

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590204

研究課題名(和文) 6 デサチュラーゼ遺伝的多型がクローン病患者におけるリノール酸代謝に及ぼす影響

研究課題名(英文) Genetic polymorphisms in FADS1 and FADS2 alter desaturase activity in a Japanese population

研究代表者

久保田 隆廣 (KUBOTA, Takahiro)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50323580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：日本人の炎症性腸疾患( IBD )患者数が急増している原因のひとつとして、日本人の食生活の欧米化が指摘されている。我々は多価不飽和脂肪酸の代謝能、すなわち 6 desaturase 活性に人種差・個体差があるため、リノール酸とアラキドン酸のバランスが失われ、その結果、発症に至るとの仮説を検証した。IBD 治療に際して同意が得られた被験者 53 名を対象に 6 desaturase 遺伝的多型の解析をおこない、6 desaturase 活性(具体的にはリノール酸やアラキドン酸などの測定値)との整合性を確認する。

研究成果の概要(英文)：We have studied the genetic analysis of the 6 desaturase (FADS2) polymorphisms, alter desaturase activity in Japanese individuals, on the metabolic activity of 3-/6-polyunsaturated fatty acid (PUFA). In addition, we are comparing the relationship between the dietary PUFA ratio and genetic polymorphisms using an in vivo evaluation method in 53 Inflammatory Bowel Disease Japanese patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：6 desaturase IBD Crohn's disease n-3 PUFA n-6 PUFA genetic polymorphism arachidonate cascade Japanese

1. 研究開始当初の背景

日本人における炎症性腸疾患 (IBD)、すなわち潰瘍性大腸炎 (UC) やクローン病 (CD) 患者の数が急増している。古来、日本人は穀物や魚を多く食しており、そうした食材には n-3 多価不飽和脂肪酸 (n-3 PUFA) が多く含有されていた。近年の食生活の欧米化にともない、急激に摂取量が増した食肉や野菜、ならびに食用植物油にはリノール酸 (LA) をはじめとした n-6 多価不飽和脂肪酸 (n-6 PUFA) が多く、それはプロスタグランジン (PG) などの炎症性メディエーターを生み出すアラキドン酸 (AA) に代謝される (図 1)。こうした理由から、日本における IBD の増加の原因のひとつとして、食生活の欧米化にともなう n-6 PUFA の過度の摂取が注目されている。

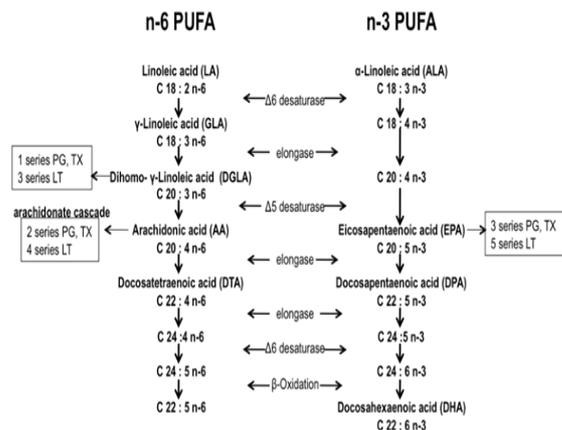


図 1. 多価不飽和脂肪酸の代謝過程

我々は IBD 患者を対象に食事の際の脂肪酸摂取の調整を図ることで IBD を鎮静化および寛解を維持することができることを報告した (*Inflamm Bowel Dis*, 2010, **16**: 1696-1707)。そもその着想は、n-3 PUFA が多く含まれる魚脂を摂取すること、あるいは LA 摂取を控えることで AA 産生を抑えることができたとする報告 (*Eur J Clin Invest* 2000; **30**: 58-65, *Biochim Biophys Acta* 1992; **1180**: 147-162) に基づいている。

