

令和元年6月18日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16589

研究課題名(和文)中枢神経系における脂肪滴蓄積の影響

研究課題名(英文)The effect of lipid droplet accumulation in central nervous systems

研究代表者

中島 進吾 (NAKAJIMA, Shingo)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第三部・科研費研究員

研究者番号：50750014

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)：アストロサイトにおける脂肪滴蓄積が、不飽和脂肪酸の一つであるオレイン酸によって強く引き起こされることを見出した。さらに、その蓄積にはジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼが関与し、脂肪滴蓄積により脂質毒性から保護する働きを担っていることを明らかにした。高ラード高スクロース食を摂取したラットでは、不安様行動が惹起され、血清中のリゾホスファチジルコリン濃度と強い相関があることを明らかにした。また、ラウリン酸による神経成熟作用や環状リン脂質によるグリア細胞増殖作用も明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満や糖尿病などの代謝異常は脳機能に悪影響を及ぼすが、その原因は依然として明らかとなっていない。本研究課題では、グリア細胞の一種であるアストロサイトにおいて、脂肪滴の蓄積を誘導する脂肪酸の同定および脂肪滴の役割を明らかにした。これにより、今後アルツハイマー病などの疾患の発症・進行において、この脂肪滴蓄積がどういった過程で生じるか、疾患マーカーとなり得るか、など新たな観点を提供することができる。また、飽和脂肪酸を多く含む脂肪の過剰摂取により不安が惹起されることや、それに関わる脂質分子を見出したことで、脳機能の低下に食事の質が関わることを広く社会に周知できる。

研究成果の概要(英文)：In primary cultured astrocytes, oleic acid (a mono-unsaturated fatty acid) strongly induced lipid droplet accumulation. We also found that a diacylglycerol acyltransferase mediates oleic acid-induced lipid droplet accumulation. The lipid droplet accumulation has a role to protect against lipotoxicity. High-lard/high-sucrose diet caused anxiety-like behavior in rats. Serum lysophosphatidyl choline levels were well correlated to anxiety-like behavior. In addition, we also revealed that lauric acid-induced neuronal maturation and cyclic phospholipid-induced glial proliferation.

研究分野：栄養生化学、神経科学

キーワード：アストロサイト 脂肪滴 高脂肪食 不安行動 LC-MS/MS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病や統合失調症などの精神疾患やアルツハイマー病などの神経変性疾患では、肥満や糖尿病など末梢のエネルギー代謝異常による発症リスクの増加が認められている。グリア細胞の一種であるアストロサイトは、神経伝達物質の制御や神経栄養因子産生などの働きに加え、ニューロンに多価不飽和脂肪酸やケトン体を供給するなど、中枢神経系における脂質代謝において中心的な役割を担っている。

脂肪滴はトリグリセリドなどの中性脂質やホスファチジルコリンなどのリン脂質によって構成される細胞内の脂質貯蔵形態で、アストロサイトにおいても古くから脂肪滴の存在が確認されていたが、その役割や影響は不明であった。近年、アストロサイトに脂肪滴が蓄積すると、神経変性が促進される可能性があること (Liu et al., *Cell*. 2015)、そしてアルツハイマー病では脳に脂肪滴が蓄積することが明らかになってきた (Hamilton et al., *Cell Stem Cell*. 2015)。エネルギー代謝の中心である肝臓や脂肪組織では脂肪の蓄積を抑制する薬剤や機能性食品の探索が進んでいるが、脳組織における脂肪蓄積の制御に関する知見は少ない。過剰なエネルギー摂取によって脳でも脂肪が蓄積するかどうか、その蓄積が脳機能の異常に関与するかどうかを明らかにすることは、生活習慣病に伴う精神疾患・神経変性疾患の発症や進行を防ぐためにも重要である。

