

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07918

研究課題名(和文) 情動制御作用を有するプラズマローゲンのデザインと脳内輸送経路および標的細胞の解明

研究課題名(英文) Design of a plasmalogen with the function of the emotional control and elucidation of its transport pathway into the brain target cells.

研究代表者

宇田川 潤 (Udagawa, Jun)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：10284027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：異なる分子内構造を有するリン脂質をラットに投与し行動変化との関連を調べたところ、sn-2位のDHAは探索行動の低下を招くが、sn-1位のエーテル結合やsn-3位のコリンへの置換は探索行動を活性化させることが示唆された。また、PE(18:0/22:6)による記憶低下作用は、sn-1位のビニルエーテル結合やsn-3位のコリンへの置換によって消失することが示唆された。一方、PCではsn-1位のビニルエーテル結合が抗不安作用に重要であり、PC・PE共にsn-2位のDHAは社会行動抑制に働くと考えられた。また、リン脂質の標的部位の候補として、前頭皮質を含む大脳皮質、視床、扁桃体、海馬、脳梁が推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症を含む精神疾患、自閉症などの神経発達症、アルツハイマー型認知症などの神経変性疾患では、脳内のリン脂質構成異常が指摘されている。しかしながら、特定のリン脂質の脳機能に与える影響に関しては、未だ不明の点が多い。

本研究では、構造的特徴の異なるリン脂質をラットに投与し、行動変化を観察することで、リン脂質の分子内構造と情動制御機能との関連を明らかにしてきた。その成果は、情動制御においてより高機能なリン脂質の開発に応用可能である。また、リポソームを用いたリン脂質の脳内取り込みの解析結果は、特異的な標的部位へのリン脂質の効率的な輸送手段の開発に重要な知見を提供すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the functions of phospholipid moieties, we injected rats with phospholipids with different moieties and conducted behavioral tests. Exploratory activity was reduced by PE(18:0/22:6) but not PC(18:0/22:6) or PE(P-18:0/22:6), which harbors a vinyl-ether linkage. Ethanolamine and a vinyl-ether linkage in PE were thus postulated to be involved in exploratory activity. Anxiety-like behavior was reduced by plasmeyl PC(18:0/20:4), which harbors a vinyl-ether linkage, but not by PC(18:0/20:4) or plasmany PC(18:0/20:4), suggesting the anxiolytic effects of vinyl-ether linkage. The activation of social interaction was suppressed by PE(18:0/22:6), PC(16:0/22:6), plasmany PE(16:0/22:6), and plasmany PC(16:0/22:6) but not by PE(18:0/20:4) or plasmeyl PE(18:0/20:4). DHA may suppress social interaction, whereas arachidonic acid(20:4) may restore social deficits. Our findings indicate the characteristic effects of different phospholipid moieties on rat behavior.

研究分野：発生学、神経科学

キーワード：リン脂質 行動 血液脳関門

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

プラズマローゲンは脳のリン脂質の約 20%を占め、特に灰白質のホスファチジルエタノールアミン(PE)分画では 57%、白質では 84%を占める。プラズマローゲンは膜流動性やシグナル伝達への関与のほか、ビニルエーテル結合の抗酸化作用や脳保護との関連も報告されている。また、その疎水性部位にはうつ病や認知症・精神疾患の発症予防効果を有する多価不飽和脂肪酸を含む分子も多く、本脂肪酸のキャリアとしても機能していると考えられている。

申請者は妊娠初期の母体低栄養により生後の仔ラットに多動や探索行動の活発化などの行動異常が生じることを見出し、その原因について究明してきた。その過程で、多動ラットでは、情動と関連の深い前頭前皮質でのリン脂質構成異常を認めた。特にエタノールアミン型プラズマローゲンのうち *sn*-2 位にドコサヘキサエン酸(DHA)が結合した PE(P-18:0/22:6)が顕著に増えていたため、14 週齢でリポソーム膜に PE(P-18:0/22:6)を組み込み投与したところ、行動異常のうち探索行動の活発化を再現できた。PE(P-18:0/22:6)を投与したラットでは前頭前皮質で当該リン脂質が増加していたことから、脳内に移行した PE(P-18:0/22:6)により情動が制御された可能性が考えられ、リン脂質の脳内局在と量の調節が神経発達症や情動障害などの発症予防・治療ターゲットの一つになり得ると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、神経発達症や精神疾患の予防や治療に応用可能な高機能リン脂質の創出を目指し、以下の実験を行った。

