

岩手医科大学  
審査学位論文  
(博士)

## 大脳皮質神経培養における, ドコサヘキサエン酸添加による 軸索伸長効果及びその分子メカニズム

三田俊成<sup>1), 2)</sup>

<sup>1)</sup> 岩手医科大学医歯薬総合研究所, 神経科学研究部門

<sup>2)</sup> 岩手医科大学医学部, 神経精神科学講座

(Received on December 11, 2015 & Accepted on December 29, 2015)

### 要旨

多価不飽和脂肪酸は, 不飽和結合を2つ以上もつ脂肪酸で, その一つであるドコサヘキサエン酸 (Docosahexaenoic acid, 以下略 DHA) は n-3 多価不飽和脂肪酸に分類される. DHA は, 心筋, 精子, 血液細胞にも分布しているが, とりわけ神経系に多く存在する. 脳において DHA は, 神経細胞の細胞膜リン脂質の主要な成分であり, 軸索伸長に関与している

との報告があるが, その分子メカニズムはいまだ明らかでない. 本研究は, ラット初代神経培養細胞を用いその分子メカニズムを明らかにすることを目的とした. ラット神経培養細胞に DHA 添加した結果, DHA 投与にて軸索長が有意に延長すること, そのメカニズムの一つとして Akt と p70 S6 Kinase の活性化を介して軸索伸長を来たすことを明らかにした.

**Key words :** *Docosahexaenoic acid, Cortical neuron primary culture, rapamycin, axon outgrowth, p70 S6 Kinase*

### I. 緒 言

多価不飽和脂肪酸は, 不飽和結合を2つ以上もつ脂肪酸である. その一つであるドコサヘキサエン酸 (Docosahexaenoic acid, 以下略 DHA) は n-3 多価不飽和脂肪酸に分類される. DHA はヒトを含む多くの動物の体内にて  $\alpha$ -リノレン酸から生合成されるが, 変換される割合はわずかであり<sup>1)</sup>, かつ  $\alpha$ -リノレン酸も必須脂肪酸であるため, DHA は食物やサプリメントより摂取する必要がある.

DHA は, 心筋, 精子, 血液細胞にも存在しているが, とりわけ神経系に多い. 脳においては, DHA は神経細胞の細胞膜リン脂質の主要成分であり, 細胞膜の流動性を亢進することで, 軸索突起伸長<sup>2, 3)</sup> といった神経発達過程に関与していると考えられてきた. ヒトで最も神経発

達が盛んな時期は生後1年であるが, この時期に脳での DHA 含有量が増加していることが報告されている<sup>4)</sup>. さらに, 近年, 神経発達期のみならず, 脳保護作用効果からアルツハイマー型認知症の予防効果を認めること<sup>5, 6)</sup>, またうつ病患者において血中 DHA 量の減少を認める報告<sup>7)</sup> や, DHA あるいはエイコサペンタエン酸投与でうつ病が軽減するなどの報告<sup>8, 9)</sup> があり, 精神疾患との関連性が指摘されている.

前述のように DHA は神経発達, とくに軸索伸長に関与しているが, その分子メカニズムはいまだ明らかになっていない. そこで本研究では, ラット初代神経培養細胞を用いそのメカニズムを明らかにすることを目的とする.

## II. 研究材料および方法

### 1. 大脳皮質神経細胞初代培養

wistar ラット (日本 SLC, 静岡) 胎生 18.5 日目における大脳皮質を用いた。大脳皮質を採取後, 0.025% trypsin (T4549, Sigma-aldrich, USA) 溶液にて 7 分間 37°C で処理し, ピペッティングで単一細胞に分離した。その後, Poly-L-lysine hydrobromide (P2636, Sigma-aldrich, USA) にてコーティングしたカバーガラス上に  $1.0 \times 10^4$  細胞/cm<sup>2</sup> の密度で細胞を播種した。培地はラットアストログリア細胞で一晩培養した 1 mM ピルビン酸, 0.6% グルコース, 2% B27 supplement (Life technologies, USA) 含む MEM 培養液 (Life technologies, USA) を用いて, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。尚, 本研究は岩手医科大学動物実験指針に基づいた実験計画を申請し承認を得ている。

### 2. 薬剤処理

DHA による影響を検討するため, 神経細胞初代培養に 1  $\mu$ M DHA (ENZO, USA) を添加した。尚, DHA の酸化を防止するため 1  $\mu$ M Vitamine E (DL- $\alpha$ -tocopherol acetate, Sigma-aldrich, USA) も添加している。rapamycin (MERCK, USA) は培養開始時より添加し, 対照群として触媒であるジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide, 以下略 DMSO) を添加した。