脂肪酸は脂質の主要な構成分子であり、炭素鎖長や二重結合数 (不飽和度) の違いによってその性質は異なる。液体クロマトグラフ - タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) は、各種脂質クラスに付随する脂肪酸の種類まで同定することが可能であり、脂質代謝の解析からバイオマーカー探索まで幅広く用いられている。このような網羅的な脂質解析法を駆使することで、中枢神経系に及ぼす脂質の影響を詳細に明らかにし、代謝異常に伴う脳機能への悪影響を引き起こす原因の解明を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究課題ではアストロサイトにおける脂肪滴蓄積に着目し、それを誘導する脂質分子の同定、および脂肪滴の影響・役割を明らかにすることを目的とした。また、食事誘導性の代謝異常に伴う脳機能への影響を明らかにするため、異なる油脂を用いた食事誘導性肥満モデルを作製し、摂取する脂質の性質が脂肪滴形成も含めて脳機能に影響を及ぼす可能性を検証した。さらに、LC-MS/MS を用いて、これまで明らかにされていなかったアストロサイトに蓄積する脂質の構造・性質や、食事誘導性肥満に伴う血中の脂質分子の変化と脳機能への影響を探索した。

## 3. 研究の方法

(1) ICR マウスおよび Wistar ラットの脳皮質から初代培養アストロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞およびニューロンを作製した。種々の脂肪酸に対する脂肪滴蓄積は、Oil Red O 染色により評価した。

(2) 初代培養アストロサイトおよびオリゴデンドロサイト前駆細胞に種々の脂質分子を曝露し、細胞増殖や神経栄養因子の発現を解析した。

(3) アストロサイトを介したニューロンへの脂肪酸の影響を検討するため、初代培養アストロサイトとニューロンの共培養系や、アストロサイトの培養上清を用い、ニューロンのシナプス関連タンパク質発現量を解析した。

(4) 食事としての過剰な脂質摂取が脳機能に影響するかどうかを検証するため、飽和脂肪酸の豊富な高ラード高スクロース食、およびオレイン酸の豊富な高オリーブオイル高スクロース食を作製し、肥満や行動 (不安行動や社会性など) に及ぼす影響を検証した。

(5) LC-MS/MS を用いて、各種初代培養細胞やラット血液中の脂質分子を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) オレイン酸が脂肪滴蓄積を強く誘導する

炭素鎖長や不飽和度の異なる種々の脂肪酸の中で、オレイン酸がアストロサイトにおける脂肪滴蓄積を最も誘導した。オレイン酸による脂肪滴形成過程におけるトリグリセリドの脂質分子種を LC-MS/MS により解析したところ、オレイン酸を組み込んだトリグリセリドが多く増加していた。その他の脂肪酸による脂質分子種の変化を調べたところ、細胞外の脂肪酸の影響を大きく受けていることが明らかとなった。ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ阻害剤存在下ではオレイン酸による脂肪滴形成が消失したことから、オレイン酸による脂肪滴形成にはこの酵素の関与が大きいことが明らかとなった。ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼの阻害によって、オレイン酸曝露時の細胞生存率が低下したことから、アストロサイトにおける脂肪滴形成は脂質毒性を低下させる役割を担っていることが予想された。

### (2) 飽和脂肪酸を多く含んだ高脂肪高スクロース食で不安様行動が増加する

一般的な食事誘導性肥満モデルで用いられる動物性脂肪 (ラード) に加え、オレイン酸がア

astrocyteにおける脂肪滴形成を強く誘導したことから、オリーブオイルを多く含んだ高脂肪高スクロース食を作製し、ラットの行動に対する影響を比較・検討した。どちらの高脂肪高スクロース食も顕著な体重増加や脂肪重量増加を引き起こしたが、オープンフィールド試験における不安様行動や社会性相互作用試験における接触時間の低下は高ラード高スクロース食でのみ観察された。これらの結果は肥満ではなく、飽和脂肪酸の過剰摂取が脳機能に影響を及ぼす可能性を示唆している。さらに、LC-MS/MSを用いて血清中の脂質分子種を測定し、不安行動との相関を解析したところ、リゾホスファチジルコリンのいくつかの分子種に強い相関が認められた。