ビニルエーテル結合や多価不飽和脂肪酸の有無など、分子構造の異なるリン脂質を合成し、ラットに投与して行動変化を観察する。これにより分子構造と機能との関連を明らかにできる。

蛍光標識リン脂質を注入し、脳内動態を調べる。これによりリン脂質の脳内標的部位が明らかとなる。本知見をもとに、より高機能なリン脂質をデザインするための知見を得る。

### 3. 研究の方法

#### (1). 脳内移行に適したリポソーム構成の検討

脳内取り込み効率の良いリポソームを選別するため、蛍光物質の DiIc18 を組み込んだ 4 種類のリポソーム (Egg PC + 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylethanolamine(DSPE)、Egg PC + DSPE + cholesterol、Egg PC + PEG2000-DSPE、および Egg PC + PEG2000-DSPE + cholesterol) をマウスの尾静脈から投与し、3 時間後に *in vivo* imaging system を用いてこれらのリポソームの脳内取り込み率を比較した。

リポソームの血液脳関門(BBB)透過度を BBB *in vitro* 再構成モデルにより検討し、脳内移行に適したリポソーム構成成分について検討した。

#### (2). 注入したリン脂質の脳内移行および局在の検討

上記(1)では膜に取り込まれる DiIc18 の蛍光を検出していたが、リン脂質の脳内移行をさらに確実に検討するため、蛍光標識リン脂質(ATT0740 DOPE)をリポソームに組み込んでマウスの尾静脈から注入した。注入 3 時間後に脳を取り出し、*in vivo* imaging system を用いて蛍光を測定した。また、厚さ 1 mm の脳の冠状断切片を作成し、同様に蛍光を検出することによって、注入したリン脂質の脳内局在を観察した。

#### (3). 行動試験

オープンフィールド試験、新奇物体認識試験、高架式十字迷路試験、社会的相互作用試験を行った。社会的相互作用では、2 つのカゴをフィールド内に設置し、以下の 4 つの条件下でラットがカゴに近づいた時間を測定した(図 1)。

Trial 1: 双方とも空のカゴとする。

Trial 2: 一方のカゴのみにラット(*novel intruder*)を入れる。

Trial 3: 翌日に Trial 2 と同じ条件下で、Trial 2 と同じラット(*familiar intruder*)との相互作用を観察する。

Trial 4: *familiar intruder* を取り出し、新奇のラット(*novel intruder*)に交換する。

したがって、Trial 2 および 4 では新奇ラットに対する相互作用、trial 3 では、*familiar rat* に対する相互作用を観察する。

#### (4). リン脂質の分子構造と行動に対する影響との関連の検討

*sn*-1 位の化学結合(エステル結合、アルキルエーテル結合、ビニルエーテル結合)、*sn*-1 位および *sn*-2 位の脂肪酸の種類、*sn*-3 位の親水性部分の構造(エタノールアミンあるいはコリン)の行動制御に対する機能を詳細に比較するため、アルキルエーテル結合を有するリン脂質および PC(18:0-20:0)を合成した。

*sn*-1 位のビニルエーテル結合、および *sn*-3 位の親水性部分の行動に対する作用を検討するため、PC(18:0-22:6)、PE(18:0-22:6)、ならびに *sn*-1 位にビニルエーテル結合を有する PC(P-18:0-22:6)、PE(P-18:0-22:6)をラットの尾静脈に注入し、オープンフィールド試験、新奇物体認識試験、ならびに高架式十字迷路試験を行った。

