

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22504

研究課題名（和文）特殊な脂肪酸を利用する神経再生医療法の検証

研究課題名（英文）Control of neuronal morphology by using a specific fatty acid

研究代表者

服部 光治（Hattori, Mitsuharu）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・教授

研究者番号：60272481

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：海馬初代培養神経細胞においてミード酸が神経突起の分岐増加と伸張を引き起こすことを見いだした。この効果は、リーリン欠損マウス（脳内のミード酸量が多い）の神経細胞で観察された。薬理的検討の結果、ミード酸が特定の受容体系にリガンドとして働く可能性は低いことが示唆された。膜の流動性を反映して蛍光が変化する化合物をフランスの研究者から入手し、培養神経細胞膜の流動性イメージングを行った。その結果、膜分岐部位や微小突起では流動性が異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞の脂質組成は特殊であるが、これは生じるメカニズムも、その特殊性の生物学的意義も、明確には判っていない。本研究は、神経細胞に対して特殊な脂肪酸がもつ効果を足がかりに、神経細胞膜の性質を本質的に理解しようとするものである。残念ながらミード酸が神経細胞に及ぼす効果のメカニズムを解明することはまだできていないが、薬理学的実験およびイメージング実験から、その候補を絞り込みつつある。将来的には、脂質を人為的に操作することで神経細胞の形態をコントロールする技術の開発へとつなげたい。

研究成果の概要（英文）：We found that mead acid cause increased neurite branching and elongation in primary hippocampal neurons. This effect was observed in neurons obtained from Reelin-deficient mice. Pharmacological studies suggest that mead acid is unlikely to act as ligands for specific receptive systems. A compound whose fluorescence changes to reflect the fluidity of the membrane was obtained from a French group, and the fluidity of the cultured neuronal cell membrane was imaged. It was suggested that the fluidity differs in the membrane bifurcation site and the microprojections.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：脳 神経細胞 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

脳の脂肪酸組成が他の臓器と大きく異なることは古くから良く知られているが、その差異が生じるメカニズム、および、生物学的意義の全貌は今なお未解明である。疫学的研究から、脳における DHA (C22:6, n-3) 等の多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) の減少が、うつ・統合失調症・記憶障害などの精神神経疾患の一因または悪化要因であることが確実視されている。また、細胞レベルでは、PUFA は神経細胞 (特にシナプス) で重要な機能をもつことが判っている。しかし、個々の PUFA 分子種が個別に重要な意義をもつのか、それとも、膜を構成するリン脂質の炭素数・二重結合数の全体的なバランスの問題なのかは不明である。

一方、神経変性疾患については数多くの研究がなされてきてはいるが、現在でも治療法は限定的であり、社会的に大きな問題である。神経変性疾患に対する薬物治療は安全性が高く長期投与可能でなければならないことも、創薬や治験における高いハードルである。

我々は、脂肪酸の一種ミード酸 (C20:3, n-9) が、初代培養海馬神経細胞の神経突起を著しく伸長・分岐させることを見いだした。ミード酸は、微量ながら我々の体・脳に存在し、他の脂肪酸と同様の経路によって代謝される安全性が高い物質である。もしミード酸が損傷神経に対しても伸長効果があれば、臨床応用できる可能性は非常に高い。また、もし DHA 等を越えるシナプス形成増強効果があれば、神経変性疾患や一部の精神疾患に対する効果も期待できる。さらに、神経細胞における脂質の機能解明における新ツールともなる。本研究では、ミード酸の疾患治療への応用を目指すとともに、脂質生物学と神経生物学をつなぐ新たな架け橋をかける可能性も追求する。

2. 研究の目的

神経変性疾患の治療薬としてのミード酸の可能性を検証するとともに、ミード酸の特異な効果の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

ミード酸のシナプス形成に対する効果を検証するため、海馬初代培養神経細胞にミード酸を添加し、シナプスの数や密度を定量する。まずは培養初期から全培養期間にミード酸を添加する実験を行うが、より短期間の投与 (例えばおおむねシナプス形成が始まる時期のみ、または、シナプス完成後、など) で効果が認められるか否かが重要な実験となる。

ミード酸が突起伸長と分岐を促すメカニズムとして、何らかの受容体を介し、細胞内シグナル伝達経路や遺伝子発現を変化させる、膜リン脂質に取り込まれ、細胞膜または膜内在性タンパク質の性質を変化させる、の二つが考えられる。薬理学的実験および膜の流動性を測定することで、これらのメカニズムについて検討する。

4. 研究成果

海馬初代培養神経細胞にミード酸を添加したところ、神経突起 (主には軸索) の分岐増加と伸張が観察された。同じ PUFA の一種である DHA でも同様の効果はあった (既に複数の他グループの論文で報告されている) が、同じ濃度で比較するとミード酸のほうがはるかに強い効果を持っていた。この効果は長期間培養によって一見徐々に小さくなったが、コントロール細胞でも分岐が増え、突起も長くなるのが主因と思われる。長期間培養した細胞の PSD-95 を染色することで興奮性シナプスの数や密度を調べたところ、ミード酸の効果はほぼないことが判った。また、リーリン欠損マウス (脳内のミード酸量が多い) の神経細胞でも同様の効果が観察された。

