

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461635

研究課題名(和文) 神経回路形成期における脂肪酸のホメオスタシス 精神疾患脆弱性因子としての探索

研究課題名(英文) Effect of BDNF on fatty acid homeostasis during brain 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪酸をはじめとする栄養素の摂取量低下が神経回路の形成障害を引き起こし、精神疾患などの発病脆弱性に関与する可能性が示唆されている。しかしながら、新生児期における脳の脂肪酸ホメオスタシスは十分に明らかになっていない。そこで、本研究では、発達過程の脳における脂質ホメオスタシスへの影響の解明を試みた。その結果、新生児期の脳において飽和脂肪酸は積極的に不飽和化していること、BDNFが肝臓のSCD-1の活性に関与し、全身の脂肪酸のホメオスタシスに関与しうること、BDNFがHPA系の修飾に関与する蛋白質の発現誘導に強くかかわることが見出された。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that lower dietary intake of nutrients such as fatty acids during the development is related to the vulnerability to the on-set of psychiatric disorders. However, brain fatty acid homeostasis in the neonatal period has not been fully understand. In this study, we tried to elucidate the brain lipid homeostasis in this period. As a result, it was found that saturated fatty acids are actively desaturated in neonatal brain, that BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) is involved in liver SCD-1 activity and can participate in systemic fatty acid homeostasis, and that BDNF induces the expression of HPA axis-related protein.

研究分野：胎児・新生児医学

キーワード：脂肪酸 発達 BDNF 脳 肝臓

1. 研究開始当初の背景

統合失調症研究における「神経発達障害仮説」では、脂肪酸をはじめとする栄養素の摂取量低下が神経回路の形成障害を引き起こし、発病脆弱性を惹起すると考えられている。実際、アラキドン酸やドコサヘキサエン酸(DHA)をはじめとする脂肪酸の摂取が、胎児・新生児期の脳の発達にとって重要であることがこれまでに多数示されている。さらに近年では、幼若期に特定の脂肪酸の摂取を制限したマウスが、後に統合失調様行動を示すことが明らかになったことから、脳の発達期における脂肪酸の重要性に注目が集まっている。一方、新生児期における脳の脂肪酸のホメオスタシスは、今のところ十分解明されていない。しかし、脂肪酸が脳に取り込まれ、神経回路構築に利用される過程は、脳の発達や統合失調症における発病脆弱性の惹起に強く関与する可能性があるため、この過程の解明は医学的にも非常に重要である。

これまでに我々は、新生児期においてシナプスの発達・成熟を誘導する脳由来神経栄養因子(BDNF)と脂質との関係を探る研究を行ってきた(Suzuki ら, J Cell Biol, 2004; Suzuki ら, J Neurosci, 2007; Suzuki ら, J Cell Neurobiol, 2011)。これらの研究を実施する中で、BDNF のノックアウトマウスの新生児脳において、主要な脂肪酸(アラキドン酸や DHA を含む)の量が減少していることを新たに発見した。しかしながら、新生児期における脳の合成や末梢との関係、さらにはその分子メカニズムなどはほとんど理解されていない。そこで本研究では新生児期における脳の脂肪酸ホメオスタシスの解明と BDNF と脂肪酸ホメオスタシスとの関係解明に焦点を当て、研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究では、BDNF が発達過程の脳における脂質ホメオスタシスへの影響を分子レベルで解明することを目的とし、(1) 新生児期の正常なマウス脳における脂肪酸ホメオ

スタシスの解析、(2) BDNF が肝臓の脂質合成に与える影響の解析、(3) BDNF が発達過程の神経細胞に及ぼす影響の解明を実施した。

3. 研究の方法

(1) 新生児期の正常なマウス脳における脂肪酸ホメオスタシスの解析

新生児期の脳における脂肪酸ホメオスタシスを調べるために 13C 安定同位体化グルコース(13C-U-Glucose)を用いた代謝フラックス解析を行った。具体的には、生後1日齢(P1)のマウスに3日間連続で13C-U-Glucoseを皮下投与し(P1からP3)、生後4日齢(P4)および生後8日齢(P8)に前脳を回収した。回収した前脳をホモジナイズ後、そこからイソプロパノール-ヘプタン系を用いて脂質を鹸化後・酸性条件下で抽出した。精製した脂質をBSTFA/TMCSを用いてTMS化した後、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC/MS)を用いて各脂肪酸由来フラグメントの同位体分布データを取得した。13C-U-Glucose非投与マウスの脳由来脂質をコントロールとして、各マウス由来の脳の脂肪酸に同位体がどれほど取り込まれたのかを調べた。

