

摂食による脳内脂質環境の変化が高次脳機能に与える影響

山本 由 似

山口大学大学院医学系研究科 学術研究員

(現 同大学院医学系研究科 助教)

緒 言

脂肪酸の摂取障害が神経機能や免疫機能など様々な生体機能に異常を引き起こすことは、栄養学的に古くから知られている。疫学調査から、統合失調症や双極性障害などの精神疾患と、血中不飽和脂肪酸の低下との相関が明らかになった。さらに、精神疾患患者死後脳での脂肪酸組成解析から、患者前頭皮質において多価不飽和脂肪酸(PUFA)の低下が報告されている。これを裏付けるように、PUFAが精神疾患に著効し、PUFAを含むサプリメントが数多く販売されている。しかしながら、PUFAの精神疾患への治療効果の分子機序については、ほとんど理解されていない。機能性食品としてPUFAの精神症状改善効果の医学的根拠の解明が急務である。不飽和結合を2つ以上有するPUFAの多くは、食餌からの摂取に依存する必須脂肪酸として知られている。生体膜リン脂質を構成している脂肪酸のPUFA含有率が高いほど流動性が増し、神経細胞においては情報伝達効率が高まる。統合失調症、双極性障害やうつ病など精神疾患において、脳内PUFAが低下していることが明らかになっている。しかし、これらの疫学データと精神疾患の関連を結ぶ分子や制御機構は不明である。

我々は、PUFAの認知機能を含めた高次脳機能に及ぼす影響と、その制御機構を解明する鍵として、脂肪酸結合タンパク質(FABP)に着目した。FABPは、水に不溶性脂肪酸や脂肪酸代謝物の細胞内取り込み・輸送・代謝の調節を介して、様々な細胞機能に関わっている。すなわち外来(食餌・循環血液)あるいは細胞自身に由来する脂肪酸が、機能を発揮するための制御分子である。中枢神経系において、グリア細胞特異的に発現するFABP7遺伝子の変異が、ヒト統合失調症患者の遺伝子スクリーニングの結果発見された¹⁾。一方FABP3は、生体内の神経細胞特異的に発現し、FABP3遺伝子欠損(KO)マウスでは、脂肪酸の脳への取り込みが減少していることが知られている²⁾。FABP3は、外界からの情

報統合を司る前部帯状皮質(ACC)に高発現している。ACC神経活動の認知機能や情動表出への関与は、多く報告されているが^{3,4)}、FABP3によって制御されるACC神経細胞内の脂質代謝変化と、ACCに関連する高次脳機能への影響について不明な点が多い。我々の研究グループは以前、線条体においてFABP3がコリン作動性介在神経やグルタミン酸作動性神経終末に発現し、アセチルコリンおよびグルタミン酸の開口放出を負に制御していることを明らかにした⁵⁾。これらの背景から、FABP3はACCにおける神経伝達物質の開口放出を制御し、ACCを含む神経回路の安定・維持に関与することで、認知や情動のような高次脳機能を制御しているという着想に至った。本研究では、FABP3 KOマウスを用いて、ACCでの神経伝達物質の放出にFABP3がいかに関与するのか、ACCを含む神経回路の維持にいかに関与するのかを明らかにし、FABP3の高次脳機能に及ぼす影響の解明を目指した。

方 法

野生型およびFABP3 KOマウスに対して、行動バッテリーとしてオープンフィールド試験、高架式十字迷路試験(不安様行動)、受動的回避試験(恐怖記憶)、新奇物体認識試験(認知機能)、尾懸垂試験、強制水泳試験(うつ様行動)を行った。

野生型マウスおよびFABP3 KOマウスから作成したACCのスライス標本に対して、ホールセルパッチクランプ法を適用し、微小興奮性シナプス後電流(mEPSC)と微小抑制性シナプス後電流(mIPSC)を測定した。テトロドトキシン(ナトリウムチャネル阻害剤)存在下で、FABP3 KOマウスのACC第II/III層の錐体細胞からmEPSCとmIPSCを記録した。テトロドトキシンを灌流適用することで、電位依存性ナトリウムチャネルを選択的に阻害し、活動電位の発生を抑え、活動電位によらずプレシナプスから自然放出したグルタミン酸、もし

