

ドコサヘキサエン酸の脳内時空間的輸送経路の解明

国立国際医療研究センター 脂質シグナリングプロジェクト
柳田 圭介

【目的と背景】

ドコサヘキサエン酸（DHA）は脳の生体膜リン脂質の主要脂肪酸の1つであり、食事での摂取が必要な必須脂肪酸である。DHAは脳機能に極めて重要な脂質であり、アルツハイマー病、双極性障害や統合失調症等の脳機能障害においてその低下が確認されている。また数々の疫学や臨床試験により、DHAの摂取/補充の脳機能の維持/回復への有効性も実証されてきた。しかしながら、DHAをはじめとする脂肪酸の脳内への輸送経路、その分子形態や、生体機能などの分子機能についての基礎的研究はなかなか進んでいなかった。

近年、脳への脂肪酸供給メカニズムについて、研究の大きな進展があった。具体的には、脳へのリゾホスファチジルコリン（LPC）輸送体 MFSD2A が同定され（Nguyen *et al.*, *Nature*, 2014）、脂肪酸がLPCの形態で脳に運ばれることが提唱された。これにより、ブラックボックスであったDHAをはじめとする脂肪酸の脳内時空間的代謝経路を明らかにする準備が揃ったと考え、これを目的として本研究を開始した。

一方、後述の通り本研究を開始してまもなく、LPCの形態で脳に輸送された脂肪酸はそのほとんどが脳血管内皮細胞に留まることを新たに見出した。従って上記の既報より想定されている仮説とは異なり、MFSD2AによりLPC形態で運ばれる脂肪酸は主に脳血管内皮細胞へと供される可能性が考えられた。そこで研究展開を変更し、脳血管内皮細胞内での輸送されたLPC由来の脂肪酸の代謝経路およびそのメカニズムに迫ることとした。さらに脳血管内皮細胞以外にLPC由来脂肪酸を取り込む細胞の同定を試みた。

【研究内容】

(0) はじめに -研究展開変更の経緯-

上述の通り、脳血管内皮細胞を介した脳へのDHA輸送の第一ステップにおいて、DHAがリゾリン脂質であるLPCの形態でMFSD2Aを介して運ばれることが提唱されている。そこで本研究を開始するにあたり、まず血中のDHA含有LPCが実際に脳実質へのDHAの主要な供給形態であることの確認を、遺伝子改変マウスと液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）により行うこととした。具体的には血中でDHA含有LPCが10分の1以下に減少している遺伝子Zの肝臓特異的欠損マウスにおいて脳DHA含有リン脂質量を測定した。その結果、予想に反して当該マウスの脳DHA含有リン脂質は10%程度しか減少していなかった。さらに当該マウスの脳血管内皮細胞を単離しそのリン脂質組成を調べたところ、DHA含有リン脂質が半分に以下に低下していることが見出された。

以上より、血中DHA含有LPCは脳実質というよりはむしろ脳血管内皮細胞へのDHA供給の寄与が高いことが想定され、LPCは脳血管内皮細胞への脂肪酸の供給形態であるという新たな仮説が生まれた。そこで、脳血管内皮細胞内での輸送された脂肪酸の代謝経路およびそのメカニズムに迫ることを研究目的とした。

(1) 重水素ラベル脂肪酸含有LPCを用いた脂肪酸の脳内追跡

マウス新生仔（1-2日齢）に重水素ラベルされたパルミチン酸を含有するLPCを静脈注射し、2時間後に脳を回収、酵素による分散およびソーティングにより脳血管内皮細胞とそれ以外の脳実質細胞に分離しガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-MS）にてラベル化パルミチン酸の定量を行なった。その結果、投与されたLPC由来の重水素ラベル化パルミチン酸の多くが血管内皮細胞に検出され、その他の脳実質細胞への輸送は限定的であることがわかった。同様の実験をMFSD2A欠損マウスにて行なったところ、血管内皮細胞への重水素ラベル化パルミチン酸の取り込みは激減しており、これがLPC輸送体を介した特異的なものであること