(2) BDNF が肝臓の脂質合成に与える影響の解析

これまでの研究により、新生児期における BDNF ノックアウトマウスの脳では有意に主要な脂肪酸の量が低下していることを我々は見出している。BDNF は視床下部を介して末梢の代謝に働きかけることが報告されているため、BDNF が脂肪酸合成を積極的に行っている肝臓にも作用し得るのではないかと考えた。そこで、BDNF ノックアウトマウスを用いて、肝臓における脂肪酸量が変化している可能性を探索した。具体的には、P5 または P6 の野生型(WT)および BDNF ノックアウトマウスから肝臓をそれぞれ取り出し、上記と同様に脂質を抽出後、脂肪酸量を GC/MS にて

測定した。親の違いによる代謝への影響を補正するため、同腹で生まれた WT とノックアウトマウスを実験に用い、親ごとの個体差をそれぞれ補正した。

(3) BDNF が発達過程の神経細胞に及ぼす影響の解明

新生児期における BDNF の作用をより詳細に解明するために、BDNF が培養大脳皮質神経細胞に与える影響を探索した。ラット (E20) の大脳皮質から神経細胞を調整し、in vitro で7日間培養させた後、BDNF を添加し、3日後に RNA を回収、qPCR によって HPA 系に關与する可能性が考えられる分子の発現変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 新生児期の正常なマウス脳における脂肪酸ホメオスタシスの解析

上記実験により代謝フラックス解析を行ったところ、主要な脂肪酸であるステアリン酸 (18:0)、オレイン酸 (18:1)、パルミチン酸 (16:0) におけるデータが得られた。他の脂肪酸については、高分子の同位体由来ピークが小さいため、信頼できるデータが得られなかった。実験の結果、3日間連続で脂質合成の材料となる ^{13}C -U-Glucose を投与したマウスの一日後 (P4) の脳では、ステアリン酸 (18:0)、オレイン酸 (18:1)、パルミチン酸 (16:0) のすべてにおいて強い安定同位体の取り込みが見られた。これは末梢に取り込まれたグルコースから脂肪酸が体内で合成され、それが脳にまで到達していることを示している。そして、P8 になると、安定同位体が取り込まれたステアリン酸 (18:0) とパルミチン酸 (16:0) の量はコントロールに近いレベルにまで減少している一方、安定同位体が取り込まれたオレイン酸 (18:1) の量はステアリン酸 (18:0) やパルミチン酸 (16:0) ほどは減少していなかった。これらの結果から発達期においては、飽和脂肪酸が脳で積極的に不飽和化している可能性が考えられた。

GC/MS の結果をさらに解析したところ、P3 から P8 にかけて、ステアリン酸、オレイン酸、パルミチン酸の総量はそれぞれ 1.50、1.37、1.52 倍に増加していたことから、体内 (末梢若しくは脳) で合成された飽和脂肪酸が脳で速やかに不飽和化すると同時に、さらに脳への飽和脂肪酸の取り込み・もしくは合成が行われているものと考えられた。

(2) BDNF が肝臓の脂質合成に与える影響の解析

肝臓の脂肪酸量を解析した結果、BDNF の欠損により、ステアリン酸 (18:0) とパルミチン酸 (16:0) の量には変動は見られなかったが、パルミトレイン酸 (16:1) の量が有意に増加していた。また、オレイン酸 (18:1) も有意ではないが増加傾向にあった。そこで各個体における 16:1/16:0 比と 18:1/18:0 比を算出したところ、BDNF ノックアウトマウスではこれらが共に有意に増加していた。この結果は、BDNF が肝臓において、飽和脂肪酸の不飽和化を担う Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) の活性に關与している可能性を示している。一方、BDNF 欠損は肝臓のコレステロール量には影響を及ぼさなかった。

Scd-1 の活性上昇は VLDL の増加を誘導するため、脳の脂肪酸量も増加すると考えられるが、BDNF ノックアウトマウスでは脳の脂肪酸量が減少することがこれまでの研究で明らかになっている。そのため、今回の結果は、中枢から末梢に向けて脂肪酸合成の要求が出ているにもかかわらず、中枢において脂質の取り込みや輸送が低下している可能性が考えられた。