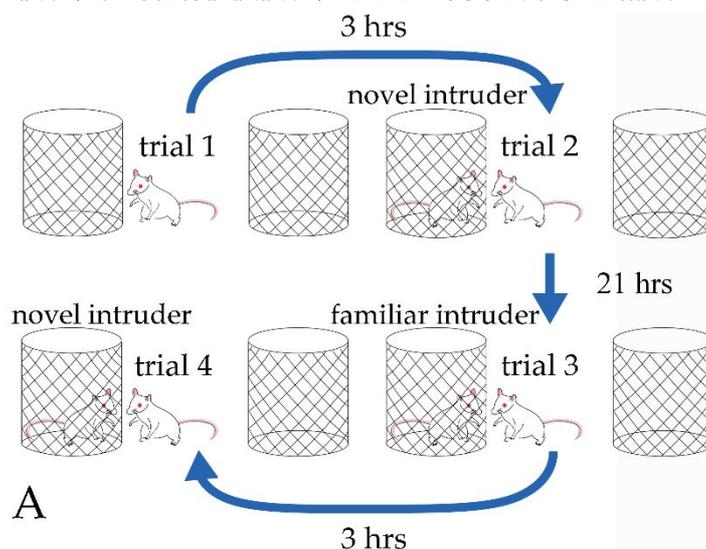


図1 社会的相互作用試験（論文1より抜粋引用）

PCの機能における *sn*-2 位の脂肪酸飽和度、および *sn*-1 の化学結合の影響を調べるため、PC(18:0/20:0)、PC(18:0/20:4)、PC(18:0/20:4)、アルキルエーテル結合を有する PC(0-18:0/20:4)、ならびに PC(P-20:4)をラットに投与し、上記の行動試験を行った。PEの機能における *sn*-2 位の脂肪酸飽和度、および *sn*-2 位にアラキドン酸 (ARA) を有するリン脂質における *sn*-1 位の化学結合の種類の影響を調べるため、PE(18:0-18:0)、PE(18:0-22:6)、PE(18:0-20:4)および PE(P-18:0-20:4)をラットに注入後、上記の行動試験に加えて社会的相互作用試験を行った。

行動に対する *sn*-1 位の脂肪酸の長さや *sn*-1 位のアルキルエーテル結合の影響、またこれらの分子構造と *sn*-3 位の親水性部分の構造との相乗作用について検討するため、PC(16:0-22:6)、PC(0-16:0-22:6)および PC(0-18:0-22:6)、ならびに PC(P-16:0-22:6)を投与し、(エ)と同様の行動実験を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1). 脳内移行に適したリポソーム構成

生体では Egg PC + DSPE + cholesterol、および Egg PC + DSPE + PEG の構成のリポソームの投与後、脳で蛍光が検出されたため、この二種類のリポソーム構成がリン脂質の脳内移行に適していると考えられた。本リポソームを用いて BBB in vitro 再構成モデルの透過性を検討したところ、Egg PC + DSPE + cholesterol で構成されるリポソームの透過性が最も高かった（論文1）。

##### (2). 注入したリン脂質の脳内局在

蛍光標識リン脂質は、前頭前皮質、運動皮質、感覚皮質、視床、扁桃核、海馬、脳梁、前交連などに取り込まれていたが、線条体や視床下部には蛍光が検出されなかった（論文1,2）。したがって、以上の脳領域がリン脂質の標的部位の候補として考えられた。

##### (3). 行動試験

###### 探索行動

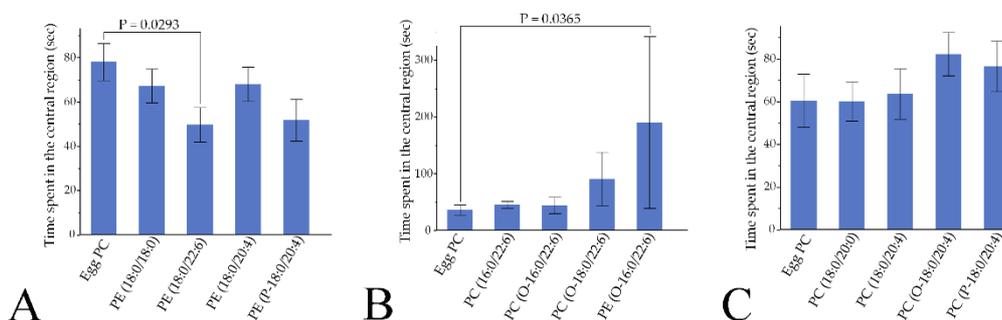


図2 ラットのオープンフィールド試験結果（論文1より抜粋引用）

PE(18:0/22:6)の投与によりオープンフィールド試験での中央領域滞在時間が減少したが、PC(18:0/22:6)やPE(P-18:0/22:6)、PE(18:0/18:0)、PE(18:0/20:4)の投与では