### 3. western blot

細胞を SDS サンプルバッファーにて可溶化し, 95°C, 5 分間処理後, 超音波破碎し SDS サンプルとした。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により各蛋白質を分離し, Immobilion-P Transfer Membrane (Millipore, USA) に転写した。5% スキムミルク TBS-T によって 1 時間室温でブロッキングした後, 1 次抗体を 4°C で一晩反応させた。使用した 1 次抗体は, 抗 GAPDH 抗体 (マウス, M171-3 MBL, 名古屋), 抗  $\beta$ -actin 抗体 (マウス, A5441, Sigma-aldrich, USA), 抗 Neuronal Class III  $\beta$ -Tubulin (TUJ1) 抗体 (マウス, MMS-

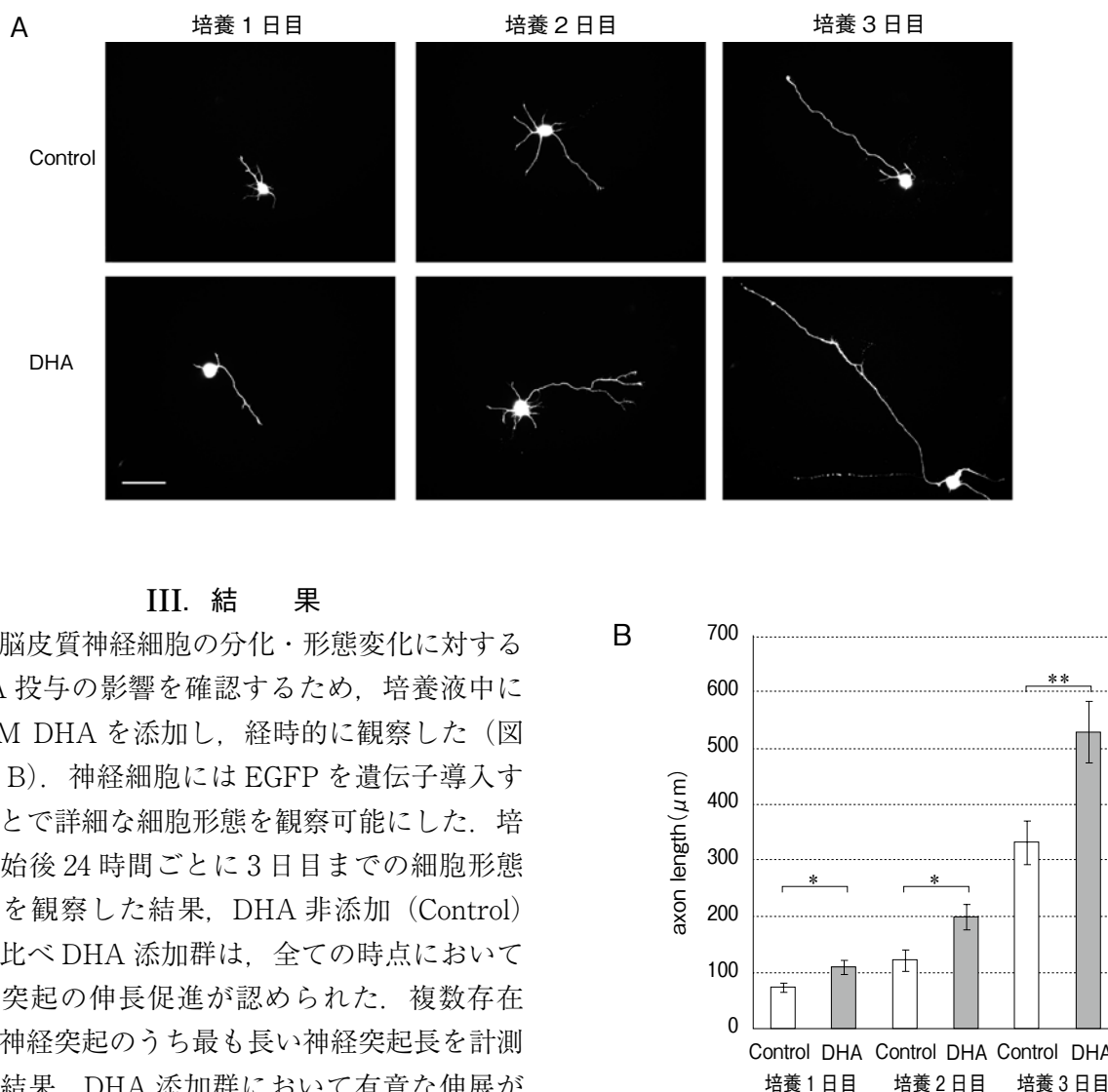
435P, COVANCE, USA), 抗 Akt1 (c-20) 抗体 (ヤギ, sc-1618, Santa cruz Biotechnology, USA), 抗リン酸化 Akt (Ser473) 抗体 (ウサギ, #4060, Cell signaling technology, USA), 抗 p70 S6 kinase  $\alpha$  抗体 (C-18) (ウサギ, sc-230, Santa Cruz Biotechnology, USA), 抗リン酸化 p70 S6 Kinase (Thr421/Ser424) 抗体 (ウサギ, #9204, Cell signaling technology, USA) である。尚, 全ての一次抗体は Can Get Signal (東洋紡, 大阪) にて希釈して用いた。その後, 2 次抗体を 1 時間室温で反応させた。2 次抗体として, 1 次抗体に対応した horseradish peroxidase 標識した抗マウス抗体 (GE Healthcare, USA), 抗ウサギ抗体 (GE Healthcare, USA), 抗ヤギ抗体 (Santa Cruz Biotechnology, USA) を使用した。検出は Clarity Western ECL Substrate (BIO-RAD, USA) を用いた化学発光法を用いた。

