

機関番号：36102

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2008～2010

課題番号：20500347

研究課題名（和文） グリア細胞における脂質代謝が仲介する脳病変制御および修復機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of regulatory and repair mechanisms of brain lesion mediated by lipid metabolism in glial cells.

研究代表者

宋 時栄（ Song Si-Young ）

徳島文理大学・神経科学研究所・教授

研究者番号：00399693

研究成果の概要（和文）：

脳神経系でグリア細胞や神経細胞で発現している 3 種類の脂質代謝関連酵素、lipidosin、lanosterol 14 α -demethylase、stearoyl-CoA desaturase の実験的脱髄、脳虚血、神経変性疾患モデル動物での発現変化を調べ、これらの酵素が髄鞘再生過程や、脳虚血後の損傷修復過程あるいは神経変性疾患の初期応答など、様々な脳病変の進行の制御や病変からの修復に関与していることを示唆する所見を得た。

研究成果の概要（英文）：

Examined the expression changes of three kinds of lipid metabolism-related enzymes, lipidosin, lanosterol 14 α -demethylase, and stearoyl-CoA desaturase, which are expressed in glial and neuronal cells in the nervous system, in the animal model of experimental demyelination, ischemia and neurodegeneration. Obtained findings that suggest involvements of these enzymes in the regulation of the development of brain lesions and the recovery processes from them such as remyelination, recovery from brain ischemia and early responses in neurodegeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 21 年度	900,000	270,000	1,170,000
平成 22 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科、細目：神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

Alzheimer 病において APO ϵ 4 がリスクファクターとなっていることから、脳のコレステロール代謝が Alzheimer 病の中核となる病変にどのように関わっているかが注目を集めている。またヒト型 APOE knock-in マウスでの虚血実験においても、APO ϵ 4 knock-in マウスでは他の isotype の knock-in マウスに比べて病変の広がりが大きく、アストロサイトの反応性も増強しているという報告（J Cerebr Blood Flow Metab 24: 646-656, 2004）か

ら示唆されるように、ApoE 蛋白を発現しているアストロサイトやミクログリアでの脂質代謝が脳病変の成立過程で中心的役割を占める、あるいは中核となる病態や治癒過程での修飾因子として作用している可能性は高い。またこうした病理学的現象のみならず、アストロサイトから分泌されるコレステロールが、シナプス形成を促進する（Science 294: 1354-1357, 2001）という報告に見られるように、グリア細胞におけるコレステロール、脂肪酸代謝の神経細胞の生理機能への関与

が考えられている。しかしながら、脳における脂質代謝は、肝臓など末梢臓器におけるものとはかなり様相を異にし、未解明の点が多いことなどが原因となっており、その神経疾患の病態における意義や、脂質代謝を介するグリア細胞と他の神経系の構成細胞との cross talk の実態は未解明の点が多い。こうした点を解明し、神経疾患の新しい治療戦略を探ることは、高齢化社会を迎え、Alzheimer 病に代表されるような加齢に伴う疾患や、多発性硬化症に代表されるような神経難病が大きな問題となっている現状において意義が深いと思われた。

2. 研究の目的

以下の3つの脂質代謝関連酵素について、神経系の様々な病変における機能的意義を検討し、神経疾患の新しい治療戦略を探索する。

- (1) アシル CoA 合成酵素 lipidosin
- (2) ステロール合成酵素 Lanosterol 14- α Demethylase (LDM,CYP51)
- (3) 一価不飽和脂肪酸合成酵素 Stearoyl-CoA desaturase(SCD)

3. 研究の方法

- (1) それぞれの酵素の特異的抗体を用いた免疫組織化学的検索によって、発現細胞を同定し、様々な脳病変における発現変化を検討する。
- (2) それぞれの酵素の特異的抗体を用いた Western blot 分析によって、発生過程や様々な脳病変における発現変化を検討する。
- (3) 様々な脳病変として以下のような病態モデル動物を用いる。
 - 1) cuprizone 添加飼料投与による脱髄誘発後の髄鞘再生モデルマウス
 - 2) スナネズミの片側総頸動脈の一時的クリッピングによる脳虚血モデル