中央領域滞在時間の減少は認められなかった(図2、論文2)。一方、PE(0-16:0/22:6)では中央領域滞在時間が増加したが、PE(0-18:0/22:6)やPC(0-16:0/22:6)、PC(16:0/22:6)では変化がなかった(図2)。これらの結果は、PEにおいてsn-2位のDHAは探索行動の低下を招くが、sn-1位のエステル結合からエーテル結合への置換やsn-3位のエタノールアミンからコリンへの置換は、探索行動を活性化させることが示唆された。

### 記憶

PE(18:0/22:6)の投与により新奇物体認識試験で記憶の低下が認められたが、PE(P-18:0/22:6)では記憶低下が認められなかった(論文2)。二元配置分散分析の結果、sn-1位のエステル結合からビニルエーテル結合への置換、ならびにsn-3位のコリンからエタノールアミンへの置換は記憶を改善する効果があることが示唆された(論文2)。

### 不安様行動

高架式十字迷路試験によりPC(P-18:0/20:4)は抗不安効果を有することが示された(図3)。しかしながらPC(18:0/20:4)、PC(0-18:0/20:4)、PC(0-18:0/22:6)、PC(18:0/22:6)、PE(P-18:0/20:4)、ならびにPE(P-18:0/22:6)は不安様行動に影響を及ぼさなかった(論文1、2)。さらに、PE(0-16:0/22:6)はPC(0-18:0/22:6)と比較して抗不安効果を示すが、PC(0-16:0/22:6)とは差が無かった(図3)。sn-2位にARAを有するPCではsn-1位のビニルエーテル結合が、sn-1位のエーテル結合とsn-2位のDHAを有するPCではsn-2位のパルミチン酸とsn-3位のエタノールアミンへの置換が抗不安作用の発揮に重要と考えられた。

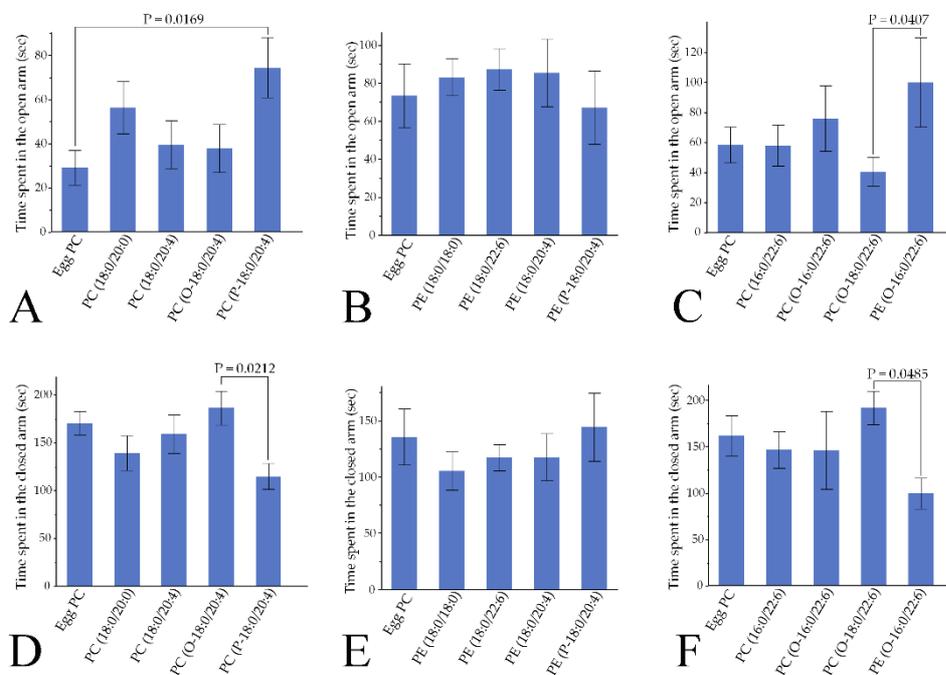


図3 ラットの高架式十字迷路試験結果(論文1より引用)

