

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07098

研究課題名(和文) 神経保護作用を持つ生理活性脂質の新規メカニズムの解明：脳血管障害治療への応用

研究課題名(英文) A novel mechanism of bioactive lipids with neuroprotective effects: application for treatment of cerebrovascular disease

研究代表者

後藤 真里 (GOTOH, Mari)

帝京大学・医療技術学部・准教授

研究者番号：80467050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管障害は認知障害などの後遺症をもたらし、患者のQOLを著しく低下させる。虚血により生じる認知機能障害は海馬CA1領域の遅発性神経細胞死に密接に関連しており、血管性認知症の治療・予防には、この細胞死への対処が必要不可欠である。環状ホスファチジン酸は、脳に多く存在する生理活性脂質であり、神経系で重要な役割を示すことが明らかにされてきた。本研究においては環状ホスファチジン酸の誘導体を用いてミクログリアやアストロサイトに対する作用について解析を行った。その結果、環状ホスファチジン酸はミクログリアの炎症を抑制し、アストロサイトのテネイシンCの発現を上昇させ、神経細胞死を減少させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳血管障害における環状ホスファチジン酸による神経細胞死抑制、炎症抑制の作用機序は解明されていなかった。本研究では、環状ホスファチジン酸の未知受容体同定、ミクログリア、アストロサイトへの作用解明、代謝物の同定を行った。神経細胞死や炎症を抑制する責任分子の同定することができ、脳血管障害の制御機構の理解につながった。

研究成果の概要(英文)：Cerebrovascular disease causes sequelae such as cognitive impairment, and significantly reduces the patient's QOL. Cognitive dysfunction caused by ischemia is related to delayed neuronal cell death in the hippocampal CA1 region. To suppress neuronal cell death is essential for the treatment and prevention of vascular dementia. Cyclic phosphatidic acid is abundant bioactive lipid in the brain and have been shown to play important roles in the nervous system. In this study, we analyzed the effects of cyclic phosphatidic acid derivatives, 2ccPA, on microglia and astrocytes. We found that cyclic phosphatidic acid suppressed microglial inflammation, and suppressed neuronal cell death by increasing astrocyte tenascin-C expression.

研究分野：脂質生化学

キーワード：環状ホスファチジン酸 脳血管障害 ミクログリア アストロサイト 神経細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞を主体とする脳血管障害は、我が国の死因第 4 位であり認知障害などの後遺症は患者の QOL を著しく低下させる要因の一つである。虚血により生じる認知障害は海馬 CA1 領域の遅発性神経細胞死に密接に関与しており、血管性認知症の治療・予防には、この細胞死への対処が必要不可欠である。環状ホスファチジン酸(cyclic phosphatidic acid, cPA)は、脳に多く存在する生理活性脂質であり、神経系で重要な役割を示すことが明らかにされてきた。特に海馬における神経突起伸長の促進と分化の誘導(Fujiwara Y. et al., J Neurochem. 2003)、一過性脳虚血処理による海馬 CA1 領域の遅発性神経細胞死の抑制(Gotoh M. et al., Eur. J. Pharm. 2010)は、cPA が神経ネットワーク形成に重要な因子であり、脳血管障害にも密接な関わりを持つことを強く示す。さらに我々は、外傷性脳損傷のモデルとして穿刺脳損傷における炎症や修復に対する cPA の効果を調べ、cPA はミクログリアの活性化と炎症性サイトカインの産生を抑制し、損傷修復を促進するということを明らかにした(Hashimoto K. et al., Sci. Rep. 2018)。

cPA は、構造類似体のリゾホスファチジン酸(lysophosphatidic acid, LPA)をリガンドとする膜受容体(LPA 受容体は現在までに 6 種類報告されている)に作用することがわかっている。しかし、脳血管障害における cPA による細胞死抑制、炎症抑制の詳細な作用機序は、既知の cPA が作用する受容体のシグナル経路では説明がつかず、未だ解明されていない。cPA は LPA と LPA 受容体を共有するが、LPA の生理作用とは対照的な cPA 特有の作用を示す場合がある。これらの事象から我々は、『脳には cPA の標的タンパク質が存在し、特有の作用を誘導しているのではないか』と考えた。

