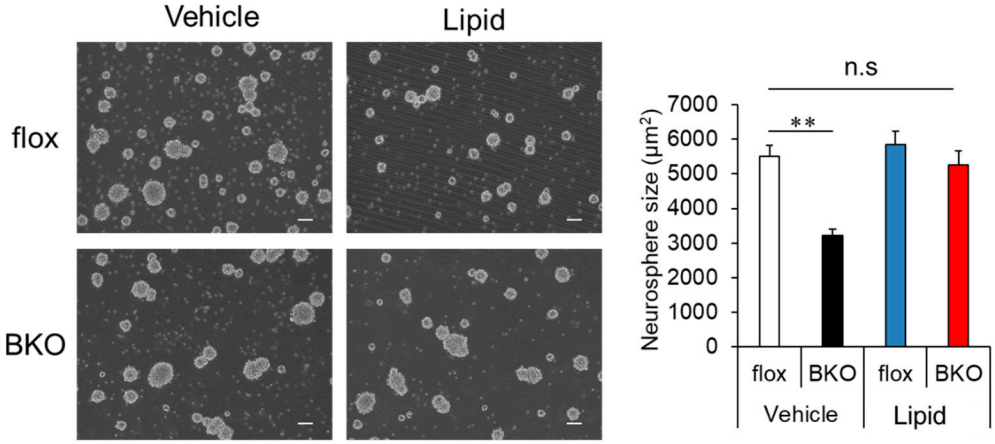
175　脂肪酸伸長酵素Elovl6による神経新生制御機構解明	大野　博

【目的】哺乳類の脳では、生涯にわたって神経新生が起こることが知られており、記憶・学習や情動行動、脳損傷後の修復・再生などに極めて重要である。脳は脂質を豊富に含む組織であり、脂質の主要な構成成分である脂肪酸は脳機能に深く関与し、近年、神経新生にも重要であることが報告されているものの、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。Elovl family member 6（Elovl6）は、炭素数（C）12～16 の飽和・一価不飽和脂肪酸を基質とし、C18 の脂肪酸への伸長に必須の脂肪酸伸長酵素である。Elovl6 は、脂質を豊富に含む組織に高発現しており、脳においても高い発現を有する。これまでの研究から、*Elovl6* 欠損マウスでは、神経新生の低下や、記憶障害等の行動異常が認められることを見出している。本研究では、神経幹細胞における Elovl6 に着目し、神経幹細胞における Elovl6 の役割を明らかとし、Elovl6 による神経新生の制御機構を解明することを目的とした。

【方法】主に神経幹細胞に発現する Nestin のプロモーター下に Cre リコンビナーゼを発現させた Nestin-Cre マウスと *Elovl6*$^{flox/flox}$（flox）マウスを交配し、中枢神経特異的 *Elovl6* 欠損（brain- specific Elovl6 knockout : BKO）マウスを作製し、解析を行った。また、BKO マウスと flox マウスを交配させ、胎生 14 日目の胎仔の大脳皮質、あるいは成体の脳室下帯より神経幹細胞塊（ニューロスフェア）を調製し、自己複製能や分化を評価した。また、ニューロスフェアのサイズが回復した特定の脂質を多く含む食餌をマウスに与え、神経新生の評価を行った。

【結果】BKO のニューロスフェアのサイズは flox と比較して有意に低下することを見出している。また、特定の脂質の添加により、胎生 14 日目から調製した 1 次スフェアでは回復が認められず、1 度継代した 2 次スフェアでサイズの低下が回復することが明らかとなった。そこで、脂質の補充が 1 次あるいは 2 次ニューロスフェアのどちらにおいて重要であるかを検討したところ、2 次ニューロスフェアのみでの補充でサイズの回復が認められた。成体においても、脳室下帯より調製したニューロスフェアでは、BKO マウス由来のニューロスフェアはそのサイズが flox と比較して有意に低下した。したがって、Elovl6 は発達段階および成体のその両方において重要であることが明らかとなった。さらに、プラグチェックにより妊娠を確認した雌マウスに、ニューロスフェアサイズの回復が認められた脂質を豊富に含む食餌を新生マウスが離乳するまで与え続け、離乳したマウスの神経新生を評価したところ、脂質の補充により神経新生の回復が認められた。これらのことから、Elovl6 は神経新生において重要であり、特定の脂質を基軸として神経新生を制御していることが明らかとなった。

