)量は、EPA/DHA混合群でのみ有意に増加していた。このことは、同じ ω -3PUFAでもEPA単独よりもEPA/DHA混合の方が認知機能の改善に効果的であることを示唆している。また、EPAは投与後、脳内へ移行することは知られているが、蓄積量はDHAやARAと比較すると100倍以上少ないこともEPA単独での記憶学習能の改善効果が低い要因の一つと考えられる。現在、 ω -3PUFA投与後の脳内PUFA代謝物の測定を進め、認知機能改善効果との相関関係を検討している。

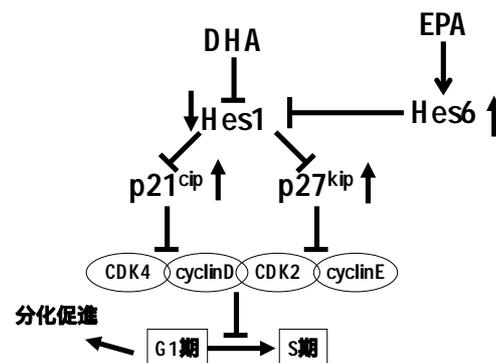
(2) ω -3PUFAによる神経幹細胞からニューロンへの分化促進機構の解明(Stem Cell International, 2013, 4904476, 2013.)

DHAは神経幹細胞からニューロンへの分化を促進させること報告したが、EPAやARAの効果は検討されていなかった。神経幹細胞をPUFAで処置したところ、ニューロンマーカーのTuj-1陽性細胞数はコントロールと比較して、DHAまたはEPA添加により培養4、

7日目ともに有意に増加した。しかし、ARA添加では、このような作用は認められなかった(図1)。



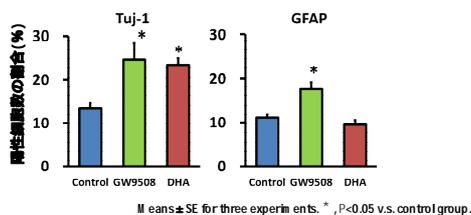
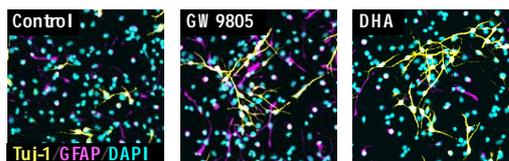
NSCsの増殖と分化を制御しているbasic helix-loop-helix転写因子の発現量に対するPUFAの影響を検討した。抑制性因子Hes1の発現量は、DHAにより減少し、EPAにより増加した。また、ARAでは変化しなかった。Hes1抑制因子Hes6発現量はEPAでのみ増加した。Hes1の標的遺伝子であるNeuroDやMap2の発現量は、DHA、EPAともに増加したが、ARAでは変化しなかった。次に、細胞周期に対するPUFAの影響を検討した。DHA、EPAによって、S期の細胞は減少し、G0/G1期の細胞は増加した。また、G0/G1期からS期への移行を抑制するp21とp27の発現量は、DHA、EPAにより増加した。以上より、DHAはHes1の発現を抑制することにより、EPAはHes6の発現を増加させることにより、Hes1の作用を抑制し、NSCsのニューロンへの分化を促進させることが明らかとなった(図2)。



(3) 神経幹細胞における ω -3PUFA受容体GPR40の役割

先の実験結果より、DHAやEPAは受容体を介して神経幹細胞からニューロンへの分化を促進させる可能性がある。そこで、本研究では、遊離脂肪酸受容体GPR40の神経幹細胞における役割について検討した。未分化な培養神経幹細胞ではGPR40の発現はmRNAおよびタンパク質レベルで認められなかった。しかし、培養後1日後からGPR40の発現量は

増加していた。4日間分化後の細胞では、Tuj-1、GFAPと共にGPR40陽性細胞が認められた。二重免疫染色により、GPR40はTuj-1陽性細胞だけでなく他の分化した細胞にも発現していることが示された。DHA処置はTuj-1陽性細胞数、Tuj-1 mRNAを増加させたが、GFAPの発現には影響を与えなかった。一方、GW9805処置は、Tuj-1、GFAP両方の陽性細胞数、mRNAの発現量を増加させた(図3)。



GW1100は、GW9805の作用を抑制したが、DHAの作用は抑制しなかった。神経幹細胞の分化を抑制している転写因子Hes1 mRNAおよびHes1の上流で作用するセクレターゼ mRNA発現量は、DHAにより減少したが、GW9805による影響は認められなかった。これらの結果から、GPR40アゴニストは神経幹細胞のニューロン・アストロサイトのいずれの分化も促進していると考えられた。しかし、DHAによるニューロンへの分化促進機構には別の細胞内情報伝達経路が存在することが示唆された。

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4件)