くはGABAによって発生した微小シナプス後電流をそれぞれ記録した。

ACC内でのFABP3の発現を明らかにするため、野生型マウスの凍結切片を作製し、FABP3抗体と各神経マーカー抗体との蛍光二重染色を行った。また、ACCをパンチアウトし作製した試料を用いて、シナプス応答に関わるタンパク質発現やリン酸化反応をウェスタンブロット法やリアルタイム定量PCR法を用いて解析した。ACC内のグルタミン酸遊離量は、*in vivo*マイクロダイアリシス法により解析した。あらかじめACCに透析プローブを挿入し、リンゲル液を灌流することによって無麻酔・自由行動下でグルタミン酸を回収し、HPLC/電気化学検出器システム (Eicom) にて測定した。ACC内のGABA濃度は、GABA Research ELISA kit (LDN) を用いたELISA法により解析した。

結果・考察

1. FABP3が認知・情動行動に与える影響の検討

マウス行動テストバッテリーを用いて、FABP3遺伝子欠損の影響を解析した結果、以下の点が明らかになった。

①オープンフィールド試験においてFABP3 KOマウスは、野生型マウスと比較してオープンフィールドのセンターエリア滞在時間が有意に減少していた (図1)。また、高架式十字迷路試験において、不安様行動の指標であるオープンアームへの侵入回数、滞在時間および移動距離が有意に減少していた (図1)。これらの結果は、FABP3 KOマウスは不安様行動が増強していることを示している。

②マウスの嫌悪記憶を評価する受動的回避試験は、獲得試行として1日目から4日目まで暗室進入時にフットショックを与えた (0.5 mA, 3秒間)。さらに5, 12, 20, 27日目までを保持試行として、マウスを明室に置き、明室から暗室へ移動するまでの時間 (遅延時間、Latency time) を最大300秒として測定した。遅延時間が長いほど、嫌悪刺激を受けた暗室を記憶していると判断した。野生型マウスと比較して、FABP3 KOマウスは12, 20, 27日目のLatency timeが有意に延長していたことから、恐怖行動が亢進していることが示唆される (図2)。

③新奇物体認識試験は、マウスの新奇性を好む特性を利用したもので、2つのオブジェクトを置いた装置内で10分間自由に探索させた (訓練試行)。訓練試行の1時間後、片方を新奇オブジェクトに置換した装置内でさらに5分間自由に探索させた (保持試行)。野生型

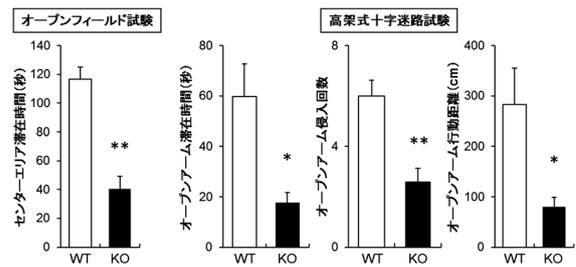


図1 FABP3 KO マウスは不安様行動を示す

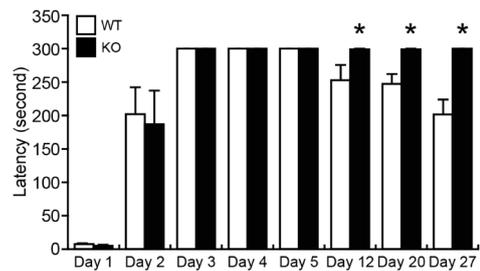


図2 FABP3 KO マウスは恐怖記憶が増強している

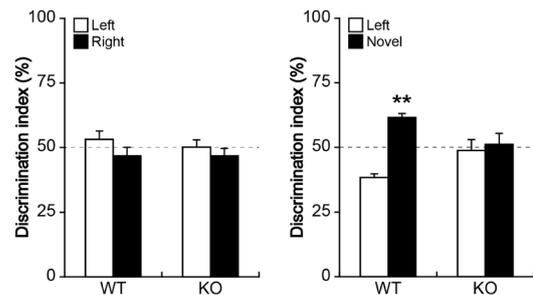


図3 FABP3 KO マウスは新奇物体に対する認知機能が障害されている

(左; 訓練試行, 右; 保持試行)

マウスでは保持試行において、新奇物体に対する関心度を示す Discrimination index の有意な増加が認められたが、FABP3 KOマウスでは変化が認められなかった (図3)。このことから、FABP3 KOマウスは新奇物体に対する認知機能が障害されていることを示している。