ミード酸が突起伸長と分岐を促すメカニズムの可能性として、G タンパク質共役型の脂肪酸受容体 (GPR40 など) を介して細胞内情報伝達系が活性化されるということが考えられる。これを検証するため、いくつかの GPCR 阻害剤や細胞内情報伝達関連酵素の阻害剤などを添加する実験を行ったが、明確に効果のある薬剤はなかった。神経細胞に対するミード酸の効果はある程

度高くないとみられないことから、ミード酸が特定の受容体系にリガンドとして働く可能性は低いことが示唆された。

細胞レベルでミード酸などの脂肪酸を局在を検出できる技術は現在存在しないが、最近、膜の流動性を反映して蛍光が変化する化合物が報告された (Switchable Solvatochromic Probes for Live-Cell Super-resolution Imaging of Plasma Membrane Organization. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*58, 14920 (2019))。この化合物をフランスの研究者から入手し、培養神経細胞膜の流動性イメージングを行った。その結果、膜分岐部位や微小突起では流動性が異なることが示唆された。ミード酸添加によって細胞全体の流動性が変化するような知見は得られていないが、分岐部位や微小突起などにおいてミード酸が何らかの効果を現している可能性を考え、現在解析を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okugawa Eisuke, Ogino Himari, Shigenobu Tomofumi, Yamakage Yuko, Tsuiji Hitomi, Oishi Hisashi, Kohno Takao, Hattori Mitsuharu	4. 巻 10
2. 論文標題 Physiological significance of proteolytic processing of Reelin revealed by cleavage-resistant Reelin knock-in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61380-w	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 Hatanaka Yumiko, Kawasaki Takahiko, Abe Takaya, Shioi Go, Kohno Takao, Hattori Mitsuharu, Sakakibara Akira, Kawaguchi Yasuo, Hirata Tatsumi	4. 巻 21
2. 論文標題 Semaphorin 6A?Plexin A2/A4 Interactions with Radial Glia Regulate Migration Termination of Superficial Layer Cortical Neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 359 ~ 374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.10.034	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 Yamakage Yuko, Kato Michinao, Hongo Aya, Ogino Himari, Ishii Keisuke, Ishizuka Takumi, Kamei Takana, Tsuiji Hitomi, Miyamoto Tomomi, Oishi Hisashi, Kohno Takao, Hattori Mitsuharu	4. 巻 100
2. 論文標題 A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2 cleaves and inactivates Reelin in the postnatal cerebral cortex and hippocampus, but not in the cerebellum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 103401 ~ 103401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mcn.2019.103401	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 Ogino Himari, Yamakage Yuko, Yamashita Mihoshi B., Kohno Takao, Hattori Mitsuharu	4. 巻 2043
2. 論文標題 Assay for Reelin-Cleaving Activity of ADAMTS and Detection of Reelin and Its Fragments in the Brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 105 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9698-8_9	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 Kohno Takao, Ogino Himari, Yamakage Yuko, Hattori Mitsuharu	4. 巻 2043
2. 論文標題 Expression and Preparation of Recombinant Reelin and ADAMTS-3 Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 93 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9698-8_8	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 Ishii Keisuke, Kohno Takao, Hattori Mitsuharu	4. 巻 514
2. 論文標題 Differential binding of anti-Reelin monoclonal antibodies reveals the characteristics of Reelin protein under various conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 815 ~ 820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.05.005	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 -