2. 研究の目的

本研究では、cPA 特異的に結合する脳由来のタンパク質を単離・同定し、cPA の脳血管障害抑制のシグナル経路及び cPA 標的タンパク質の機能を明らかにすること、cPA のミクログリア、アストロサイトへの生理活性解明、2ccPA の薬物動態についても解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

cPA 結合型磁性粒子の調製

cPA の環状リン酸基は、活性に重要な構造であると考えられているが、ホスファターゼ分解を受けやすいと考えられる、本研究では代謝に安定な誘導体 2carba-cPA(2ccPA)を磁性微粒子に固定する。

アジド基とアルキン基のクリック反応を利用して、磁性粒子に 2ccPA を固定し、この 2ccPA 固定化ビーズを用いてアフィニティー精製を進める。使用する磁性粒子(FG ビーズ)は、分散・可動性に優れ、単位面積あたりの表面積が大きく、多くのリガンドが固定できる。

ミクログリア細胞溶解液からタンパク質画分を調製し、アフィニティー精製により 2ccPA 特異的に結合するタンパク質の単離・精製を進める。アフィニティー精製により得られた 2ccPA 特異的結合タンパク質を電気泳動法で分離し、特異的スポットに含まれるタンパク質のアミノ酸配列を解析し、タンパク質を同定する。2ccPA との特異性は、競合阻害試験や Pull-down assay で検証する。

外傷性脳損傷モデルを用いて 2ccPA のアストロサイトへの作用解明を行う。

培養したアストロサイトに 2ccPA を添加し、馴化培地を作成する。馴化培地のミクログリアへの影響、神経細胞への影響について解析する。

2ccPA の薬理学的基礎研究として、体内動態と代謝産物について解析を行う。

2ccPA を腹腔内投与、経口投与し、経時的に血液を回収し、血液中に含まれる 2ccPA、LPA の量、2ccPA によって阻害される ATX の活性について測定する。

4. 研究成果

2ccPA の外傷性脳損傷モデルにおける神経保護的作用について作用機序解明を進めた結果、2ccPA はミクログリアの炎症を抑制することで神経保護作用を示す可能性が示された(Hashimoto K. et al., Sci. Rep. 2018)。そこで、本研究では 2ccPA 固定化磁性微粒子をミクログリア細胞溶解液と混合し、2ccPA 固定化磁性微粒子に特異的に結合するタンパク質を単離した。単離したタンパク質のアミノ酸配列を決定し、2ccPA の標的タンパク質は Adenine nucleotide translocase 2(ANT2)であることを同定した。さらに、2ccPA が標的タンパク質 ANT2 と相互作用することにより強酸化剤が引き起こすミクログリアのアポトーシスを抑制することを明らかにした(Tsukahara T. et al., Cell. Signal. 2021)。

2ccPA がミクログリアの炎症を抑制することは示されていたが、アストロサイトへの作用につ

いては不明であった。そこで本研究では 2ccPA のアストロサイトへの影響について解析を行った。その結果、2ccPA はアストロサイトのテネイシン C 分泌を促し、テネイシン C が神経細胞の生存率を向上させることがわかった(Nakashima M. et al., J. Neuroimmunol. 2021)。また、2ccPA のミクログリアの炎症抑制作用機序として 2ccPA がアストロサイトに対し、ミクログリアを抗炎症に分化させるためのシグナル分子の分泌を促していることを明らかにした。(Takei R. et al., Neurosci. Lett. 2023)

2ccPA の薬物動態について解析を行った。2ccPA をマウスに腹腔内投与したところ血中の半減期は 16 分であること、投与後 20 分以内に脳内に達することを明らかにした(Shimizu Y. et al., Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2020)。さらに、2ccPA の経口投与法を開発するために、2ccPA の様々な pH 溶液中における安定性を調べ、2ccPA は酸性溶液中で直ちに分解されることを明らかにした。そのため、2ccPA を経口投与する場合、胃酸での分解を防ぐため、2ccPA を腸溶化カプセルに封入することとした。ラットに 2ccPA 含有腸溶化カプセルを経口投与し、血液中の 2ccPA の量を経時的に測定した。2ccPA は約 2 時間後に血液中で検出され、その後も 10 時間以上にわたり血液中から検出可能であった(Shimizu Y. et al., Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2020)。2ccPA には LPA 合成酵素 ATX の酵素活性を抑制する作用があるが、経口投与され、血液中に移行した 2ccPA は血液中の LPA 量を減少させた。