### 社会行動

PE(18:0/18:0)、PE(18:0/22:6)、PC(16:0/22:6)、PC(0-16:0/22:6)、ならびにPE(0-16:0/22:6)の投与では novel intruder に対する社会的相互作用時間の減少がみられたが、PE(18:0/20:4)、PE(P-18:0/20:4)、ならびにPC(0-18:0/22:6)では社会的相互作用の減少が認められなかった(図4A-D)。さらにPC(0-18:0/22:6)投与群ではPC(16:0/22:6)と比較して、familiar rat に対する社会的相互作用が増強した(図4E, F)。sn-2位のARAからDHAあるいはステアリン酸への置換は社会的相互作用の低下に、sn-1位のステアリン酸とアルキルエーテル結合の組合せは社会性の亢進につながると考えられた。

以上のように、リン脂質のsn-1位の化学結合とそれを介して結合する脂肪酸、sn-2位の脂肪酸、およびsn-3位の親水性部分の構造は、単独で、または相加・相乗的に探索行動や記憶、抗不安効果、社会行動の変化に関与することが明らかとなった。また、注入したリン脂質の脳内局在はこれらの行動変化と密接に関連した領域であり、リン脂質の標的部位に関する知見も本研究で得ることができた。

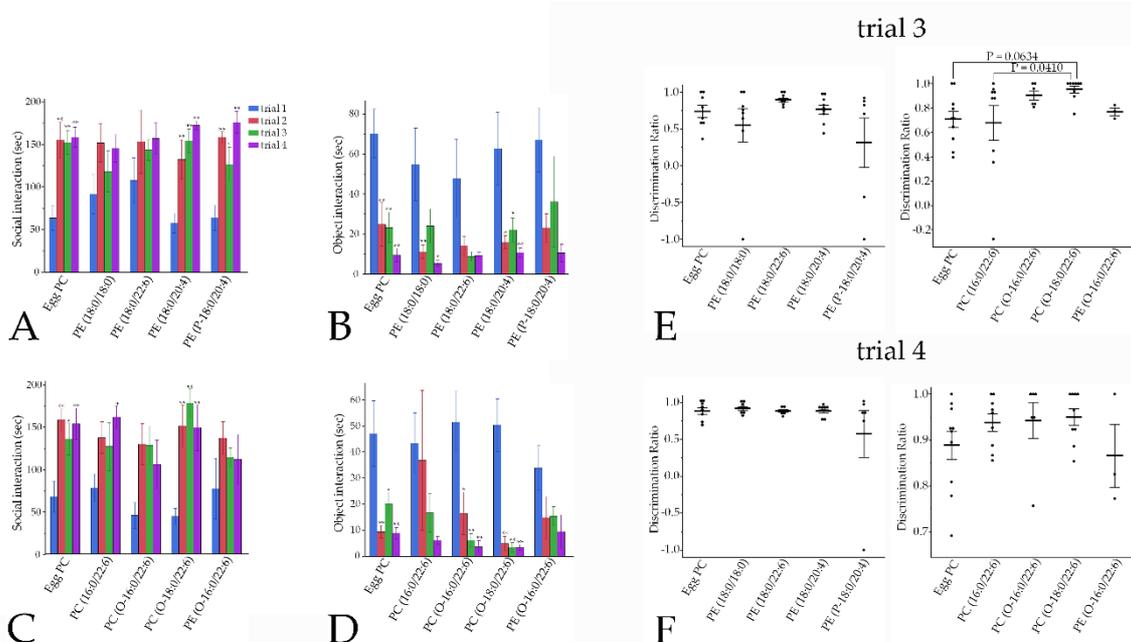


図4 ラットの社会的相互作用試験結果 (論文1より抜粋引用)

