

大脳新皮質形成におけるオメガ3脂肪酸DHAとEPAの異なる役割の解析

酒 寄 信 幸

東北大学大学院医学系研究科 博士課程
(現 福島県立医科大学医学部 特任助教)

緒 言

オメガ3 (ω -3) 多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は細胞膜を構成する重要な要素であり、かつ種々のシグナル伝達物質の前駆体としても重要な役割を担う物質である。 ω -3 PUFAは哺乳類の体内において新規に合成されず、食物を介して摂取しなければならない必須脂肪酸であり、文字通り必須の栄養素として知られている。私はこれまで、神経系を形成する材料となる細胞である神経幹細胞をラット胎仔大脳皮質原基から培養し、代表的な ω -3 PUFAであるドコサヘキサエン酸 (DHA) を培養液中に添加することにより、DHAが神経幹細胞の増殖と神経細胞への分化を制御することを見出し、 ω -3 PUFAが大脳新皮質形成を制御する可能性を報告した¹⁾。また、 ω -3 PUFA欠乏飼料を妊娠ラットに投与することにより、その仔における大脳新皮質の神経細胞層の低形成が起こること²⁾や、DHAが成体ラット海馬における神経新生に必要であること³⁾が他研究グループから発表されている。現在、世界中の多くの国々において ω -3 PUFAの摂取不足が報告されている^{4,5)}ため、 ω -3 PUFAの神経発生における役割の解明は非常に重要である。

DHAはその前駆体であるエイコサペンタエン酸 (EPA) から合成されるが、DHAとEPAはそれぞれ異なる代謝産物へ変換されることから、同じ ω -3 PUFAであっても異なる役割を担っている可能性が考えられる。しかしながら脳内のEPAは非常に早く酸化される⁶⁾ため、脳におけるEPAの機能を解析することは容易ではない。そこで本研究では、 ω -6 PUFAであるアラキドン酸をEPAに変換する、哺乳類には本来存在しないFat-1酵素をコードする遺伝子をマウスに組み込んだFat-1トランスジェニックマウス⁷⁾を用い、飼料ではなく代謝によってEPAを脳において効率的に増加させ、大脳新皮質形成におけるDHAとEPAの役割を解明する

ことを目的とした。

方 法

1. 供試動物

野生型C57BL/6マウスを日本クレアより購入し、Fat-1マウスを米国ハーバード大学より導入した。Fat-1マウスにはEPA合成の基質を提供するため、omega-6 PUFA高含有飼料²⁾を投与した。13週齢の雌マウスを野生型 (WT) 雄マウスと交配させ、妊娠させた後に仔の解析を行った。ここでは、神経幹細胞の下層・上層神経細胞産生の転換期にあたる胎生14日目⁸⁾、および大脳新皮質6層構造の形成が完了している生後10日目の仔マウスを解析した。すべての動物実験は東北大学医学部動物実験委員会の許可を受けて実施した。

2. 脂肪酸組成分析

仔の脳を摘出後、クロロホルム・メタノール混和溶液を用いて脂質を抽出し、脂肪酸残基をメタノール塩酸によりメチル化させ、脂肪酸メチルエステルをヘキサンにより抽出後、Agilent 6890ガスクロマトグラフ (Agilent) を用いて脂肪酸組成を定量した。ここではペンタデカン酸を内部標準として添加した。

3. 組織解析

4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて仔マウスを還流固定した後、脳を摘出し、30%スクロース溶液を用いてスクロール置換を行い、凍結後に12 μ m (胎生14日目におけるサンプル) または40 μ m (生後10日目におけるサンプル) の凍結切片を作成した。切片は免疫染色の後、LSM5共焦点顕微鏡 (Zeiss) を用いて撮影、定量した。各領域の厚さは μ m、細胞密度は $5.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ (図3、Pax6)、 $3.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ (図3、Tbr1)、 $4.0 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ (図4) あたりの陽性細胞数にて示した。