酸性条件下における 2ccPA 分解産物の同定を TOF-MS を用いて行った。その結果 2ccPA は加水分解されることを明らかにした。2ccPA 加水分解物を 2carbaLPA とした。2ccPA は生体内でも 2carbaLPA となることが考えられたため、2ccPA 投与後の血液中に 2carbaLPA が存在するかを調べた。結果、2carbaLPA は血液中に存在することがわかった。さらに 2carbaLPA の機能として、ATX 活性を阻害し、LPA 受容体を活性化することが示された。これらの結果は、2ccPA が体内で 2carbaLPA に代謝され、生理活性を持つ可能性を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Ishikawa Masaki, Konno Ryo, Nakajima Daisuke, Gotoh Mari, Fukasawa Keiko, Sato Hironori, Nakamura Ren, Ohara Osamu, Kawashima Yusuke	4. 巻 21
2. 論文標題 Optimization of Ultrafast Proteomics Using an LC-Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer with Data-Independent Acquisition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 2085 ~ 2093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.2c00121	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 Gotoh Mari, Miyamoto Yasunori, Ikeshima-Kataoka Hiroko	4. 巻 24
2. 論文標題 Astrocytic Neuroimmunological Roles Interacting with Microglial Cells in Neurodegenerative Diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1599 ~ 1599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24021599	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 Takei Rino, Nakashima Mari, Gotoh Mari, Endo Masaki, Hashimoto Kei, Miyamoto Yasunori, Murakami-Murofushi Kimiko	4. 巻 797
2. 論文標題 2-carba-cyclic phosphatidic acid modulates astrocyte-to-microglia communication and influences microglial polarization towards an anti-inflammatory phenotype	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 137063 ~ 137063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2023.137063	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 Nagata Wataru, Koizumi Akiho, Nakagawa Keiichi, Takahashi Sayaka, Gotoh Mari, Satoh Yasushi, Ishizuka Toshiaki	4. 巻 212
2. 論文標題 Treatment with lysophosphatidic acid prevents microglial activation and depression-like behaviours in a murine model of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 81 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cei/uxad010	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 Nakashima Mari, Gotoh Mari, Hashimoto Kei, Endo Misaki, Murakami-Murofushi Kimiko, Ikeshima-Kataoka Hiroko, Miyamoto Yasunori	4. 巻 361
2. 論文標題 The neuroprotective function of 2-carba-cyclic phosphatidic acid: Implications for tenascin-C via astrocytes in traumatic brain injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 577749 ~ 577749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2021.577749	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 Fukasawa Keiko, Gotoh Mari, Uwamizu Akiharu, Hirokawa Takatsugu, Ishikawa Masaki, Shimizu Yoshibumi, Yamamoto Shinji, Iwasa Kensuke, Yoshikawa Keisuke, Aoki Junken, Murakami-Murofushi Kimiko	4. 巻 11
2. 論文標題 2-Carba-lysophosphatidic acid is a novel -lysophosphatidic acid analogue with high potential for lysophosphatidic acid receptor activation and autotaxin inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96931-2	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 Tsukahara Tamotsu, Sahara Yasuka, Ribeiro Nigel, Tsukahara Ryoko, Gotoh Mari, Sakamoto Satoshi, Handa Hiroshi, Murakami-Murofushi Kimiko	4. 巻 82
2. 論文標題 Adenine nucleotide translocase 2, a putative target protein for 2-carba cyclic phosphatidic acid in microglial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 109951 ~ 109951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2021.109951	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 該当する

1. 著者名 Hashimoto Kei, Yamashita Kimiko, Enoyoshi Kanako, Dahan Xavier, Takeuchi Tatsu, Kori Hiroshi, Gotoh Mari	4. 巻 46
2. 論文標題 The effects of coating culture dishes with collagen on fibroblast cell shape and swirling pattern formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Physics	6. 最初と最後の頁 351 ~ 369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10867-020-09556-3	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 該当する

