

97. DHA の生体内代謝物による神経保護作用の解析

大黒 亜美

広島大学 大学院医系科学研究科 生体機能分子動態学研究室

Key words : ドコサヘキサエン酸 (DHA), メチル水銀, 神経毒性, チトクローム P450, エポキシド加水分解酵素

緒言

必須不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) の摂取は、子供の正常な脳発達に必要であることや、パーキンソン病等の脳疾患による脳機能の低下を抑制させることが明らかとなっている。しかし、これらの作用機序は十分には明らかとなっていない。我々はこれまで、成ラットに DHA を摂取させると、脳内の DHA 量は変化しないのに対し、DHA 代謝物である DHDP が脳内で増加していることを明らかにした。さらにこの DHDP は、DHA 摂取によるパーキンソン病症状の軽減効果にも重要であることを明らかにしている [1]。従って、DHA の摂取効果には、その代謝物である DHDP が重要な働きを担っている可能性が考えられ、子の脳発達においてもこれら DHA 代謝物の作用が関わっているのではと考えた。母親が摂取した DHA は胎盤や母乳を介して子へ移行し、脳内に蓄積する。しかし、母親の DHA 代謝物が子へ移行するのか、また子の脳内で DHA 代謝物が産生されるかは不明であり、DHA 代謝物の脳発達への影響も明らかにされていない。

DHA は主に青魚に含まれているが、魚介類にはメチル水銀等の脳発達に悪影響を与える毒性物質も含まれていることから、妊婦が魚介類を多量摂取することは注意が必要であると厚生労働省により示されている。一方で、セーシェル諸島における疫学研究では DHA を含む ω -3 脂肪酸レベルが低い母親に限り、母親のメチル水銀濃度が高いほど子の精神発達遅延が観察されており [2]、青魚を摂食することによる DHA 摂取は、メチル水銀毒性をある程度マスクしていると予想される。

そこで本研究では、母体の DHA 摂取が、胎児脳のメチル水銀毒性を軽減できるか、またその効果に DHA 代謝物が関与しているかどうかを明らかにすることを目的とする。

DHA は現在、乳児用ミルクに添加されているが、DHA 代謝物の脳発達への作用が明らかとなれば、DHA 代謝物を直接添加することでより効率的な脳発達促進効果や毒性物質からの神経保護効果が得られることが期待される。

方法

妊娠マウス (C57BL/6J) を 3 群に分け (コントロール群、メチル水銀群、メチル水銀+DHA 群)、メチル水銀は 4 ppm となるよう飲料水に添加し、妊娠時から仔が離乳する生後 3 週間まで摂取させた。DHA は粉末試料 AIN-93G の総脂質の 4% となるように混合し、妊娠マウスにメチル水銀と同様の期間摂取させた。仔マウス (オス) の生後 5 週間目に握力測定、及びロータロッド試験、Y 字迷路試験により仔マウスの運動機能や短期記憶を評価した。またこの時の胎生 16 日、および生後 14 日における仔の脳内 DHA およびその代謝物を LC-MS を用いて調べた。同時に、母マウスの脳や肝臓、血液、母乳に含まれる DHA 代謝物を LC-MS により解析した。また、マウス胎児および乳児の脳、肝臓に含まれる DHA 代謝酵素 (チトクローム P450 や sEH) の mRNA 量やタンパク質発現量を解析した。またマウス胎児大脳皮質から初代神経細胞を単離し、DHDP を 100 nM となるように添加することで、メチル水銀による神経細胞死の軽減効果を MTT アッセイにより解析した。また DHDP による抗酸化因子の発現を解析した。

結果

1. 妊娠マウスの DHA 摂取が仔の脳におけるメチル水銀毒性に与える影響

母体へのメチル水銀投与により、仔の成長後 5 週齢において、体重減少、握力低下が見られ、ロータロッド試験により運動機能の低下、および Y 字迷路試験により、短期記憶の低下が観察された。これらの低下は、母マウスにおいては観察されなかった。一方で、メチル水銀と共に DHA を母体に摂取させると、メチル水銀によるこれらの仔マウスへの影響が抑制された。これらの結果より、母体の DHA は仔のメチル水銀毒性を軽減できることが示された。

