

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460320

研究課題名(和文) 感染ストレスによる脳内神経炎症機序とプラズマローゲン

研究課題名(英文) Neuroinflammation induced by systemic stress and plasmalogen

研究代表者

片渕 俊彦 (KATAFUCHI, TOSHIHIKO)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：80177401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：(1)プラズマローゲン(PIs)によるAktやERKの活性化が、オーファンGPRであるGPR1, GPR19, GPR21, GPR27およびGPR61を介していることを示した。(2) NF- κ Bが誘導したc-mycがPIs合成酵素GNPATを抑制することをLPSの末梢投与、拘束ストレス、および老化や、ヒトAD患者の脳で示した。(3) PIsをマウスに与えると、水迷路学習行動が促進し、海馬の脳由来神経栄養因子(BDNF)の発現がp-CREBを介して増強することを示した。

研究成果の概要(英文)：(1) We found that the plasmalogen (PIs)-induced activation of protein kinases was mediated by at least 5 orphan G-protein-coupled receptors (GPCRs), GPR1, GPR19, GPR21, GPR27 and GPR61 using knockdown and overexpression cells (PLoS ONE, 11: e0150846, 2016). (2) We found that inflammatory stimuli reduced PIs contents by downregulation of PIs synthesizing enzyme, GNPAT, through the NF- κ B-mediated recruitment of c-Myc onto the GNPAT promoter in both murine and human cell lines. (J Neurosci, 37 (15): 4074-4092, 2017). (3) Knock down of GNPAT in the mouse hippocampus impaired spatial memory and decreased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression. PIs-containing diet in mice increased hippocampal PIs, enhanced spatial memory with high expressions of phosphorylated (p-) Akt, p-CREB and BDNF along with enhanced hippocampal neurogenesis, spine formation, and long term potentiation. (in submission).

研究分野：神経生理学

 キーワード：プラズマローゲン オーファンG蛋白共役型受容体 海馬 NF- κ B リポポリサッカライド ショートヘアピンRNA 水迷路学習 神経新生

1. 研究開始当初の背景

神経炎症仮説：近年、アルツハイマー病 (AD) やパーキンソン病などの神経変性疾患や、自閉症やうつなどの精神疾患、さらには極度の疲労と共に高次脳機能や免疫系にも異常がある慢性疲労症候群 (CFS) などの病態において、脳-免疫系連関による“神経炎症仮説”が提唱されている。すなわち、環境因子としての末梢における感染炎症ストレスが、中枢神経系のグリア細胞や神経細胞を巻き込んだ神経炎症反応を惹起し、神経変性や神経新生、およびモノアミン代謝などに影響を与えた結果、これらの疾患の発症や増悪につながることを示唆されている。例えば、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライド (LPS) を末梢投与すると AB の脳内への蓄積による学習行動の障害が起こり (*J. Neuroinflammation*, 2008; *Nat. Rev. Neurosci.*, 2008)、合成 2 重鎖 RNA である poly I:C の末梢投与が、海馬における神経新生を抑制 (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2010) し、前頭前野ではアストロサイトのセロトニントランスポーターの発現増強による中枢性疲労 (*Eur. J. Neurosci.* Katafuchi T et al., 2005) を惹起すること、さらにはうつなどの精神疾患にも関与していること (*Neuropsychopharmacology*, 2008; *J. Neurosci.* 2010) が報告されている。しかし脳内神経炎症の詳細な発症機序については不明な点が多く、これらを解決することは、各疾患の予防や治療にもつながると考えられていた。また、本研究者はこの神経炎症に対してビニルエーテル型グリセロリン脂質であるプラズマローゲンが、抗炎症作用を持つことを示唆する知見を得ていたが (*J. Neuroinflammation*, 2012)、その作用機序についての詳細な解析はなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経炎症モデルにおける、(1) 神経炎症、および (2) 表現型としての学習記憶障害の機序を、個体およびグリアや神経細胞の初代培養系を用いて検討し、環境因子としての感染炎症ストレスによる脳内神経炎症のメカニズムを分子～個体レベルで解明する。また、(3) 抗酸化性グリセロリン脂質であるプラズマローゲン (Pls) による神経炎症の制御メカニズムを明らかにし、神経炎症に起因する種々の疾患の治療薬としての可能性を探る。

3. 研究の方法

TLR のリガンドである LPS や poly I:C の末梢投与と投与による脳内神経炎症モデルを作製し、(1) 神経炎症、および (2) 学習や情動行動を評価し、グリア細胞の活性化を形態学および mRNA や蛋白レベルで検討する。さらに (3) 神経炎症モデルにおける脳

