＜平成19年度＞

魚の摂取と脳保護効果の分子基盤

小　泉　修　一
（山梨大学医学部薬理学講座）

1. はじめに

『魚を食べると頭が良くなる』などと雑誌やテレビが盛んに伝え，またそれを支持する調査・報告もある。『頭がよくなる』ことの真偽は別として，青魚等に多く含まれる n-3 系不飽和脂肪酸ドコサヘキサエン酸（DHA）が脳の発達やシナプス伝達等に影響を与え，またその抗酸化作用から，DHA は酸化ストレスに対する脳保護効果を有していることが指摘されている。脳は他の組織に比べて DHA が多く含み，DHA と高次脳機能及びその維持との関連性が注目されている。一般に多価不飽和脂肪酸は生体内での酸化ストレスを受けやすく，各種疾患の危険因子になる可能性を有するが，DHA のような n-3 系多価不飽和脂肪酸は，脳内に取り込まれると逆に抗酸化作用を促進することが知られている。その理由の一つに，DHA が核内受容体 RXR（レチノイン酸 X 受容体）の内在性アゴニストとして機能し[1]，種々の遺伝子発現制御に積極的に関わることが挙げられる。一方，近年，脳機能が神経細胞だけでなく，グリア細胞によって強く・積極的に制御されていることが明らかとなり[2, 3]，今や脳研究を展開するにあたりグリア細胞の視点は不可欠である。特に，脳疾患との関連性は大きく，例えば殆どの脳疾患はグリア細胞の機能変調が付随し，また逆に正常グリア細胞は，神経細胞を酸化ストレスから保護するために必須の細胞である[4]。しかし，DHA のグリア細胞機能に果たす役割は全くわかっていない。そこで本研究では，DHA が脳内抗酸化作用で中心的な役割を果たすグリア細胞（アストロサイト）の遺伝子発現に与える影響を解析することにより，その抗酸化作用発現機序の解明を行う。先ず（1）DHA 刺激をした初代培養アストロサイトを用いて，グリア細胞の機能調節に最も重要な ATP 受容体（P2 受容体）発現変化の解析を行う。（2）（1）で得られた分子のうち，最も有力な P2 受容体について定量的 PCR 法及び Western blotting 法等で確認したのち，これらが神経細胞保護に与える影響を *in vitro* 酸化ストレスモデルを用いて精査する。（3）候補因子の薬理学的遮断及び RNA 干渉法による遺伝子ノックダウン法により，これら候補因子が酸化ストレスに対する脳保護効果に果たす役割を明らかとする。前述したように，グリア細胞は脳の恒常性維持，機能制御に必須であり，その破綻は種々の脳疾患を引き起こす。脳内に入った医薬品，有害環境物質，さらに今回の DHA 等の食品が脳内に入った際に，必ずグリア細胞もこれらに暴露されるが，食品等化学物質がグリア細胞に与える影響は全くわかっていない。本研究の遂行により，脳を神経細胞 - グリア細胞の共同体ととらえて，食品等化学物質の影響を検討する重要性が明らかとなることが期待できる。さらに本研究は，**魚介類を多く摂る日本の伝統的な食文化が，DHA を介して脳の健康増進に果たす役割を分子の言葉で解き明かす**可能性を有するものである。

2. 方　　法

初代培養アストロサイト[5]及びミクログリア[6]の培養は既報に従って行った。アストロサイトは1日齢ラットの海馬より採取し，またミクログリアは1日齢ラット大脳皮質のアストロサイトを培養12日後にアストロサイト上で産生されるミクログリアを回収して用いた。神経細胞は，17日齢の胎児海馬を採取し，既報によって培養を行った。DHA処置によるP2受容体発現変化の解析は，主に定量的RT-PCR法を用いた。また，Western blottingによるタンパク量の解析及びfura-2法によるカルシウムイメージング法により機能解析を行った。神経細胞の生存率の解析は，過酸化水素（H_2O_2）により惹起される神経細胞障害を惹起し，これに対するアストロサイトDHAの作用をWST-1アッセイにより行った。トランスクリプトーム解析には，Agilent社製DNAマイクロアレイを用いた。