1. 著者名 Shimizu Yoshibumi, Fukasawa Keiko, Yamamoto Shinji, Shibaike Yuki, Tsukahara Ryoko, Ishikawa Masaki, Iwasa Kensuke, Yoshikawa Keisuke, Gotoh Mari, Murakami-Murofushi Kimiko	4. 巻 150
2. 論文標題 Evaluation of the pharmacokinetics of 2-carba-cyclic phosphatidic acid by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Prostaglandins & Other Lipid Mediators	6. 最初と最後の頁 106450 ~ 106450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prostaglandins.2020.106450	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 Nakajima Shingo, Gotoh Mari, Fukasawa Keiko, Murakami-Murofushi Kimiko, Kunugi Hiroshi	4. 巻 1725
2. 論文標題 Oleic acid is a potent inducer for lipid droplet accumulation through its esterification to glycerol by diacylglycerol acyltransferase in primary cortical astrocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 146484 ~ 146484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2019.146484	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 Shibaike Yuki, Gotoh Mari, Ogawa Chinatsu, Nakajima Shingo, Yoshikawa Keisuke, Kobayashi Tetsuyuki, Murakami-Murofushi Kimiko	4. 巻 19
2. 論文標題 2-Carba cyclic phosphatidic acid inhibits lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production in a human macrophage cell line	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100668 ~ 100668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2019.100668	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 Nakajima Shingo, Fukasawa Keiko, Gotoh Mari, Murakami-Murofushi Kimiko, Kunugi Hiroshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Saturated fatty acid is a principal cause of anxiety-like behavior in diet-induced obese rats in relation to serum lysophosphatidyl choline level	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Obesity	6. 最初と最後の頁 727 ~ 738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41366-019-0468-z	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 藤井愛、後藤真里、片桐沙紀、内海優里、宮本泰則、橋本恵
2. 発表標題 老化促進モデルマウス SAMP8 における認知機能発現機構
3. 学会等名 第32回神経行動薬理若手研究者の集い
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深澤桂子、田中誠也、三宅亮介、石川将己、後藤真里
2. 発表標題 オートタキシンによるリゾホスファチジルコリンからの 型リゾホスファチジン酸生合成経路の解明
3. 学会等名 第64回日本脂質生化学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keiko FUKASAWA, Mari GOTOH, Akiharu UWAMIZU, Takatsugu HIROKAWA, Masaki ISHIKAWA, Yoshibumi SHIMIZU, Shinji YAMAMOTO, Kensuke IWASA, Keisuke YOSHIKAWA, Junken AOKI, Kimiko MURAKAMI-MUROFUSHI
2. 発表標題 Biosynthesis of -lysophosphatidic acid from cyclic phosphatidic acid by autotaxin, and bioactivity of a novel - lysophosphatidic acid analogue, 2-carba-lysophosphatidic acid
3. 学会等名 The Lysophospholipid and Related Mediators Conference: From Bench to Clinic (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mari NAKASHIMA, Kei HASHIMOTO, Ayana HAMANO, Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Mari GOTOH, Kimiko MURAKAMI-MUROFUSHI, Yasunori MIYAMOTO
2. 発表標題 2-carba-cyclic phosphatidic acid contributes to the neuroprotection via astrocytes in traumatic brain injury
3. 学会等名 第63回 日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Misaki ENDO, Mari NAKASHIMA, Hiroko IKESHIMA-KATAOKA, Mari GOTOH, Kimiko MURAKAMI-MUROFUSHI, Yasunori MIYAMOTO
2. 発表標題 穿刺脳損傷の修復における環状ホスファチジン酸誘導体2ccPAの効果/The effect of cyclic phosphatidic acid derivative 2-carba-cPA on repair of brain stab wound
3. 学会等名 第63回 日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mari Nakashima, Kei Hashimoto, Ayana Hamano, Hiroko Ikeshima-Kataoka, Mari Gotoh, Kimiko Murakami-Murofushi, Yasunori Miyamoto
2. 発表標題 2-carba cyclic phosphatidic acid contributes to the neuroprotection in stab-wounded cerebral cortex via regulation of astrocytes
3. 学会等名 ASCB (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島麻里, 橋本恵, 濱野文菜, 池島(片岡)宏子, 後藤真里, 室伏きみ子, 宮本泰則
2. 発表標題 2-carba cyclic phosphatidic acid suppresses the activation of astrocytes in the stab-wounded mouse cerebral cortex
3. 学会等名 第62回 日本神経化学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島麻里, 橋本恵, 濱野文菜, 池島(片岡)宏子, 後藤真里, 室伏きみ子, 宮本泰則
2. 発表標題 マウス大脳皮質穿刺損傷時のアストロサイトにおける2ccPA のテネイシンC 発現への効果
3. 学会等名 第6回Matricell フォーラム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 カルバリソホスファチジン酸	発明者 室伏きみ子, 後藤真里, 深澤桂子, 青木淳賢	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-211367	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

ヒューマンライフサイエンス研究所 http://www-w.cf.ocha.ac.jp/ihli/news_20210902/

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
研究分担者	宮本 泰則 (Miyamoto Yasunori) (50272737)	お茶の水女子大学・ヒューマンライフイノベーション研究所・教授 (12611)	
研究分担者	毛内 拡 (Monai Hiromu) (90708413)	お茶の水女子大学・基幹研究院・助教 (12611)	

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
---------	---------