

## 論文の内容の要旨

論文題目 周産期におけるドコサヘキサエン酸含有リン脂質の役割に関する研究

氏名 叶谷 愛弓

### [序論]

22個の炭素数を持ち、6つの二重結合を有するドコサヘキサエン酸 (DHA) は最初の二重結合がメチル基末端から数えて3番目の炭素に存在することから $\omega$ -3脂肪酸と呼ばれ、脂肪酸の中でも特に生体機能に重要な役割を持つ。哺乳類は脂肪酸の $\omega$ -3位に二重結合を導入する酵素を有していないため、 $\omega$ -3脂肪酸自体を体内で合成することはできない。そのため、DHAやその合成に必要な $\omega$ -3脂肪酸である $\alpha$ リノレン酸も食事からの摂取が不可欠となる。細胞内においてDHAをはじめとする脂肪酸は主として生体膜のリン脂質に組み込まれた形で存在している。リン脂質に結合する脂肪酸の炭素数や二重結合は脂肪酸の物理的な性質に影響を与えることから、二重結合を6つ持つDHAを多く含む生体膜は流動性や柔軟性に富み、膜タンパク質の局在、活性、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスなどの膜の解離や融合過程また、細胞分裂や形態変化において重要な役割を有する。このDHA含有リン脂質 (DHA-PLs) の生体膜における割合が異なることが、各組織や臓器の特徴を生み出す。

DHA-PLs は精巣や網膜と並んで脳に豊富に含まれていることが知られている。グリア細胞や神経細胞の生体膜には流動性を高める DHA-PLs が多く存在することが神経細胞の樹状突起の伸長・形成や神経伝達物質の分泌などに役割を果たすと考えられている。つまり、脳の構造や機能が急速に発達する胎児期から新生児期、乳児期にかけて DHA の摂取は非常に重要であると考えられる。胎児期および新生児期における DHA の摂取は母親からの胎盤、あるいは母乳を介した供給に依存していると考えられるが、その輸送メカニズムについては不明な点が多い。本研究は、DHA-PLs 産生に重要な酵素であるリゾホスファチジン酸アシル転移酵素 3 (LPAAT3) の欠損マウスを用いて、DHA 供給のメカニズムを含めた周産期における DHA の意義を解明することを目的とした。

### [方法]

1. LPAAT3 野生型 (WT)、ヘテロ型 (HZ)、欠損型 (KO) 成マウスを用いた実験
  - 1-1. 4週齢の LPAAT3 WT および KO マウスにおける脳、褐色細胞、白色細胞、肝臓の DHA-PLs の割合を測定した。さらに、体重・脳重量・肝臓重量および離乳直後の3週齢から5週齢にかけての体重変化を測定した。
  - 1-2. LPAAT3 WT、HZ、KO 成マウスに行動実験 (Tail suspension テスト、Rotarod テスト) を行った。
2. LPAAT3 WT 妊娠マウスを用いた実験
  - 2-1. 非妊娠マウスと妊娠11日目、14日目、18日目および出産後12日目のマウス肝

臓における DHA-PLs の割合の変化を測定した。さらに、妊娠 11 日目、14 日目、18 日目のマウス血清中の DHA 含有脂質およびトリグリセリド (TG) 定量値を測定した。

- 2-2. 妊娠 11 日目、14 日目、18 日目のマウス胎盤、妊娠 14 日目、18 日目の胎仔肝臓および胎仔脳における DHA-PLs の割合変化を測定した。さらに、妊娠 14 日目、16 日目、18 日目の胎盤、胎仔肝臓および産後 12 日目の新生仔肝臓における脂肪酸合成酵素 (FADS1、FAD2、Elov12、Elov15) の遺伝子発現の変化を測定した。

### 3. 交配実験

LPAAT3 HZ オスマウスと LPAAT3 HZ および KO メスマウスを交配させ、4 種類 (①母 : HZ / 仔 : HZ、②母 : HZ / 仔 : KO、③母 : KO / 仔 : HZ、④母 : KO / 仔 : KO) のジェノタイプの組み合わせを作成した。

