

ドコサヘキサエン酸の脳内ステロイド合成促進を介した 脳機能改善作用

石原 康 宏

広島大学大学院総合科学研究科 行動科学講座分子脳科学研究室 助教

緒 言

n-3系高度不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) は、脳内の全脂肪酸の26.7%を占める脳内の主要な脂肪酸である。DHAは、老化とともに減少すること、アルツハイマー病患者の脳内DHA量は、健常者の半分程度であること、また、魚油の脳機能改善の報告などから“頭を良くする物質”として注目されてきた。DHAはGタンパク質シグナルを調節することにより神経細胞を保護し、また、フォスファチジルセリンなどのリン脂質の合成を増加させて網膜の機能を改善するとされる¹⁾。さらに、DHAは、抗炎症作用、抗酸化作用をもつことも明らかとなってきた²⁾。しかし、これらの知見では、DHAの脳機能改善作用や神経保護効果を説明するには十分でなく、DHAの作用を媒介するメディエーターの存在が示唆される。

脳は末梢内分泌腺が合成するステロイドの標的器官として捉えられてきたが、最近の研究により、脳それ自身がステロイドホルモンを合成し、独自の内分泌系を形成して、神経機能を調節していることが明らかとなった。脳内ステロイドは、スパイン新生³⁾や樹状突起の伸長⁴⁾を引き起こすことが報告され、さらに、筆者らは、シナプス形成⁵⁾に関与することを示した。加えて、最近、代表的な脳内ステロイドであるエストラジオールやプロゲステロンが、トリブチルスズやメチル水銀などの環境化学物質による神経障害を抑制することを報告し、脳内ステロイドの化学物質に対する神経保護作用を明らかにした⁶⁾。

末梢のステロイドホルモン合成の律速段階は、ミトコンドリアへのコレステロールの取り込みであり、この段階を触媒するStARタンパク質により、ステロイドホルモン合成が制御される。しかし、脳内ステロイドホルモン合成は、チトクロムP450 17 α に制御される。筆者らは、レチノイン酸（ビタミンA）によりレチノイドX受容体（RXR）を刺激するとチトクロムP450 17 α の発現が上昇し、テストステロン、エストラジオールの合成

量が増加することを報告し、脳内のステロイドホルモン合成にRXRが重要であることを明らかにした⁷⁾。

DHAは、RXRのアゴニストとして作用することから⁸⁾、DHAは、脳内でステロイドホルモン合成を活性化し得る。そこで、本研究では、“DHAは脳内ステロイドホルモン合成を活性化することにより、神経機能を改善する”との仮説を立脚し、この仮説を、DHAを投与したマウスを用いて検証する。

実験プロトコールと測定法の概要

実験には、4週齢雄性ICRマウスを使用した。マウスを(i)大豆油含有餌群、(ii)ヤシ油含有餌群、および、(iii)ヤシ油+DHA含有餌群の3群に分けた。大豆油、ヤシ油は、AIN-93Gに7% (w/w)の含量で添加し、DHA群については、脂質含量の4% (w/w)のDHAを添加した。それぞれの餌を自由に与えて4週間（28日間）飼育した後、下記の測定に供した。飼育の間、マウス体重と食餌量を、経時的に測定した。

マウスより脳を摘出し、全脳重量を測定した後、大脳皮質、小脳、海馬に分け、それぞれの重量を測定した。大脳よりRNAを抽出し、cDNAを合成した後、ステロイド合成酵素mRNAの発現をreal-time PCRにより測定し、大豆油含有食餌群を1に標準化した $\Delta\Delta Ct$ 法により定量した。大脳よりエストラジオールを含む脂溶性分子群を抽出し、2段階の精製の後、ELISAによりエストラジオールを定量した。協調運動をロータロッド試験により測定した。探索行動と移動活動量をオープンフィールド試験により、空間作業記憶をY字迷路試験により、新規物体に対する応答を物体認識試験によりそれぞれ評価した。

