

平成25年度 香川県立保健医療大学 学内共同研究課題
「Fads 2 遺伝子ノックアウトマウスを用いた
心臓中アラキドン酸及びドコサヘキサエン酸の機能解析」

山主 智子^{1)*}, 加太 英明¹⁾

¹⁾香川県立保健医療大学教養部

A 2013 Intramural Joint Research from Kagawa Prefectural University
of Health Sciences: An Analysis of the Effects of Arachidonic Acid and
Docosahexaenoic Acid on the Hearts of Fads2 Gene Knockout Mice

Tomoko T. Yamanushi^{1)*}, Hideaki Kabuto¹⁾

¹⁾*Kagawa Prefectural University of Health Sciences, Faculty of Liberal Arts and Sciences*

要旨

Δ 6 不飽和化酵素 (D 6 D) をコードする Fads 2 遺伝子をノックアウトし体内でアラキドン酸 (AA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA) を生合成できないマウス (Fads 2 KO) を用い, 体内から DHA または AA を欠乏させた場合の心臓機能への影響を検証する事が本研究の目的であった. イリノイ大学との共同研究という形で, 2014年4月, 麻布大学より Fads 2 マウスヘテロ型 (+/-) を譲渡いただいた. これまでに5回の交配から, 合計41匹の子マウスが得られ, 本学での Fads 2 KO の安定的な繁殖が確立されたと考えた. 今後, AA 欠乏または DHA 欠乏食で飼育した Fads 2 KO マウスを用いて, 心臓機能を明らかにする研究を行ってゆきたいと考えている.

Key Words: 学内共同研究 (intramural joint research), ドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid (DHA)), Δ 6 不飽和化酵素 (Δ 6 desaturase), Fads 2 遺伝子 (Fads 2 gene), ノックアウトマウス (knockout mouse)

*連絡先: 〒761-0123 香川県高松市牟礼町原281-1 香川県立保健医療大学教養部 山主 智子

*Correspondence to: Tomoko T. Yamanushi, Kagawa Prefectural University of Health Sciences, Faculty of Liberal Arts and Sciences, 281-1 Murecho-hara, Takamatsu, Kagawa 761-0123, Japan
E-mail: t.t.yamanushi@chs.pref.kagawa.jp

本稿では、平成25年度学内共同研究「Fads2 遺伝子ノックアウトマウスを用いた心臓中アラキドン酸 (AA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA) の機能解析」について、本研究を着想した背景及び目的、研究計画を述べ、さらにこれまでの研究状況等について報告する。この内容は、2014年9月5日に行われた学内研究報告会にて発表した。

研究背景

グリーンランドに住むイヌイットは、デンマーク人と比較して、急性心筋梗塞を発症する人の割合が少ないという研究が1971年にBangらにより報告された¹⁾。グリーンランドは、デンマーク領であり、国土の約85%が氷に覆われている²⁾。Bangらが調査を行った当時、グリーンランドの住民イヌイットは魚や海獣を狩猟し主食としていた。一方、デンマークは北ヨーロッパに位置し、伝統的に肉、ジャガイモ、乳製品中心とした食事スタイルである²⁾。当時のイヌイットの食生活は、魚油や、魚油に特徴的な脂肪酸エイコサペンタエン酸 (EPA) 及びDHAを多量に摂取するものであった。従って、これらの脂肪

酸には心臓保護効果があると考えられ、研究が進められてきた。疫学研究、臨床医学研究、動物実験、in vitro実験など様々な異なるアプローチからの数多くの研究が、DHAやEPAの心臓血管保護効果を報告している^{3), 4)}。これらの報告に基づき、欧米諸国及び日本では、現在、1日1g以上のDHA及びEPAの摂取が推奨されている^{4), 5)}。

Δ6不飽和化酵素 (D6D) は、リノール酸 (n-6系脂肪酸) 及びαリノレン酸 (n-3系脂肪酸) を不飽和化し、炭素鎖を延長してドコサペンタエン酸 (DPA, n-6系脂肪酸) およびDHA (n-3系脂肪酸) へと代謝する経路 (図1) の最初にあり、この系の律速も行っている酵素である⁶⁾。リノール酸及びαリノレン酸は、必須脂肪酸であり、飼料から欠乏させる事はできない。そのため、EPAやDHAを飼料から除いても、図1の代謝経路により、リノール酸及びαリノレン酸を基にEPAやDHAは生合成されてしまうという問題がある。D6DをコードするFads2 遺伝子をノックアウトすれば、体内でリノール酸やαリノレン酸を基に炭素鎖を延長することができず、AA、EPAやDHAは生合成されない。これにより、生体内でEPA、DHAまたはAAを欠乏させた場合の影響を知ることが期待される。Fads2 遺伝子ノック