〔学会発表〕 計26件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hagihara et al.
2. 発表標題 Systematic analysis of brain pH and lactate levels in animal models: relationships and implications for behavioral outcomes
3. 学会等名 21st Annual Meeting of the International Behavioural and Neural Genetics Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideo Hagihara, et al.
2. 発表標題 Systematic analysis of brain pH and lactate levels in animal models: relationships and implications for behavioral outcomes
3. 学会等名 21st Annual Meeting of the International Behavioural and Neural Genetics Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井圭介、河野孝夫、服部光治
2. 発表標題 分泌タンパク質リーリンによる海馬形成制御機構の解明
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻野ひまり、中島鼓美、鳥内皐暉、青山峰芳、服部光治
2. 発表標題 分泌タンパク質リーリンは脳でオリゴデンドロサイト前駆細胞の数と配置に影響を与える
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学大会 (Neuro2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原理加、梅本銀河、中川真一、吉田稔、服部光治、築地仁美 Rika Uehara, Ginga Umemoto, Shinichi Nakagawa, Minoru Yoshida, Mitsuharu Hattori, Hitomi Tsuiji
2. 発表標題 長鎖ノンコーディングRNAであるGomafuの核内繫留機構におけるSF3b2の寄与の解明
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重信奉文、奥側英介、河野孝夫、大石久史、服部光治
2. 発表標題 分解抵抗型リーリン発現マウスにおける海馬層構造異常の原因解明
3. 学会等名 第65回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 常浦祐未、北川佳奈子、高瀬冴子、澤幡雅仁、伊藤教道、河野孝夫、服部光治、永井拓、山田清文
2. 発表標題 RNA干渉法を利用した脳内リーリングナルを増強させる手法の開発
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学大会 (Neuro2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤幡雅仁、浅野裕樹、河野孝夫、服部光治、永井拓、山田清文
2. 発表標題 Reelinの前頭前皮質内投与がMK801誘発性行動障害およびc-Fos発現に与える影響
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学大会 (Neuro2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大嶋智葉、中島鼓美、大石久史、服部光治 Tomoha Ohshima, Tsuzumi Nakajima, Hisashi Oishi, Mitsuharu Hattori
2. 発表標題 脳におけるリン脂質フリッパーゼの機能の解明
3. 学会等名 NCUライフサイエンスリトリート2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井圭介、河野孝夫、服部光治
2. 発表標題 海馬形成における分泌タンパク質リーリンの機能解明
3. 学会等名 第18回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 興柏勝成、水上智晴、河野孝夫、服部光治 Katsunari Korogi, Tomoharu Mizukami, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori
2. 発表標題 神経細胞における特定の脂肪酸の生理的意義
3. 学会等名 第18回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井圭介、河野孝夫、服部光治 Keisuke Ishii, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori
2. 発表標題 リーリンは発生後期における海馬形成を制御する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大嶋智葉、中島鼓美、大石久史、服部光治 Tomoha Ohshima, Tsuzumi Nakajima, Hisashi Oishi, Mitsuharu Hattori
2. 発表標題 脳におけるリン脂質フリッパーゼの機能の解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 興柏勝成、水上智晴、河野孝夫、服部光治 Katsunari Korogi, Tomoharu Mizukami, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori
2. 発表標題 神経細胞における特定の脂肪酸の生理的意義
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原理加、梅本銀河、中川真一、吉田稔、服部光治、築地仁美 Rika Uehara, Ginga Umemoto, Shinichi Nakagawa, Minoru Yoshida, Mitsuharu Hattori, Hitomi Tsuiji
2. 発表標題 長鎖ノンコーディングRNAであるGomafuの核内繫留機構におけるSF3b2の寄与の解明
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森由紀子、中尾洋介、河野孝夫、服部光治 Yukiko Mori, Yousuke Nakao, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori
2. 発表標題 分泌タンパク質リーリンの切断を担う酵素ADAMTS-3の構造解析に向けた精製及び安定化の検討
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島鼓美、荻野ひまり、鳥内皐暉、青山峰芳、服部光治
2. 発表標題 リーリンはオリゴデンドロサイト前駆細胞の数及び配置を制御する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野孝夫、服部光治
2. 発表標題 大脳皮質形成におけるリーリンの機能制御機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Ishii, Takao Kohno, Mitsuharu Hattori
2. 発表標題 Reelin regulates the positioning of late-born neurons during hippocampal development
3. 学会等名 Society for Neuroscience (SFN) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤幡雅仁、浅野裕樹、永井拓、河野孝夫、鍋島俊隆、服部光治、山田清文
2. 発表標題 成熟マウスにおけるReelinの前頭前皮質内微量投与がMK801誘発性行動障害及びcFos発現に与える影響
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大嶋智葉、中島鼓美、大石久史、服部光治 Tomoha Ohshima, Tsuzumi Nakajima, Hisashi Oishi, Mitsuharu Hattori
2. 発表標題 神経細胞におけるリン脂質フリッパーゼの機能の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 興梠 勝成, 水上 智晴, 河野 孝夫, 関 仁望, 仁子 陽輔, 服部 光治
2. 発表標題 神経細胞における特定の脂肪酸の意義
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤幡雅仁、浅野裕樹、永井拓、河野孝夫、鍋島俊隆、服部光治、山田清文
2. 発表標題 成熟マウスの前頭前皮質におけるReelin シグナルの活性化がMK801 誘発性行動障害に与える影響
3. 学会等名 第136回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石塚 拓巳、大石 久史、服部 光治
2. 発表標題 シナプス形成と可塑性におけるリーリン機能とその制御機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重信 奉文、奥川 英介、河野 孝夫、大石 久史、服部 光治
2. 発表標題 分解抵抗型リーリンノックインマウスを用いた、海馬におけるリーリン分解の生理的意義の解明
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中尾洋介、横川慧、河野孝夫、鈴木崇弘、服部光治
2. 発表標題 生物発光イメージングを用いたリーリンの分泌機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
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
---------	---------