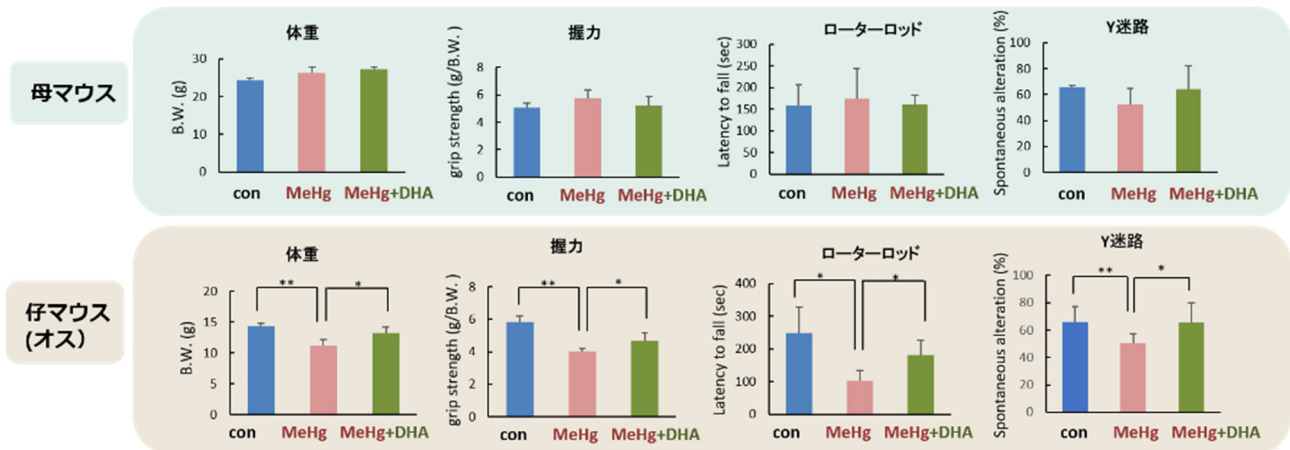


図 1. 母体の DHA 摂取による仔のメチル水銀毒性の軽減効果

妊娠マウスにメチル水銀および DHA を妊娠時より出産後 21 日まで摂取させ、仔の成長後（生後 5 週齢）の運動機能、および記憶能力を行動試験により評価した。

Holm's post-hoc test、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

2. 母体の DHA 摂取が仔の脳内 DHA 及びその代謝物に与える影響

胎生 16 日、生後 14 日における仔マウスの脳内 DHA 及び DHA 代謝物を解析したところ、母体の DHA 摂取により胎児および乳児の DHA が増加していることが確認でき、さらに DHA 代謝物である DHA エポキシ体 (19,20-EDP) 及び DHA ジオール体 (19,20-DHDP) が顕著に増加していることが示された。一方で、母マウスにおいては、これまでの成ラットを用いた実験結果と同様、DHA 摂取により脳内 DHA 量は増加しない一方で、DHA 代謝物である 19,20-DHDP 量が脳内で増加した。

3. 胎児、乳児における DHA 代謝酵素の発現解析

EDP は DHA がチトクローム P450 によりエポキシ化した代謝物であり、これがさらに可溶性エポキシド加水分解酵素 (sEH) により代謝されることでそのジオール体である DHDP となる (図 2)。これらの酵素は、肝臓に多く発現しているが、成ラットやマウスでは脳にも発現していることを明らかにしている。しかし、胎児におけるこれらの酵素 (CYP2A4/5、CYP2C29、CYP2E1、sEH) の発現量を調べたところ、胎児では肝臓や脳ともに発現が低く、出生後、徐々に発現量が増加することが示された。これらの結果は、胎児や乳児の脳に蓄積している DHA 代謝物は、仔の体内で生成したものではなく、母体から移行している可能性が示された。

