授与番号　甲第1663号

論文内容の要旨

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)

(岩手医学雑誌　平成27年4月掲載(予定))

Ⅰ．研究目的

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，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，神経発達，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．

Ⅱ．研究対象ならび方法

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，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大脳皮質神経細胞初代培養を行った．DHAが神経細胞に与える影響を検討するため，神経培養細胞に1μM DHA(ENZO, USA)を添加した．また，DHAがAkt/mTOR/S6K経路に与える影響を検討するため，rapamycin(MERCK, USA)を培養開始時より添加した．

軸索伸長にp70 S6 Kinaseが関与している事を検討するため，神経培養細胞に活性変異型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．各々に対し，蛍光顕微鏡を用いての観察と軸索長の測定，Western Blottingにおける蛋白質発現量を比較観察した．

Ⅲ．研究結果

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1μM DHAを添加し，経時的に観察した．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．

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が，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．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い，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蛋白質である．神経突起伸長期の神経細胞においてDHA投与によりAktおよび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100nM 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．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．

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もしくは不活性型p70 S6 Kinaseを共発現させ，培養3日目に観察した．活性化型p70 S6 Kinase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，不活性型p70 S6 Kinase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($p<0.05$)．

Ⅳ．結　　語

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とで，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．

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．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，またうつ病患者において血中DHA量の減少を認める報告や，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があり，DHAと精神疾患との関連性が指摘されている．

今回，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．

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者
主査　教授　　石垣　　泰　（内科学講座：糖尿病・代謝内科分野）
副査　副学長　祖父江　憲治（医歯薬総合研究所　神経科学研究部門）
副査　講師　　星　克仁　　（神経精神科学講座）

神経疾患の根本的治療が確立されていない中、神経細胞の修復、再生は大きな期待がよせられている分野である。本研究論文は、脂肪酸の一つであるドコサヘキサエン酸（DHA）の神経発達や軸索伸長における効果と分子メカニズムを検討したものである。提出者は初代培養ラット大脳皮質神経細胞を用いて、分化や形態変化に及ぼす培地に添加したDHAの影響をex vivoで検討した。その結果、DHA添加によって神経軸索突起の伸長を促進することが明らかになった。さらに遺伝子導入の手法を用いて、DHAの軸索伸長効果はAkt-S6kinaseの経路を介していることを明らかにした。すなわち、生体内に広く存在するDHAが神経細胞の伸長を促進していることを解明し、神経疾患に対する治療に応用できる可能性を示したといえる。

本論文は、DHAの神経細胞軸索伸長に及ぼす促進効果を科学的に検証した、学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

本研究で用いたDHA濃度の生理的妥当性や実験サンプル数、DHAの添加方法など具体的な質問に的確に返答した。また神経軸索伸長に対するS6kinaseの役割や本研究で得られた結果は細胞膜あるいは神経細胞質内におけるDHAが機能しているのかについても考察した。それぞれの質問に対して真摯に回答しており、学位に値する学識を有していると考える。

参考論文

1）統合失調症における自殺企図の特性：救急受診例に基づく検討（肥田篤彦、他8名と共著）
岩手医学雑誌，64巻、2号（2012）
２）Aripiprazole と valproate の併用が有効であった双極性感情障害の１例（水谷歩未　他9名と共著）
臨床精神薬理、16巻、7号（2013）
３）Predictors for delayed encephalopathy following acute carbon monoxide poisoning（急性一酸化炭素中毒後に生じる遅発性脳症の予測因子）（工藤薫　他12名と共著）
BMC Emergency Medicine、14巻、3号（2014）