

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16206

研究課題名(和文) 栄養不足が起因する精神疾患におけるアストロサイト脂質ラフトの役割

研究課題名(英文) The role of astrocyte lipid rafts in mental disorder induced by a lack of nutrition

研究代表者

香川 慶輝 (Kagawa, Yoshiteru)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30728887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、脳の高次機能や神経疾患と栄養摂取との関係が注目されている。中でもn-3系多価不飽和脂肪酸の摂取不足は精神疾患を誘発することが数多く報告されているが、その分子基盤は不明である。本申請では、アストロサイトに強く発現し、n-3系多価不飽和脂肪酸に親和性を持つFABP7分子に着目し、細胞外部刺激応答の開始点である脂質ラフトの機能制御との関連を検証した。その結果、1. FABP7は脂質ラフト骨格蛋白質caveolin-1の発現を制御することでアストロサイト細胞外部刺激応答を調節すること、2. FABP7-KOアストロサイト由来の液性因子の産生異常が、神経可塑性を変化させること、が判明した。

研究成果の概要(英文)：Recently, the relationship between higher brain functions and neurological disorder has been paid attention. It is reported that a lack of nutrition such as n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) induces mental disorders, but its mechanism is still unknown. In this study, we focused the fatty acid binding protein (FABP7) which is highly expressed in astrocytes and has high affinity with n-3 PUFAs. We examined whether FABP7 is involved in the functions of lipid rafts which is the main source of cellular activity in response to external stimuli. The following results have been so far obtained: 1. FABP7 controls lipid raft function through regulation of caveolin-1 expression and is involved in the response of astrocytes to the external stimuli, 2. altered production of humoral factors from FABP7-KO astrocytes induced neuroplasticity changes.

研究分野：神経科学、分子生物学

キーワード：脂肪酸結合蛋白質 FABP7 アストロサイト 脂質ラフト caveolin-1 神経可塑性

### 1. 研究開始当初の背景

近年、脳の高次機能や神経疾患と栄養摂取との関係が相次いで報告されている。その中でも特に注目されているのが、魚油に含まれるドコサヘキサエン酸 (DHA) などの n-3 系多価不飽和脂肪酸である。n-3 系脂肪酸は出生前後の脳形成期に脳組織に蓄積され、その摂取不足は認知機能の低下や異常行動などの機能異常となって現れ、統合失調症や注意欠陥・多動性障害 (ADHD) などの疾患を引き起こすことが栄養学的に知られている。しかし、多価不飽和脂肪酸は水に不溶であり、ゲノムに直接コードされない性質を持つことから機能解析が非常に難しく、脳内分子基盤については未だ不明な点が多いままである。

アストロサイトは神経細胞の支持や神経伝達物質の代謝を制御することで脳内の恒常性を維持しており、その機能変化は様々な神経変性疾患や自己免疫疾患を引き起こすことが知られている。我々はアストロサイトに強く発現し、細胞内脂質動態を制御する分子である脳型脂肪酸結合蛋白質 FABP7 に着目し、精緻な機能解析を行っており、これまでに FABP7-KO マウスやその脳から樹立した初代培養アストロサイトを用いた解析を行い、FABP7-KO マウスで脳の DHA 量が減少し、恐怖増加などの情動行動異常を示すこと (Owada et al. 2006)、FABP7 がアストロサイトの増殖に関与すること (Sharifi et al. 2011) を報告してきたがその分子機構は解明されていなかった。

### 2. 研究の目的

外部刺激の受容は細胞膜の受容体分子によって行われ、その多くは脂質ラフトと呼ばれる細胞膜ドメインに局在する。また脂質ラフト形成の有無が外部刺激への応答を大きく変化させることが分かっている。本研究ではアストロサイトの脂質ラフト機能制御における FABP7 の役割を明確にすると共に、その調節機構を解明することを目的とし以下の項目を検証した。

- (1) ①アストロサイトにおける FABP7 の脂質ラフト機能への関与
- ②FABP7 による脂質ラフト関連因子の発現調節機構の解明
- (2) アストロサイトにおける FABP7 遺伝子欠損が神経可塑性に及ぼす影響を解析