また lipidosin の機能解析には lipidosin 遺伝子 KO マウスを用いた。

4. 研究成果

- (1) マウスに髄鞘を形成するオリゴデンドログリアに対する障害作用を持つ cuprizone 添加飼料の投与によって脱髄を誘発した後、正常飼料を投与すると髄鞘再生が起こる。正常対照動物と、新規のアシル CoA 合成酵素 lipidosin 遺伝子 KO マウスを用いて、こうした過程を組織学的に検討した結果、lipidosin 遺伝子 KO マウスでは、対照動物に比べて髄鞘再生の遅延傾向を示すことがわかった (図 1)。これらの所見は、lipidosin が髄鞘再生過程での脂質代謝に関与することを示唆している。

また lipidosin 遺伝子 KO マウスで見られ

た脱髄部には、副腎白質ジストロフィー症の副腎で認められるようなコレステロール結晶と類似の沈着物が認められた (図 2)。ショウジョウバエでの lipidosin ホモログである *bubblegum* ミュータントは、神経系の変性、超長鎖脂肪酸の蓄積などのヒトの副腎白質ジストロフィー類似の所見を示すことから、lipidosin の副腎白質ジストロフィーへの関与が注目されている。副腎白質ジストロフィーの原因である ALD 遺伝子 KO マウスでは、副腎白質ジストロフィーの病理学的所見が再現しないことから、ALD 遺伝子以外の要因が病態を修飾する因子として関与しているのではないかとの考えがあるが、lipidosin が仲介する脂質代謝は、そうした修飾因子の候補である可能性がある。

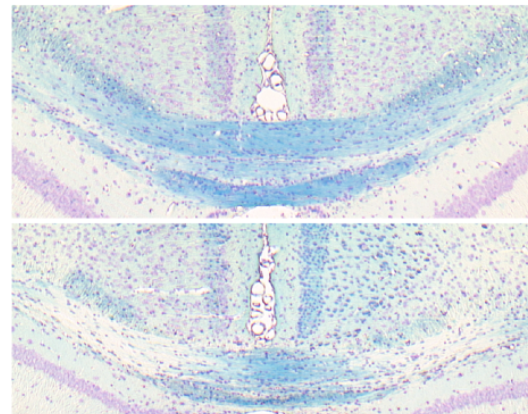


図 1 0.3% cuprizone 添加飼料を 32 日間、0.45% cuprizone 添加飼料を 56 日間投与の 28 日後の野生型 (上段) および lipidosin KO マウス (下段) の脳梁、背側海馬交連。Lipidosin KO マウスでは強い脱髄が見られる。

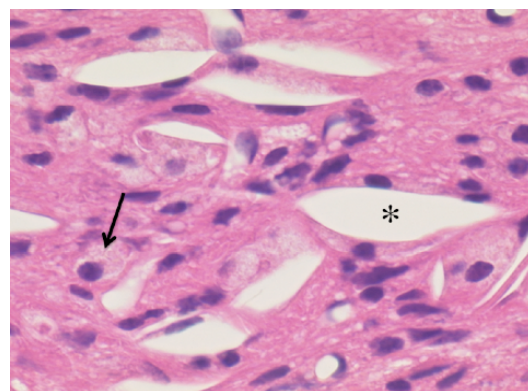


図 2 Lipidosin KO マウス脱髄部に認められたコレステロール結晶と類似の沈着物 (* 標本作製過程で沈着した脂質が抜けて白く見える)。その周囲には多数の、脂質を貪食して腫大したマクロファージ (矢印) の浸潤が認められる。

(2) ステロール合成経路に必須の lanosterol 14

α -demethylase(LDM)に対する特異的抗体を用いた免疫組織化学的検索の結果、LDM 免疫活性は髄鞘に局在し (図 3)、出生直後の発現は弱く、生後 2-3 週まで次第に増加した後、減少した。Laser capture microdissection によって切り出した大脳白質から抽出した蛋白の Western blot でもこの所見と相関する発現変化が認められた。また cuprizone 誘発脱髄後の髄鞘再生モデルマウス脳では、control に比べて脱髄時に 2 倍程度、髄鞘再生時に 3 倍程度の発現増大が観察された (図 4)。