M. Katakura, M. Hashimoto, T. Inoue, A. Mamun, Y. Tanabe, R. Iwamoto, M. Arita, A. Tsuchikura, O. Shido. Omega-3 fatty acids protect renal functions by increasing docosahexaenoic acid-derived metabolite levels in SHR.Cg-Lepr^{fp}/NDmcr rats, a metabolic syndrome model. *Molecule*, 19, 3247-3263, 2014. (査読あり)
DOI:10.3390/molecules19033247

M. Katakura, M. Hashimoto, T. Okui, M.S. Hossain, K. Matsuzaki, O. Shido. Omega-3 polyunsaturated fatty acids enhance neuronal differentiation in cultured rat neural stem cells. *Stem Cell International*, 2013, 4904476, 2013. (査読あり)
DOI:10.1155/2013/490476

M. Hashimoto, T. Inoue, M. Katakura, Y. Tanabe, S. Hossain, S. Tsuchikura, O. Shido. Prescription n-3 fatty acids, but not eicosapentaenoic acid alone, improve reference memory-related learning ability by increasing

brain-derived neurotrophic factor levels in SHR.Cg-Lepr^{fp}/NDmcr rats. *Neurochemical Research*, 38, 2124-2135, 2013. (査読あり)
DOI:10.1007/s11064-013-1121-1

M. Katakura, M. Hashimoto, Y. Tanabe, O. Shido. Hydrogen-rich water inhibits glucose and α,β -dicarbonyl compound-induced reactive oxygen species production in the SHR.Cg-Lepr^{fp}/NDmcr rat kidney. *Medical Gas Research*, 9 (2), pp 18-25, 2012. (査読あり)
DOI:10.1186/2045-9912-2-18

[学会発表](計21件)

M. Katakura, M. Hashimoto, K. Matsuzaki, T. Okui, O. Shido. Activation of G protein-coupled receptor 40, one of free fatty acid receptors, induces the enzymes of polyunsaturated fatty acids synthesis and facilitates differentiation of cultured neural stem cells. 第91回日本生理学会大会、2014年3月16-18日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島)

片倉賢紀, 橋本道男, 井上隆之, 田邊洋子, 山口修平, 並河徹, 塩飽邦憲, 紫藤治, 高齢者における青魚摂取と無気力との関連: Shimane CoHRE Study, 第11回日本機能性食品医学会総会、2013年12月7-8日、東京海洋大学品川キャンパス(東京)

片倉賢紀, 橋本道男, n-3多価不飽和脂肪酸による神経変性疾患・精神疾患の予防効果、第一回食と環境、そして高齢化を考える研究会、2013年11月22日、ホテル日航金沢(石川)

片倉賢紀, 橋本道男, 奥井俊之, 松崎健太郎, 紫藤治, 神経幹細胞の分化における多価不飽和脂肪酸受容体、GPR40の役割、第65回日本生理学会中国四国地方会、2013年11月2日-3日、川崎医科大学(岡山)

橋本道男, 加藤節司, 山口修平, 田邊洋子, 片倉賢紀, 大野美穂, 井上佳恵, 椎名彦, 大倉英久, 佐々木祐輔, 松井禮子, 岩野智栄美, 下田友子, 笠井宏美, 紫藤治, 高齢者向けの居住系介護施設等入居者の認知機能と介護者負担におよぼすn-3系脂肪酸と運動の影響、日本脂質栄養学会第22回大会、2013年9月6-7日、高知会館(高知)

井上隆之, 片倉賢紀, 橋本道男, 田邊洋子, Abdullah Al Mamun, 大谷浩, 紫藤治, 多価不飽和脂肪酸摂取によるラット骨格筋の筋線維型に及ぼす影響、日本脂質栄養学会第22回大会、2013年9月6-7日、高知会館(高知)

片倉賢紀, 橋本道男, 井上隆之, 田邊洋子, 山口修平, 並河徹, 塩飽邦憲, 紫藤治, 高齢者の精神神経機能と赤血球膜脂肪酸組成との関連: Shimane CoHRE Study, 日本脂質栄養学会第22回大会、2013年9月6-7日、高知会館(高知)

橋本道男, Hossain Shahdat, 片倉賢紀, 紫藤治, The Binding of $A\beta_{1-42}$ to Lipid-Rafts containing Detergent Resistant Membranes of RBC Ghost is Enhanced by Dietary

Docosahexaenoic Acid in rats: an implication of erythrocyte functions to Alzheimer's Disease. Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2013, 2013年7月13-16日, Boston Convention & Exhibition Center (ボストン / 米国)

片倉賢紀, 橋本道男, 奥井俊之, 松崎健太郎, 田邊洋子, 紫藤治, Omega-3 多価不飽和脂肪酸による神経幹細胞のニューロンへの分化誘導機構, 第67回日本栄養食糧学会大会, 2013年5月24-26日, 名古屋大学(愛知)