### 3. 研究の方法

FABP7-KO マウスやその脳から樹立した初代培養アストロサイトを用いた検討を行った。

(1) ①アストロサイトの外部刺激応答における FABP7 分子の影響を検討するため、LPS 刺激後のサイトカインの産生を ELISA で、細胞内シグナリング (MAPKs, NF $\kappa$ B) の活性をウエスタンブロットで検討した。さらに、シヨ糖密度勾配遠心法を行い脂質ラフト分画を抽出し、脂質ラフトへの TLR4 の集積を検討

した。

②脂質ラフト関連因子の発現における FABP7 分子の影響を検討するため、まず網羅的な遺伝子発現変化をマイクロアレイで検討した。さらに qPCR やウエスタンブロットで詳細な発現変化を確認した。さらに発現変化のあった因子に関して、転写調節領域のエピゲノム変化をバイサルファイトシーケンス法や特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降法で検討した。

(3) FABP7-KO マウスに見られる情動行動異常のメカニズムを検討するため、脳の神経細胞の形態をゴルジ染色や蛍光免疫染色により詳細に観察した。さらに、さらにアストロサイトの FABP7 欠損とニューロンの形態異常を関連付けるため、野生型マウスより初代培養ニューロンを作製し、野生型及び FABP7-KO マウスより作製した初代培養アストロサイトとそれぞれ共培養させたときのニューロンの形態を観察した。

### 4. 研究成果

(1) ①野生型に比べ、FABP7-KO アストロサイトでは LPS 刺激後の TNF- $\alpha$  の産生、MAPKs $\cdot$ NF $\kappa$ B の活性、脂質ラフトへの TLR4 の集積が低下していた。この現象が他の受容体でも生じるのかを確認するため、GDNF 添加による GFP $\alpha$ 1 の脂質ラフトへの集積も同様に検討した所、やはり FABP7-KO アストロサイトで低下していることが明らかになった。これらの結果より、FABP7 はアストロサイトの脂質ラフト機能を介した外部刺激応答を調節することが解明された。(図 1)

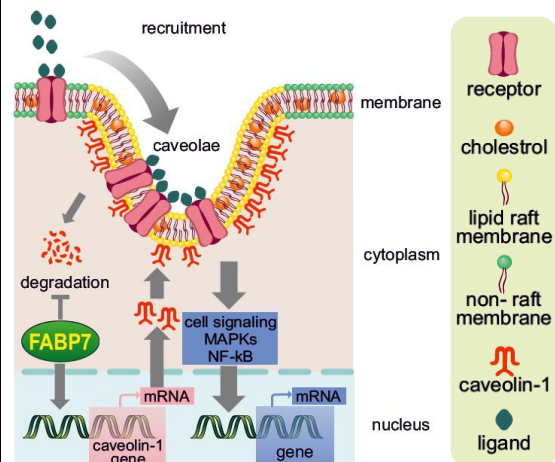


図 1. 申請者が明らかにしたアストロサイトの外部刺激応答に対する FABP7 の機能の模式図

②マイクロアレイにより脂質ラフト骨格蛋白質 caveolin-1 の発現が FABP7-KO アストロサイトで減少していることが明らかになった。そこで、FABP7 による caveolin-1 遺伝子発現の制御機構について DNA メチル化をバイサルファイトシーケンス法で、ヒストンメ

チル化・アセチル化を特異的な抗体を用いた CHIP アッセイ法で検討した結果、FABP7-KO アストロサイトでは caveolin-1 の転写調節領域における DNA のメチル化レベルが増加すること、ヒストン H3 蛋白質リジン 27 残基のアセチル化レベルが低下することが明らかになった。これらの結果より、FABP7 が調節する細胞内脂質動態がエピゲノム変化を介した caveolin-1 の発現調節に関与していることが示唆される。

(2) FABP7-KO マウス脳において情動行動を支配する内側前頭前野のニューロンを観察し、樹状突起の数とシナプスの数が減少していることを見出した。さらに、FABP7-KO アストロサイトとの共培養ニューロンでは樹状突起の数および長さ、シナプスの数に異常が見られた。また WT 及び FABP7-KO アストロサイトの培養上清を用いたニューロンの培養でも、同様の結果が得られた。以上の結果は、FABP7-KO アストロサイト由来の液性因子の産生異常が、神経可塑性を変化させることを示唆するものである。