以上のように、オレイン酸はastrocyteにおける脂肪滴蓄積を誘導する脂肪酸であることが明らかとなった。しかしながら、オレイン酸の過剰摂取では動物の行動に影響が見られなかったことから、脳内に蓄積する脂肪滴は末梢の脂質代謝とは独立した現象であることが予想された。その一方で、食事として摂取する脂質の性質が脳機能に大きく影響することが示され、特に飽和脂肪酸の過剰摂取に伴うリゾホスファチジルコリンの低下が不安様行動に寄与するなど、今後の研究の進展につながる重要な知見を得た。

本研究計画の、主題となる脂肪滴蓄積とastrocyteの関わりを調べていく中で、その他の脂肪酸やリン脂質が神経機能の働きを調節することを見出した。

#### (3) ラウリン酸はシナプス成熟を促進する

各種脂肪酸類による神経栄養因子やサイトカイン発現への影響を比較したところ、ラウリン酸によってastrocyteにおけるグリア由来神経栄養因子 (Glial derived neurotrophic factor: GDNF)、Interleukin-6 (IL6)、および C-C motif chemokine 2 (CCL2) の遺伝子発現が強く誘導された。これらがニューロンの成熟に寄与することから、astrocyte-ニューロンの共培養系およびニューロン単独培養系においてラウリン酸を曝露したところ、astrocyte共存下においてのみシナプス関連タンパク質の増加が確認された。さらに、ラウリン酸に曝露したastrocyteの培養上清でニューロンを単独で培養すると、共培養系と同様にシナプス関連タンパク質の増加が認められた。

#### (4) オレイン酸含有環状リン脂質によるリゾホスファチジン酸受容体を介したグリア細胞増殖誘導作用

環状ホスファチジン酸のカルバ変換体であり、その構造中にオレイン酸を含有する 2-O-carba-oleoyl-cyclic phosphatidic acid (2ccPA 18:1) によって、astrocyteおよびオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖が認められた。これらの増殖には、リゾホスファチジン酸受容体を介していることが阻害剤を用いた試験によって確かめられ、細胞内シグナル伝達機構として extracellular-signal regulated kinase (ERK) および pAkt 経路を介していることが明らかとなった (Nakajima et al., *Brain Research*. 2018)。

以上のように脂質を構成する脂肪酸の種類やリン脂質などの脂質クラスの違いによって、中枢神経系に及ぼす影響は異なることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計2件)

Fukasawa K, Nakajima S, Gotoh M, Tanaka S, Murofushi H, Murakami-Murofushi K. Qualitative and quantitative comparison of cyclic phosphatidic acid and its related lipid species in rat serum using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2018, 1567, 177-184.

Nakajima S, Gotoh M, Fukasawa K, Murofushi H, Murakami-Murofushi K. 2-O-carba-oleoyl cyclic phosphatidic acid induces glial proliferation through the activation of lysophosphatidic acid receptor. *Brain Res*. 2018, 1681, 44-51.

### [学会発表](計3件)

中島 進吾、功刀 浩「ラウリン酸はastrocyteを介してシナプス成熟を促進する」第73回日本栄養・食糧学会大会、2J-13p、2019年、5月18日 静岡県立大学(静岡)

中島 進吾、後藤 真里、深澤 桂子、室伏 きみ子「初代培養astrocyteにおける脂肪滴蓄積の影響」第71回日本栄養・食糧学会大会、3A-B22、2017年、5月21日 沖縄コンベンションセンター(那覇)

中島 進吾、後藤 真里、深澤 桂子、室伏 擴、諸星 俊郎、室伏 きみ子「初代培養グリア細胞における 2ccPA の効果」日本農芸化学学会大会、3A02p08、2017年、3月19日 京都女子大学(京都)

〔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〕

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。