Elovl6 欠損によるニューロスフェアのサイズの低下と脂質補充による回復



175. 脂肪酸伸長酵素 Elovl6 による神経新生制御機構解明

大野　博

筑波大学 医学医療系 内分泌代謝・糖尿病内科

Key words：脂肪酸，脳，神経新生，神経幹細胞

緒　言

哺乳類の脳では、生涯にわたって神経新生が起こることが知られており、記憶・学習や情動行動、脳損傷後の修復・再生などに極めて重要である。ストレスの多い現代社会において、うつ病、統合失調症、アルツハイマー型認知症の患者数は爆発的に増加している。これらの精神・神経疾患と神経新生は密接に関わっていることが報告されている［1］。しかしながら、未だその発症メカニズムや分子機序については不明な点が多い。脂肪酸は生体にとって必要不可欠な栄養素であり、あらゆる生命現象に関与する。脳は他の組織に比べて多彩で豊富な脂質を含み、神経新生における脂肪酸の役割は多価不飽和脂肪酸（PUFA）の量的な制御を中心に知られている［2］が、飽和・一価不飽和脂肪酸の生理的意義や病態との関連は明らかではない。Elovl family member 6（Elovl6）は、炭素数（C）12～16 の飽和・一価不飽和脂肪酸を基質とし、C18 の脂肪酸への伸長に必須の脂肪酸伸長酵素である。Elovl6 は、脂質を豊富に含む組織に高発現しており、脳においても高い発現を有する。これまでの研究から、*Elovl6* の欠損により、脳において C16 脂肪酸の増加および C18 脂肪酸の減少が認められ、脂肪酸の質が変化することを明らかとした。さらに、脳重量の増加、種々の行動異常、海馬歯状回および側脳室下帯における神経新生の低下など、様々な異常が認められることを見出した。また、*Elovl6* 欠損により神経幹細胞の自己複製能が低下することを明らかとした。したがって、Elovl6 による脂肪酸組成の制御は、従来の脳研究の中心であった脂肪酸の量だけでなく、脂肪酸組成という脂肪酸の質の重要性を示している。そこで、神経幹細胞における Elovl6 の機能的・生理的意義を解析することにより、脂肪酸組成依存的な神経幹細胞の増殖・分化の制御メカニズムを解明するとともに、脂肪酸組成の異常が引き起こす高次脳機能異常との関連を明らかにすることを目的とした。

方法および結果

1. *Elovl6* 欠損によるニューロスフェアサイズの低下の回復は 2 次ニューロスフェアのみの脂質補充で認められた

主に神経幹細胞に発現する Nestin のプロモーター下に Cre リコンビナーゼを発現させた Nestin-Cre マウスと *Elovl6*$^{flox/flox}$（flox）マウスを交配して作製した中枢神経特異的 *Elovl6* 欠損（brain- specific Elovl6 knockout：BKO）の胎生 14 日目の大脳皮質から 1 次ニューロスフェアを調製し、一度継代した 2 次ニューロスフェアとともに解析を行った。これまでの結果から、*Elovl6* 欠損由来のニューロスフェアは 1 次、2 次ともにサイズの低下が認められたが、1 次ニューロスフェアから特定の脂質を添加することで 1 次ニューロスフェアのサイズは回復しないが、2 次ニューロスフェアでサイズの回復が認められた。そこで、脂質による効果が 1 次、2 次どちらのニューロスフェアで重要であるかを評価した。その結果、脂質の補充は 1 次のみでは回復せず、2 次のみでの補充ではニューロスフェアのサイズの回復が認められた。したがって、2 次ニューロスフェアでの脂質の補充が重要であることが示唆された。

2. 特定の脂質含有食により海馬歯状回における神経新生の回復が認められた

神経新生は発達において非常に重要であるが、神経新生は生涯にわたって認められる現象であり、成体でも持続している。そこで、*in vivo* における神経新生低下が、ニューロスフェアのサイズの回復が認められた脂質の補充により回復するかどうかを評価した。プラグチェックにより妊娠を確認した雌マウスに特定の脂質を含む食餌を新生マウスが離乳

するまで与え続けた。離乳前日に EdU を 50 mg/kgBW で 1 日 2 回腹腔内投与し、翌日にマウスを灌流固定後、脳の摘出をし、凍結切片を作製後、EdU の染色を行った。その結果、特定の脂質を含む食餌を与えたマウスの新生仔は flox マウスと同程度まで神経新生が回復した（図 1）。したがって、特定の脂質は発達のみならず、成体における神経新生にも重要であり、一定の時期ではなく発達過程において影響をおよぼす可能性が示唆された。