上記 (1) (2) の結果をまとめると、FABP7 欠損により caveolin-1 の転写調節領域のエピゲノム変化が生じ、その発現が変化することでアストロサイトの脂質ラフト機能に異常が生じる。その結果、ニューロンの形態異常などの神経可塑性変化が生じ情動行動異常が引き起こされることが考えられる。本研究によりアストロサイトの脂質代謝異常に起因する精神疾患発症メカニズムの一端が明らかになった。

## 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 10 件)

①Pakkarato S, Thongseabyoun W, Tachow A, Rawangwong A, Kagawa Y, Owada Y, Kondo H, Hipkaeo W. (2016) : Ultrastructural histomeric evidence for expansion of sustentacular cell envelop in response to hypersecretion of adrenal chromaffin cells in mice. *Anat Sci Int*. Sep 15. [Epub ahead of print], 査読有

②香川慶輝、尾形雅君、Majid Ebrahimi、大和田祐二 (2016) : 脳型脂肪酸結合蛋白質によるアストロサイトの膜微小ドメイン機能制御 *Proceedings Clinical Electron Microscopy*, 査読無、34 巻、1-4 頁

③Ebrahimi M, Yamamoto Y, Sharifi K, Kida H, Kagawa Y, Yasumoto Y, Islam A, Miyazaki H, Shimamoto C, Maekawa M, Mitsushima D, Yoshikawa T, Owada Y. (2016) : Astrocyte-expressed Fabp7 regulates dendritic morphology and excitatory synaptic

function of cortical neurons. *Glia*. 査読有、Jan;64(1):48-62. doi: 10.1002/glia.22902.

④Imai H, Shoji H, Ogata M, Kagawa Y, Owada Y, Miyakawa T, Sakimura K, Terashima T, Katsuyama Y. (2016) : Dorsal forebrain-specific deficiency of Reelin-Dab1 signal causes behavioral abnormalities related to psychiatric disorders. *Cereb Cortex*. 査読有、Jan 12. pii: bhv334. [Epub ahead of print]

⑤Yasumoto Y, Miyazaki H, Vaidyan LK, Kagawa Y, Ebrahimi M, Yamamoto Y, Ogata M, Katsuyama Y, Sadahiro H, Suzuki M, Owada Y. (2016) : Inhibition of Fatty Acid Synthase Decreases Expression of Stemness Markers in Glioma Stem Cells. *PLoS One*. 査読有、Jan 25;11(1):e0147717. doi: 10.1371/journal.pone.0147717.

⑥Islam A, Kodama T, Yamamoto Y, Ebrahimi M, Miyazaki H, Yasumoto Y, Kagawa Y, Sawada T, Owada Y, Tokuda N. (2016) : Omega-3 fatty acid transport through the placenta. *Asian J. Med. Biol. Res*. 査読有、March, 2(1): 1-8. URL: <http://www.ebupress.com/journal/ajmbr/2016/05/07/review-omega-3-fatty-acids-transport-placenta>

⑦Ebrahimi M, Sharifi K, Islam A, Miyazaki H, Yasumoto Y, Kagawa Y, Yamamoto Y, Kitagawa T, Kuramitsu Y, Nakamura K, Owada Y. (2015) : Proteomic differential display analysis reveals decreased expression of PEA-15 and vimentin in FABP7-deficient astrocytes. *J Proteom Bioinform*, 査読有, 8, 9-14. doi:10.4172/jpb.1000347. URL: <https://www.omicsonline.org/open-access/proteomic-analysis-of-fabpdeficient-astrocytes-jpb.1000347.php?aid=36639>

⑧Pakkarato S, Chomphoo S, Kagawa Y, Owada Y, Mothong W, Iamsaard S, Sawatpanich T, Kondo H, Hipkaeo W. (2015) : Immunohistochemical analysis of sustentacular cells in the adrenal medulla, carotid body and sympathetic ganglion of mice using an antibody against brain-type fatty acid binding protein (B-FABP). *J Anat*. 査読有、Apr;226(4):348-53. doi: 10.1111/joa.12285.