結 果

1. 群間の体重、食餌量、脳重量の比較

大豆油含有餌群、ヤシ油含有餌群、および、ヤシ油

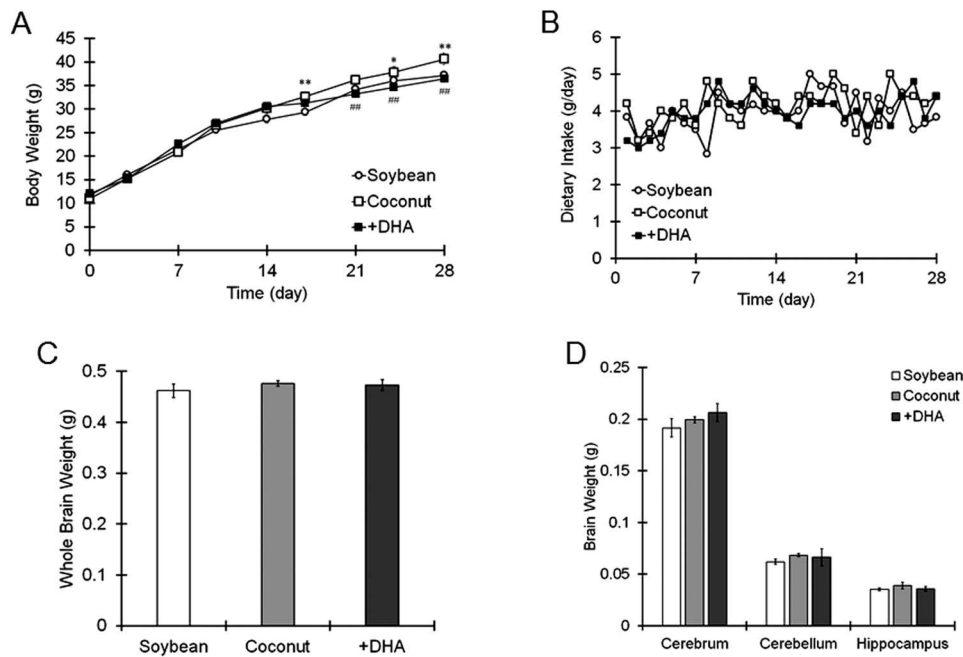


図1 飼料中の脂質の (A) 体重、(B) 食餌量、(C) 全脳重量、および、(D) 脳領域重量に及ぼす影響

雄性ICRマウスを大豆油含有餌、ヤシ油含有餌、および、ヤシ油+DHA含有餌で28日間飼育し、(A) 体重変化と (B) 食餌量を経時的に測定した。飼育28日後に脳を摘出し、(C) 全脳重量と (D) 大脳皮質、小脳、および海馬の重量をそれぞれ測定した。

+DHA含有餌群の体重変化と食餌量を28日間記録した。ヤシ油含有餌群の体重は、大豆油含有餌群と比較して17日目より有意に増加し、28日目においてもその差は有意であった(図1A)。ヤシ油にDHAを添加すると体重の増加は抑制され、ヤシ油+DHA含有餌群の体重は大豆油含有餌群の体重とほぼ一致した(図1A)。したがって、DHAはヤシ油含有餌による体重増加を抑制する作用があるのかもしれない。

マウス1日あたりの食餌量は3群間において変化は認められなかった(図1b)。また、投与28日目における全脳重量、および、大脳皮質、小脳、海馬重量も3群間の差は認められなかった(図1C、D)。

2. ステロイド合成酵素発現量と脳内エストラジオールの定量

抹消と同様、脳内においても、ステロイドホルモンは、コレステロールのミトコンドリア内膜への取り込みに端を発する多段階反応により合成されている(図2)。そこで、これらの中から主要なステロイド合成酵素9種類(steroidogenic acute regulatory protein (StAR)、translocator protein (TSPO)、cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc)、3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (3 β -HSD1)、cytochrome P450

