

神経幹細胞の増殖分化に対する高度不飽和脂肪酸の効果

大 隅 典 子

東北大学大学院医学系研究科 教授

緒 言

神経新生は現在、世界中の研究者から注目が集まっており、その分子機構としては、転写制御因子や分泌因子を中心に解析が為されてきたが、栄養的な観点からの研究はほとんど行われていない。必須脂肪酸である n-3 系、n-6 系の高度不飽和脂肪酸 (PUFA) は特に脳に多く存在しており、その機能に深く関わっているといわれている。大部分の神経細胞は胎生期に作られるが、海馬歯状回および側脳室下帯には神経幹細胞が生後においても存在しており、神経細胞の産生、すなわち神経新生が起り続ける。近年、生後の神経新生の低下がうつ病や統合失調症等に関係する可能性が指摘されている。また、PUFA の一種であるドコサヘキサエン酸 (DHA) が海馬歯状回での神経新生に関与しているという報告がなされた (Kawakita *et al.* 2006)。我々はこれまで、脳の発生・発達に重要な転写因子 Pax6 の機能についての研究を行ってきたが、その過程において Pax6 が胎生期および生後海馬での神経幹細胞の増殖と分化を制御することを見出した (Maekawa *et al.* 2005; Osumi *et al.* 2008)。また、Pax6 はラット終脳において、脂肪酸結合タンパク質 Fabp7 の発現を制御し、胎生期の神経幹細胞を未分化状態に維持している (Arai *et al.* 2005) ことから、脂肪酸結合タンパク質 (Fabp) の機能に着目した。すでに我々は Fabp7 が海馬の神経新生に重要であることを報告し (Watanabe *et al.* 2007)、また、Fabp7 が統合失調症の発症リスクに関わることも明らかにした (Watanabe *et al.* 2007)。一方、野生型ラットおよび神経新生が低下している *rSey*²/*+*ラットに、生後まもなくから母獣を介してアラキドン酸 (ARA) を投与し、海馬の神経新生を解析したところ、どちらの系統においても細胞増殖が亢進することが確認された。さらに、富山大学の井ノ口研究室との共同研究によって、ARA 投与の *rSey*²/*+*ラットではプレパルス抑制 (統合失調症、自閉症等精神疾患の生物学的指標の一つ) の低下が改善されることがわかった

(Maekawa *et al.* 2009)。以上のような背景をふまえ、本研究ではとくに脳に豊富な脂肪酸に着目することにより、神経幹細胞に対する影響を詳細に検討した。

実験方法

胎生 16.5 日目のラット胚の脳を切り出し、マイクロ剪刀を用いて大脳皮質原基を取り出し、ピペッティングにより細胞を解離させた。この細胞を塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、上皮増殖因子 (EGF) を添加した無血清培地で培養し、一次ニューロスフェアを形成させた。以下の実験においては、この一次ニューロスフェアと、継代を 2 回繰り返した三次ニューロスフェアを用い、それぞれを、神経細胞の産生が多い neurogenic な神経幹細胞、グリア細胞の産生が多い gliogenic な神経幹細胞とみなして実験を行った。

ARA および DHA が神経幹細胞の増殖能に与える影響を評価するため、一次もしくは三次ニューロスフェアを再び解離させ、 2.0×10^3 cells/well となるように 96 穴プレートに播いた。ここで種々の濃度の ARA または DHA を添加し、7 日間培養し、1 ウェルあたりの直径 50mm 以上の二次または四次ニューロスフェア数を定量した。

また、ARA および DHA が神経幹細胞の分化能に与える影響を評価するため、一次または三次ニューロスフェアを再び解離させ、 5.3×10^4 cells/cm² となるようにポリ-L-オルニチンおよびラミニンでコートしたチャンバースライドに播き、bFGF および EGF は添加せず、分化を誘導した。ここで種々の濃度の ARA または DHA を添加し、4 日間培養し、抗 β 3-tubulin 抗体および抗 GFAP 抗体を用いて免疫染色を行い、それぞれニューロンおよびアストロサイトの割合を定量した。

結 果

1. 一次ニューロスフェアの増殖に対するARAおよびDHAの効果

10⁻⁷ および 10⁻⁶ M の ARA 添加によって、二次ニューロスフェアの数が有意に増加し、10⁻⁴ M の ARA 添加によって、二次ニューロスフェアの数が有意に減少した (図 1)。また、10⁻⁷ M の DHA 添加によって、二次ニューロスフェアの数が有意に増加し、10⁻⁶ および 10⁻⁵ M の DHA 添加によって、二次ニューロスフェアの数が有意に減少することが分かった (図 1)。このことから、ARA および DHA は neurogenic な神経幹細胞の増殖能を亢進することができる一方、高濃度では毒性を示すことが示唆された。