M. Katakura, M. Hashimoto, K. Matsuzaki, T. Okui, O. Shido. Role of G protein-coupled receptor 40, a free fatty acid receptor, in the proliferation and differentiation of cultured neural stem cells. 第90回日本生理学会大会, 2013年3月27-29日, タワーホール船堀(東京)

橋本道男, 井上隆之, 片倉賢紀, 田邊洋子, Abdullah Mamun, 紫藤治, 処方剤としてのn-3系脂肪酸は、エイコサペンタエン酸単剤と異なり、メタボリックシンドロームモデルラットの脳由来栄養因子を増加させ認知機能を改善する, 第86回日本薬理学会年会, 2013年3月23日, 福岡国際会議場(福岡)

片倉賢紀, 橋本道男, 紫藤治, 多価不飽和脂肪酸による神経幹細胞の分化制御機構の解析, 第86回日本薬理学会年会, 2013年3月21-23日, 福岡国際会議場(福岡)

H. Shahdat, M. Hashimoto, M. Katakura, O. Shido. Docosahexaenoic acid inhibits amyloid beta peptide fibrillogenesis by inhibiting the formation of di-, tri-, tetra-, and oligomer amyloid intermediate species destined for matured fibers. 第17回武田振興財団生命科学シンポジウム, 2012年12月6-7日, 武田薬品工業(株)研修所(大阪)

M. Hashimoto, H. Shahdat, M. Katakura, O. Shido. Protective effects of docosahexaenoic acid on cognitive decline with aging and dementia: From animal and human interventional studies. 第17回武田振興財団生命科学シンポジウム, 2012年12月6-7日, 武田薬品工業(株)研修所(大阪)

M. Katakura, M. Hashimoto, H. Shahdat, O. Shido. Omega-3 polyunsaturated fatty acids enhance neuronal differentiation in cultured rat neural stem cells. 第17回武田振興財団生命科学シンポジウム, 2012年12月6-7日, 武田薬品工業(株)研修所(大阪)

井上隆之, 橋本道男, 片倉賢紀, 田邊洋子, Abdullah Al Mamun, 松崎健太郎, 大谷浩, 紫藤治, 加齢ラット骨格筋に及ぼすアラキドン酸長期投与の影響, 日本脂質栄養学会第21回大会, 2012年9月7-8日, 麻布大学(神奈川)

片倉賢紀, 橋本道男, 井上隆之, 田邊洋子, Abdullah Al Mamun, 紫藤治, 加齢ラット腎臓の多価不飽和脂肪酸代謝物に及ぼすアラキ

ドン酸長期投与の影響, 日本脂質栄養学会第21回大会, 2012年9月7-8日, 麻布大学(神奈川)

橋本道男, 片倉賢紀, 井上隆之, 田邊洋子, 十万佐知子, 三木和博, 海津幸子, 谷戸正樹, 若・加齢ラットの認知機能, 網膜機能, 免疫能, 骨格筋に及ぼすアラキドン酸長期投与の影響, 日本脂質栄養学会第21回大会, 2012年9月7-8日, 麻布大学(神奈川)

T. Inoue, M. Hashimoto, Y. Tanabe, T. Hara, K. Matsuzaki, M. Katakura, H. Otani, O. Shido. Effect of chronic administration of arachidonic acid on skeletal muscle lipids in aged rats. 2012年5月26-30日, Westin Bayshore Hotel Vancouver (バンクーバー / カナダ)

M. Hashimoto, T. Inoue, Y. Tanabe, A. Mamun, M. Katakura, K. Matsuzaki, O. Shido. Effects of long-term administration of arachidonic acid on spatial cognition in aged rats. 10th Congress of the international society for the study of fatty acids and lipids (ISSFAL2012). 2012年5月26-30日, Westin Bayshore Hotel Vancouver (バンクーバー / カナダ)

② M. Katakura, T. Okui, M. Hashimoto, K. Matsuzaki, O. Shido. Conjugated linolenic acid controls neuronal differentiation of cultured neural stem cells by alternating mRNA levels of bHLH transcription factors and cell cycle. 10th Congress of the international society for the study of fatty acids and lipids (ISSFAL2012). 2012年5月26-30日, Westin Bayshore Hotel Vancouver (バンクーバー / カナダ)

〔図書〕(計1件)

Katakura, M & Hashimoto, M. iConcept Press. Antioxidant Renoprotective Effects of Hydrogen-rich Water in the SHR.Cg-Lepr^{cp}/NDmcr Rat-a Metabolic Syndrome Rat Model. Research on Diabetes I. 2014. ISBN: 978-1-477555-01-9.

〔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

島根大学教員情報検索システム

<https://www.staffsearch.shimane-u.ac.jp/kenkyu/search/detail/1ced59bf6fc49f51c2f902ba654db341/research.html>

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