3. 結果及び考察

3.1　アストロサイト及びミクログリアのP2受容体発現変化に対するDHAの作用

図1は，アストロサイト及びミクログリアそれぞれに種々濃度のDHAを加えた際の，P2受容体mRNAの変化を示したものである。**表1**上段で示すように，アストロサイトではP2Y2受容体の発現亢進が大きく，1 μMで約7倍に達した。またミクログリアでは，P2Y2及びP2X7受容体の発現亢進が顕著で，1 μM DHAにより約2倍（P2Y2）及び2.5倍（P2X7）の発現亢進が認められた（**表1**下段）。アストロサイトP2Y2受容体発現亢進の時間変化及びタンパク質レベルでの変化も確認できた（**図1**a及びb）。また，uridine 5’-triphosphate（UTP）は内在性のP2Y2受容体の選択的リガンドであり，UTPの刺激によりGq共役がたP2Y2受容体を刺激すると，細胞内カルシウムイオン濃度（[Ca^{2+}] i）が観察される。**図1**cで示すように，DHAを処置したアストロサイトはUTP刺激による（[Ca^{2+}] iの上昇（F340/F380）が有意に亢進していた。

3.2　神経細胞死に対するDHA処理アストロサイトの作用

次に海馬培養神経細胞の純培養系を用い，酸化ストレスに対する障害モデルを作成した。H_2O_2処置により，神経細胞の生存率（Cell viability）は濃度依存的に低下した（**図2**a）。神経細胞の生存率が約30%となるH_2O_2の濃度として300 μM（2時間処置）を採用し，以下の検討を行った。DHA（0.1及び1.0 μM）を処置したアストロサイトの培養上清（DHA-ACM；astrocyte-conditioned medium）を神経細胞に処置し，24時間後にH_2O_2を負荷すると，神経細胞の生存率低下は有意に抑制された（**図2**b）。また，同濃度のDHA単独（1.0 μM）を神経細胞に処置した場合でも，神経細胞に対する保護効果が認められたが，この作用はDHA-ACMを処置した場合に比べて明らかに弱かった。従って，DHAには，神経細胞に直接作用して細胞を保護する作用以外に，アストロサイトを介した強力な二次的神経細胞保護作用を有していることが明らかとなった。

3.3　神経細胞死に対するUTP処理アストロサイトの作用

P2Y2受容体アゴニストのUTP（100 μM）で処置したアストロサイト上清（UTP-ACM），さらにDHA（1 μM）処置アストロサイトにさらにUTP（100 μM）を処置した上清（DHA-UTP-ACM）には，それぞれさらに強い神経細胞保護作用が認められた（**図3**）。その効果はDHA-UTP-ACM ＞ UTP-ACM ＞ DHA-ACM ＜ の順番に強かった。これら総ての効果は，P2受容体阻害薬のsuramin（100 μM）及びPPADS（30