2. 三次ニューロスフェアの増殖に対するARAおよびDHAの効果

10⁻⁶ ~ 10⁻⁴ M の ARA 添加によって、四次ニューロスフェアの数が有意に減少した (図 2)。また、10⁻¹⁰ ~ 10⁻⁸ M の DHA 添加によって、四次ニューロスフェアの数が有意に増加し、10⁻⁶ および 10⁻⁵ M の DHA 添加によって、四次ニューロスフェアの数が有意に減少することが分かった (図 2)。このことから、DHA は gliogenic な神経幹細胞の増殖能も

亢進できることが示唆された。

3. 一次ニューロスフェアの分化に対するARAおよびDHAの効果

10⁻⁹ ~ 10⁻⁵ M の ARA 添加によって、β 3-tubulin 陽性細胞および GFAP 陽性細胞の割合に有意な差は認められなかった。また、同様に 10⁻⁹ ~ 10⁻⁵ M の DHA 添加によっても β 3-tubulin 陽性細胞および GFAP 陽性細胞の割合に有意な差は認められなかった。このことから、ARA および DHA は neurogenic な神経幹細胞の分化には効果を示さないことが示唆された。

4. 三次ニューロスフェアの分化に対するARAおよびDHAの効果

10⁻⁵ M の ARA 添加によって、GFAP 陽性細胞の割合が有意に増加した。一方、10⁻⁹ ~ 10⁻⁵ M の ARA 添加によつては、β3-tubulin 陽性細胞の割合に有意な差は認められなかった (図 3)。また、10⁻⁷ M の DHA 添加によって、β 3-tubulin 陽性細胞の割合が有意に増加した。一方、10⁻⁹ ~ 10⁻⁵ M の DHA 添加によつては、GFAP 陽性細胞の割合に有意な差は認められなかった (図 4)。このことから、ARA は gliogenic な神経幹細胞のアストロサイ