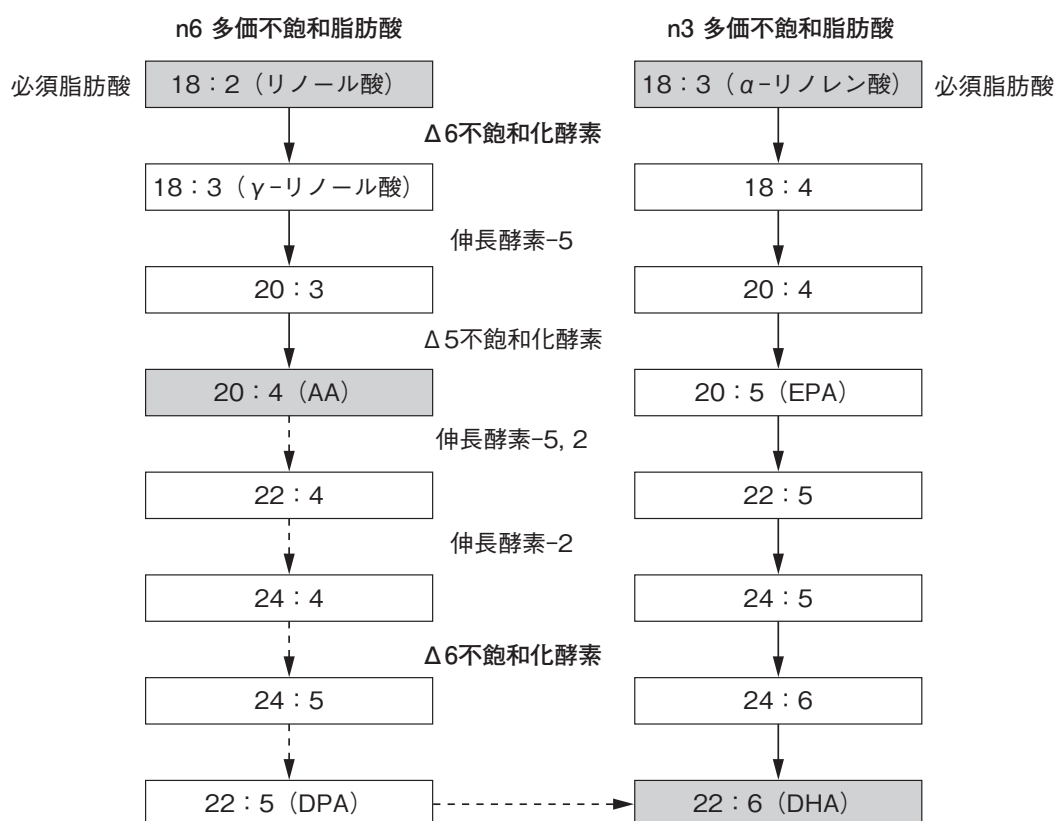


図1 n6及びn3系多価不飽和脂肪酸の代謝経路

n6系多価不飽和脂肪酸では、18:3 (リノール酸) を基に22:5 (DPA) が合成され、この途中AAが生じる。またn3系多価不飽和脂肪酸では、18:3 (αリノレン酸) を基に22:6 (DHA) が合成され、この途中20:5 (EPA) が生じる。この両方の代謝経路は競合しており、酵素は共通している。Δ6不飽和化酵素は、この経路の最初にあり、この系の律速も行っている。図中の比は脂肪酸を、炭素数:二重結合数で表している。

アウトマウス (Fads 2 KO) (-/-) は, DHA及びAAを含まない飼料で飼育した場合, 20週齢で特に皮膚潰瘍, 精子の形成不全などが報告されている⁶⁾. また, この時, 心臓中にはDHA及びAAが正常マウスのそれぞれ27%及び25%程度しか含まれないことが報告されている⁶⁾.

