

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02820

研究課題名（和文）新たな脂質異常症の概念の確立を目指した脳修復性脂質の作用機序の解明と治療剤開発

研究課題名（英文）Clarification of the role of brain-reparative lipids for the novel concept of dyslipidemia

研究代表者

七田 崇 (Takashi, Shichita)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：00598443

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：脳損傷後に神経修復が起こり、脳機能がある程度回復することは知られていたが、どのような分子メカニズムによって神経修復が開始されるのかは不明であった。本研究は脳梗塞後に産生される脳修復的な脂肪酸代謝物ジホモ リノレン酸や15-HETrEが神経修復の引き金となり、PADI4によるヒストンのシトルリン化を介して修復遺伝子の発現を誘導する事を証明した。DGLAや15-HETrEの投与によって脳梗塞モデルマウスの神経症状を改善することができたほか、同等の修復機転が脳梗塞患者の脳組織においても観察された。脳修復的な脂質を摂取することで脳卒中後の機能予後を改善する新規治療法への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題によって発見できた脳修復的脂質は食事で摂取することにより脳に蓄積させることが可能である。脳機能回復を促進させる食事療法の開発のほか、実際に脳修復的脂質が不足している患者（脳梗塞、軽度認知障害、心筋梗塞、糖尿病、加齢など）が存在することが既に知られているため、脳修復作用が低下している患者をスクリーニングする診断技術、検査薬の開発が期待できる。既にPCT出願済みであり、新たな脂質異常症の概念の確立に向けた構想を練っている。

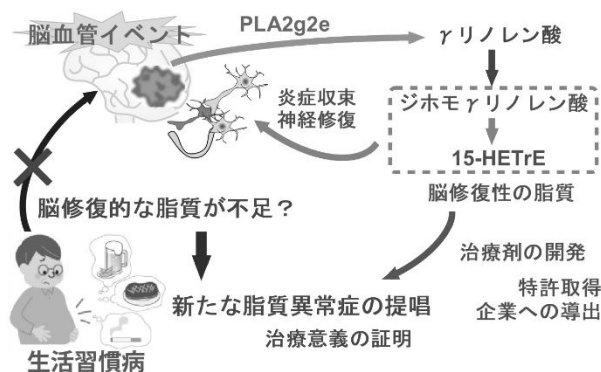
研究成果の概要（英文）：While the brain generally struggles to regenerate after injury, our study reveals a previously unknown self-repair mechanism. We found that damaged neurons release an enzyme called PLA2G2E, which produces DGLA which is essential for activating functional recovery mechanisms after ischemic stroke. When PLA2G2E is lacking, PADI4 is also reduced, which controls the activity of genes involved in recovery after stroke. Our analysis shows that PADI4 activates these recovery genes through a process called histone citrullination. Among the various substances derived from DGLA, we identified 15-HETrE as the one responsible for stimulating PADI4 production in surviving neurons. Giving 15-HETrE to stroke-affected individuals improved their recovery. These findings highlight the brain's remarkable capacity for self-repair, triggered by specific lipids produced in response to injury. This discovery opens new avenues for developing therapies to enhance recovery after stroke and other brain injuries.

研究分野：脳卒中学

キーワード：脳梗塞 神経修復 脳修復的脂質

1. 研究開始当初の背景

脂質は生体の主要な構成分子の一つであり、様々な生命現象を制御する脂質メディエーターを作り出す。ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペント酸 (EPA) の代謝物は、炎症や動脈硬化の抑制効果が証明され、脂質異常症に対して心・脳血管イベントの発症を低減させるために汎用されている。しかしながら、「実際にどのような脂質が、脳血管障害においてどのように作用し、患者の予後を変えうるのか」については未解明であった。