### 4. 遺伝子導入

培養開始時にリン酸カルシウム沈殿法による遺伝子導入を行った<sup>10)</sup>。発現ベクターとして, Enhanced Green Fluorescent Protein (以下 EGFP と略) あるいは活性変異型の S6 Kinase を組み込んだ pCAGGS ベクターを用いた。尚, 活性変異型 S6 Kinase としては, C 末端側を欠失させ, さらに 389 番目のスレオニンをグルタミン酸に置換した恒常活性化型 p70 S6 Kinase (以下 CA-S6K と略), 229 番目のスレオニンをアラニンに置換した不活性型 p70 S6 Kinase (以下 DN-S6K と略) を用いた。活性変異型 p70 S6 Kinase 発現ベクター, あるいは発現遺伝子の組み込まれていない pCAGGS ベクターを対照として EGFP 発現ベクターと共に導入し, EGFP の蛍光によって検出を行った。

### 5. 画像解析

神経細胞の観察には, HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 (KEYENCE, 大阪) を使用し撮影を行い, 軸索長の計測は ImageJ (NIH, USA) を使用した。



### III. 結 果

大脳皮質神経細胞の分化・形態変化に対するDHA投与の影響を確認するため、培養液中に1 μM DHAを添加し、経時的に観察した(図1A, B)。神経細胞にはEGFPを遺伝子導入することで詳細な細胞形態を観察可能にした。培養開始後24時間ごとに3日目までの細胞形態変化を観察した結果、DHA非添加(Control)群に比べDHA添加群は、全ての時点において神経突起の伸長促進が認められた。複数存在する神経突起のうち最も長い神経突起長を計測した結果、DHA添加群において有意な伸長が認められた(図1, 培養1日目 - DHA添加群:  $111.1 \pm 12.7 \mu\text{m}$ ,  $n=22$ , DHA非添加群:  $74.7 \pm 8.1 \mu\text{m}$ ,  $n=23$ ,  $p<0.05$ 。培養2日目 - DHA添加群:  $199.2 \pm 22.9 \mu\text{m}$ ,  $n=22$ , DHA非添加群:  $123.3 \pm 19.2 \mu\text{m}$ ,  $n=21$ ,  $p<0.05$ 。培養3日目 - DHA添加群:  $530.0 \pm 56.5 \mu\text{m}$ ,  $n=26$ , DHA非添加群:  $332.2 \pm 37.2 \mu\text{m}$ ,  $n=27$ ,  $p<0.01$ , mean  $\pm$  SEM)。軸索のマーカであるTau蛋白質(Tau1)、樹状突起のマーカであるMAP2蛋白質に対する免疫染色により、今回突起長の測定を行った最も長い神経突起は培養3日目には軸索へと分化していることを確認している。また、EGFP同様にDHAによる軸索伸長効果を認めた(data not shown)。