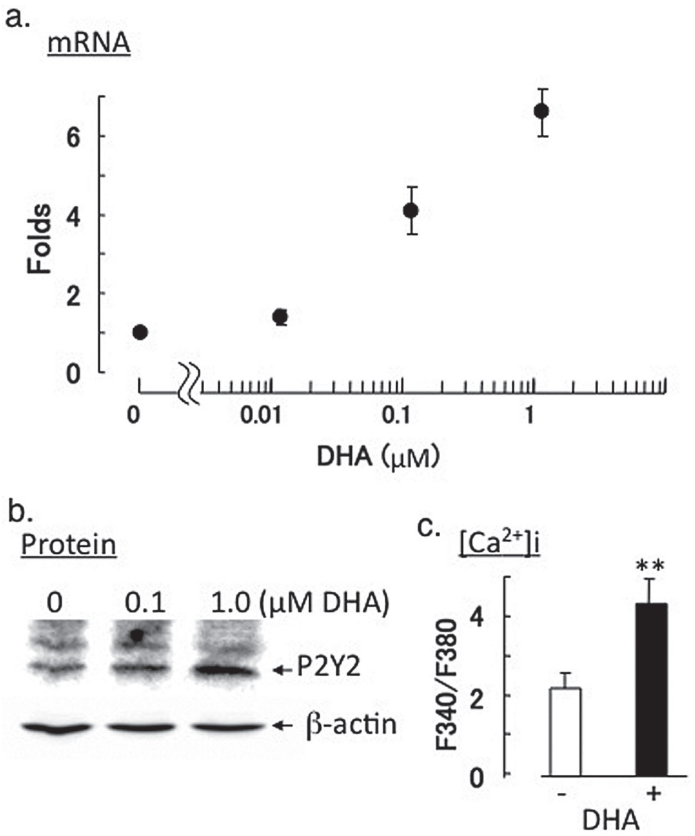

図1　DHA によるアストロサイトの P2Y2 受容体の発現亢進
a．DHA は濃度依存的にアストロサイト P2Y2 受容体 mRNA の発現を亢進させた。
b．Western blotting により，P2Y2 受容体の発現亢進はタンパク質レベルで確認できた。
c．DHA を処置したアストロサイトは UTP（100μ）刺激により惹起される［Ca^{2+}］i 変化（F340/F380 比として表示）を有意に増大させた。

表1　DHA（1μM, 1hr）により惹起されるアストロサイト（上段）及びミクログリア（下段）の P2 受容体 mRNA の発現変化

アストロサイト

	P2Y1	P2Y2	P2Y4	P2Y6	P2Y12	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X7
Folds	1.1	6.8	1.3	1.5	1.6	1.1	1.4	1.6	1.5	1.1

ミクログリア

	P2Y1	P2Y2	P2Y4	P2Y6	P2Y12	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X7
Folds	1.3	2.2	1.0	1.7	1.7	0.9	1.6	1.7	1.4	2.6

μM，データ省略）により消失したことから，ACM 中の神経保護因子は，P2Y2 受容体を介して産生されていることが明らかとなった。既に我々[7] 及び他の研究グループ[8] が，それぞれ皮膚及び子宮頸部の P2Y2 受容体を用いた研究により，retinoid 受容体が P2Y2 受容体の発現亢進に関与していることが報告されている。また，DHA が RXR 受容体リガンド[1] として機能することを考慮すると，アストロサイトにおいても DHA は RXR を介して P2Y2 受容体の転写を亢進させたことが強く示唆される。P2Y2 受容体発現が亢進しても，そのリガンドが通常存在しなければ，P2Y2 受容体の活性化が亢進しない。しかし，アストロサイトは ATP（P2Y2 受容体にも作用）及び UTP を恒常的に放出している。従って，P2Y2 受容体の発現亢進それ自身が，アストロサイトの恒常的な P2Y2 受容体活性化シグナルを増強する結果になったものと考えられた。

