<総説>

胎生期の多価不飽和脂肪酸過剰摂取は眼の発生異常を 誘発する可能性がある

前川素子

理化学研究所 脳科学総合研究センター 分子精神科学研究チーム

〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1,

電話 : 048-462-1111 (内 7634), FAX : 048-467-7462

E-mail : mmaekawa@brain.riken.jp

キーワード: アラキドン酸、C57BL/6、眼、小眼症、遺伝環境相互作用、マウス

Excessive ingestion of long-chain polyunsaturated fatty acids during developmental stage causes strain- and sex-dependent eye abnormalities in mice

Motoko Maekawa

Laboratory for Molecular Psychiatry, RIKEN Brain Science Institute

2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

Summary

The eyes are rich in long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) such as arachidonic acid (AA; 20:4 ω 6) and docosahexaenoic acid (DHA; 22:6 ω 3). Despite their abundance in the eyes, AA and DHA cannot be efficiently synthesized *de novo* in mammals. During gestation, eye development is exceptionally rapid, and substantial amounts of LC-PUFAs are needed to ensure proper eye development. Here, we studied the influences of dietary LC-PUFAs in dams (C57BL/6 and C3H/He) on the eye morphogenesis and organogenesis of their pups. Intriguingly, fetuses and newborn mice from C57BL/6 dams fed an LC-PUFA (particularly AA)-enriched diet displayed a much higher incidence of eye abnormalities such as microphthalmia (small eye) and corneal opacity than those from dams fed an

LC-PUFA-poor diet. The effects of LC-PUFAs on eye anomalies were evident only in the female pups of C57BL/6 inbred mice, not in those of C3H/He mice or male C57BL/6 mice. These results demonstrate a gene-by-environment (GxE) interaction in eye development in mice. Furthermore, our molecular analysis suggested the potential roles of *Pitx3* and *Pax6* in the above interaction involving AA.

Key words: arachidonic acid, C57BL/6, eye, microphthalmia, gene-by- environment (GxE) interaction, mouse

1. はじめに

我々は普段は精神疾患の研究を行っており、”発達期の脂肪酸欠乏が統合失調症脆弱性形成に与える影響”について解析を進めている。この研究の過程で、C57BL/6 系統の妊娠マウスに対して AA (arachidonic_acid: アラキドン酸)を過剰に投与すると、雌の仔マウスの眼に異常(小眼症や角膜混濁)が頻発することに気がついた。眼の異常は重要な知見であるため、我々は眼の専門家ではないがこの現象について報告することにした。本稿では、妊娠中のマウスに対する AA 過剰投与が、仔の眼の形成に与えるリスクについて論じる。

2. 眼の正常発生

眼は、外界からの情報を獲得するために必要な感覚器官であり、その発生過程はよく解析されている。眼の形成はまず間脳の一部が左右に突出して眼胞と呼ばれる構造を作ることから始まる。次に、眼胞が表皮外胚葉に接すると、接触した領域は肥厚して水晶体プラコードとなる。更に、水晶体プラコードは内方向に陥入し、表皮外胚葉から分離して水晶体胞を形成した後水晶体となる。眼胞は中央部が陥入して眼杯となり、その後網膜、網膜色素上皮へと分化する。分化した網膜は、外顆粒層、内顆粒層、神経節細胞層を形成し (Fig. 1)、神経線維とシナプスからなる外網状層と内網状層がこれらをつなぐことでシグナルが伝達される。神経節細胞から伸び出した視神経線維は、網膜最内層を走行し、視神経乳頭に集積した後、脳の視中枢に向かって伸張し、網膜と脳を結ぶ神経回路網が形成される。これらの器官の分化に関わる転写制御機構も詳細に明らかとなっている。

3. 眼の発生・発達に対する不飽和脂肪酸の影響

眼、特に網膜には、AA や DHA (docosahexaenoic acid: ドコサヘキサエン酸)が豊富に含まれている²⁾。発達期における眼の機能と脂肪酸については、1) ヒトの低体重児は与える ω 3系の不飽和脂肪酸の量によって網膜の発達に違いが出る^{3,4)}、2) 早産児に対してAAとDHAを投与すると視覚機能が向上する^{5,6)}、3) 発達中の児にDHAを投与すると視機能

が向上する⁷⁾、などの報告がある。これらの知見から、脂肪酸は眼の発達および眼の機能に対して重要な役割を担うことが推察できる。

Fig.1. Schematic illustration of adult mouse retina.