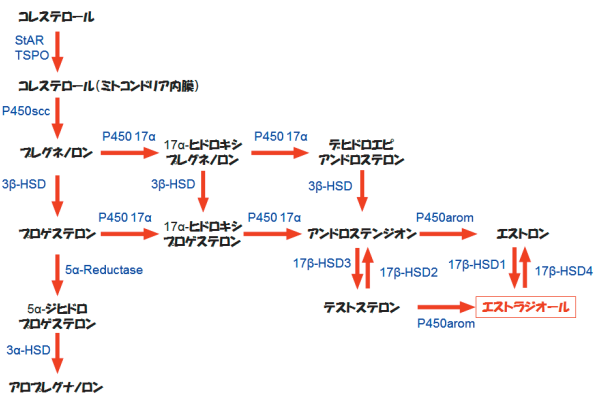


図2 脳内ステロイド合成経路の概略

矢印横の青字は反応触媒酵素を示す。

17 α hydroxylase/17,20 lyase (P450 17 α)、17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1)、17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (17 β -HSD3)、5 α -reductase (5 α -Red) の mRNA の発現変化を real-time PCR により調べた。大豆油含有餌を与えたマウスとヤシ油含有餌を与えたマウスでは、上記9種類の酵素の mRNA 量に大きな変化は認められなかった(表1)。一方、ヤシ油含有餌群とヤシ油+DHA含有餌群とを比較すると、P450 17 α 、17 β -HSD3およびP450arom mRNA の発現が増大していた(表1)。中でも、17 β -

表1 ステロイド合成酵素とステロイド受容体の発現変化

	Soybean	Coconut	+DHA
StAR	1.0±0.1	0.8±0.1	0.5±0.1
TSPO	1.0±0.1	0.7±0.1	1.0±0.2
P450scc	1.0±0.0	0.8±0.1	0.5±0.1
3β-HSD1	1.0±0.1	1.1±0.1	1.7±0.4*
P450 17α	1.0±0.1	1.7±0.1	5.9±2.4**
17β-HSD1	1.2±0.3	0.7±0.1	1.0±0.1
17β-HSD3	1.4±0.1	0.6±0.1	31.1±16.7**
5α-Red	1.0±0.0	0.9±0.1	0.7±0.1
P450arom	1.0±0.2	1.5±0.1	6.7±2.4**
AR	1.0±0.0	0.9±0.0	1.0±0.1
ERα	1.0±0.0	1.0±0.0	1.3±0.1
ERβ	1.0±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1

雄性ICRマウスを大豆油含有餌、ヤシ油含有餌、および、ヤシ油+DHA含有餌で28日間飼育した。脳を摘出し、大脳皮質を分離した後RNAを抽出し、cDNAを合成した。ステロイド合成酵素、または、ステロイド受容体のmRNA発現をreal-time PCRにより定量した。

HSD3 mRNAは、大豆油含有餌群やヤシ油含有餌群と比べて30倍以上に増加した(表1)。次に、アンドロゲン受容体 (androgen receptor (AR)) とエストロゲン受容体 (estrogen receptor α (ERα)、estrogen receptor β (ERβ)) の発現も調べたところ、3群間でこれらmRNAに変化は認められなかった。以上の結果より、DHAは、P450 17α、17β-HSD3およびP450aromの発現を増大させると考えられる。

P450 17αは、プレグネノロンやプロゲステロンを代謝する酵素、17β-HSD3はアンドロステンジオンからテストステロンの合成を触媒する酵素、P450aromはテストステロンからエストラジオールを合成する酵素である(図2)。したがって、これら3酵素の発現の増大は、プロホルモンであるプレグネノロンからエストラジオールへの合成が亢進していると考えられる。そこで、マウス大脳皮質のエストラジオールを定量した。

マウス大脳よりヘキサノール酢酸エチルを用いてステロイドホルモンを抽出し、固相カラム (C18)、順相HPLCによりエストラジオールを精製した後、ELISAにより定量した。大豆油含有餌群と比較して、ヤシ油含有餌群では、有意差は得られなかったものの、大脳エストラジオール量が低下する傾向が認められた(図3)。一方、ヤシ油にDHAを添加しておく、エストラジオール量は増加する傾向であった(図3)。したがって、大脳エストラジオール量は、DHAによる制御を受けている可能性が示された。