内局所の Pls レベルの変動と学習行動障害を検討する。また、本研究者は Pls が AKT および ERK1/2 などの学習記憶関連蛋白キナーゼの活性を上昇させることを明らかにしたが、神経炎症による海馬や前頭前野のこれらの酵素活性の変化を解析する。また Pls の作用機序として、Pls がオーファン GPCR のリガンドとして作用している可能性を、スクリーニングする。さらに、Pls 合成酵素 (glyceronephosphate O-acyltransferase (GNPAT) の発現を抑制する shRNA レンチウイルスベクターを作成し、これを培養細胞系およびマウス海馬への局所注入し、その効果を in vivo および in vitro において学習行動変化や AKT および ERK1/2 活性を指標に検討する。また、GNPAT の発現制御に対する、炎症刺激や老化およびストレスの影響を、GNPAT のプロモーターアッセイなどにより明らかにする。これらの成果から、神経炎症に起因する高次脳機能障害の機序、および Pls の病態生理学的意義について、統合的に解析する。

4. 研究成果

(1) われわれはこれまで、エーテル型グリセロリン脂質であるプラズマローゲン (Pls) が培養神経細胞において Akt や ERK1/2 などを活性化し、その結果抗炎症作用や BDNF の発現を増強することを示してきた。Pls によるシグナル伝達に関して、G 蛋白の関与を検討したところ、G 蛋白阻害剤である GDP S によって Pls による Akt および ERK1/2 の活性化が抑制されることから、約 20 種のオーファン GPR のうち、培養神経細胞において発現が認められる 10 種について、それらの sh-RNA レンチウイルスベクターを作成し、発現をノックアウトし Pls を投与した。その結果、GPR1, GPR19, GPR21, GPR27 および GPR61 のノックダウン細胞では、Pls による Akt および ERK1/2 の活性化が著明に抑制されることが明らかになった (図 1)。

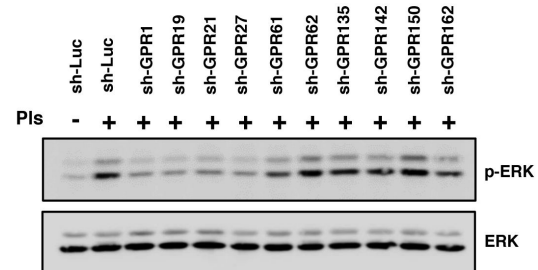


図 1 GPR1, 19, 21, 27, および 61 のノックダウンによる Pls 誘導性 ERK の活性化の抑制 (PLoS ONE, 2016 より)

一般的に GPR はヘテロまたはホモダイマーを形成して受容体機能が発揮されることから、Pls がこれら数種の GPR によって

細胞内シグナル伝達を行っている可能性が示唆された(PLoS ONE, 2016)。

(2)培養ミクログリア細胞株における LPS や IL-1 β 投与による炎症刺激が、ペルオキシゾームに存在するプラズマローゲン(Pls)合成酵素である glycerone phosphate O-acyltransferase (GNPAT)の発現を有意に抑制すること、その機序として、炎症刺激によって活性化された NF- κ B が c-myc タンパクを誘導し、c-myc が GNPAT のプロモーター領域に結合して GNPAT の発現を抑制することを明らかにした。さらに同様の現象がマウス初代培養グリア細胞および、ヒト培養細胞株においても見られること、また、マウスにおいて LPS の末梢投与、拘束ストレス、および老化によって海馬で起っていること、さらに、3XTg アルツハイマー病(AD)モデルマウスの脳や、ヒト AD 患者の脳でも同様の現象が観察された。興味深いことに、マウスの脳内に GNPAT の mRNA 発現を阻害する sh-RNA を微量投与するとミクログリアが活性化することが示された。以上から、GNPAT は神経炎症に対する保護作用を有し、その欠如が、グリア細胞の活性化ひいてはアルツハイマー病などの神経変性疾患を惹起する可能性を示唆していた(図2)。(J Neurosci, 37 (15): 4074-4092, 2017)。

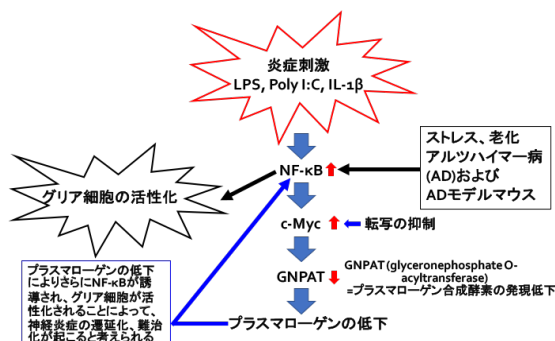


図2 神経炎症による NF- κ B および c-Myc を介した Pls 合成酵素(GNPAT)の発現抑制機序

(3)Pls が学習記憶に関与していることを明らかにするため、マウスの両側海馬へ、GNPAT の sh-RNA を微量投与すると、学習行動が障害され、脳由来神経栄養因子(BDNF)の発現量が低下していることを明らかにした。また、神経細胞で、Pls 投与により Akt が活性化され、その結果 p-CREB が増加し、BDNF の発現が増強することを明らかにした。最終的に Pls を含む飼料をマウスに6ヶ月与えると、コントロール食群と比較して水迷路学習行動が促進すること、この時海馬の Akt の活性化による BDNF の発現が増強していることを示し、その成果は現在論文投稿中である。

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11件)