研究目的

筆者らは, EPAまたはDHAの心臓血管保護効果を検証する事, 及びそのメカニズムを明らかにする事を目的とした研究を進めている. これまでに, EPAまたはDHAを健常動物に経口摂取させ, 心拍数減少や心電図Q波-T波間隔の短縮を見いだした⁷⁾. また, EPAまたはDHAを心不全モデルラットに経口摂取させた場合は, DHAにのみ心電図Q波-T波間隔延長の抑制, 及び心筋組織への炎症細胞浸潤抑制効果がある事が分かった⁷⁾. さらに詳細なDHAの心臓機能への影響を知るために, 体内に存在するDHAを欠乏させるアプローチを考えた. 前述のように, Fads 2 KO (-/-) では心臓機能に障害がある事が推測される.本研究では, Fads 2 KO (-/-) を用い, 体内からDHA及びAAを欠乏させた場合の, 心臓機能への影響を検証する事を目的とした.

研究計画

本課題の研究計画は, 以下の通りである.

- (1) Fads 2 遺伝子改変マウスの安定的な繁殖を確立する.
- (2) DHAまたはARA欠乏飼料にて, Fads 2 KO (-/-) 及び野生型 (+/+) マウスを20週齢時まで飼育する.
DHAまたはARAの欠乏による心臓の変化を知るため, これらを用いて(3)~(8)を行う.
- (3) 心電図記録及び血圧測定を行う.
- (4) 血漿中脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) 濃度を定量する. BNPは, 心疾患の指標として用いられる.
- (5) 心臓のパラフィン切片を作成し, 光学顕微鏡にて, 心臓形態を観察する.
- (6) 心臓中脂肪酸濃度の定量をガスクロマトグラフィーにより行う.
- (7) 炎症性サイトカインの発現量を定量PCR法にて定量する.
- (8) イオンチャネルmRNA発現量を定量PCR法にて定量する.

これまでの研究状況

1. Fads 2 KOの譲渡

Fads 2 KOは, イリノイ大学中村教授が作製したノック

アウトマウスである⁶⁾. 中村教授と議論し, イリノイ大学との共同研究という形で, イリノイ大学とFads 2 KO譲渡の契約を結んだ.しかし, イリノイ大学からのマウスの輸送は, 高額かつマウスにストレスがかかるため, 麻布大学守口教授より譲渡してもらう事となった (イリノイ大学との譲渡の契約にこの点も含まれる). 2013年4月, 筆者は麻布大学守口教授を訪問して, Fads 2 KOの譲渡を依頼した.そして, 本学でFads 2 KOを飼育するための準備等を整え, 2013年夏頃に輸送する約束をした.しかし, マウスを輸送する段階になって, 麻布大学ではカルタヘナ法を批准する学内規定がなく, 輸送はできない事が分かった.「カルタヘナ法」すなわち「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」は, 2000年1月に遺伝子組換え生物の使用による生物多様性への悪影響を防止することを目的とし国連で採択された「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書 (カルタヘナ議定書)」に基づき, 日本では2003年6月に成立, 公布された (2004年2月19日より施行)⁸⁾. ちなみに, アメリカ合衆国は, カルタヘナ法を批准していない.日本においてマウスを輸送するためには, 麻布大学がカルタヘナ法を批准していなければならず, そのため麻布大学の学内規定を改正する必要がある.これにさらに時間を要した.2014年4月オス・メスそれぞれ12匹のFads 2 ヘテロ型 (+/-) マウスが, 麻布大学より本学へ譲渡された.

2. Fads 2 KOの安定的繁殖の確立

Fads 2 KOを用いて研究を行うために, まず研究計画(1) Fads 2 KOの安定的な繁殖の確立を試みた. Fads 2 オスケージへメスを入れ, 5日間程度交配を行った.妊娠期間は通常のマウスと相違なく約20日間であった. Fads 2 KOは神経質なマウスであるため, 妊娠後期及び出産直後~1週間程度は, 静寂な環境を保つよう心がけた.また Fads 2 KOは弱く生育が悪いため, 実験用標準マウス飼育飼料MF (オリエンタル酵母) にDHA (DHASCO: DHA海藻オイル (≥40%) 含有), 及びAA (ARASCO: ARA海藻オイル (≥40%) 含有) を添加し, 交配期間よりマウスに与えた. DHASCO及びARASCOは, Martek社 (MD, USA) より供与された. 子マウスは4週齢で離乳させ, Extract N Amp Tissue PCR kit (Sigma) を用いて, PCR法にて, 遺伝子型の同定を行った. Fads 2 ヘテロ型 (+/-) マウスではFads 2 遺伝子の片方が, Fads 2 KO (-/-) では両方がネオマイシン耐性遺伝子 (Neo) に置き換わっている. これまでにFads 2 ヘテロ型 (+/-) マウスの交配5回から, オス: 野生型 (+/+) 4匹, ヘテロ型 (+/-) 6匹, KO (-/-) 10匹, 及びメス: 野生型 (+/+) 4匹, ヘテロ型Fads 2 (+/-) 11匹, Fads 2 KO (-/-) 6匹の合計41匹の子マウスが得られた. 理論上, Fads 2 野生型 (+/+) : ヘテロ型 (+/-) : KO (-/-) は 1 : 2 : 1 で出生する. 母マウス