3.4　アストロサイト P2Y2 受容体刺激による神経保護作用の分子メカニズム

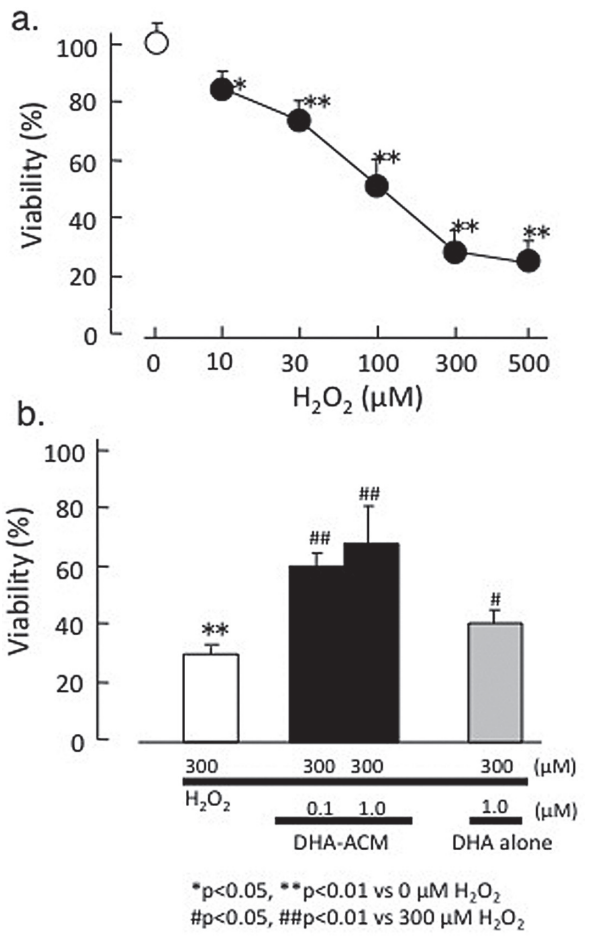

図 2　H_2O_2 により惹起される神経細胞死とアストロサイト DHA の効果

a．H_2O_2（2 時間処理）は，濃度依存的に培養海馬神経細胞の生存率を低下させた。生存率は WST-1 アッセイによって定量した。

b．DHA（0.1 または 1.0μM）を処理したアストロサイトの上清（DHA-ACM）は，H_2O_2 により惹起される神経細胞死を有意に抑制した。また，DHA を神経細胞に直接添加しても，神経細胞死は抑制されたが，その程度は小さかった。

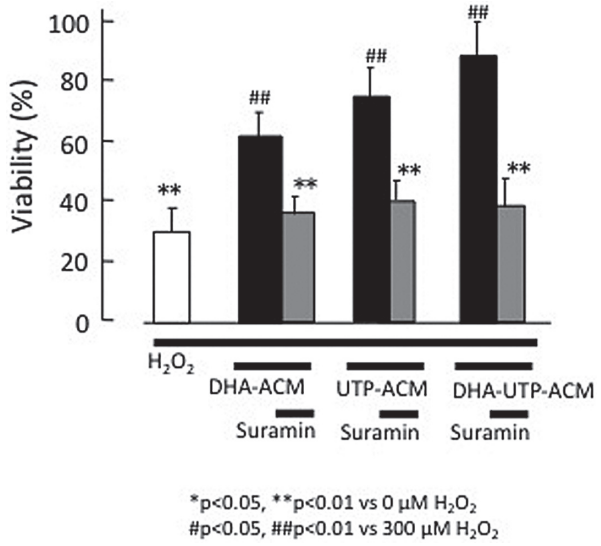

図 3　神経保護効果におけるアストロサイト P2Y2 受容体の役割
UTP（100μM）を処置した ACM（UTP-ACM）及び DHA を処置した ACM にさらに UTP を加えた ACM（DHA-UTP-ACM）も，強い神経細胞保護効果があった。これらの保護効果は，P2 受容体拮抗薬 suramin（100μM）により消失した。

以前我々は，アストロサイトが P2Y1 受容体を介して，thioredoxin reductase（TrxR）等の抗酸化物質類を産生することにより，H_2O_2 に対する抵抗性を獲得することを報告した[4]。しかし，今回は，アストロサイトの P2Y2 受容体が責任受容体であること，またアストロサイト自身の酸化ストレス抵抗性ではなくて，周辺の神経細胞に対する抵抗性を獲得することから，TrxR 産生とは異なる作用と考えられる。実際，P2Y1 受容体阻害薬 MRS2179（10 μM）を処置しても，DHA-ACM の神経細胞保護効果は抑制されなかった（DHA-ACM，67.2 + 4.4 vs. DHA-ACM + MRS2179，62.6 + 8.3% cell viability）。そこで，P2Y2 受容体刺激により惹起されるアストロサイトの遺伝子発現変化を，DNA array を用いて網羅的に解析した。UTP 刺激により，発現が 3 倍以上亢進した遺伝子は 280 あり，クラスタリング解析により，最も顕著な遺伝子群は炎症性サイトカインであった（transforming growth factor-α, TNF-α；interleukin-1 β, IL-1 β；interleukin-6；IL-6 等）。このうち，もっとも顕著な発現亢進を認めた IL-6 について解析を行った。UTP は濃度依存的（3-100 μM））にアストロサイトの IL-6 発現亢進を引き起こし，またこれは DHA を前処理したアストロサイト（白△）で顕著であった（**図 4**a）。さらに，IL-6 で神経細胞に前処理すると，H_2O_2 により惹起される神経細胞障害が有意に抑制された。また，UTP を処理したアストロサイトによる神経細胞保護効果は，IL-6 の中和抗体により IL-6 を除去すると消失した（**図 4**b）。以上より，炎症性サイトカイン IL-6 が，アストロサイトの P2Y2 受容体刺激のアウトプットとして産生され，このアストロサイト由来 IL-6 が，酸化ストレスに対する神経細胞障害に対して保護効果