④尾懸垂試験や強制水泳試験では、無動時間の差は検出されなかったことから、うつ様行動にはFABP3遺伝子欠損は影響を与えていないと考えられる。

2. FABP3がACC神経細胞の興奮性/抑制性シナプス均衡化に与える影響の検討

結果1で得られた、FABP3 KOマウスの行動異常は、FABP3が高発現しているACC神経細胞の活動異常が原因として考えられる。そこで、FABP3 KOマウスの

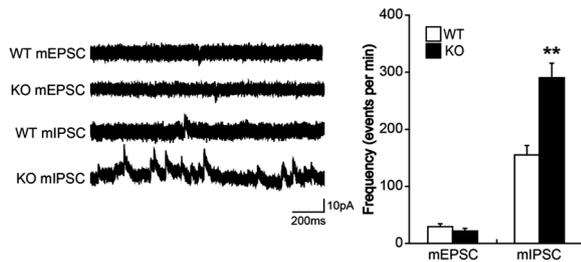


図4 FABP3 KO マウスはmIPSCの発生頻度が増加している

ACC 第II/III層の錐体細胞からmEPSCとmIPSCを記録した。野生型マウスに比べてmIPSCの頻度が増加している一方で、mEPSCの頻度は変化がないことがわかった(図4)。mEPSC、mIPSCともに振幅には変化が見られなかった。つまりFABP3 KOマウスで認められるmIPSCの頻度の増加は、ACC錐体細胞への抑制性シナプスの増加、もしくは、GABA放出の増加を示唆する結果である。

3. FABP3がACC神経細胞の活性に与える影響の検討

結果2で得られた、FABP3 KOマウスで認められたmIPSCの頻度減少は、ACCからの出力細胞である錐体細胞への興奮性/抑制性シナプス応答の不均衡が原因と考えられる。そこで、ACC錐体細胞に対する興奮性/抑制性シナプス応答のマーカーとなるタンパク質発現およびリン酸化反応を、ウェスタンブロット法、リアルタイム定量PCR法および免疫蛍光二重染色法を用いて検討した。さらに、ACCにおける主要な神経伝達物質である興奮性アミノ酸のグルタミン酸および抑制性アミノ酸のGABAを解析した結果、以下の点が明らかになった。

- ①興奮性神経活動を主に反映する、カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK)II/IVおよび転写因子CREBのリン酸化反応と、神経栄養因子BDNFのタンパク質量を、ウェスタンブロット法を用いて解析したところ、いずれも低下していた(図5)。
- ②野生型マウスを用いた免疫蛍光二重染色の結果、FABP3は小胞性グルタミン酸輸送体1(グルタミン酸神経終末のマーカー)との発現が一致していなかったことから、グルタミン酸神経終末にはFABP3が発現していないことがわかった。
- ③GABA関連分子(GAD67, GAD65, GABA_A受容体(GABA_AR), Gephyrin)の発現変化を、ウェスタンブロット法を用いて解析したところ、GABA合成酵素のGAD67タンパク質の発現量のみが、FABP3 KOマウスで有意に増加していた(図6)。また、リアルタイム