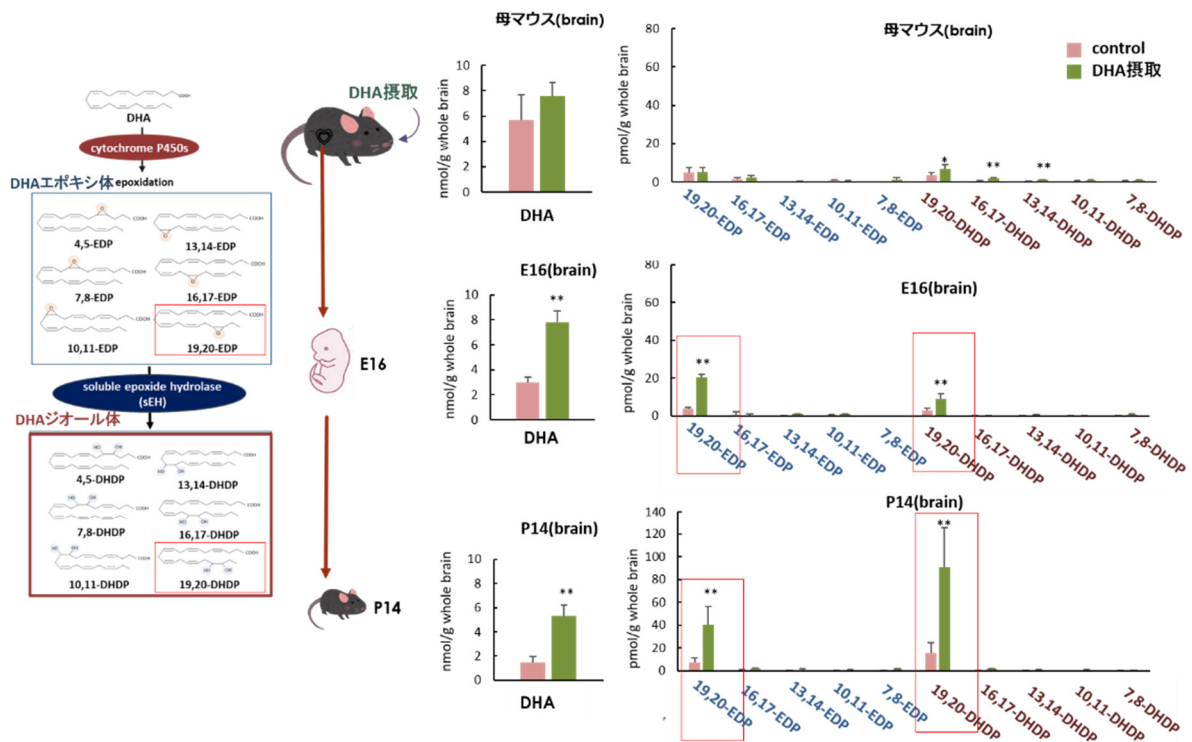


図2. 母体のDHA摂取が仔の脳内のDHAおよびその代謝物に及ぼす影響
 妊娠マウスにDHAを妊娠時より摂取させ、母体、および仔の胎生16日および生後14日における脳内のDHA及びその代謝物量をLC-MSにより定量した。Student's t-test、** $p < 0.01$ 。