- 3-1. LPAAT3 HZ および KO 母獣マウスの血清中 DHA 含有脂質 (ホスファチジルコリン; PC、リゾホスファチジルコリン; LPC、コレステロールエステル; CE、TG) について測定した。
- 3-2. ①-④のジェノタイプにおける妊娠 18 日目の胎盤、胎仔血漿、胎仔肝臓、胎仔脳の DHA-PLs の割合を測定した。同時期における胎仔重量、脳重量も測定した。
- 3-3. ①-④のジェノタイプにおける生後 1 日目、8 日目、28 日目新生仔の脳および肝臓における DHA-PLs の割合変化を測定した。同時期における体重と脳重量も測定した。
- 3-4. 出生後 8 日目の新生仔マウス胃から採取した内容物を母乳として、LPAAT3 HZ および KO 母獣の母乳中の脂肪酸を測定した。

### [結果]

LPAAT3 KO 成マウス組織における DHA-PLs の割合はコントロールマウスと比べて劇的に減少し、体重、脳重量、肝臓重量も有意な低下を認めた。3 週齢から 5 週齢にかけての発育は LPAAT3 KO マウスではコントロールマウスと比べて緩徐であった。Tail suspension テストでは LPAAT3 KO マウスにおいて有意にスコアが高く、Rotarod テストでは LPAAT3 KO マウスで有意に落下するまでの時間が短かった。

次に野生型妊娠マウスを用いた実験を行った。妊娠中の脂質の供給源である母獣肝臓において DHA-PLs の割合は非妊時より妊娠時に高くなり、妊娠経過と共に増加、出産後に減少した。母獣血清における DHA-PLs および DHA 含有コレステロールエステル (DHA-CE) も同様に妊娠経過と共に増えていたが、DHA 含有トリグリセリド (DHA-TG) に変化は見られなかった。脂質を受け取る側である、胎盤・胎仔肝臓・胎仔脳における DHA-PLs の割合も妊娠経過と共に増加しており母獣肝臓や血清と同じ傾向にあった。妊娠 14 日目・16 日目・18 日目の胎盤および胎仔肝臓、生後 12 日目の新生仔肝臓における脂肪酸合成酵素の

遺伝子発現は、生後 12 日目の新生仔肝臓が他の組織と比べて圧倒的に誘導されていた。

続いて、LPAAT3 HZ および KO 妊娠マウスを用いた検討を行った。妊娠 18 日目における血清中の DHA-PLs および DHA-CE の割合は LPAAT3 KO 妊娠マウスで著明な低下を認めただが、DHA-TGs には変化が見られなかった。TG の定量値でも LPAAT3 HZ と KO では変わりなかった。このような脂質の変化をもつ LPAAT3 HZ メスマウスおよび LPAAT3 KO メスマウスから産出された 4 種類の胎仔における、妊娠 18 日目の胎盤、血漿、肝臓、脳の DHA-PLs の割合を測定したところ、4 者すべてでその割合は異なり、仔の LPAAT3 のジェノタイプに加えて母獣の LPAAT3 のジェノタイプの影響も見られることが判明した。しかしながら、同時期の体重や脳重量は 4 者で変わりなかった。

続いて、出生後の DHA-PLs の割合の変化を確認した。脳における DHA-PLs 割合は LPAAT3 HZ 新生仔で、成長が進むにつれて増加し、LPAAT3 KO 新生仔は変化がないもしくは低下していた。興味深いことに、出生直後には見られた母獣の LPAAT3 の影響は生後 1 週間で完全に消失しており、それぞれの新生仔の LPAAT3 のジェノタイプの影響のみ見られた。胎仔期と同様に新生仔期の体重、脳重量を測定したところ、出生直後と出生後 8 日目の体重および脳重量においては胎仔期や出生後の DHA-PLs 含有量の違いによる影響は見られなかった。それに対し、離乳期直前の出生後 28 日目においては母獣の LPAAT3 ジェノタイプによらず LPAAT3 KO マウスで HZ マウスに比べて体重および脳重量の有意な減少を認めた。母乳中の脂肪酸としての DHA の割合は LPAAT3 HZ と KO で変わりなかった。