4. AA 過剰投与による眼の異常の出現頻度の上昇

我々は、C57BL/6 系統マウス、C3H/He 系統マウス、に対して特殊餌投与を行った。餌は、1) AA(+)/DHA(+): AA と DHA の両方が過剰に含まれる餌、2) AA(+)/DHA(-): AA のみが過剰に含まれ DHA は含まれない餌、3) AA(-)/DHA(+): DHA のみが過剰に AA は含まれない餌、4) AA(-)/DHA(-): 対照餌、の 4 種類を用意した。これらの餌を、交配の 2 週間前から母親マウスに投与し、交配、妊娠、出産、授乳期間中は投与を継続して、仔が離乳した時点で通常の餌 (CRF-1) に切り替えた。このような方法で飼育した動物のうち、AA(+)/DHA(+)餌および AA(+)/DHA(-)餌を投与した C57BL/6 の雌の仔マウスに小眼症や無眼球症 (Fig. 2)、角膜混濁、の出現頻度の有意な上昇が認められた。また、発生頻度は少ないものの、下顎のない個体 (Fig. 2) や、レンズの発生異常や網膜の層構造に異常がある個体も認められた (Fig. 3)。なお、C57BL/6 雄では AA 過剰餌投与群と非投与群で眼の異常の出現頻度に差はなかった。また、C3H/He 系統は、AA 過剰餌投与を行っても眼の異常は出現しなかった。

C57BL/6: female (E16.5)

Normal phenotype

AA(+)/DHA(-) or AA(+)/DHA(+)

Abnormal phenotype

small eye

small eye

anophthalmia

Fig.2. Effects of LC-PUFA diets on the eyes of C57BL/6 female mice at E16.5. The left panel shows the normal eye of mouse fed on control diet. The right panel shows varying phenotypes including microphthalmia (small eye), anophthalmia, and small brains and hypoplasia of low jaws in C57BL/6 female embryos at E16.5 fed on ARA(+)/DHA(-) diet or ARA(+)/DHA(+) diet.

5. 妊娠中の AA 過剰餌投与が眼の遺伝子発現に与える影響

次に我々は、AA を過剰投与した C57BL/6 群の仔の眼について、眼の発生を制御する遺伝子群 (*Lhx2*, *Rax*, *Otx2*, *Foxe3*, *Pitx3*, *Maf*, *Sox2*, *Pax6*, *Cryaa*, *Cryab*, *Crybb1*, *Crygd*) の発現変化を調べた。その結果、AA(+)/DHA(-)群では、胎生 12.5 日の段階で *Pitx3* 遺伝子の発現低下が認められた。*Pitx3* は、眼のレンズの発生に重要な役割を果たし、*Pitx3* の突然変異マウスでは

C57BL/6: female (6 month)

Normal phenotype

AA(+)/DHA(-)

Fig.3. Histological examinations of the eyes from C57BL/6 females fed on control diet (panels a and b) or ARA(+)/DHA(-) diet at adult stage. The abnormalities are shown for the lens dysgenesis (white arrow in panel c: residual lens-like structure) and partly folded, layer disorganized retina (panel d). Scale bars indicate 200 μ m.

小眼症などの眼の異常が起こる^{8,9)}ことが知られている。AA(+)/DHA(+)投与群では、胎生 16.5 日の段階で眼の発生に関わる多数の転写因子の発現変化が認められたが、その中でも特に *Pax6* 遺伝子の発現低下が注目に値する。*Pax6* は、眼の発生に中心的役割を果たすため、眼の発生のマスター遺伝子と呼ばれている。*Pax6* のヘテロ接合体マウスおよびヘテロ接合体ラットにおいては、小眼症やその他の眼の発生異常が起こる^{10,11)}。以上の結果から、AA 過剰投与により、(詳しい経路は不明であるが) *Pitx3*、*Pax6* などの眼の発生に重要な役割を果たす転写因子の遺伝子発現変化が起こり、その結果として今回観察されたような眼の異常が起こったのではないかと推測された。