による育児放棄や食殺のために、全ての子マウスが生育しなかったため、今回は理論比と異なる比率で子マウスが得られたと考えた。メスFads2ヘテロ型(+/-)は、8週齢時までに脱毛が見られた。以上により、本学でのFads2 KOの安定的な繁殖が確立されたと考えた。

3. DHA欠乏飼料によるFads2 KO (-/-) 及び野生型 (+/+) マウスの飼育

現在、交配により得られたFads2 KO (-/-) 及び野生型 (+/+) マウスは、DHA添加飼料(0.2% DHASCO及び0.2% ARASCO添加マウス用精製飼料AIN93G(オリエンタル酵母))または、DHA無添加飼料(0.2% ARASCO添加AIN93G)にて飼育を行っている。DHA無添加飼料で飼育しているFads2 KO (-/-) は、前述のように体内でDHAが合成されず、DHA欠乏であると考えられる。20週齢時まで飼育後、解剖し、研究計画(3)~(8)を行うために、心臓や血清を採取する予定である。

おわりに

以上、本研究の背景、計画、及びこれまでの状況を述べた。現在、Fads2 KOの繁殖が確立され、やっとスタート地点に立ったような段階である。今後、研究計画(3)~(8)へと研究を進めてゆく予定である。今回はDHA欠乏のみについての研究を進めているが、さらにAA欠乏についても研究を行いたいと考えている。成果を得るまでには未だに道のりは長いが、このような研究を開始できた幸運に感謝し、精力的に進めてゆく所存である。これらの研究を行うには資金が必要であり、研究資金不足しているのが現状である。今後とも、学内共同研究費のような助成を受けながら、研究を進めてゆくこととなろう。

謝 辞

本研究に理解をいただき、学内共同研究費を授与いた

だいた事に深く感謝したい。また本研究は、科研費(課題番号25350133)の一部助成を受けた。

本研究の一部は、平成26年度臨床検査学科4年生の卒業研究課題とした。研究に参加した学生、及び支援いただいた方々に感謝する。

参考文献

- 1) Bang HO, Dyerberg J, Nielsen AB. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. *Lancet* 297(7710): 1143-1145, 1971.
- 2) デンマーク大使館HP, 2014-10-19, <http://japan.um.dk/ja/>
- 3) De Caterina R. n-3 fatty acids in cardiovascular disease. *N Engl J Med* 364(25): 2439-2450, 2011.
- 4) von Schacky C, Harris WS. Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Cardiovasc Res* 73(2): 310-315, 2007.
- 5) 厚生労働省HP. 日本人の食事摂取基準(2010年版)脂質, 2014-10-19, www.mhlw.go.jp/shingi/2009/05/dl/s0529-4g.pdf
- 6) Stroud CK, Nara TY, Roqueta-Rivera M, Radlowski EC, Lawrence P, et al. Disruption of FADS2 gene in mice impairs male reproduction and causes dermal and intestinal ulceration. *J Lipid Res* 50(9): 1870-1880, 2009.
- 7) Yamanushi TT, Kabuto H, Hirakawa E, Janjua N, Takayama F, et al. Oral Administration of Eicosapentaenoic Acid or Docosahexaenoic Acid Modifies Cardiac Function and Ameliorates Congestive Heart Failure in Male Rats. *J Nutr* 144(4): 467-474, 2014.
- 8) 農林水産省HP. カルタヘナ法とは, 2014-10-19, http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/c_about/

Abstract

The purpose of the present study was to investigate the deficient effects of arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA) on heart function by using Fads2 gene knockout mice (Fads2KO) which are unable to synthesize AA and DHA as a result of the knocking-out of the Fads2 gene coding the $\Delta 6$ desaturase (D6D). In a collaborative research project with Illinois University, twelve male and twelve female hetero type Fads2(+/-) mice were provided by Azabu University in April 2014. Since then, a total of 41 pups have been obtained by mating the hetero type Fads2 mice (+/-) five times. It was considered that the methods of breeding were established at Kagawa Prefectural University of Health Sciences. In the near future, we would like to perform experiments using Fads2KO mice fed AA or DHA deficient diets to examine heart function.

受付日 2014年10月20日

受理日 2015年1月19日