#### [考察]

DHA-PLs の脳の発達における必要性やその獲得時期、胎児期での DHA の輸送メカニズムについては、完全には理解されていない。本研究の行動実験より、DHA-PLs が正常な神経機能の構築に不可欠であることが明らかとなった。このことは、脳への DHA 輸送を担う DHA-LPC のトランスポーターである Major facilitator superfamily domain containing 2A (Mfsd2a) 欠損型マウスを用いた解析においても示されている。Mfsd2a 欠損型マウスにおいても脳における DHA-PLs が低下して脳重量も低下、今回の実験でも行った Tail suspension テストなど小脳機能の異常を検出するような行動実験で異常が見られることが報告されており、さらに小脳プルキンエ細胞の数の減少を組織切片で指摘している。今回の研究において脳の組織の解析は施行しておらず、今後の課題であると考え。Mfsd2a および LPAAT3 両者の欠損型マウスは体重についてもコントロールに比べて低いことが分かっている。このことから、DHA-PLs の欠乏は脳機能だけでなく、成長、発達にも影響を及ぼす可能性が示唆された。

今回の実験の交配によって DHA-PLs の割合の異なる 4 種類の胎仔の作成に成功したが、妊娠 18 日目における体重、脳重量に差は見られなかった。一方で、生後 1 ヶ月の離乳期直前になると LPAAT3 KO マウスで体重、脳重量共に有意に低い結果が得られた。生後、成長と共に脳や肝臓における DHA-PLs の割合が増加することから胎仔期は DHA-PLs が成長発

達にまだそれほど重要ではない可能性が考えられる。しかしながら、ヒトとマウスでは脳の体積増加や神経細胞の分化のピークは異なると報告されている。マウスにおいては生後1週間から離乳期直前までであるのに対し、ヒトでは妊娠36週から妊娠40週頃の胎児期であると言われていることから、ヒトにおいてはDHA-PLsの欠乏が成長発達、脳重量に影響を及ぼす可能性が考えられた。以上より、ヒトの脳やその他の組織におけるDHA-PLsの増加のタイミングを明らかにすることは、胎児期および新生児期におけるDHAの適切な供給を行う上で不可欠であると考えられた。

DHAの母児間の輸送に関しては、過去の報告などから、リポタンパク中のTGを介して運ばれると考えられてきた。しかしながら、母獣血液中のDHA-TGsの割合は妊娠の進行に伴う増加は見られなかった一方で、DHA-PLsおよびDHA-CEの割合は妊娠が進むにつれて増えていくことが明らかとなった。胎児側の組織である胎盤、胎児肝臓、胎児脳におけるDHA-PLsの割合も妊娠が進むにつれて増加した。また、胎児臓器のDHA量は胎児自身のLPAAT3のジェノタイプに加えて母獣のLPAAT3のジェノタイプにも影響をうけることが判明した。すなわち、胎児のDHA量を規定する要因として、自身でDHA-PLsを合成する能力に加えて母獣血液中からのDHA-PLsの供給も大きいと考えられた。以上の結果から、胎児期における母親からのDHAの供給源としては、過去に推察されていたTGに加えて、リン脂質が重要であることが示唆された。

今回の研究は、 $\omega$ -3脂肪酸欠乏食摂取による過去のモデルとは異なり、遺伝子操作によるDHA-PLsの特異的な減少をきたす新たなモデルであり、今までの研究では届かなかった部分への研究ができるようになったという点で新しいと考える。それにより、母仔間のDHA輸送はTGの形として運ばれるとした過去の多くの報告とは異なる、リン脂質によって運ばれるという新たな輸送メカニズムを提言することができ、新規性のある報告となった。