2. 研究の目的

脳梗塞モデルマウスを用いて脳内のリン脂質代謝物の網羅解析を実施した結果、リン脂質代謝酵素 PLA2g2e によって生成されるジホモ リノレン酸と、その代謝物の 15-hydroxyeicosatrienoic acid (15-HETrE) が、脳梗塞後の神経症状を改善することを既に発見していたため、その詳細な作用機序を明らかにすることを目的に研究を実施した。ジホモ リノレン酸や 15-HETrE の脳梗塞における作用は未解明であったが、哺乳類では 6 脂肪酸であるジホモ リノレン酸や リノレン酸は少量しか存在しないため不足しやすいことが知られている。また、糖尿病患者では血液中のジホモ リノレン酸が低下していることや、脳梗塞の重症例や血管性認知症においても血液中のジホモ リノレン酸が欠乏することが報告されている。したがって、脳修復的な脂質の代謝経路と作用機序を解明することにより、脳血管イベント発生時の機能予後を改善するための生活習慣病対策と新たな脂質異常症の概念を提唱し、治療意義を証明することを目標とした。

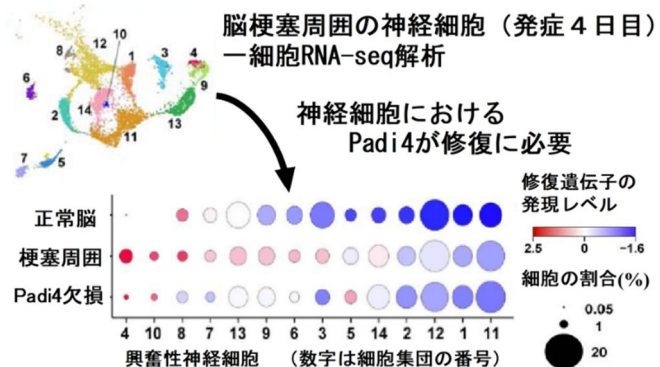
3. 研究の方法

脳修復的な脂質の同定のため、脂質メディエーターの産生に関わるリン脂質代謝酵素 phospholipase A2 (PLA2) の作用に着目し、脳梗塞モデルマウスを用いて脳梗塞組織における脂質の網羅解析を実施した (東京大学 村上誠教授との共同研究)。その結果、脳梗塞後の脳組織におけるリン脂質の動態は劇的に変化しており、50 種類ほど存在する PLA2 サブタイプのうち 9 種類が脳梗塞の経過に伴って大きく変化することを見出した。それぞれの PLA2 サブタイプをの遺伝子欠損マウスを用いて脳梗塞モデルを作製し、PLA2g2e 欠損マウスでは野生型と比較して神経症状が悪化することが証明できた。マイクロアレイ解析によって PLA2g2e 欠損マウスの脳組織では神経修復に関連する遺伝子群の発現が低下することが判明した。特に PLA2g2e 欠損マウスの脳梗塞組織で欠損している転写調節因子として Padi4 (Peptidyl arginine deiminase 4) を見出した。すなわち PLA2g2e は脳梗塞後の脳内で何らかの脳修復的な生理活性脂質を生成し、脳梗塞後の神経細胞に Padi4 依存的な修復機能を付与することが予想されたため、神経細胞における Padi4 の役割を明らかにしつつ、脳修復的な脂質の作用機序を解明した。

4. 研究成果

まず神経細胞特異的な Padi4 欠損マウスを作成して脳梗塞モデルを作製し、脳梗塞組織における網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、神経細胞特異的な Padi4 欠損マウスでは炎症の程度が増強しており、神経修復に関わる遺伝子発現がかなり低下していることが明らかとなった。神経細胞特異的な Padi4 欠損マウスの脳組織から、脳梗塞周囲の神経細胞をセルソーターによって単離する技術を確認し、RNA-seq 解析や ATAC-seq 解析を実施した。その結果、Padi4 はヒストンタンパク質のシトルリン化を介して、神経細胞の軸索伸長やシナプス形成、神経新生に関わる遺伝子群の発現を誘導することが証明できた。発症 7 日目までの脳梗塞体積と神経症状を野生型マウスやマクロファージ特異的な Padi4 欠損マウスと比較したところ、神経細胞特異的な Padi4 欠損マウスでは脳梗塞後の神経症状と梗塞体積が悪化することを発見した。