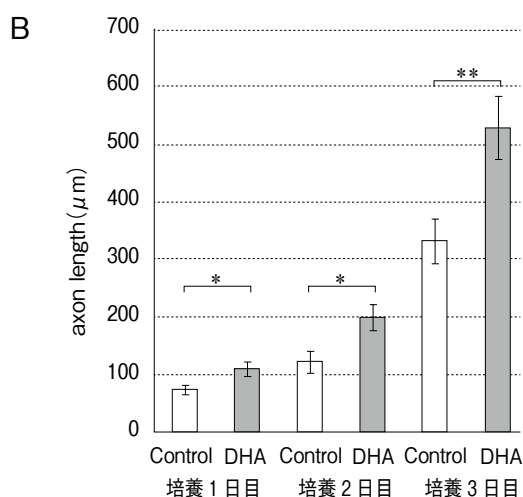


図1. DHA添加による大脳皮質神経軸索伸長の経時的变化。

A: 培養開始時よりEGFPを遺伝子導入し培養1日目, 2日目, 3日目に観察。Control (DHA非添加)群(上段), DHA群(下段)。スケールバー: 50 μm。

B: EGFP遺伝子導入神経細胞の軸索長を計測。統計解析はStudent's t-testを用いた。(\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ )

そこで、DHA添加により軸索長が亢進するメカニズムを検討するため、培養3日目の神経細胞を用い、軸索伸長に関連する蛋白質を中心に発現量及び活性化状態について検討した。その結果、Akt1及びp70 S6 Kinaseにおいて蛋白質の発現量には変化を認めなかった。一方で、

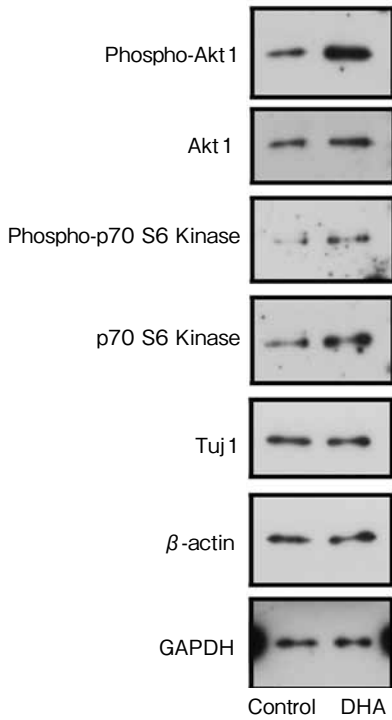


図2. DHA 添加による蛋白質質量変化を western blotting 法にて検討した。

Akt 及び p70 S6 Kinase のいずれも、DHA 添加群で顕著なリン酸化レベルの亢進を認めた (図2)。Akt は細胞の生存に密接に関わる他に神経細胞の極性分化、神経突起の伸長に重要な働きを担う。また、p70 S6 Kinase は Akt/mTOR/S6K 経路により活性化され、翻訳調節によるタンパク質合成に深く関与する。Akt の 473 番目のセリン残基および p70 S6 Kinase の 421 番目スレオニン / 424 番目セリン残基のリン酸化はいずれも活性化に関わる修飾であることが知られていることから、神経突起伸長期の神経細胞において DHA 投与により Akt お