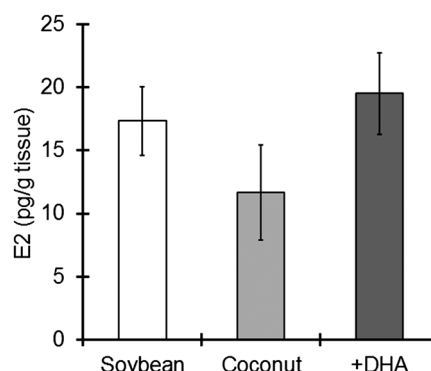


図3 マウス大脳皮質エストラジオール量の変化

雄性ICRマウスを大豆油含有餌、ヤシ油含有餌、および、ヤシ油+DHA含有餌で28日間飼育した。脳を摘出し、大脳皮質を分離した。大脳皮質中のエストラジオール量をELISAにより定量した。

3. 行動解析

ロータロッド試験によりマウスの協調運動能を測定した。ヤシ油含有餌群でロータロッド上の滞在時間が低下し、DHA添加により上昇する傾向が認められたが、いずれも有意差は得られていない(図4A)。オープンフィールド試験により、探索行動と移動活動量を評価したところ、探索行動は、大豆油含有餌群と比較して、ヤシ油含有餌群で有意に低下し、DHAはこの低下に影響しなかった(図4B)。移動活動量については、3群間で有意差は得られていない(図4C)。Y字迷路により空間作業記憶を測定したところ、3群間で有意差は得られなかった(図4D)。物体認識試験を行ったところ、DHA添加によりマウスの好奇心が増加する傾向が認められたが、有意差は得られなかった(図4E)。

考 察

本研究では、DHAの脳機能改善作用について、脳内ステロイドに焦点を当てて検討した。DHAを1ヵ月間与えたマウスにおいて、ステロイド合成酵素であるP450 17α、17β-HSD3およびP450aromの発現が増大し、大脳皮質エストラジオール量が増加した。したがって、DHAは、ステロイド合成酵素の発現亢進を介して脳内エストラジオール量を増大させていると考えられる。この知見は、DHAの新たな作用点を見出しただけでなく、新たな脳内ステロイド合成制御メカニズムを示した点でも意義があると考えられる。DHAは、RXRのアゴニストとして作用することが報告されており⁸⁾、我々は、RXR刺激によりP450 17αとP450aromの発現が増大す