6. 考察

今回の解析において、妊娠中の C57BL/6 系統マウスに AA 過剰餌を投与すると、仔(雌)において眼の異常の出現頻度が増加することがわかった。一方、C57BL/6 系統の仔(雄)や C3H/He 系統(雄も雌も)においては、AA 過剰餌を投与しても眼の異常の出現頻度は増加しないこともわかった。一般的に、C57BL/6 系統のマウスは、遺伝的に眼の異常が起こりやすい系統であること¹²⁾、雄と雌では脂肪酸の代謝に差がある¹³⁾。ことが知られているが、これらの知見を総合すると、AA 過剰投与による眼の異常は、遺伝要因 (C57BL/6 系統の雌の遺伝的バックグラウンド) と環境要因 (今回のケースでは AA) の相互作用によって起きたものと考えられる。つまり、遺伝的にリスクがある妊娠動物に AA を過剰投与した場合は眼に異常が起こる可能性があると言える。今回の結果をヒトに敷衍すると、ヒトは遺伝的に非常に異質な集団のため、リスクを持った個人が妊娠中に AA を過剰摂取すると、出生した子供に眼の異常が生じやすくなることも否定できない。通常の食事をする分には AA を過剰に摂取することはないと考えられるが、著しく偏った食事をする場合にはその限りではないため、妊娠中の栄養摂取の仕方には十分な注意が必要であると思われる。

今回の解析では、AA 過剰に関連するゲノム要因の特定には至らなかったが、我々は現在 C57BL/6 系統のマウスと C3H/He 系統のマウスの全 Exon シークエンシングを実行中である。この解析によってどのようなゲノム多型の組み合わせで AA 過剰投与が眼の異常に至るのかについて、更に詳細な情報が得られることが期待される。

謝辞

本研究を平成 23 年度の大塚賞に選考くださいましたありがとうございます。また、本研究にご協力・ご指導頂きました吉川武男チームリーダーおよび関係者の皆様方にこの場をお借りして心より感謝申し上げます。

参考文献

1. Graw J. Eye development. *Curr Top Dev Biol* 90: 343-386, 2010.
2. Alessandri JM, Goustard B, Guesnet P, Durand G. Docosahexaenoic acid concentrations in retinal phospholipids of piglets fed an infant formula enriched with long-chain polyunsaturated fatty acids: effects of egg phospholipids and fish oils with different ratios of eicosapentaenoic acid to docosahexaenoic acid. *Am J Clin Nutr* 67: 377-385, 1998.
3. Birch DG, Birch EE, Hoffman DR, Uauy RD. Retinal development in very-low-birth-weight infants fed diets differing in omega-3 fatty acids. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2365-2376, 1992.
4. Birch EE, Birch DG, Hoffman DR, Uauy R. Dietary essential fatty acid supply and visual acuity development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 3242-3253, 1992.
5. Uauy R, Hoffman DR. Essential fat requirements of preterm infants. *Am J Clin Nutr* 71: 245S-250S, 2000.
6. O'Connor DL, Hall R, Adamkin D, Auestad N, Castillo M et al. Growth and development in preterm infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a prospective, randomized controlled trial. *Pediatrics* 108: 359-371, 2001.
7. Hoffman DR, Theuer RC, Castaneda YS, Wheaton DH, Bosworth RG et al. Maturation of visual acuity is accelerated in breast-fed term infants fed baby food containing DHA-enriched egg yolk. *J Nutr* 134: 2307-2313, 2004.
8. Semina EV, Murray JC, Reiter R, Hrstka RF, Graw J. Deletion in the promoter region and altered expression of Pitx3 homeobox gene in aphakia mice. *Hum Mol Genet* 9: 1575-1585, 2000.
9. Rieger DK, Reichenberger E, McLean W, Sidow A, Olsen BR. A double-deletion mutation in the Pitx3 gene causes arrested lens development in aphakia mice.

Genomics 72: 61-72, 2001.

10. Kanakubo S, Nomura T, Yamamura K, Miyazaki J, Tamai M et al. Abnormal migration and distribution of neural crest cells in Pax6 heterozygous mutant eye, a model for human eye diseases. *Genes Cells* 11: 919-933, 2006.
11. Matsuo T, Osumi-Yamashita N, Noji S, Ohuchi H, Koyama E et al. A mutation in the Pax-6 gene in rat small eye is associated with impaired migration of midbrain crest cells. *Nat Genet* 3: 299-304, 1993.
12. Robinson ML, Holmgren A, Dewey MJ. Genetic control of ocular morphogenesis: defective lens development associated with ocular anomalies in C57BL/6 mice. *Exp Eye Res* 56: 7-16, 1993.
13. Kitson AP, Stroud CK, Stark KD. Elevated production of docosahexaenoic acid in females: potential molecular mechanisms. *Lipids* 45: 209-224, 2010.