

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 31 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350904

研究課題名(和文) 種々の脂肪酸摂取および直接投与が心血管機能に及ぼす効果の検討

研究課題名(英文) The investigations of the effects of fatty acids consumption or direct administration on the functions of cardiovascular system.

研究代表者

加園 恵三 (Keizo, Kasono)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：90177387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：<1> パルミトオレイン酸(POA)の2週間の経口投与は、糖尿病モデルマウス(KKA-y)のインスリン抵抗性を改善し、血糖値を低下させた。また、POA投与により代償的にPPAR-による弛緩の増強を引き起こされた可能性がある。<2> エイコサペンタエン酸(EPA)は濃度依存的に、TNF-によって増加したヒト大動脈血管内皮細胞株のVCAM-1およびICAM-1タンパク質発現量を抑制した。低酸素環境利用における魚油製剤服用により、持久力の改善効果を下げることなくHt値上昇による心血管系への負担を減少できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：<1> The administration of palmitoleic acid (POA) for 2 weeks improved the insulin resistance and reduced the plasma glucose levels in diabetic model mice (KKA-y). It was speculated that the administration of POA compensatory increased the relaxation response induced by PPAR-. <2> Eicosapentaenoic acid (EPA) dose-dependently decreased the up-regulated protein levels of VCAM-1 and ICAM-1 induced by TNF- in human aortic endothelial cells. <3> It is speculated that fish oil supplementation reduces the cardiovascular loading induced by increase of Ht during hypoxic training without blunting the improvement of endurance performance.

研究分野：生活習慣病

キーワード：糖尿病 糖尿病合併症 n-3系多価不飽和脂肪酸 エイコサペンタエン酸 血管内皮機能 脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

我々のこれまでの研究成果により以下の事実が判明した。(1) n-3系多不飽和脂肪酸(n-3 PUFA)は、糖脂質代謝改善のみならず、脂肪の体内分布を適正化する(*J. Health Sc.*, 57,341-349,2011.)。(2) 肥満後の食餌量制限による減量時は牛脂食に比較して魚油食を用いた方が、脂肪肝を早期に改善し、効率よく安全に体重減少が達成できる(*Biosci Biotechnol Biochem.*, 76,1011-1014,2012.)。(3) 魚油の糖・脂質代謝改善作用は、魚油に多く含まれる n-3 PUFA(eicosapentaenoic acid; EPA や docosahexaenoic acid; DHA)によるところも大きい。これ以外にも一価不飽和脂肪酸の palmitoleic acid (C16:1)にも DHA,EPA と同様の脂肪肝改善作用がある(*Biosci Biotechnol Biochem.*, 75:2401-2403, 2011.)。(4) 魚油の糖・脂質代謝改善作用の機序として、PPAR- α および PPAR- γ 刺激作用を介する部分とそれらを介さない部分があり、特に脂質代謝改善作用は、PPARs系からは独立した機序による(*Lipids Health Dis.*, 9: 101-109,2010.)。(5) 糖尿病による大動脈の内皮機能障害のうち、アセチルコリン(ACh)による血管弛緩反応の減弱が EPA 摂取により有意に改善する(論文投稿準備中)。

これまでの多くの研究で、n-3系多不飽和脂肪酸の摂取が、心血管病変の発症を予防し、心血管病変による死亡率だけでなく総死亡率も有意に低下させることが報告されている(*Lancet* 376,540-550,2010.)。しかし、2型糖尿病において、n-3PUFAなどの摂取が血管弛緩反応や心筋のエネルギー効率に及ぼす影響やその機序について、薬理的な観点からの詳細な検討はなされていない。また、我々が見出したように一価不飽和脂肪酸の パルミトオレイン酸(C16:1)も EPA とほぼ同様の脂肪肝改善作用を持つこと、オレイン酸(C18:1)には PPAR δ を介したインスリン感受性維持機能があると考えられることから C:16-1 や C18:1 の摂取や直接投与による心血管機能の改善作用についても検討する意義がある。

なお、当初予定した心筋への直接投与実験については、技術上および時間的な制約が生じたため、取りやめることとした。これに代わり、男子駅伝選手を対象とした低酸素環境トレーニング下における魚油製剤摂取の影響を検討することとした。