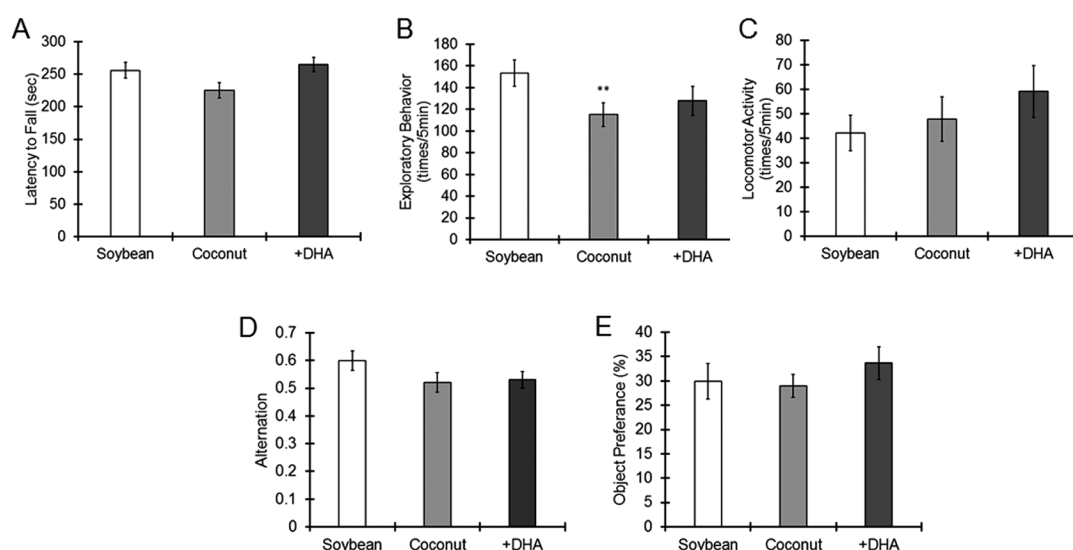


図4 飼料中の脂質のマウス行動に対する影響

雄性ICRマウスを大豆油含有餌、ヤシ油含有餌、および、ヤシ油+DHA含有餌で28日間飼育した。(A) ロータロッド試験により協調運動能を測定し、(B、C) オープンフィールド試験により (B) 探索行動と (C) 移動活動量を評価した。(D) Y字迷路により空間作業記憶を測定し、(E) 物体認識試験により好奇心を評価した。

ることを明らかにしている⁷⁾。したがって、本研究で見出したDHAによるエストラジオール合成亢進にもRXRが関与すると考えられる。また、ラット海馬スライスをレチノイン酸で刺激すると、P450 17 α とP450aromの発現が増大するが、17 β -HSD3の発現は変化しなかった⁷⁾。本研究では、DHAによりP450 17 α とP450arom、17 β -HSD3と3つの酵素mRNAが増加した。したがって、DHAによる17 β -HSD3の発現上昇は、RXRは関与しないメカニズムであるかもしれない。

行動試験により5種類のパラメーター、協調運動能、探索行動、移動活動量、空間作業記憶、および、好奇心性を評価した。ヤシ油含有餌群において、大豆油含有餌群と比較して探索行動が減少するとの結果を得たが、他の試験においては有意な差は認められなかった。DHAは、血液能関門を通過して脳に輸送されるが、脳内でのターンオーバーは早くはない。また、若年の動物ほど、投与により脳への移行・蓄積が認められる。本研究では、DHAの投与期間を1ヵ月(28日)としたが、投与期間を長くして行動試験を行う、あるいは、妊娠期投与の後、仔の脳内ステロイド量を測定し、行動試験を行うなど、実験プロトコルを改変し、DHAの行動に及ぼす影響を精査したいと考えている。

要約

雄性ICRマウスを使用し、大豆油含有餌、ヤシ油含有

餌、または、ヤシ油+DHA含有餌で1ヵ月間飼育した後、脳内ステロイド合成と行動を評価した。DHA投与群において、大脳皮質のP450 17 α 、17 β -HSD3およびP450aromの発現が上昇し、エストラジオール量が増加した。協調運動能、探索行動、移動活動量、空間作業記憶、および、好奇心性を測定したが、今のところ、ヤシ油+DHA含有餌群において有意に生じる現象は見出していない。本研究より、DHAは、ステロイド合成酵素の発現亢進を介して脳内エストラジオール量を増大させることが明らかとなった。DHAの行動に及ぼす影響については、より詳細な解析が必要である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人三島海雲記念財団より助成金を賜りました。ここに記して、関係各位に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) N. Salem, et al.: *Lipid*, **36**, 945-959, 2001.
- 2) J. M. Schwab, et al.: *Nature*, **447**, 869-874, 2007.
- 3) H. Mukai, et al.: *Neuroscience*, **138**, 757-764, 2006.
- 4) H. Sakamoto, et al.: *J. Neurosci.*, **21**, 6221-6232, 2001.
- 5) H. Mukai, et al.: *J. Neurochem.*, **100**, 950-967, 2007.
- 6) Y. Ishihara, et al.: *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 343706, 2015.
- 7) E. Munetsuna, et al.: *Endocrinology*, **150**, 4260-4269, 2009.
- 8) A. M. de Urquiza, et al.: *Science*, **290**, 2140-2144, 2000.