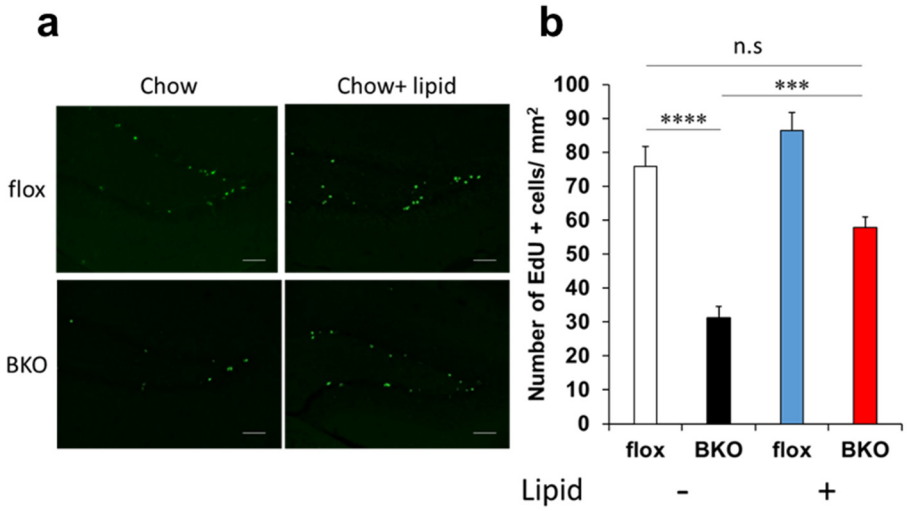


図 1. 特定の脂質を含む食餌を与えた妊娠マウスから離乳したマウスでは、*Elovl6* 欠損による海馬歯状回での神経新生低下の回復が認められた

a) 海馬歯状回における EdU 染色像（スケールバー：100 μm）。

b) 海馬歯状回面積（mm^2）あたりの EdU 陽性細胞数（4 週齢雄マウス 各群 n＝3）。各マウス 20 μm 間隔の切片を 6 枚評価した（two-way ANOVA、Tukey post hoc test：*** $p<0.001$、**** $p<0.0001$、n.s＝no significant）。

3. 成体由来のニューロスフェアサイズは *Elovl6* の欠損により低下し、脂質含有食によりサイズの回復が認められた

これまでの研究から、*Elovl6* 欠損マウスでは海馬歯状回および側脳室下帯での神経新生の低下が認められることを明らかとしている。また、*Elovl6* 欠損による海馬歯状回の神経新生の低下は特定の脂質含有食を与えることで有意な回復が認められた。成体における神経新生は、脳血管や、グリア細胞などの脳内環境における要因も考えられるため、成体における神経新生をより詳細に解析するために、8 週齢の雄マウスの側脳室下帯を摘出し、ニューロスフェアの培養により、成体の神経幹細胞の評価を行った。*Elovl6* の欠損は、少なくとも発達期の神経幹細胞の自己複製能を低下させ、特定の脂質を補充することで自己複製能が回復することを明らかとした。そこで、神経幹細胞の自己複製能の低下が成体でも認められるかどうかを検討するために、8 週齢の flox および BKO の側脳室下帯を摘出し、ニューロスフェア培養を行った。BKO 由来のニューロスフェアでは flox と比較してサイズの有意にサイズの低下が認められた。また、ニューロスフェアのサイズの低下は胎生 14 日目由来のニューロスフェアと同様に、特定の脂質を補充することによって回復が認められた（図 2）。したがって、神経幹細胞における *Elovl6* 欠損は発達期のみならず、成体まで継続的に重要であることが示唆された。