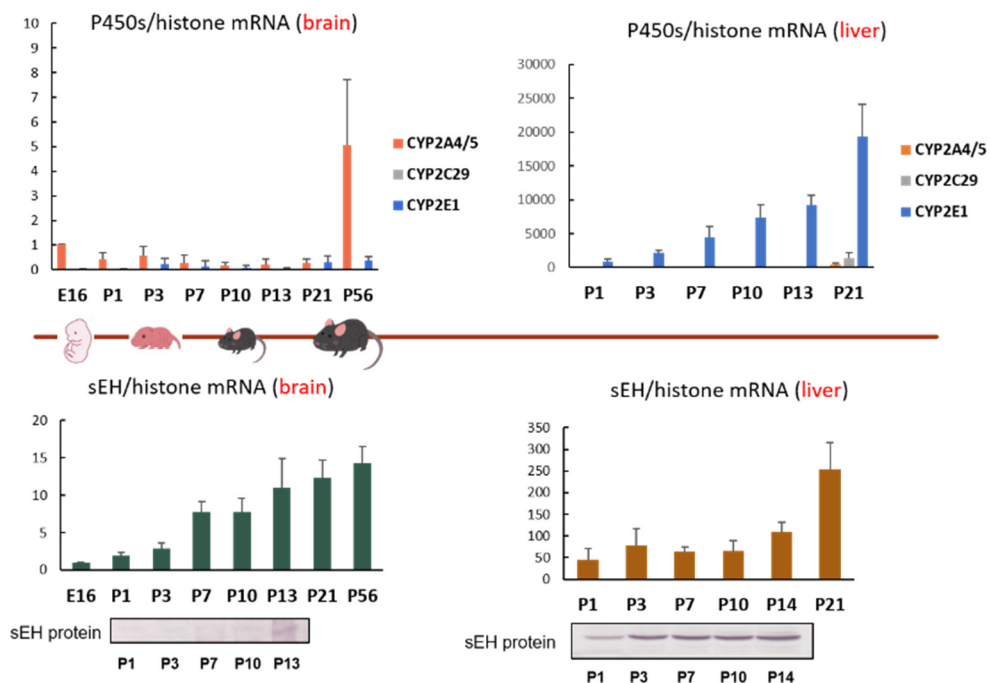


図3. 胎児および乳児の脳、肝臓におけるDHA代謝酵素の発現
 マウスの各発達段階におけるチトクロームP450およびsEHの発現量をRT-PCRおよびウエスタンブロッティングにより定量した。

4. 母体血、および母乳に含まれる DHA 代謝物の解析

母マウスの母乳中に含まれる DHA 代謝物を調べたところ、母乳に DHA 代謝物が検出され、DHA を摂取することで母乳中の 19,20-EDP 及び 19,20-DHDP が顕著に増加することが明らかとなった。また DHA 代謝物は母体の血中にも存在することを明らかにした。これらの結果は、DHA 代謝物が母体から仔へ積極的に移行していることを示している。

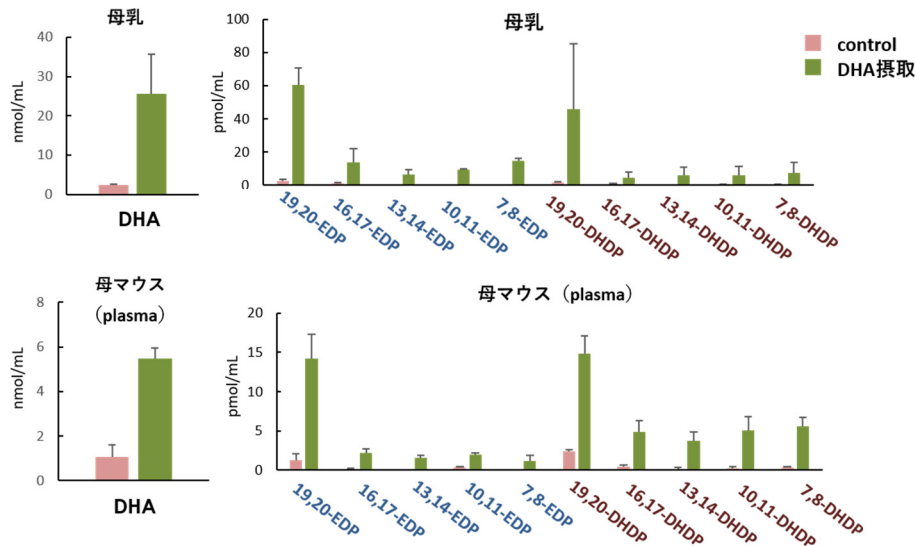


図 4. DHA 摂取による母体の血液および母乳中の DHA 代謝物量の変化

妊娠マウスに DHA を妊娠時より摂取させ、母体血および母乳中の DHA 及びその代謝物量を LC-MS により定量した。

5. マウス初代神経細胞を用いた DHA 代謝物の生理活性解析

DHA 代謝物である 19,20-DHDP の神経細胞における生理活性を明らかにするため、マウス初代神経細胞を用いて検討を行った。その結果、19,20-DHDP は抗酸化酵素である SOD やカタラーゼの mRNA 量を増加させることが示された (図 5A および B)。また SOD やカタラーゼの発現に関与する抗酸化因子 Nrf2 のタンパク質量を安定化することが示された (図 5C)。また 19,20-DHDP は、メチル水銀による神経細胞死を軽減することが示された (図 5D)。