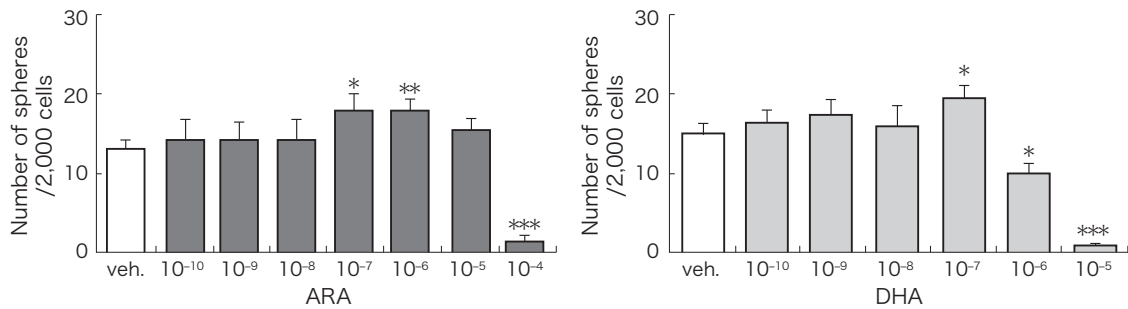


図 1 一次ニューロスフェアの増殖に対する ARA および DHA の効果

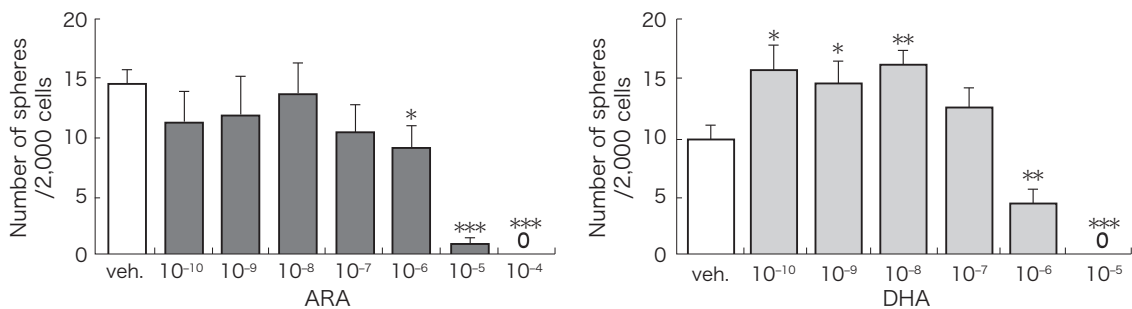


図 2 三次ニューロスフェアの増殖に対する ARA および DHA の効果

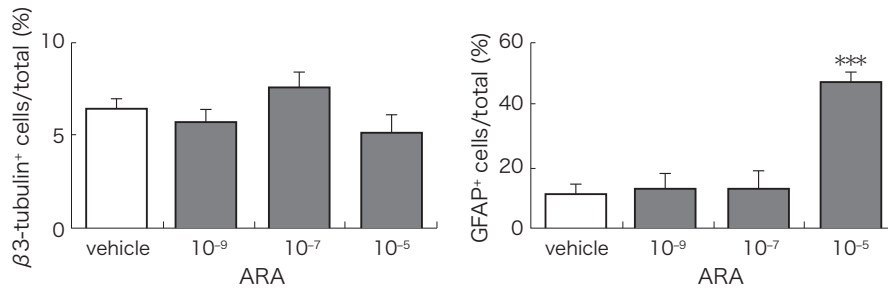


図3 三次ニューロスフェアの分化に対する ARA の効果

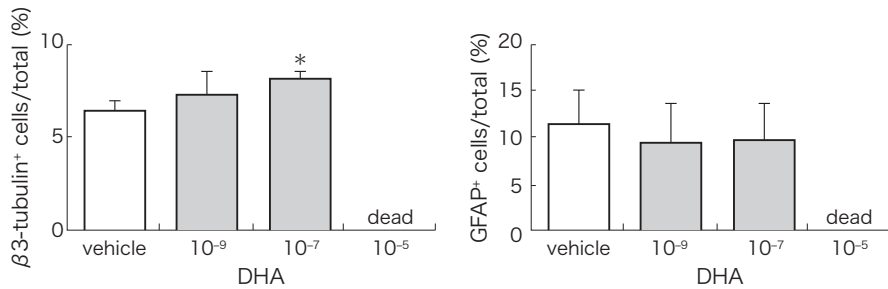


図4 三次ニューロスフェアの分化に対する DHA の効果

ト分化を亢進し、DHA は gliogenic な神経幹細胞のニューロン分化を亢進することが示唆された。

考 察

ラット胎児由来神経幹細胞のニューロスフェア培養系を用いた本研究により、脳に多量に含まれる ARA および DHA が神経幹細胞の増殖および分化において重要な働きをすることが示された。井ノ口らによる、神経新生の低下とマウス PTSD モデル (Kitamura *et al.*, 2009) や、Hibbeln らの n-3 系脂肪酸のうつや自殺に対する効果 (Hibbeln, 2009) 等、他の研究結果も合わせると、神経新生の低下に起因する可能性が指摘される精神症状 (うつ、統合失調症、PTSD 等) に関して、ARA や DHA などの栄養素を用いてその予防や改善を行い、健やかな脳の発達や維持に貢献しうる可能性がさらに強く示唆された。今後、例えばヒト iPS 細胞から、あるいは直接に誘導した神経幹細胞を用いることにより、脂肪酸が神経新生に与える効果のメカニズムを詳細に明らかにしていくことが必要である。

要 約

ラット胎児由来神経幹細胞のニューロスフェア培養系を用いたアッセイにより、ARA および DHA が神経幹細胞の増殖と分化に対して、それぞれ異なる効果があることがわかった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、文部科学省科学研究費および公益財団法人三島海雲記念財団のご支援を頂きましたことを感謝申し上げます。

参考文献・引用文献

- 1) Arai, Y., et al.: *J Neurosci.* 25, 9752-9761, 2005.
- 2) Maekawa, M., et al.: *Genes Cells.* 10, 1001-1014, 2005.
- 3) Kawakita, E., et al.: *Neuroscience.* 139, 991-997, 2006.
- 4) Watanabe, A., et al.: *PLoS Biol.* 5, e297, 2007.
- 5) Osumi, N., et al.: *Stem Cells.* 26, 1663-1672, 2008.
- 6) Maekawa, M., et al.: *PLoS ONE.* 4, e5085, 2009.
- 7) Hibbeln, J.R.: *World Rev Nutr Diet.* 99, 17-30, 2009.
- 8) Kitamura, T., et al.: *Cell.* 139, 814-827, 2009.
- 9) Sakayori, N., et al.: *Genes Cells.* 16, 778-790, 2011.