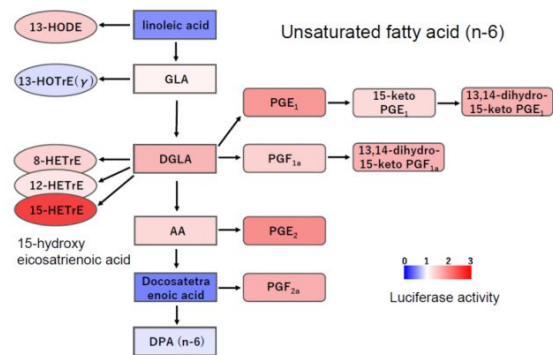
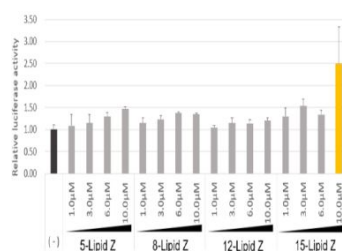
一細胞 RNA-seq 解析では神経細胞は 14 の細胞集団に区分され、正常脳から採取した神経細胞集団と比較すると、脳梗塞後 4 日目における全ての細胞集団において虚血ストレスによる影響が観察された。特に cluster 4 に区分された神経細胞は、野生型マウスにおける発症 4 日目の脳梗塞巣周囲に見られ、正常脳や、神経細胞特異的な Padi4 欠損マウスの脳梗塞周囲には観察されないことを発見した。Gene ontology 解析では、脳梗塞後の神経細胞では神経組織の形成、神経突起の伸長やシナプスの形成に関わる遺伝子群の発現が顕著に増加することが明らかとなった。実際、これらの脳機能回復に関わる修復遺伝子の発現レベルを、14 の神経細胞集団それぞれについて評価したところ、正常脳に比べて脳梗塞後の脳では、全ての神経細胞集団で修復遺伝子の発現レベルが増加していた。しかし神経細胞特異的な Padi4 欠損マウスでは、これらの修復遺伝子の発現が顕著に損なわれており、神経細胞における Padi4 の発現が修復遺伝子の発現誘導に重要な役割を持つことが明らかとなった。



脳梗塞組織を用いた質量分析による網羅的な脂質解析の結果、PLA2g2e 欠損マウスでは脳梗塞組織におけるリノレン酸やジホモ リノレン酸の含有量が低下していることを発見した。そこで、神経細胞株 Neuro2A に添加した場合に、Padi4 の発現が誘導される

不飽和脂肪酸とその代謝物をルシフェラーゼレポーターアッセイによってスクリーニングした。その結果、ジホモリノレン

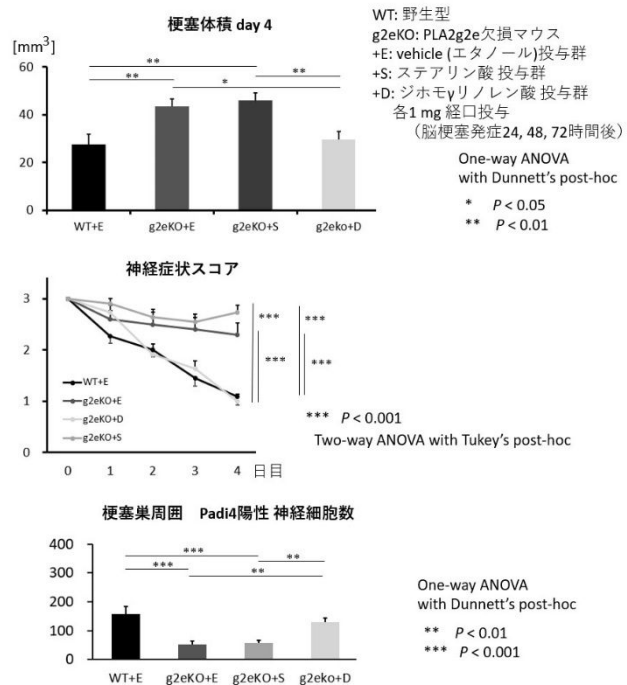
Luciferase assay (Neuro2A)
Padi4 promoter region (3.0kb)