- Hossain, M.S., Oomura, Y. and Katafuchi, T. Glucose can epigenetically alter the gene expression of neurotrophic factors in the murine brain cells. Mol. Neurobiol. 2017. doi: 10.1007/s12035-017-0578-3
- Hossain, M.S., Abe, Y., Ali, F., Youssef, M., Honsho, M., Fujiki, Y. and Katafuchi, T. Reduction of ether-type glycerophospholipids, plasmalogens, by NF- κ B signal leading to microglial activation. J. Neurosci. 37 (15): 4074-4092, 2017. doi:10.1523/JNEUROSCI.3941-15.2017
- Hossain, M.S., Mineno, K. and Katafuchi, T. Neuronal orphan G-protein coupled receptor proteins mediate plasmalogens-induced activation of ERK and 1 Akt signaling. PLoS ONE 11(3): e0150846, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0150846
- Hossain, M.S. and Katafuchi, T. Functional involvement of brain lipids in the neuronal survival and anti-neuroinflammation. Journal of Fatigue Science, 11 (2): 7-17, 2016.
- Hossain, M.S. and Katafuchi, T. Roles of brain lipids in glial activation. Adv. Neuroimmun. Biol. 6: 61-67, 2016.
- Mori, Y., Tomonaga, D., Kalashnikova, A., Furuya, f., Akimoto, N., Ifuku, M., Okuno, Y., Beppu, K., Fujita, K., Katafuchi, T., Shimura, H., Churilov, L.P. and Noda, M. Effects of 3,3',5-triiodothyronine on microglial functions. Glia 63: 906-920, 2015. doi: 10.1002/glia.22792
- Katafuchi, T., Hossain, M.S., Mineno, K. and Mohamed, F.A. Bioactive lipids safeguard our brain from various challenges. Fukuoka Acta Medica. 106 (11): 293-301, 2015.
- Ifuku, M., Hossain, M. S., Noda, M. and Katafuchi, T. Induction of IL-1 β by activated microglia is a prerequisite for immunologically induced fatigue. Eur. J. Neurosci. 40: 3253-3263, 2014. doi: 10.1111/ejn.12668
- 片瀬俊彦. プラズマローゲンと神経細胞信号伝達機能. 機能性食品と薬理栄養. 第9巻 第5号, 315-321, 2016.

10. 片淵俊彦. Poly I:C 疲労モデルラットにおける神経炎症機序. 日本疲労学会誌 第10巻 第2号, 6-11, 2015.
11. 片淵俊彦. 発熱と生体防御. 小児内科. 第46巻 第3号, 320-323, 2014.

〔学会発表〕(計6件)

1. Katafuchi, T., Hossain, M.S., Mineno, K. and Ali, F. Plasmalogen-induced signal transduction in learning and memory. Symposium Session: Plasmalogens and Alzheimer's disease. The 1st International Plasmalogen Symposium. Abstract book p.22, 2016. November 7-November 8 (Fukuoka)
2. 片淵俊彦. プラズマローゲンによるオーファン GPCR を介したシグナル伝達. シンポジウム 「疲労の脳科学」第12回日本疲労学会総会・学術集会. 日本疲労学会誌第12巻第1号 p.40, 2016. 5月21-22日. (横浜)
3. Katafuchi, T. Significant roles of hippocampal plasmalogens in learning and memory. Symposium Session I. Central and peripheral mechanisms of the nervous and immune systems interaction. The V International Symposium: Interaction of the nervous and immune systems in health and disease. Abstract book p.28, 2015. June 23-June 26. (St. Petersburg, RUSSIA)
4. 片淵俊彦. エーテル型グリセロリン脂質・プラズマローゲンの抗神経炎症作用. シンポジウム 「疲労の脳科学解析およびモデル動物を用いた解析研究」第11回日本疲労学会総会・学術集会. 日本疲労学会誌第11巻第1号 p.40, 2015. 5月15-16日. (山口)
5. 片淵俊彦. 心と体の疲労: 基礎からの理解. 教育講演 第54回日本心身医学会九州地方会 2015. 1月24日-25日. (北九州市)
6. Katafuchi, T. and Hossain, M.S. Role of Hippocampal ether-type glycerophospholipids, plasmalogens, in neurodegenerative diseases. Symposiumu 3: Therapeutic interventions in neuroimmunological diseases. The 9th Congress of the International Society for Neuroimmunomodulation. Abstract book p. 33, 2014. September 25-27. (Liege, BELGIUM)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 学習記憶能力増強剤
 発明者: 三明清隆、琴浦聡、片淵俊彦、シャミン ホセイン
 権利者: 出願人丸大食品株式会社. 国立大学法人九州大学
 種類: 特願 2015-92999
 番号: 03652014JP
 出願年月日: 平成27年4月30日
 国内外の別: 国際特許分類 A23L 1/313

取得状況(計 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
 片淵 俊彦 (KATAFUCHI TOSHIHIKO)
 九州大学・医学研究院・教授
 研究者番号: 80177401

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号:

(4)研究協力者 ()