4. EPA代謝産物の網羅的定量

UPLC高速液体クロマトグラフ (Waters)・QTRAP5500 タンデム型質量分析計 (Ab Sciex) を用い、先行報告⁹⁾に基づいて行った。全脳における存在量をpg単位にて示した。

5. 神経幹細胞の培養

神経幹細胞の培養は先行報告¹⁰⁾に基づいて行った。培養には胎生14日目の大脳皮質原基を用いた。

6. 統計処理

各試験の結果は平均±標準誤差にて示した。群間における有為差は * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ にて示した。

結 果

まず仔の脳における脂肪酸組成を分析したところ、2群間における総 ω -3 PUFA組成には差が認められないものの、DHA組成の減少とEPA組成の増加が*Fat-1*マウスにおいて認められた (図1,2)。また、総飽和脂肪酸、総一価不飽和脂肪酸、総 ω -6 PUFA、もう一つの

ω -3 PUFAであるリノレン酸の組成において、二群間に差は認められなかった。よって、WTマウスと*Fat-1*マウスの脂肪酸組成において有為な差が認められた脂肪酸はDHAとEPAに限られることから、この2群を比較することによりDHAとEPAの相対的な役割を解析することが可能である。

続いて仔の脳における組織解析を行った。まず胎生14日目における大脳皮質原基を様々な領域において解析したところ、大脳皮質原基全体の厚さ (図3A、E、I)、Pax6陽性神経幹細胞層 (図3B、F、J)、 β 3 tubulin陽性幼弱神経細胞層 (図3C、G、K)、Tbr1陽性成熟神経細胞層 (図3D、H、L) において有為な差は認められなかった。しかし生後10日目の大脳新皮質においては、一次運動野におけるCtip2陽性第5層の神経細胞密度が増加し、Cux1陽性第4-2層の神経細胞層の厚さが減少した (図4A-C)。また、一次体性感覚野におけるFoxp2陽性第6層の神経細胞密度が増加し、Ctip2陽性第5層の神経細胞密度が増加し、Cux1陽性第4-2層の神経細胞層の厚さが減少した (図4D-F)。また、一次視覚野におけるFoxp2陽性第6層の神経細胞密度が増加し、