(3) BDNF が発達過程の神経細胞に及ぼす影響の解明

BDNF の投与により、視床下部-下垂体-副腎系 (HPA 系) に關与する特定の蛋白質の合成が強く (5 倍から 20 倍程度) 促進されることを新たに見出した。この蛋白質の合成は BDNF 投与 4 時間後から開始され、神経活動を阻害

しても抑制されないことが明らかになった。副腎皮質ホルモンは肝臓における脂質代謝に強く影響を与えるため、BDNFがこの因子の発現誘導を介して、HPA系に働き、さらに肝臓の脂質ホメオスタシスに関与する可能性が考えられるが、大脳皮質の初代培養を用いた結果であるため、この現象が視床下部においても生じることを今後確認する必要がある。

以上の結果より、(1) 新生児期の脳において飽和脂肪酸は積極的に不飽和化していること、(2) BDNFが肝臓のSCD-1の活性に関与すること、(3) BDNFがHPA系の修飾に関与する蛋白質の発現誘導に強くかかわること、が本研究で明らかとなった。

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)

1. Ohta KI, Suzuki S, Warita K, Kaji T, Kusaka T, Miki T. Prolonged maternal separation attenuates BDNF-ERK signaling correlated with spine formation in the hippocampus during early brain development. *J Neurochem.* 2017 Apr;141(2):179-194. (査読有)

2. Suzuki S, Koshimizu H, Adachi N, Matsuoka H, Fushimi S, Ono J, Ohta K, Miki T. Functional interaction between BDNF and mGluR II in vitro: BDNF down-regulated mGluR II gene expression and an mGluR II agonist enhanced BDNF-induced BDNF gene expression in rat cerebral cortical neurons. *Peptides.* 2017 Mar;89:42-49. (査読有)

3. Warita K, Mitsuhashi T, Hoshi N, Ohta

KI, Suzuki S, Takeuchi Y, Miki T. A Unique Pattern of Bisphenol a Effects on Nerve Growth Factor Gene Expression in Embryonic Mouse Hypothalamic Cell Line N-44. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2014 Sep 29;65(3):293-9. (査読有)

4. Suzuki S, Murotomi K, Nakajima Y, Kawai K, Ohta K, Warita K, Miki T, and Takeuchi Y. Development of an artificial calcium-dependent transcription factor to detect sustained intracellular calcium elevation. *ACS synthetic biology* 2014 Oct 17;3(10):717-22. (査読有)

[学会発表](計 5 件)

1) 太田 健一, 鈴木 辰吾, 天雲 千晶, 日下 隆, 三木 崇範: 脳発達期の母子分離による扁桃体の興奮/抑制バランス崩壊. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017年3月28-30日, 長崎大学(長崎県長崎市)

2) 太田 健一, 鈴木 辰吾, 割田 克彦, 加地 智洋, 日下 隆, 三木 崇範: 脳発達早期の母子分離は海馬 CA1 領域における BDNF シグナルと樹状突起スパイン形成に影響を与える. 第5回日本 DOHaD 研究会学術集会, 2016年7月23-24日, 国立成育医療研究センター(東京都世田谷区)

3) 加地 智洋, 太田 健一, 鈴木 辰吾, 三木 崇範: 母子分離ラットにおける BDNF 発現と神経回路網の形成異常. 日本解剖学会第70回中国・四国支部学術集会, 2015年10月24-25日, 愛媛大学(愛媛県松山市)

4) Ken-ichi Ohta, Shingo Suzuki, Katsuhiko Warita, Takashi Kusaka, Takanori Miki: Early life stress reduces BDNF expression

and its related factors in rat hippocampus during brain development. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会/第92回日本生理学会大会 合同大会, 2015年3月21-23日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

5)加地智洋、太田健一、鈴木辰吾、割田克彦、三木崇範: 脳発達期の母子分離は海馬 BDNF 発現とその下流シグナルを低下させる. 日本解剖学会第69回中国・四国支部学術集会, 2014年10月25-26日, 広島大学(広島県広島市)

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

(2)研究分担者

三木崇範 (MIKI TAKANORI)

香川大学・医学部・教授

研究者番号: 30274294

太田健一 (OHTA KEN-ICHI)

香川大学・医学部・助教

研究者番号: 50403720

割田克彦 (WARITA KATSUHIKO)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号: 40452669