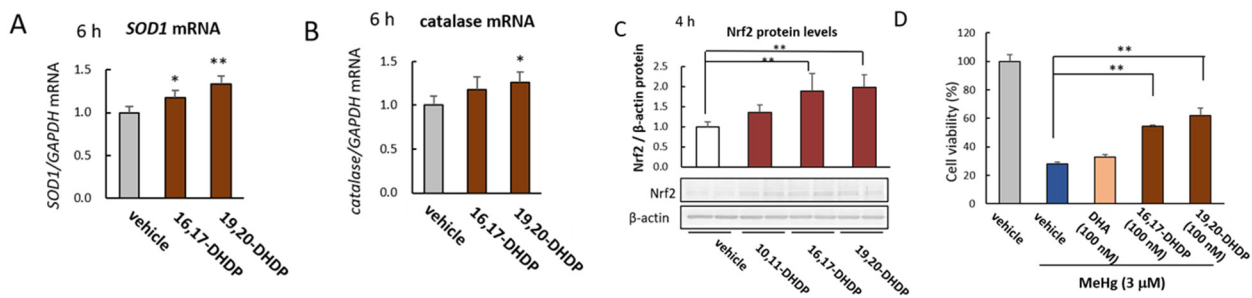


図 5. マウス初代神経細胞における 19,20-DHDP の生理活性

- マウス胎児大脳皮質から単離した初代神経細胞に 19,20-DHDP を 100 nM となるように添加し、SOD (A) およびカタラーゼ (B) の mRNA 量を定量した。
- 19,20-DHDP を添加したときの Nrf2 のタンパク質量をウエスタンブロッティングにより定量した。Student's t-test、** $p < 0.01$ 。
- メチル水銀を添加する 24 時間前に DHA または DHDP を添加し、メチル水銀添加後 24 時間後の細胞生存率を MTT アッセイにより解析した。Holm's post-hoc test、** $p < 0.01$ 。

考 察

これまでの疫学研究により DHA を含む ω -3 脂肪酸摂取はメチル水銀毒性を軽減することが示唆されてきたが、本研究により、母体の DHA 摂取により仔の脳内 DHA のみならず DHA 代謝物が増加し、メチル水銀による仔の脳機能障害が軽減されることが示された。また DHA 代謝物が母乳を通して仔へと移行することを本研究で初めて見出した。また DHA 代謝物は胎児の脳でも蓄積していたことから、胎児期において、DHA 代謝物は胎盤を通して胎児へと移行していることが予想される。従って、DHA を多く含む魚介類の摂取や、サプリメント等による DHA やその代謝物の摂取は仔のメチル水銀毒性軽減や脳発達促進に有効であると考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Oguro, Y. Ishihara, F.M. Siswanto, T. Yamazaki, A. Ishida, H. Imaishi, S. Imaoka, Contribution of DHA diols (19,20-DHDP) produced by cytochrome P450s and soluble epoxide hydrolase to the beneficial effects of DHA supplementation in the brains of rotenone-induced rat models of Parkinson's disease, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1866 (2021) 158858. doi: 10.1016/j.bbalip.2020.158858
- 2) J.J. Strain, A.J. Yeates, E. van Wijngaarden, S.W. Thurston, M.S. Mulhern, E.M. McSorley, G.E. Watson, T.M. Love, T.H. Smith, K. Yost, D. Harrington, C.F. Shamlaye, J. Henderson, G.J. Myers, P.W. Davidson, Prenatal exposure to methyl mercury from fish consumption and polyunsaturated fatty acids: associations with child development at 20 mo of age in an observational study in the Republic of Seychelles, *Am J Clin Nutr*, 101 (2015) 530-537. doi: 10.3945/ajcn.114.100503