が確認された。一方、野生型マウスで限定的に認められたその他の脳実質細胞への重水素ラベル化パルミチン酸の存在量は MFSD2A 欠損マウスにおいても遜色なく、これが MFSD2A 非依存的な経路によることが示唆された。

以上の結果より、血液から脳へと LPC の形態で MFSD2A により運ばれる脂肪酸は少なくとも一定のあいだ脳血管内皮細胞に留まることが新たに見出された。これは、LPC 由来脂肪酸が少なくとも速やかに脳実質に運ばれるわけではないことを示唆する。

(2) 脳血管内皮細胞における LPC およびその脂肪酸の代謝運命

次に、脳血管内皮細胞において LPC 由来の脂肪酸の代謝運命を検証した。上記と同様に重水素ラベル化パルミチン酸含有 LPC を静脈投与したマウス脳由来の血管内皮細胞画分およびその他の脳実質細胞画分より脂質抽出後、アミノプロピルカートリッジにより脂質分画を行なった。分画された中性脂質、遊離脂肪酸、リン脂質それぞれにおける重水素ラベル化パルミチン酸の量を GC-MS で定量したところ、そのほとんどがリン脂質画分に存在することが示された。さらに、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) にて解析を進めた結果、重水素ラベル化パルミチン酸はもはや LPC の形態では存在せず、専らホスファチジルコリン (PC) の形態で存在することが示された。

LPC 形態で細胞に取り込まれた脂肪酸が後に PC 中に存在するようになるその機序としては以下の 2 通りが考えられる。1 つ目は脂肪酸が LPC から解離し、リン脂質の *de novo* 合成経路に合流する経路、もう 1 つは LPC にさらに脂肪酸が添加 (アシル化) されることで LPC の骨格を保ったまま PC へと変換される経路である。このような LPC および脂肪酸の代謝経路について検証すべく、LPC を構成する脂肪酸、グリセロール、およびコリンがそれぞれ異なる数の重水素によりラベルされた全重水素置換 LPC を用いて、上記と同様の実験を行なった。これにより抽出脂質の LC-MS 解析を通じて当該 PC が投与された LPC のどの構成物を含有するかを判定することが可能となる。本実験の結果、重水素ラベル化パルミチン酸を含有する PC の多くがグリセロール骨格やコリンにも重水素ラベルを含有することが示された。つまり、脳血管内皮細胞に取り込まれた LPC はさらにアシル化されることにより LPC 骨格を保ったまま PC へと代謝されることが明らかとなった。

(3) 脳血管内皮細胞での LPC から PC への代謝におけるリゾリン脂質アシル転移酵素群の関与

リゾリン脂質にアシル化してリン脂質を合成する経路に関わる酵素群としてこれまで 14 種類リゾリン脂質アシル転移酵素 (LPLAT) が報告されている。そこで、所属教室で保有していた 10 種類の LPLAT の欠損マウスを用いて上記と同様の実験を行い、脳血管内皮細胞にて取り込まれた LPC から PC へと代謝する酵素の同定を試みた。投与された全重水素置換 LPC にさらに付加している脂肪酸としては、パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸/アラキドン酸、DHA が豊富に認められたが、それぞれの付加が LPLAT 遺伝子 W、X、Y、Z それぞれの欠損マウスにおいては、ほとんど認められないか著しく減弱していた。従って、脳血管内皮細胞に MFSD2A により取り込まれた LPC の多くは、LPLAT 群により酵素的にアシル化されることで PC へと速やかに代謝されることが示された。

(4) 重水素ラベル脂肪酸含有 LPC の傍血管線維芽細胞への取り込み

上述の通り、限定的ではあるが非血管内皮細胞からなる脳細胞集団にも重水素ラベル化パルミチン酸が検出されている。しかしながら、この取り込みは MFSD2A 欠損マウスにおいても遜色ないことから、新たな経路で取り込まれていると考えられた。そこで、この MFSD2A 非依存的に LPC 由来脂肪酸を取り込む細胞種の評価を行った。ここではフローサイトメトリーによる直接の脂肪酸追跡を可能にするため、蛍光ラベル脂肪酸含有 LPC (TF-LPC) を用いた。これまでと同様の方法にて、マウス新生仔への TF-LPC 投与実験を行い、各種細胞表面マーカーに対する抗体を用いて蛍光脂肪酸を蓄積する細胞について検討を行なった。これまでの結果と矛盾なく、血管内皮細胞にて蛍光脂肪酸の豊富な取り込みが認められたが、それに加えて PDGFR α