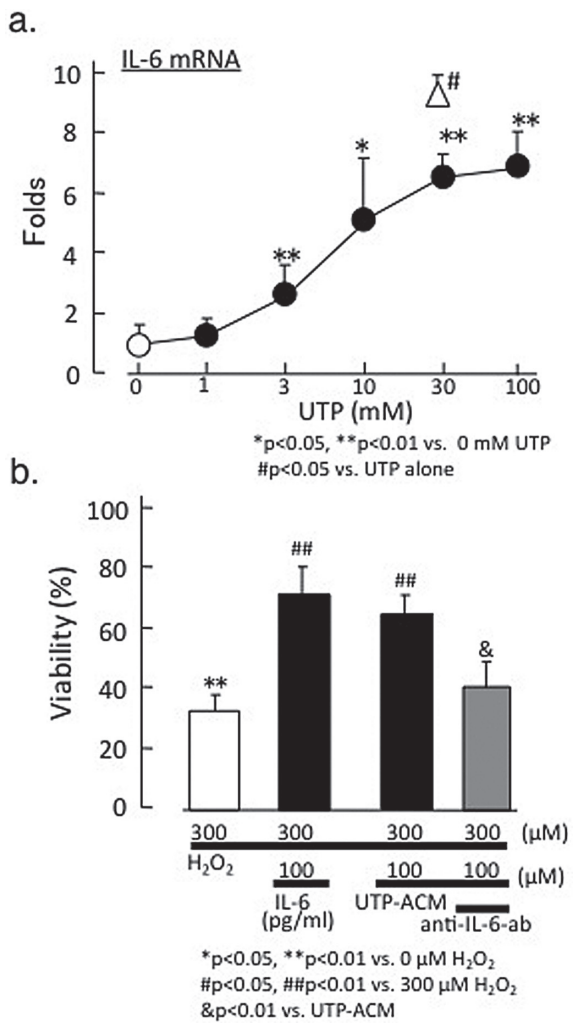

図 4　P2Y2 受容体刺激による IL-6 産生及びアストロサイト IL-6 による神経保護作用

a．UTP 刺激により惹起されるアストロサイト IL-6 mRNA 発現亢進の濃度依存性。UTP は濃度依存的に IL-6 mRNA の発現を亢進させ，これは DHA 前処置したアストロサイトではさらに顕著であった（△）。

b．IL-6 による神経保護効果。神経細胞に IL-6 を前処置（24 時間）すると，H_2O_2 により惹起される神経細胞死は有意に抑制された。また，UTP-ACM による神経保護作用は，IL-6 の中和抗体により消失した。

を呈する，実行分子であることが明らかとなった。IL-6 は代表的な炎症性サイトカインであり，神経細胞を障害することが知られている。しかし一方で，アストロサイトで産生された IL-6 が神経細胞に対して保護的に働くことが，我々[9] 及び他の研究グループ[10] に寄っても既に明らかとされている。病態時の IL-6 は，その濃度及び神経暴露のタイミングによって，神経細胞に保護的に働くものと考えられる。IL-6 による神経細胞保護の分子メカニズムは不明であるが，IL-6 を 12 時間以上作用させないと効果が得られないこと，タンパク質合成阻害薬の cycloheximide により IL-6 の保護効果が消失する[9] ことから，神経細胞において，新たな神経保護因子の発現を亢進する可能性が強く示唆される。Biber ら[11] は IL-6 が神経細胞の抑制性受容体，adenosine A1 受容体の発現を亢進させることを報告している。脳虚血等の酸化ストレス急性期には，神経細胞の興奮性が増し，所謂，興奮毒性により神経細胞が障害されることがよく知られている。本研究においても，IL-6 により adenosine A1 受容体の発現が亢進しているとすると，神経細胞の興奮性を抑え，それにより興奮毒性を軽減する可能性が強く示唆されるが，IL-6 による誘導される具体的な保護分子の同定は今後の課題である。