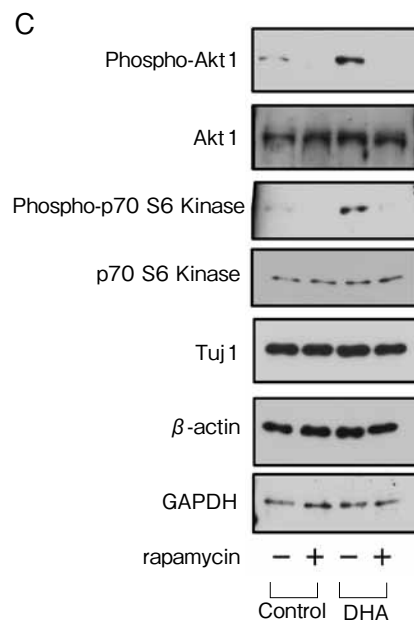
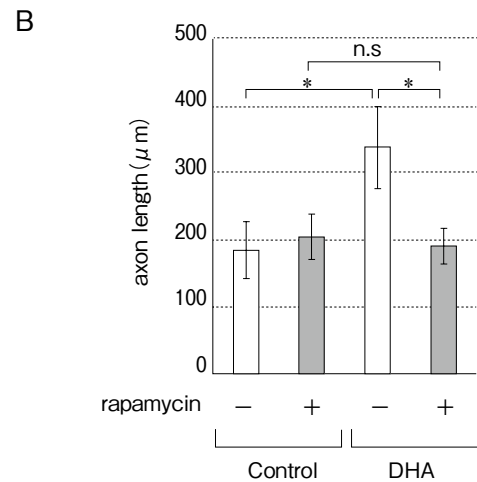
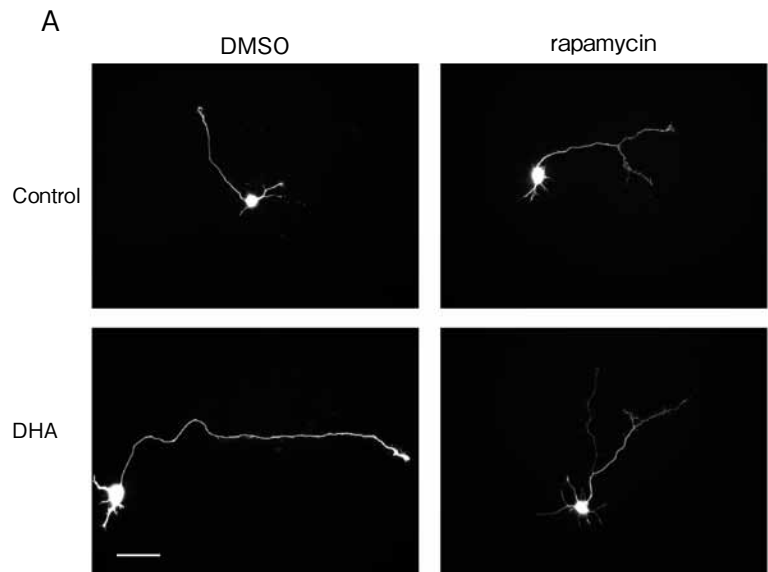


図3. rapamycin による軸索伸長変化。培養開始時より EGFP を遺伝子導入し培養3日目に観察。

A: Control (DHA 非添加) 群 (上段), DHA 群 (下段). rapamycin 非添加群 (左側), 添加群 (右側). スケールバー: 50 μm.

B: 神経細胞の軸索長計測. 統計解析は Student's t-test を用いた. (\* $p < 0.05$ .)