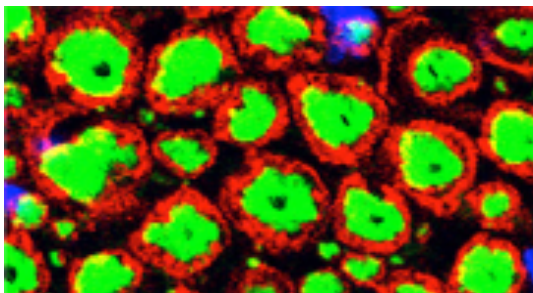


図 3 軸索 (抗 neurofilament 抗体で免疫染色し、緑色蛍光を示す) 周囲の髄鞘に認められた抗 LDM 抗体の免疫活性 (赤色蛍光)。

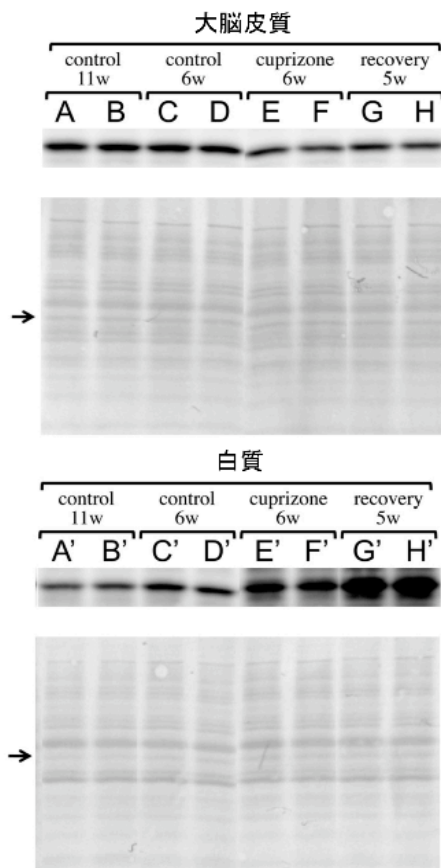


図 4 ICR マウスに 0.45% cuprizone 添加飼料

を 6 週間投与して脱髄を誘発した後、正常飼料を 5 週間投与して髄鞘を再生させ、それぞれの時点で大脳皮質、白質を laser capture microdissection によって切り出し、LDM の発現を Western blot で確認した。対照としては正常飼料を 1 週間投与したマウスを用いた。大脳皮質 (上段) では有意の変化は認められないが、白質 (下段) では脱髄誘発時から LDM 発現の増大が認められ、髄鞘再生時には一層の増大が認められる。それぞれの図の下図は各レーンに載せた蛋白量が同じであることを示すためにフィルターをエチジウムブロマイドで染色したもの。矢印は LDM の位置を示す。

(3) 神経細胞とグリア細胞から成る aggregate culture において LDM の発現を免疫細胞化学的解析によって検討した結果、LDM 免疫活性は主に、軸索とは無関係に四方へ突起を伸展したオリゴデンドログリアと、進展した軸索を覆う様なものの二種類が確認され、培養日数が経つごとに後者の割合が増加した。また、LDM 活性の大部分が myelin basic protein (MBP) や 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) の免疫活性と共存しており、培養系でも、*in vivo* とほぼ見合った時間経過でオリゴデンドログリアの突起の伸展と髄鞘形成が起こり、LDM の強い発現との相関関係が確認された。

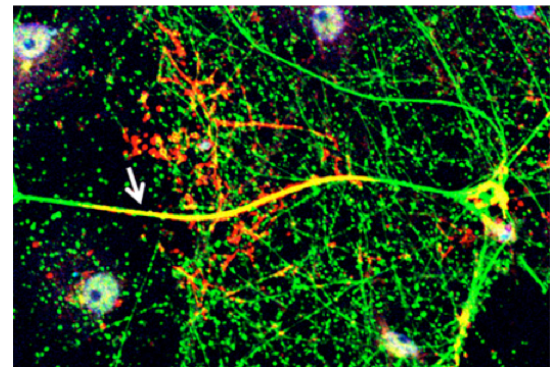


図 5 新生ラットから調整した aggregate culture の培養開始 22 日目の状態。緑色蛍光は軸索の抗 neurofilament 抗体による免疫活性、赤色蛍光は抗 LDM 抗体の免疫活性を示す。軸索周囲に髄鞘が形成されつつある様子を示す。