陽性の細胞集団にて特徴的な蛍光脂肪酸の取り込みが確認された。注目すべきことに、全ての PDGFR α 陽性細胞が蛍光脂肪酸を取り込むわけではなく、その一部の集団にのみ蛍光脂肪酸の取り込みが認められた。

次にこの蛍光脂肪酸取り込み能のある PDGFR α 陽性細胞の細胞種同定を試みた。具体的には TF-LPC を投与したマウス脳由来の PDGFR α 陽性細胞をさらに蛍光脂肪酸陽性および陰性の細胞に分離し、それぞれから回収した RNA を用いて RNA シーケンスを行なった。その結果、蛍光脂肪酸陽性の PDGFR α 陽性細胞に特徴的に高発現する上位遺伝子のほとんどが線維芽細胞特異的な遺伝子群に属することが明らかとなった。近年、脳血管周囲に存在する PDGFR α 陽性の線維芽細胞(傍血管線維芽細胞)が発見され(Vanlandewijck *et al.*, *Nature*, 2018)、脳機能や神経疾患における新たなプレーヤーとして注目を集めている(Dorrier *et al.*, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2021)。上記の結果より、この LPC 由来脂肪酸を蓄積する非血管内皮細胞が傍血管線維芽細胞である可能性が高いと考えられる。傍血管線維芽細胞が LPC に含有される脂肪酸を積極的・選択的に取り込むメカニズムやその意義についての解明は、発見後まだまもないこの新たな脳内細胞種のそもそもの機能を明らかにする上でも重要になるかもしれない。

【まとめと今後の展望】

本研究では、重水素ラベル脂肪酸含有リン脂質、各種脂質代謝関連遺伝子欠損マウスおよび質量分析を駆使することで、LPC 形態で脳へ移行した脂肪酸の空間的代謝運命の追跡を試みた。その結果、MFSD2A により脳血管内皮細胞に取り込まれた LPC は複数の LPLAT による酵素学的な脂肪酸添加によりリン脂質へと代謝され、少なくともしばらくはその場にとどまることが *in vivo* レベルで見出された。一方、LPC 形態による脳実質への脂肪酸輸送は脳血管内皮細胞に比較して低効率であることがわかった。これは血中 DHA 含有 LPC 量が激減する遺伝子改変マウスにおいても脳内 DHA 量は 10%程度の減少にとどまるという結果とも合致する。従って、MFSD2A の発見を機に現在想定されている「LPC が脳実質への主要な脂肪酸輸送」という仮説は改訂が必要になるかもしれない。

また、上述の成果により新たな重要な課題が生まれた。まず、LPC が脳実質への主要な脂肪酸 (DHA) 輸送形態でないとするならば、「真の」輸送脂質形態は何であり、そこにどのような分子が関わっているのか? これについて、本研究のようなラベル体および質量分析を駆使することで追求していきたい。さらに、MFSD2A により取り込まれた LPC が PC へと速やかに代謝されるその生理的意義は何か? MFSD2A はヒト小頭症の原因遺伝子でもあり、その欠損マウスも脳神経系の著しい異常を呈する。これまでその原因は DHA 量の減少に起因すると考えられてきたが、同じく脳 DHA 量が減少する他の遺伝子欠損マウスではここまで劇的な表現型は観察されていない。従って、DHA 量の制御には留まらない、脳血管内皮細胞への LPC の供給とそれに引き続く速やかな PC への代謝が MFSD2A 機能の本質であるかもしれない。PC からさらに先への代謝追跡や LPLAT 群をはじめとする関連リン脂質代謝酵素の欠損マウスの解析を通じて、この可能性について検証を続けていきたい。

【謝辞】

本研究を進めるにあたり、公益財団法人アステラス病態代謝研究会にご支援賜りましたことを深く感謝申し上げます。