C: rapamycin 添加による蛋白質質量変化を western blotting 法にて検討した。

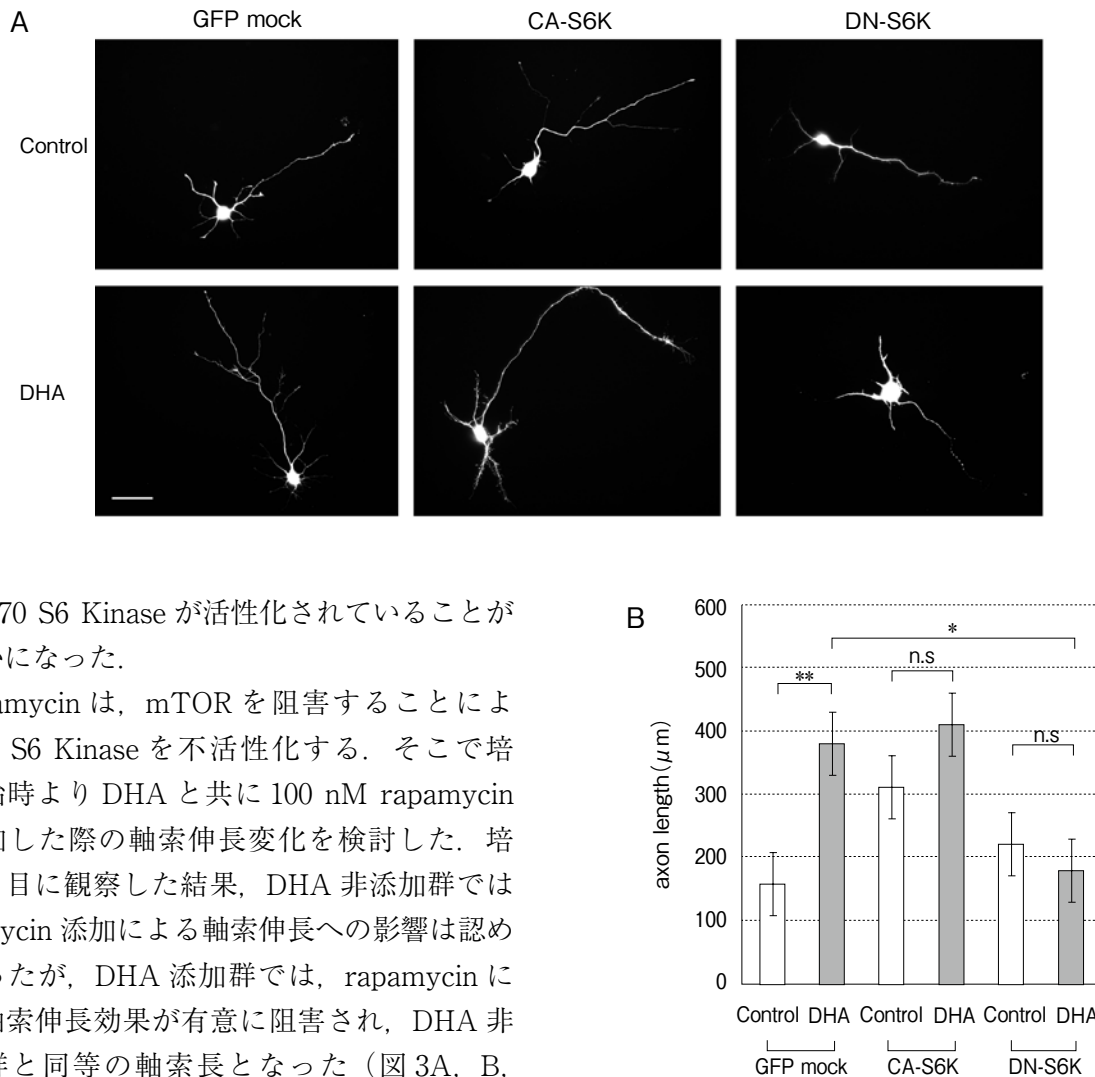


図4. 活性化型 p70 S6 Kinase (CA-S6K), 不活性化型 p70 S6 Kinase (DN-S6K) 遺伝子導入による軸索伸長変化を培養3日目に観察。

A: Control (DHA非添加)群(上段), DHA群(下段). EGFP遺伝子導入群 (GFP-mock; 左側), CA-S6K遺伝子導入群 (中側), DN-S6K遺伝子導入群 (右側). スケールバー: 50 μm.

B: 神経細胞の軸索長計測. 統計解析は Student's t-test を用いた. (\*p<0.05, \*\*p<0.01)

よび p70 S6 Kinase が活性化されていることが明らかになった。

rapamycin は, mTOR を阻害することにより p70 S6 Kinase を不活性化する. そこで培養開始時より DHA と共に 100 nM rapamycin を添加した際の軸索伸長変化を検討した. 培養3日目に観察した結果, DHA 非添加群では rapamycin 添加による軸索伸長への影響は認めなかったが, DHA 添加群では, rapamycin による軸索伸長効果が有意に阻害され, DHA 非添加群と同等の軸索長となった (図3A, B, DHA 非添加 - rapamycin 非添加群:  $184.8 \pm 42.5 \mu\text{m}$ ,  $n=18$ , DHA 非添加 - rapamycin 添加群:  $204.8 \pm 33.5 \mu\text{m}$ ,  $n=19$ , n.s. DHA 添加 - rapamycin 非添加群:  $337.9 \pm 60.7 \mu\text{m}$ ,  $n=14$ , DHA 添加 - rapamycin 添加群:  $190.3 \pm 26.8 \mu\text{m}$ ,  $n=21$ ,  $p<0.05$ . mean  $\pm$  SEM). また, 蛋白質発現量を検討した結果, rapamycin 添加は DHA 添加による p70 S6 Kinase 及び Akt1 のリン酸化による活性化を阻害することを確認した (図3C).

次に, DHA による軸索伸長促進効果に p70 S6 Kinase が関与している事を検討するため, 神経細胞に EGFP と活性化型 p70 S6 Kinase (CA-S6K) もしくは不活性化型 p70 S6 Kinase (DN-S6K) を共発現させ, 培養3日目に観察し

た. CA-S6K を発現した神経細胞では有意差水準を満たさなかったが, DHA 非添加群においても伸長傾向を認めた ( $p=0.06$ ). 一方で, DN-S6K を発現した神経細胞においては, DHA 添加による軸索伸長効果の阻害が確認された ( $p<0.05$ ). (図4A, B, DHA 非添加 - GFP-mock

群：158.5 ± 28.0 μm, n=15, DHA 非添加 - CA-S6K 群：310.3 ± 91.8 μm, n=6, DHA 非添加 - DN-S6k 群：222.7 ± 65.2 μm, n=16, DHA 添加 - GFP-mock 群：378.8 ± 63.7 μm, n=19, DHA 添加 - CA-S6K 群：410.1 ± 84.9 μm, n=9, DHA 添加 - DN-S6K 群：180.0 ± 85.6 μm, n=16, mean ± SEM). これらの結果より, DHA 添加による Akt-S6 Kinase 経路の活性化が軸索伸長に重要であることが示唆された.