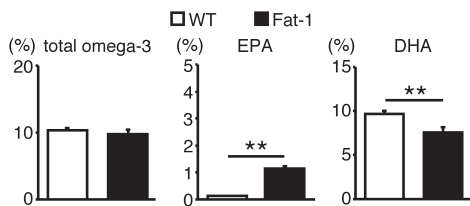


図1 胎生14日目の全脳における ω -3 PUFA組成解析

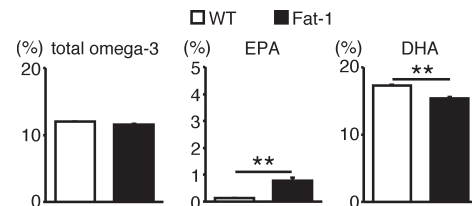


図2 生後10日目の全脳における ω -3 PUFA組成解析

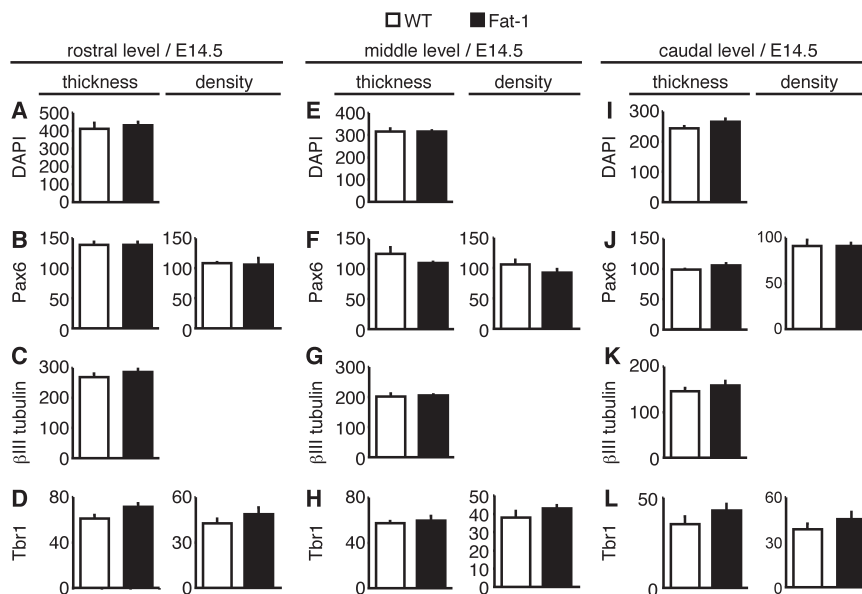


図3 胎生14日目の大脳皮質原基の組織解析

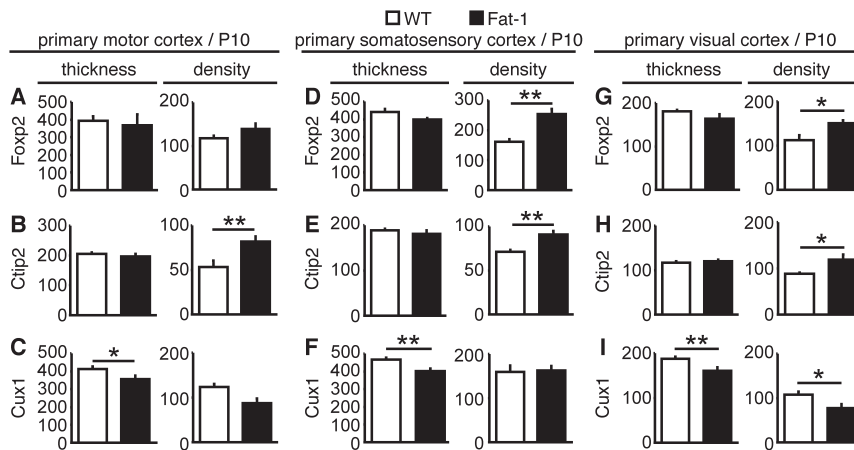


図4 生後10日目の大脳新皮質の組織解析

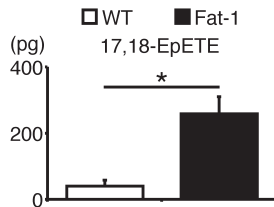


図5 胎生14日目の全脳における17,18-EpETE量

Ctip2陽性第5層の神経細胞密度が増加し、Cux1陽性第4-2層の神経細胞層の厚さと神経細胞密度が減少した(図4G-I)。よって、DHAが減少しEPAが増加したFat-1マウスにおいては、Foxp2またはCtip2陽性の下層神経細胞が増加し、Cux1陽性の上層神経細胞が減少したことがわかった。

続いてこのような組織学的表現型を引き起こした分子を同定するため、胎生14日目の胎仔全脳におけるEPA代謝産物の網羅的定量を行ったところ、大きな変動を示した代謝産物としてシトクロムP450による酸化産物である17,18エポキシエイコサテトラエン酸(17,18-EpETE)を同定した(図5)。

考察

胎生14日目においては有為な表現型が認められなかったにも関わらず、生後10日目においては下層神経細胞の増加と上層神経細胞の減少が認められた。神経幹細胞は、神経細胞産生の初期に下層の神経細胞、後期に上層の神経細胞を作り出す⁸⁾ため、本研究結果から、本来であれば胎生14日目に起こる神経幹細胞の下層・上層神経細胞産生の転換が、Fat-1マウスにおいて増加したEPA、または減少したDHAによって遅延させられた可能性が示唆された。しかし単純なDHA欠乏マウスに

おいては下層神経細胞の増加という表現型は見られない(酒寄ら、未発表)ため、Fat-1マウスにおいて見られた表現型はEPAの増加によるものと考えられる。以上より、DHAは上層神経細胞の産生に、EPAは下層神経細胞の産生に関わっていることが示唆された。