4.　ま　と　め

本実験では，DHA が核内受容体リガンドとしてアストロサイトに作用して，神経細胞に対する保護効果を呈することが明らかとなった。この作用にはアストロサイトのグリア伝達物質 ATP の受容体，P2Y2 受容体の発現亢進が関与し，P2Y2 受容体を介する IL-6 の産生が，神経細胞の保護効果と関係していることが明らかとなった。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり，研究助成を賜りました（財）浦上食品・食文化振興財団及び関係各位に心より感謝申し上げます。貴財団の，今後益々のご発展をお祈りいたします。

文　献

1）　de Urquiza, A.M., *et al.* Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290, 2140-2144（2000）.

2）　Haydon, P.G. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2, 185-193（2001）.

3）　Miller, G. Neuroscience. The dark side of glia. *Science*

308, 778-781 (2005).

4) Shinozaki, Y., *et al.* Cytoprotection against oxidative stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y1 receptors. *Glia* 49, 288-300 (2005).

5) Koizumi, S., Fujishita, K., Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y. & Inoue, K. Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 11023-11028 (2003).

6) Tsuda, M., *et al.* P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424, 778-783 (2003).

7) Fujishita, K., Koizumi, S. & Inoue, K. Upregulation of P2Y2 receptors by retinoids in normal human epidermal keratinocytes. *Purinergic Signal* 2, 491-498 (2006).

8) Gorodeski, G.I., Burfeind, P., Gan, S.U., Pal, D. & Abdul-Karim, F.W. Regulation by retinoids of P2Y2 nucleotide receptor mRNA in human uterine cervical cells. *Am J Physiol* 275, C758-765 (1998).

9) Fujishita, K., *et al.* Grape Seed Extract Acting on Astrocytes Reveals Neuronal Protection Against Oxidative Stress via Interleukin-6-mediated Mechanisms. *Cell Mol Neurobiol* 29, 1121-1129 (2009).

10) Fujita, T., Tozaki-Saitoh, H. & Inoue, K. P2Y1 receptor signaling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6 release in hippocampal cultures. *Glia* 57, 244-257 (2009).

11) Biber, K., Lubrich, B., Fiebich, B.L., Boddeke, H.W. & van Calker, D. Interleukin-6 enhances expression of adenosine A (1) receptor mRNA and signaling in cultured rat cortical astrocytes and brain slices. *Neuropsychopharmacology* 24, 86-96 (2001).

Molecular mechanisms by which docosahexaenoic acid (DHA)-induced neuronal protection via glial cells

Schuichi Koizumi

(Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Yamanashi)

Back ground and aim：Docosahexaenoic acid (DHA) is rich in the CNS, and has been reported to regulate synaptic transmissions, thereby leading to control synaptic plasticity or protection of brain damages. Recent accumulating evidence shows that glial cells, both astrocytes and microglia, have important roles for regulation of synaptic transmissions. Especially astrocytes dynamically control synaptic transmissions and are involved in inhibition of excess excitation of neurons. Thus, when we assess the effect of various chemicals or ingredients in foods such as DHA on brain functions or damages, we should investigate effects of these chemicals on the function of astrocytes, but so far, there are little report about these.

Results and discussion：ATP and their specific receptors "P2 receptors" have central roles for regulation of glial functions as well as neuronal ones via neuron-glia interactions. When astrocytes and microglia were stimulated with DHA, the most remarkable change was the upregulation of P2Y2 receptors in astrocytes. DHA-conditioned astrocytes (DHA-ACM) protected neuronal cell death against H_2O_2, which was dependent upon activation of P2Y2 receptors. DHA acting directly on neurons, could protect neuronal cell death, but the effect of DHA-ACM was more efficient. Transcriptome analysis showed that activation of P2Y2 receptors in astrocytes resulted in upregulation of pro inflammatory cytokines, among which IL-6 was remarkable. Protection of H_2O_2- evoked neuronal cell death by DHA-ACM was dependent on IL-6. These results suggest that DHA protect neuronal cell death by regulating astrocytic functions.

Conclusion：DHA could protect brain damages via regulation of astrocytic functions.