2. 研究の目的

研究の目的は、(1)日本人のクローン患者に特有とされる 6 desaturase (FADS2) の遺伝的多型性を探索すること、(2)その遺伝的多型性がリノール酸代謝活性にどのような影響を及ぼすかについて解析することである。具体的には、FADS2 遺伝子配列解析系を確立し、個々の多価不飽和脂肪酸分析の結果と照合する。

日本人における最適な n-3 PUFA と n-6 PUFA のバランス比は、未だ明らかにされていない。我々は赤血球膜リン脂質中の脂肪酸組成を解析する手法を用いて健康日本人と CD 患者で比較した結果、CD 患者では LA が低く、AA が有意に高いことを示唆する結果

を得ており、この原因が律速酵素である FADS2 にあると推測した。日本人特有の FADS2 遺伝的多型性が脂肪酸代謝能、すなわち、6di 比:(ジホモ-リノレン酸 + アラキドン酸)/リノール酸

$$6di = \frac{\text{Dihomo-} \gamma \text{-linoleic acid} + \text{Arachidonic Acid}}{\text{Linoleic Acid}}$$

に変化を及ぼし、その結果、n-3 PUFA / n-6 PUFA バランスを失わせることが明らかになれば、IBD 患者数が本邦において増加している原因の一部を説明し得ることとなり、ひいては個々の遺伝情報に基づいた脂肪酸摂取などの具体的な食事指導につながると考えている。

3. 研究の方法

(1) 研究試験計画書作成と倫理審査

被験者の募集を担当する東京慈恵会医科大学附属柏病院、得られた検体の遺伝子解析などを実施する千葉科学大学 (現所属:新潟薬科大学) の双方において倫理審査委員会による審査・承認を得た。

(2) IBD 患者の遺伝子解析用・脂肪酸分析用検体の収集

被験者には、口頭および文書にて本試験計画を説明し、同意を得た。

(3) FADS2 遺伝子多型解析系の確立

被験者の血液 5 mL からゲノム DNA を抽出した。FADS2 遺伝子配列解析系を確立し、被験者すべてのシーケンス解析 (翻訳領域のみ) を実施する。

(4) FADS2 mRNA 定量系の確立

(3) 検体から別途 mRNA を抽出した検体を用いる。FADS2 mRNA 定量系を確立し、被験者すべての FADS2 mRNA を定量する。

(5) 多価不飽和脂肪酸分析

被験者の赤血球画分を用いて、n-6 多価不飽和脂肪酸の代謝過程における LA や AA などの分析・測定を随時おこなう。

(6) FADS2 遺伝的多型がリノール酸代謝に及ぼす影響についての検証

FADS2 遺伝的多型性がリノール酸代謝活性に影響を及ぼすか否かについて検証をおこなう。

4. 研究成果

(1) 研究試験計画書作成と倫理審査

被験者の募集を担当する東京慈恵会医科大学附属柏病院 (No.24-200 6966) と千葉科学大学 (No.24-5)、加えて研究代表者の現所属先である新潟薬科大学 (No.26-002) の各施設において倫理審査委員会による承認を得た。

(2) IBD 患者の遺伝子解析用・脂肪酸分析用検体の収集

被験者には、口頭ならびに文書にて本試験計画を説明し、総計 53 名の同意を得た。

(3) FADS2 遺伝子多型解析系の確立

(2)の血液 5 mL から、すでにゲノム DNA 抽出を終えた 19 名を対象に FADS2 遺伝子配列解析系を確立した。すなわち、翻訳領域 (exon1-12) を特異的に増幅するプライマーを設計し、PCR を実施した。PCR 反応条件は、はじめに熱変性を 95 で 2 分間、つぎに熱変性、アニーリングおよび伸長をそれぞれ、95 で 20 秒、64 で 40 秒、および 72 で 30 秒、これを 30 サイクルくり返し、最後の伸長反応を 72 で 5 分間とした。さらに、得られた PCR 産物を鋳型としてダイレクトシーケンスをおこない、その遺伝子配列が FADS2 であることを確認した。