Padi4 遺伝子の promoter 領域を用いた luciferase assay による脂質代謝物のスクリーニングで、 ω 3、 ω 6 不飽和脂肪酸を主とした約 40 の脂質代謝物の中から 15-HETrE を、神経細胞に最も Padi4 の発現を強く誘導する新規の生理活性脂質として同定できた。

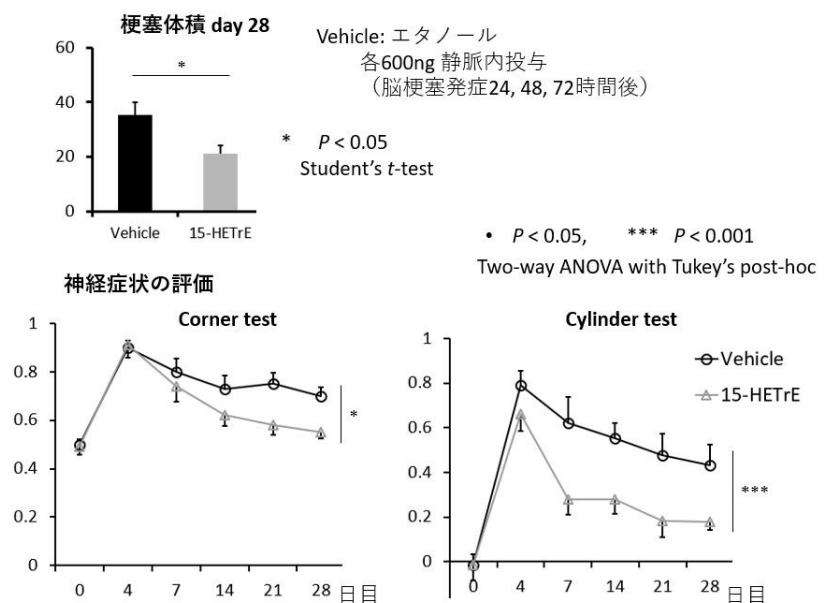
酸とその代謝物にのみ広く Padi4 を発現誘導する活性が観察されたが、特に 15-HETrE が強い Padi4 発現誘導活性を有することを発見した。

そこでジホモ リノレン酸、15-HETrE の投与によって脳梗塞後の機能回復が促進されるかどうかを検証した。PLA2g2e 欠損マウスでは野生型に比べ、神経症状が悪化し、脳梗塞体積が拡大していたが、PLA2g2e 欠損マウスにジホモ リノレン酸を投与すると、Vehicle (エタノール) 投与群やステアリン酸投与群と比較して、脳梗塞体積が縮小し、神経症状の改善が見られた。脳梗塞周囲では、ジホモ リノレン酸の投与によって Padi4 陽性の神経細胞数が増加していた。したがって、ジホモ リノレン酸の欠乏例に対しては、脳梗塞後の機能回復をジホモ リノレン酸の投与によって促進できる可能性が示唆された。



さらに 15-HETrE の脳梗塞モデルマウスに対する治療効果を検証した。脳梗塞巣周囲において、Vehicle 投与群に比して 15-HETrE 投与群では Padi4 を発現する神経細胞の数が増加していた。梗塞周囲の神経細胞を単離して、RNA-seq にて遺伝子発現を比較したところ、15-HETrE 投与群では神経組織の形成や、神経細胞の突起形成、シナプスの形成に関わる遺伝