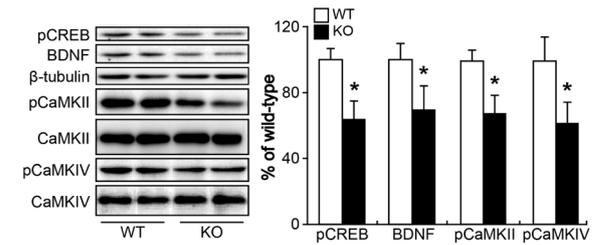


図5 FABP3 KO マウス ACCでは、興奮性シナプス関連タンパク質の発現およびリン酸化反応が低下している

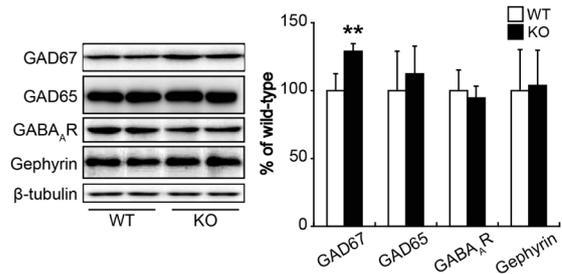


図6 FABP3 KO マウス ACCでは、GAD67の発現が低下している

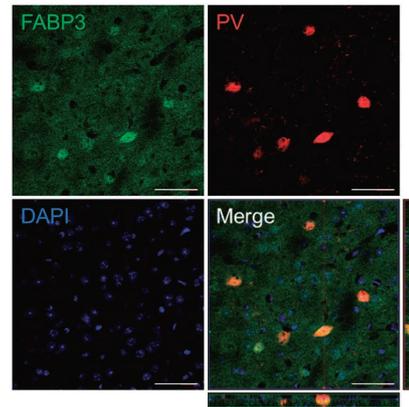


図7 FABP3はACCにおいて抑制性介在神経に発現している

タイム定量PCR法を用いた解析の結果、GAD67のmRNA発現量も同様に増加していた。

- ④野生型マウスを用いた免疫蛍光二重染色の結果、FABP3はparvalbumin (PV; 抑制性介在神経のマーカー)と発現が一致していたことから、ACCにある抑制性介在神経は、FABP3を発現していることが明らかとなった(図7)。
- ⑤マイクロダイアリシス法およびELISA法により解析した結果、FABP3 KOマウスACCでは、グルタミン酸の放出量が低下し、GABA含有量は有意に増加していた(図8)。

FABP3は、高次脳機能発現に最も重要な神経細胞に発現しているにもかかわらず、いまだ細胞生物学的意義

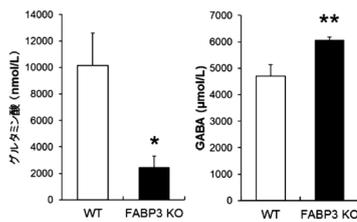


図8 FABP3 KOマウスACCでは、グルタミン酸濃度が低下し、GABA濃度が増加している

の検証がなされていなかった。FABP3の機能解析が進まない原因の一つに、FABP3は神経細胞に一様に発現するのではなく、特定の神経細胞にのみ発現していることが挙げられる。本研究で得られた結果から、FABP3はACCにおいて抑制性介在神経に発現していることがわかった。さらに、抑制性介在神経に発現しているFABP3が、メカニズムは不明だが、GABA合成酵素であるGAD67の発現を調節することで、ACCにおけるGABA濃度を調節していることが示唆された。

ACCは、情動行動や恐怖記憶の制御を司る扁桃体の過活動を抑制することで、過剰な不安や恐怖記憶を抑制する。ACCと扁桃体の機能的結合が減弱すると、不安・抑うつが強まることが報告されている。FABP3 KOマウスで観察された高次脳機能異常は、ACC錐体細胞への抑制性入力が増加することで、ACCからの出力先である扁桃体との結合が減弱したことによって引き起こされたと考えられる。一般的に、不安様行動や恐怖記憶の亢進には、脳内GABA濃度の低下が関与していると考えられている。実際、現在使用されている多くの抗不安薬の作用は、GABA受容体機能を強化するものである。一方今回得られた、局所的な抑制性神経活動の亢進が高次脳機能異常を引き起こすということは、非常に興味深い知見である。FABP3による、GAD67発現調節メカニズムの解明は、今後の課題である。

要約

本研究の結果、以下の点を明らかにすることができた。FABP3 KOマウスの行動バッテリー解析の結果、前部帯状皮質のバルブアルブミン（GABA作動性抑制性神経のマーカー）陽性細胞は、FABP3を発現していた。FABP3 KOマウスの帯状皮質では、GABA合成酵素のグルタミン酸脱炭酸酵素67（GAD67）のタンパク質およびmRNAが、野生型マウスと比べて有意に増加していた。GAD67の上昇と一致して、GABAの量も増加していた。一方、興奮性神経の神経活動を主に反映する、カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII/IVの活性は低下していた。一致して、興奮性アミノ酸のグルタミン酸の放出量が低下していることが、マイクロダイアリス法を用いた解析から明らかになった。帯状皮質は扁桃体を含む、大脳辺縁系の各部位を結び付け、感情形成・処理、記憶学習に密接な関わりを持つ部位であるため、以上の結果は、FABP3 KOマウス帯状皮質神経細胞の興奮と抑制機構のバランスが破たんし、その結果として、帯状皮質が重要な役割を果たす認知・情動行動に異常を来した可能性を示唆するものである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。なお、本研究報告書の内容は、現在投稿準備中であることを申し添えます。

文献

- 1) M. Maekawa, et al.: *J. Hum. Genet.*, **55**, 127–130, 2010.
- 2) E. J. Murphy, et al.: *Biochemistry*, **44**, 6350–6360, 2005.
- 3) A. Etkin, et al.: *Trends. Cogn. Sci.*, **15**, 85–93, 2011.
- 4) A. Heinzl, et al.: *Psychother. Psychosom.*, **79**, 363–370, 2010.
- 5) N. Shioda, et al.: *J. Neurosci.*, **30**, 3146–3155, 2010.