#### IV. 考 察

本研究では, 神経細胞に DHA を添加した際, p70 S6 Kinase のリン酸化による活性化を介して, 軸索伸長を認めることを明らかにした. これまで培養神経細胞を用いて, DHA による神経細胞軸索伸長の効果を報告した論文は 2 報存在する. CaO らは 25 μM DHA 添加にて<sup>2)</sup>, Calderon らはそれを大きく下回る 1.5 μM DHA 濃度の添加にて軸索伸長効果を認めたと報告している<sup>3)</sup>. 本研究では, Calderon らと同様に比較的低濃度である 1 μM DHA にて軸索伸長効果を確認した.

種々の神経細胞がシナプスを作り, 神経回路網が形成されることで脳は高度な処理が可能となる. この神経回路網形成にあたり, 神経細胞が適切な時期に極性決定を行い, 標的細胞に向かって軸索伸長することは必要不可欠である. この極性決定および軸索伸長過程のメカニズムはこれまで解析され, 多数の因子が報告されている. 極性決定のメカニズムの一つとして, 森田らは<sup>11)</sup>, 本研究においても同定された蛋白質である p70 S6 Kinase に注目している. p70 S6 Kinase が神経細胞の軸索特異的に存在する微小管関連蛋白質の Tau や, 極性決定に重要な役割を担う Collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) の発現量を調節し極性決定することを報告している. また極性決定後は, 軸索伸長の開始となるが, 軸索伸長を促進もしくは抑制するもの(細胞接着分子や細胞間基質

蛋白質の様に細胞表面や細胞間で軸索の足場としての情報を伝える短距離作動性因子), 軸索を誘引もしくは反発するもの(分泌された細胞から拡散して勾配を形成し軸索の伸長を制御する遠距離作動性因子)が関与し適切な標的神経細胞に誘導され, 神経回路網が形成される<sup>12)</sup>. 今回発現変化を確認した Akt は軸索の成長円錐に存在し, 軸索伸長に関与していることはすでに報告されている<sup>13)</sup>. また, p70 S6 Kinase はその Akt の下流のシグナル伝達蛋白質である<sup>14)</sup>. 尚, DHA による Akt 活性の調節においても報告されている<sup>15)</sup>が, その直接的な発現調節メカニズムは未だ解明されていない.

注意欠陥多動性障害 (ADHD) は, 不注意, 多動性, 衝動性を主症状とし, 生物学的要因が基盤となって発現すると考えられる発達障害であるが, この生物学的要因の一つとして, 神経回路網形成異常が考えられている. これらは MRI による画像解析による形態解析<sup>16)</sup>や網羅的遺伝子解析による同定遺伝子の機能計測等<sup>17)</sup>, さまざまな方面から検証, 報告されている. 実際に, 健常乳児を対象としたプラセボコントロール試験において, 乳児期に DHA を強化したミルクを与えた群で, ベイリー乳幼児発達テスト試験成績が有意に高く, かつ fMRI にて腹側前頭前野における脳血流活性化が認められたと報告している<sup>18)</sup>. また, ADHD 患児に対し, DHA とエイコサペンタエン酸を 4 ヶ月にわたり投与したプラセボコントロール試験においては, 書字能力, 注意, 過活動性, 認知機能問題の改善, 反挑戦性の減少を認めた<sup>19)</sup>. これらは DHA による神経回路網の強化を示唆するものであり, 本研究での軸索伸長効果が関与している可能性も考えられる.