引用文献

論文1) Kikuchi S, Udagawa J (責任著者) 他 14 名. Solitary and Synergistic Effects of Different Hydrophilic and Hydrophobic Phospholipid Moieties on Rat Behaviors. *Pharmaceutics*. 2024, 16, 762. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16060762>.  
 論文2) Zenika NMST, Udagawa J (責任著者) 他 9 名. Ethanolamine and vinyl-ether moieties in brain phospholipids modulate behavior in rats. *Research Square* (preprint, posted 09 Apr, 2024 ) <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2941859/v1>.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3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 Shuhei Kikuchi, Yugo Iwasaki, Mina Yoshioka, Kodai Hino, Shin-ya Morita, Ryu Tada, Yasuhiro Uchimura, Yoshinori Kubo, Tomoya Kobayashi, Yusuke Kinoshita, Masahiro Hayashi, Yoshio Furusho, Hitoshi Tamiaki, Hiroaki Ishiyama, Minoru Kuroda and Jun Udagawa	4. 巻 16
2. 論文標題 Solitary and Synergistic Effects of Different Hydrophilic and Hydrophobic Phospholipid Moieties on Rat Behaviors	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics16060762	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 Udagawa Jun, Hino Kodai	4. 巻 188
2. 論文標題 Plasmalogen in the brain: Effects on cognitive functions and behaviors attributable to its properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Research Bulletin	6. 最初と最後の頁 197~202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainresbull.2022.08.008	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 Tetsuo Ono, Kodai Hino, Tomoko Kimura, Yasuhiro Uchimura, Takashi Ashihara, Takako Higa, Hideto Kojima, Takashi Murakami, Jun Udagawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Excessive folic acid intake combined with undernutrition during gestation alters offspring behavior and brain monoamine profiles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Congenit Anom (Kyoto)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cga.12472	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 宇田川潤	4. 巻 37
2. 論文標題 胎生期環境と精神神経発達	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 20-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 宇田川潤	4. 巻 38
2. 論文標題 妊娠期の環境要因により誘起される生後の脳機能変化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1586-1589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 大谷 浩、宇田川潤、八田稔久	4. 巻 40
2. 論文標題 胎児科学をめざして(その2)、出雲から展開した研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 島根医学	6. 最初と最後の頁 59-68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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4件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宇田川潤、小野哲男、日野広大、木村智子、内村康寛、芦原貴司、比嘉貴子、小島秀人、村上節
2. 発表標題 生後の仔の行動と脳内モノアミンプロファイルの変化における妊娠期の低栄養と過剰葉酸の相互作用について
3. 学会等名 第62回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宇田川潤
2. 発表標題 妊娠母体の環境と子の心の発達との関連について
3. 学会等名 第9回新胎児学研究会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇田川潤、小野哲男、日野広大、木村智子、内村康寛、芦原貴司、比嘉貴子、小島秀人、村上節
2. 発表標題 妊娠期の母体栄養障害と仔の生後の行動異常 低栄養と過剰葉酸摂取との相互作用についてー
3. 学会等名 第10回日本DOHaD学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇田川潤
2. 発表標題 胎生期の要因による行動異常のリスクは生後の環境により低減可能か？
3. 学会等名 第11回日本DOHaD学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宇田川潤（分担執筆）	4. 発行年 2023年
2. 出版社 金原出版株式会社	5. 総ページ数 5
3. 書名 DOHaD先制医療への展開（執筆担当：胎生期低栄養と行動異常）	

〔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
研究 分担者	林 雅弘  (Hayashi Masahiro)  (00289646)	宮崎大学・農学部・教授   (17601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	岩崎 雄吾  (Iwasaki Yugo)  (50273214)	中部大学・応用生物学部・教授    (13901)	
研究分担者	内村 康寛  (Yasuhiro Uchimura)  (90803990)	滋賀医科大学・医学部・特任准教授    (14202)	

	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
研究協力者	古荘 義雄  (Furusho Yoshio)		
研究協力者	民秋 均  (Tamiaki Hitoshi)		

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