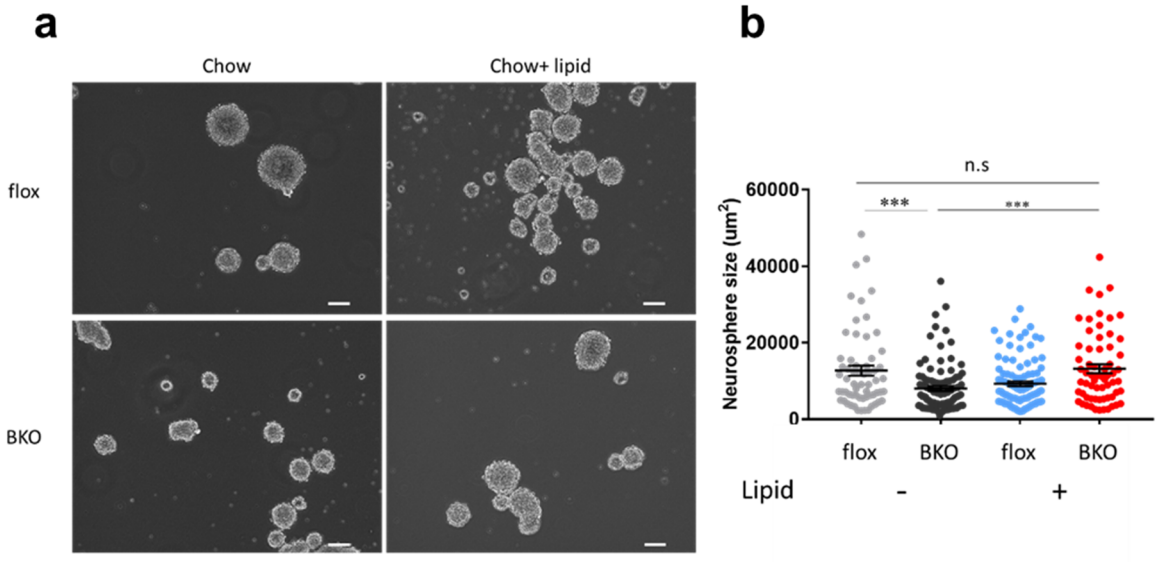


図 2. 普通食あるいは脂質含有食を与えた妊娠マウスから離乳したマウスの側脳室下帯由来のニューロスフェアは *Elovl6* の欠損でサイズが低下し、特定の脂質含有食負荷により回復した

a) 培養 8 日目の普通食あるいは脂質含有食由来の側脳室下帯ニューロスフェアの位相差像（スケールバー：100 μm）。

b) 各群におけるニューロスフェアサイズ（n= 各群 62～98）。（two-way ANOVA、Tukey post hoc test：*** $p<0.001$、n.s＝no significant）。

考　察

本研究結果から、Elovl6 が発達期・成体期ともに神経新生に重要であることが明らかとなった。また、特定の脂質が *Elovl6* 欠損によるニューロスフェアのサイズの低下を回復することを明らかとしたが、その効果は 2 次ニューロスフェアでの補充のみでも認められた。ニューロスフェアは生体における脳の分化を模倣したものであり、1 次ニューロスフェアは neurogenic な神経幹細胞が多く、2 次ニューロスフェアでは gliogenic な神経幹細胞が多いことが知られている［3］。そのため、特定の脂質の効果は神経幹細胞の性質により異なる可能性が示唆された。また、発達期における神経幹細胞の制御が成体での神経新生に重要であるという報告があることから［4］、発達期の神経幹細胞の自己複製能の低下が成体期まで継続することが考えられるが、発達期以降の成体における影響を検討するために、Nestin-CreERT2 マウスなどを用いた時期特異的な欠損マウスでの評価も必要である。今後、脂質メタボローム解析やトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析などを包括的に行い、Elovl6 が制御する神経幹細胞の増殖に重要な特定の脂肪酸組成を持つ脂質分子種の同定および詳細な分子機構を明らかとすることで、自閉症や学習障害などを含む発達障害の予防法・治療法の開発に貢献できる可能性が示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、筑波大学大学院医学医療系内分泌代謝・糖尿病内科の島野仁教授、松坂賢教授である。また、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1) Winn Winner B., Winkler J., 2015. Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. Cold Spring Harb Perspect Biol 7(4):a021287. doi: 10.1101/cshperspect.a021287.

2) Maekawa M., Takashima N., Matsumata M., Ikegami S., Kontani M., Hara Y., et al., 2009. Arachidonic acid drives postnatal neurogenesis and elicits a beneficial effect on prepulse inhibition, a biological trait of psychiatric illnesses. PLoS One 4(4):e5085. DOI: 10.1371/journal.pone.0005085

3) Okada Y., Matsumoto A., Shimazaki T., Enoki R., Koizumi A., Ishii S., et al., 2008. Spatiotemporal Recapitulation of Central Nervous System Development by Murine Embryonic Stem Cell - Derived Neural Stem/Progenitor Cells. Stem Cells 26(12):3086-3098. DOI: 10.1634/stemcells.2008-0293

4) Zhou, Y., et al., Autocrine Mfge8 Signaling Prevents Developmental Exhaustion of the Adult Neural Stem Cell Pool. Cell Stem Cell, 2018. 23(3): p. 444-452 e4. DOI: 10.1016/j.stem.2018.08.005