⑨ Kagawa Y, Yasumoto Y, Sharifi K, Ebrahimi M, Islam A, Miyazaki H, Yamamoto Y, Sawada T, Kishi H, Kobayashi S, Maekawa M, Yoshikawa T, Takaki E, Nakai A, Kogo H,

Fujimoto T, Owada Y. (2015): Fatty acid-binding protein 7 regulates lipid raft formation in astrocytes through expression of caveolin-1. *Glia*. 査読有, May; 63(5):780-94. doi: 10.1002/glia.22784.

⑩ Shirao S, Yoneda H, Shinoyama M, Sugimoto K, Koizumi H, Ishihara H, Oka F, Sadahiro H, Nomura S, Fujii M, Tamechika M, Kagawa Y, Owada Y, Suzuki M. (2015) : A novel trigger for cholesterol-dependent smooth muscle contraction mediated by the sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway in the rat basilar artery: a mechanistic role for lipid rafts. *J Cereb Blood Flow Metab*. 査読有, May;35(5):835-42. doi: 10.1038/jcbfm.2014.260.

[学会発表] (計 10 件)

① 香川慶輝, Ariful Islam, 尾形雅君, 大和田祐二、細胞核内 FABP7 は caveolin-1 遺伝子発現をエピジェネティックに制御する、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017/3/28 (長崎大学、長崎)

② 尾形雅君, 香川慶輝, 安本有希, 伊藤恒敏, 大和田祐二、腸上皮細胞間リンパ球 (IEL) の抗体刺激に伴う絨毛上皮細胞の剥離機構、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017/3/28 (長崎大学、長崎)

③ Angelina Misiou, Fumika Nanto, Yoshiteru Kagawa, Takaaki Abe, Yuji Owada, Significance of FABP7 and Ndufs4 in the regulation of astrocyte mitochondrial dynamics and functions. Euro-Japan double degree program International Workshop, 2017/1/25 (京都府立医科大学, 京都)

④ 香川慶輝, Ariful Islam, 尾形雅君, 大和田祐二、核内 FABP7 はエピジェネティックな caveolin-1 の発現制御に関与する、第 39 回日本分子生物学会年会、2016/11/30 (パシフィコ横浜, 横浜市)

⑤ 香川慶輝, Ariful Islam, 尾形雅君, 大和田祐二、脂肪酸結合蛋白質 FABP7 の細胞核局在の意義—caveolin-1 遺伝子発現制御との関連—、第 62 回日本解剖学会 東北・北海道連合支部学術集会、2016/9/3 (帯広畜産大学, 帯広市)

⑥ 尾形雅君, 香川慶輝, 安本有希, 伊藤恒敏, 大和田祐二、腸上皮間リンパ球 (IEL) における自己作用型 DNA 傷害および DNA 修復、第 62 回日本解剖学会 東北・北海道連合支部学術集会、2016/9/3 (帯広畜産大学, 帯広

市)

⑦ 勝山裕、今井英明、昌子浩孝、尾形雅君、香川慶輝、崎村健司、宮川剛、大和田祐二、寺島俊雄、大脳皮質特異的 Dab1 欠損マウスは精神疾患関連行動異常を示す、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2016/3/29 (ビックパレットふくしま、福島)

⑧ 尾形雅君、勝山裕、香川慶輝、伊藤恒敏、大和田祐二、Ultimate fate of mouse small intestinal intra-epithelial lymphocytes. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016/3/29 (ビックパレットふくしま、福島)

⑨ 香川慶輝、大和田祐二、脂肪酸結合蛋白質 FABP7 の細胞内局在が caveolin-1 遺伝子発現に及ぼす影響、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016/3/30 (ビックパレットふくしま、福島)

⑩ Yoshiteru Kagawa, Yuji Owada. FABP7 is an epigenetic modulator of caveolin-1 gene expression in astrocytes. 2015/7/30 第 38 回日本神経科学大会 (神戸ポートアイランド、神戸)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.organ-anatomy.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

香川 慶輝 (KAGAWA, YOSHITERU)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30728887

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者 ( )