現在、Fat-1マウス由来の神経幹細胞の初代培養系により、下層・上層神経細胞産生の転換の細胞生物学的解析を行っている。しかしFat-1は培養中の神経幹細胞においてもアラキドン酸からEPAを合成し続けるため、本培養条件下では神経幹細胞の維持に必要なアラキドン酸¹⁾が枯渇してしまい、神経幹細胞の維持ができなくなることを見だしている。現在は培養液の組成の最適化を行っているところであり、最適化が完了し次第、神経幹細胞における下層・上層神経細胞産生の転換の詳細な解析を行う。

ω -3 PUFAは必須の栄養素として知られ、抗炎症作用や抗がん作用を有するなど多くの有益な効果があることが知られている。日本では2010年に厚生労働省により、18歳以上の日本人男女すべてにおいて1日1グラム以上の ω -3 PUFAの摂取が望ましいと定められ、2012年の消費者庁の「食品の機能性評価モデル事業」において、 ω -3 PUFAは数ある健康食品の中で唯一のA評価を受けた項目のある栄養素である。ヒト脳機能における ω -3 PUFAの有益性も多くの疫学研究や介入試験によって示されており、 ω -3 PUFA摂取不足が記憶・学習などの脳機能の低下に関連していることが示されている¹¹⁾。このように ω -3 PUFAが非常に重要な栄養素であることは広く認識されているが、実際の食事摂取基準においては ω -3 PUFAの実体であるDHAとEPAは同じものように扱われている。本研究はDHAとEPAの神経発

生における役割に違いがあることを示すものであり、現在の食事摂取基準における「 ω -3 PUFA 摂取量」という指標だけでは不十分であり、今後は「DHA 摂取量」と「EPA 摂取量」とに分けて目安量および推奨量の検討を行う必要性を示唆している。

要 約

ω -3 PUFA は細胞膜の構成要素であり、かつ脂肪酸代謝産物の前駆体としても重要である。 ω -3 PUFA の実体である DHA と EPA はそれぞれ異なる代謝産物へ変換されることから、同じ ω -3 PUFA であっても異なる役割を担っている可能性が考えられる。そこで本研究では、EPA の増加と DHA の減少が見られる *Fat-1* マウスを用いて大脳新皮質形成における DHA と EPA の役割を解析した。組織学的な解析により、*Fat-1* マウスにおいて大脳新皮質下層における神経細胞の増加と上層における神経細胞の減少が認められ、DHA は上層神経細胞の、EPA は下層神経細胞の産生に関わっていることが示唆された。本研究は、食事摂取基準における「 ω -3 PUFA

摂取量」という指標を「DHA 摂取量」と「EPA 摂取量」とに分けて目安量を検討する必要性を示唆している。

謝 辞

本研究課題を遂行するにあたり、公益財団法人三島海雲記念財団のご支援を賜りました。財団関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) N. Sakayori, et al.: *Genes Cells*, **16**, 778–790, 2011.
- 2) P. Coti Bertrand, et al.: *J. Nutr.*, **136**, 1570–1575, 2006.
- 3) E. Kawakita, et al.: *Neuroscience*, **139**, 991–997, 2006.
- 4) A. P. Simopoulos: *Poult. Sci.*, **79**, 961–970, 2000.
- 5) A. P. Simopoulos, et al.: *J. Nutrigenet. Nutrigenomics*, **4**, 65–68, 2011.
- 6) M. Igarashi, et al.: *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **89**, 403–412, 2013.
- 7) J. X. Kang, et al.: *Nature*, **427**, 504, 2004.
- 8) T. Takahashi, et al.: *J. Neurosci.*, **19**, 10357–10371, 1999.
- 9) M. Arita: *J. Biochem.*, **152**, 313–319, 2012.
- 10) B. A. Reynolds, et al.: *J. Neurosci.*, **12**, 4565–4574, 1992.
- 11) A. S. Ryan, et al.: *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **82**, 305–314, 2010.