(2)、(3)の結果は、LDM と髄鞘形成および再生の関わりを示唆しており、多発性硬化症のような脱髄性疾患の新たな治療法につながる可能性を秘めている。

(4)ステアリン酸やパルミチン酸などの飽和

脂肪酸からオレイン酸やパルミトレイン酸などの一価不飽和脂肪酸の生成に関わる酵素 stearoyl-CoA desaturase (SCD) には isoform の存在が知られており、マウスでは SCD1 - 4 の 4 種類が同定されているが、RT-PCR によって脳では SCD1、2 が発現していた。免疫細胞化学的解析の結果、SCD 免疫活性は神経細胞、オリゴデンドログリア、アストロサイトに発現していることを確認した。cuprizone 誘発脱髄後の髄鞘再生モデルマウスや総頸動脈の一時的クリッピングによって虚血負荷を加えたスナネズミの白質では SCD 免疫活性の増大が認められ、SCD は多様な脳への傷害刺激に対する応答に関与していることが示唆され、その意義を検討している。

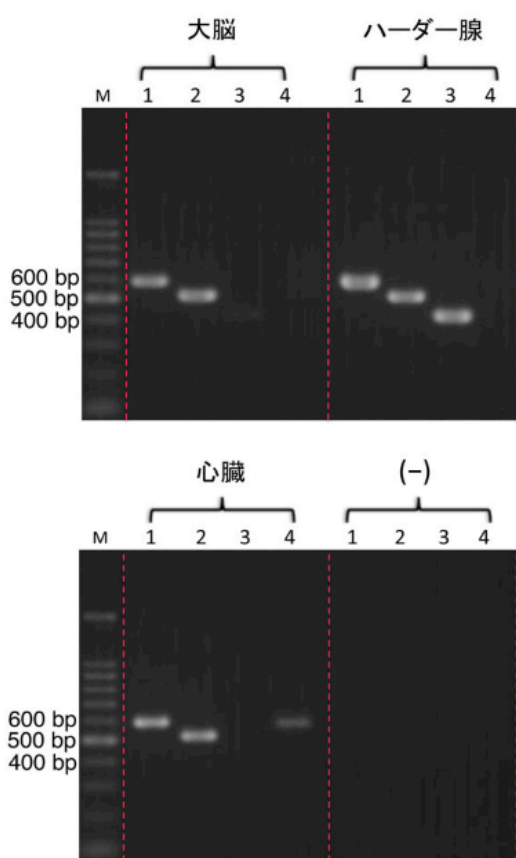


図6 RT-PCRによる大脳でのSCD1、2の発現確認。ハーダー腺はSCD3の、心臓はSCD4ポジティブコントロールとして用いた。(-)はRNAを含まないネガティブコントロール、Mは100bp DNA ラダーを示す。
 レーン1: SCD1 (584 bp)、
 レーン2: SCD2 (515 bp)、
 レーン3: SCD3 (421 bp)、
 レーン4: SCD4 (562 bp)

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)
 2 報投稿中

[学会発表] (計 4 件)

- ①Okazaki M., Nakashima K., Fujii Y, Kato C., Song S.-Y Expression of Lanosterol 14- α Demethylase in the brain and its changes during myelination and remyelination. 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月8-12日、横浜.
- ②Fujii Y Nakashima K., Okazaki M., Chieko Kato., Song S.-Y Expression of Stearoyl-CoA desaturase isoforms in the brain and their changes during the processes of experimental demyelination and remyelination. 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月8-12日、横浜.
- ③Song S.-Y Okazaki M., Fujii Y Kato C., Nakashima K. Expression of lanosterol 14- α demethylase in the nervous system and its changes in the process of myelination and remyelination. 7th Forum of European Neuroscience. July 3-7, 2010, Amsterdam, the Netherlands.
- ④Nakashima K., Fujii Y Okazaki M., Kato C., Song S.-Y. Expression of stearoyl-CoA desaturase isoforms in the brain and their changes in neuronal and glial cells during various kinds of brain injury 第33回日本神経科学大会、2010年9月2-4日、神戸.

[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]

ホームページ等

<http://kp.bunri-u.ac.jp/laboratory/neuroscience.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宋 時榮 (SONG SI-YOUNG)

徳島文理大学 神経科学研究所・教授

研究者番号：00399693

(2)研究分担者

橋本有弘 (HASHIMOTO NAOHIRO)

国立長寿医療研究センター 研究所

再生再建医学研究部 部長

研究者番号：00208456