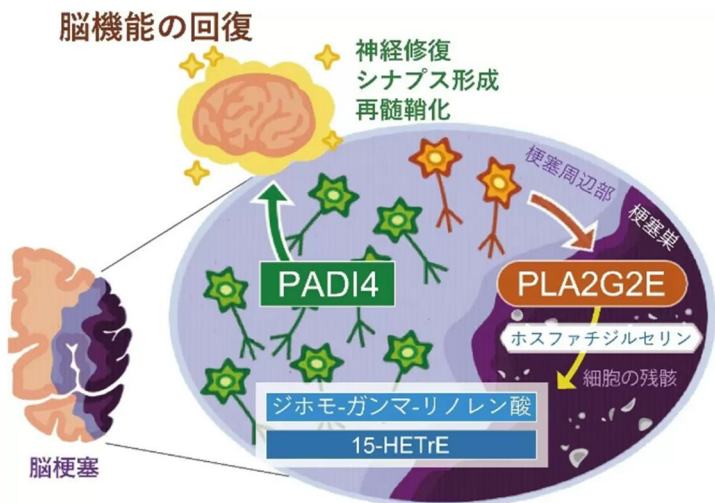
子群の発現が高く見られることが判明した。したがって、15-HETrE を脳梗塞マウスに投与すると、脳梗塞周囲で生存している神経細胞において Padi4 の発現を増加させ、脳修復作用を増強することによって機能回復を促進させると考えられた。実際



に、15-HETrE を投与した脳梗塞モデルマウスでは Vehicle 群と比較して、脳梗塞周囲の神経細胞における修復遺伝子の発現が顕著に増加していた。

以上の研究成果は、2023年7月24日付けで Neuron 誌に掲載されプレスリリースを行った。すなわち、脳は脳梗塞などの組織損傷時に脂質代謝酵素を作り出すことで脳修復的脂質を生成し、自律的な機能回復を行うことが証明できた。

脳梗塞周囲の神経細胞は虚血ストレスに伴ってPLA2g2eを発現し、主に脳梗塞組織の細胞残骸に含まれるホスファチジルセリンを代謝してジホモ リノレン酸とその代謝物15-HETrEを生成する。これらの脳修復的脂質は、脳梗塞周囲で生存している神経細胞に対し、ヒストンのシトルリン化を介して神経修復に関連した遺伝子発現を誘導し機能回復をもたらす。