本研究では, DHA が軸索伸長に与える影響を解析しメカニズムの一つを解明した. しかしながら, Akt および p70 S6 Kinase 以外のシグナル経路も存在する可能性がある. これらメカニズムを明らかにしていくことは, 将来的には

ADHD, うつ病をはじめとする精神疾患に対する治療に応用できる可能性が期待される。

稿を終えるにあたり, 本研究の機会を与えていただき, 御指導・御校閲を賜りました岩手医科大学医学部神経精神科学講座・酒井明夫教授と岩手医科大学医歯薬総合研究所神経科学研究部門・祖父江憲治教授に深く御礼申し上げます。

また, 本研究に際し, 一貫して熱心な御指導とご協力を賜りました岩手医科大学医学部神経精神科学講座・福本健太郎先生, 吉田智之先生, 岩手医科大学医歯薬総合研究所神経科学研究部門・真柳平先生, 一条宏先生に心から御礼申し上げます。

利益相反: 著者には開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) 岡田 斉, 萩谷久美子, 石原俊一, 他: Omega-3 多価不飽和脂肪酸の摂取とうつを中心とした精神的健康との関連性について探索的検討 - 最近の研究動向のレビューを中心に]. 人間科学研究 **30**, 87-96, 2008.
- 2) **Cao D, Xue R, Xu J, et al.**: Effects of docosahexaenoic acid on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures. *J Nutr Biochem* **16**, 538-546, 2008.
- 3) **Calderon F and Kim HY**: Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J Neurochem* **90**, 979-988, 2004.
- 4) **Martinez M**: Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr* **120**, S129-S138, 1992.
- 5) **Jicha GA and Markesbery WR**: Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* **7**, 45-61, 2010.
- 6) **Boudrault C, Bazinet RP and Ma DW**: Experimental models and mechanisms underlying the protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* **20**, 1-10, 2009.
- 7) **Lin PY, Huang SY and Su KP**: A meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in patients with depression. *Biol Psychiatry* **68**, 140-147, 2010.
- 8) **Krishnan KR**: Fish oil, blood vessels, and depression. *Biol Psychiatry* **68**, 116-117, 2010.
- 9) **Su KP**: Biological mechanism of antidepressant effect of omega-3 fatty acids: how does fish oil act as a 'mind-body interface'? *Neurosignals* **17**, 144-152, 2009.
- 10) **Jiang M and Chen G**: High Ca<sup>2+</sup>-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. *Nat Protoc* **1**, 695-700, 2006.
- 11) **Morita T and Sobue K**: Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway. *J Biol Chem* **284**, 27734-27745, 2009.
- 12) **Tessier-Lavigne M and Goodman CS**: The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-1133, 1996.
- 13) **Read DE and Gorman AM**: Involvement of Akt in neurite outgrowth. *Cell Mol Life Sci* **66**, 2975-2984, 2009.
- 14) **Maiese K**: Driving neural regeneration through the mammalian target of rapamycin. *Neural Regen Res* **9**, 1413-1417, 2014.
- 15) **Akbar M, Calderon F, Wen Z, et al.**: Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 10858-10863, 2005.
- 16) **van Ewijk H, Heslenfeld DJ, Zwiers MP, et al.**: Diffusion tensor imaging in attention deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev* **36**, 1093-1106, 2012.
- 17) **Poelmans G, Pauls DL, Buitelaar JK, et al.**: Integrated genome-wide association study findings: identification of a neurodevelopmental network for attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* **168**, 365-377, 2011.
- 18) **McNamara RK, Able J, Jandacek R, et al.**: Docosahexaenoic acid supplementation increases prefrontal cortex activation during sustained attention in healthy boys: a placebo-controlled, dose-ranging, functional magnetic resonance imaging study. *Am J Clinutr* **91**, 1060-1067, 2010.
- 19) **Milte CM, Parletta N, Buckley JD, et al.**: Increased Erythrocyte Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Are Associated With Improved Attention and Behavior in Children With ADHD in a Randomized Controlled Three-Way Crossover Trial. *J Atten Disord* 2013. [Epub ahead of print]



## The mechanism underlying docosahexaenoic acid induced axon outgrowth of cortical neurons

Toshinari MITA<sup>1), 2)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Neuroscience, Institute of Biomedical Sciences,  
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

<sup>2)</sup> Department of Neuropsychiatry, School of Medicine,  
Iwate Medical University, Morioka, Japan

*(Received on December 11, 2015 & Accepted on December 29, 2015)*

---

### Abstract

Polyunsaturated fatty acids are fatty acids with two or more unsaturated bonds. Docosahexaenoic acid (DHA) is one of them, and is classified as an n-3 polyunsaturated fatty acid. DHA in the brain is a major component of phospholipids in the cell membrane of neurons. It has been reported that DHA exhibits a neurite extension effect, although its molecular mechanism remains unclear. This study

seeks to clarify the molecular mechanism underlying DHA-induced axon outgrowth by using rat primary neurons in cultures. During the administration of DHA, axons were significantly extended in all culture days. It was also found that phosphorylated Akt and phosphorylated p70 S6 Kinase are closely involved in axonal outgrowth with DHA treatment.

---