遺伝子抽出を終えていない残りの検体 34 名分については、追って解析を実施し、被験者 53 名すべての遺伝子配列を比較することで多型性の有無を確認する。

(4) FADS2 mRNA 定量系の確立

(2)検体から別途 mRNA を抽出した検体を用いる。FADS2 mRNA 定量系については、後述する理由により未確立である。

(5) 多価不飽和脂肪酸分析

赤血球画分を分取した被験者 28 名を対象に、n-6 多価不飽和脂肪酸の代謝過程における LA や AA の分析・測定をおこなった。すなわち、ガスクロマトグラフィー法を用いて血清と赤血球膜由来の多価不飽和脂肪酸を定量した。また、血清および赤血球膜における AA、EPA (エイコサペンタエン酸) および 6di の項目について相関分析をおこなった。

6di 値は以下の計算式により算出した。

$$6di = \frac{\text{Dihomo-}g\text{-linoleic acid} + \text{Arachidonic Acid}}{\text{Linoleic Acid}}$$

赤血球膜と血清由来の EPA および 6di について相関分析をおこなった結果、その相関係数はそれぞれ 0.91、0.69 と高かった。一方、AA についてのそれは 0.32 と低かった。このことから、生体細胞膜リン脂質の脂肪酸組成の測定において、前者は赤血球膜と血清由来の値がそれほど乖離しないのに対して、後者は検査目的によって生体試料を選択することが必要と思われる。AA の相関性が低かった原因としては、IBD 患者を対象としているために血清由来の AA が炎症によって消費されたためではないかと考えている。また、6di の相関係数については、その計算式に相関関係が弱い AA 値が含まれ

ていることを考慮しなければならない。

赤血球画分の分取を終えていない残りの検体 25 名分については、追って定量分析をおこない、総計 53 名における相関分析を実施する。

(6) FADS2 遺伝的多型がリノール酸代謝に及ぼす影響についての検証

被験者 53 名すべての解析結果が得られたのち、(3)FADS2 の遺伝子配列と個々の(5)多価不飽和脂肪酸代謝能の結果を照合する。

倫理審査委員会へ研究計画を申請した当時、血球中における 6 desaturase の mRNA の存在が不確定だったことから、その定量に関する計画(4)のみ削除することをもとめられた。本年(平成 27 年 3 月)、再審査請求の承認 (No.26-363 7869) を受けて、遺伝的多型性、多価不飽和脂肪酸分析に加えて、当初の計画通り、(4) 6 desaturase mRNA 定量実験項目を追加する予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

久保田隆廣: アザチオプリン/6-メルカプトプリン代謝に関わる薬物代謝酵素とその遺伝的多型 *医薬品相互作用研究*, 査読無, **38**: 1-7 (2015)

[学会発表](計 2 件)

S.Odahara, K.Uchiyama, T.Kubota, N.Shimamoto, J.Mitobe, S.Tsukinaga, H.Arakawa, S.Koido, T.Ohkusa, H.Tajiri. Polymorphism of TPMT/ITPA and the risk of adverse reactions among patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine: A prospective study. DDW (AGA), **Tu1247**: S783 (2012)

小田原俊一, 内山幹, 久保田隆廣, 三戸部慈実, 飯田貴之, 花井洋行, 荒川廣志, 小井戸薫雄, 大草敏史, 田尻久雄: 炎症性腸疾患患者における Azathioprine 代謝能と副作用発現に関する前方視的検討 第 98 回日本消化器病学会総会 **109**: Suppl., A268, 0-204 (2012)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 隆廣 (KUBOTA TAKAHIRO)  
新潟薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 5 0 3 2 3 5 8 0

(2) 研究分担者

内山 幹 (UCHIYAMA KAN)  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 1 0 3 8 5 2 9 7

(3)研究分担者

小田原 俊一 ( ODAHARA SHUN-ICHI )  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号：5 0 4 4 5 6 7 3