15-HETrEは脳梗塞の発症数日を経過した亜急性期において脳修復効果をもたらす新規の生理活性脂質であることから、これまでに有効な治療薬が開発されていない発症後24時間を経過した脳梗塞に対しても、患者の神経症状を改善する画期的な治療剤となることが期待できる。ジホモ リノレン酸のような脂質は脳組織移行が良好であり、例えば経口摂取によっても脳組織に蓄積することが知られていることから、画期的な脳機能回復食が開発可能であるため実用化研究を進めている。6脂肪酸であるジホモ リノレン酸は生体内に少量しか存在せず、炎症性の脂質メディエーターを作り出すアラキドン酸にはほとんど代謝されない。ジホモ リノレン酸は体内では生成できないため食物から摂取する必要があるが、糖尿病患者や高齢者では血液中のジホモ リノレン酸が低下する症例が存在するほか、脳梗塞や認知症においても血液中のジホモ リノレン酸が低下することが報告されているため、糖尿病や脳血管障害の既往を有する患者ではジホモ リノレン酸や15-HETrEの欠乏例が存在することが予想される。このような脳修復的な脂質の代謝経路と作用機序が本研究によって明らかになったことから、脳血管イベント発生時の機能予後を改善するための生活習慣病対策と新たな脂質異常症の概念と治療意義を今後も提唱したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shichita Takashi、Ooboshi Hiroaki、Yoshimura Akihiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Neuroimmune mechanisms and therapies mediating post-ischaemic brain injury and repair	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Reviews Neuroscience	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） 10.1038/s41583-023-00690-0	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 Koyama Ryuki、Shichita Takashi	4. 巻 187
2. 論文標題 Glial roles in sterile inflammation after ischemic stroke	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 67～71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2022.10.002	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 Sakai Seiichiro、Shichita Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of alarmins in poststroke inflammation and neuronal repair	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seminars in Immunopathology	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） 10.1007/s00281-022-00961-5	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 Nakamura Koutarou、Sakai Seiichiro、Tsuyama Jun、Nakamura Akari、Otani Kento、Kurabayashi Kumiko、Yogiashi Yoshiko、Masai Hisao、Shichita Takashi	4. 巻 19
2. 論文標題 Extracellular DJ-1 induces sterile inflammation in the ischemic brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3000939
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.3000939	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 Nakahashi-Oda Chigusa, Fujiyama Satoshi, Nakazawa Yuta, Kanemaru Kazumasa, Wang Yaqiu, Lyu Wenxin, Shichita Takashi, Kitaura Jiro, Abe Fumie, Shibuya Akira	4. 巻 6
2. 論文標題 CD300a blockade enhances efferocytosis by infiltrating myeloid cells and ameliorates neuronal deficit after ischemic stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 eabe7915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.abe7915	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 Nakamura Akari, Sakai Seiichiro, Taketomi Yoshitaka, Tsuyama Jun, Miki Yoshimi, Hara Yuichiro, Arai Nobutaka, Sugiura Yuki, Kawaji Hideya, Murakami Makoto, Shichita Takashi	4. 巻 111
2. 論文標題 PLA2G2E-mediated lipid metabolism triggers brain-autonomous neural repair after ischemic stroke	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 2995 ~ 3010.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuron.2023.06.024	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 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takashi Shichita
2. 発表標題 Molecular mechanisms triggering sterile inflammation and neural repair after ischemic stroke
3. 学会等名 MMCB2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞後の神経修復を促進させる治療戦略
3. 学会等名 第48回日本脳卒中学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takashi Shichita
2. 発表標題 Lipid metabolism triggering neural repair in brain ischemia
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞における神経修復のメカニズム
3. 学会等名 第65回日本脳循環代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞後における炎症と修復の開始メカニズム
3. 学会等名 第63回日本神経学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takashi Shichita
2. 発表標題 Role of the lipids in the functional recovery after ischemic stroke.
3. 学会等名 Stroke Immunology Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takashi Shichita
2. 発表標題 Cerebral post-ischemic inflammation and lipid metabolism
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村幸太郎, 酒井誠一郎, 津山淳, 七田 崇
2. 発表標題 Extracellular DJ-1 plays a pivotal role in the induction of sterile inflammation after ischemic stroke
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井誠一郎, 石渡麗依那, 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞後の大脳新皮質における神経結合の再編と神経修復遺伝子の発現
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 朱里, 酒井 誠一郎, 村上 誠, 七田 崇
2. 発表標題 脳修復作用をもつアラームの生成・作用機序の解明
3. 学会等名 第29回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村幸太郎, 酒井誠一郎, 津山淳, 七田 崇
2. 発表標題 細胞外DJ-1は脳梗塞において無菌的な炎症を引き起こす
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞後の炎症と修復のメカニズム
3. 学会等名 第62回日本神経病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞とマクロファージ
3. 学会等名 第23回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞後に神経修復が開始されるメカニズム
3. 学会等名 第44回日本炎症再生医学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 七田 崇
2. 発表標題 ミクログリアによる脳梗塞後の神経修復
3. 学会等名 第35回日本神経免疫学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞後における神経修復の開始メカニズム
3. 学会等名 第96回日本生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞における神経修復の開始メカニズム
3. 学会等名 第8回日本骨免疫学会ウインタースクール
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 脳血管障害を予防または治療するための組成物	発明者 七田 崇、村上 誠	権利者 公益財団法人東京 京都医学総合研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/8483	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 脳損傷の治療用の医薬組成物	発明者 津山 淳、七田 崇	権利者 公益財団法人東京 京都医学総合研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、2023-44551	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 脳血管障害を予防または治療するための組成物	発明者 七田崇、村上誠	権利者 公益財団法人東京 京都医学総合研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/8483	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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