2. 研究の目的

<研究1>

2型糖尿病モデルマウス(KKAy)における血管機能障害に対するパルミトオレイン酸 POA の効果について検討した。

<研究2>

ヒト大動脈血管内皮細胞株(Immortalized Human Aortic Endothelial Cells- SV40、以下 HAEC)に TNF- α を用いて細胞接着因子である VCAM-1 と ICAM-1 を発現させ、EPA 等の脂肪酸による抑制効果の有無を検討した。

<研究3>

大学生の長距離選手における低酸素曝露のトレーニング方法として、夜間から翌朝まで主として睡眠時間帯を常圧低酸素テントで過ごし、平地でのトレーニングを実施することで、安全かつパフォーマンスの向上に繋がるかを検討した。また、低酸素環境利用によるデメリットである赤血球数やヘモグロビン値上昇に伴う心血管系への負担を軽減する目的で、魚油製剤服用の併用効果についても検討した。

3. 研究の方法

<研究1>

実験動物：実験には2型糖尿病モデルマウスである KK-Ay 雄性6週齢マウスと野生型マウスである C57BL/6J 雄性6週齢マウスを用い、通常食を8週間与えた。その後、それぞれのマウスをランダムに2群に振り分け、2週間 control 食を与えたマウスをそれぞれ、KK-Ay+Con 群、C57BL+Con 群とし、control 食に POA (600mg/kg) を混合し2週間与えたものをそれぞれ、KK-Ay + POA 群、C57BL + POA 群とした。本研究における動物実験は、実験城西大学動物管理委員会の承認を得て実施した。

血管応答測定法：それぞれのマウスより、胸部大動脈(aorta)を摘出し、血管内皮無傷標本作製した。張力応答は、定法に従い 95%O₂ + 5%CO₂ の混合ガスを通気し 37°C に恒温した Krebs-Henseleit solution 中で 1.5g の静止張力下等尺性に測定した。反応は、ProstaglandinF_{2 α} (F_{2 α} : 10⁻⁶M) により生じた最大張力上昇に対し、Acetylcholine (ACh)、Sodium Nitro Prusside (SNP)、PAR2-activating peptide (PAR-2AP)、PPAR- δ 刺激薬(GW0742)の累積弛緩反応を測定した。

血清生化学検査：各種キットを用いて測定した。

<研究2>

HAEC は、DMEM+10%FBS を用いて培養した。TNF- α および EPA が細胞増殖に及ぼす影響を MTT アッセイにて検討した。培養液中への VCAM-1 遊離量を Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay Kit を用いて測定した。VCAM-1 および ICAM-1 のタンパク質発現量を Western blot 法で検討した。

< 研究 3 >

低酸素室 (Hypoxico 製低酸素テントシステム) を男子駅伝部の寮に設置し、研究対象選手には主として夜間睡眠時間帯 (約 8 時間/日) のみ低酸素室に 3 週間居住した。低酸素環境は常圧低酸素とし、酸素濃度は海拔 2,000 ~ 2,500m に相当する 16.4 ~ 15.3% とした。トレーニングは通常環境で実施した (Live High - Train Low 方式)。

本研究の被験者になった 16 名中 8 名は低酸素環境のみを利用する群とし、「非魚油群 (non-fish oil group)」とした。他の 8 名は魚油製剤を服用しながら低酸素環境も利用する「魚油群 (fish oil group)」とした。魚油群の被験者は、魚油製剤 (日本水産株式会社製「海の元気 EPA」) を用い EPA と DHA 合計で 2.37g/日) を服用した。服用開始 4 週間後から低酸素室での居住を開始し、研究終了時まで服用を継続した。すべての研究プロトコルを予定通り終了した選手は、非魚油群 6 名、魚油群 6 名の計 12 名であった。本研究は、城西大学生命科学研究倫理審査委員会の承認を得て実施された。

血液検査: 非魚油群および魚油群ともに、研究開始時 (魚油製剤服用開始前 = 低酸素環境利用開始 4 週間前) と低酸素環境利用 1 週間後の計 2 回血液検査を実施した。

ランニングテスト: 低酸素環境利用前および利用終了 5 日後の計 2 回、ランニングテストを実施した。走行開始前に血中乳酸値を測定し、その後 3 分間走行を 1 分間の休息を入れて数回実施し毎回走行直後に血中乳酸値を測定した。速度は、開始時は 18.8 km/h とし、3 分間走行後の 1 分間の休息時に血中乳酸値を測定し、0.3 km/h ずつスピードを上げた。また、血中乳酸値測定には、簡易血中乳酸測定器 (Arcray 社製、Lactate Pro2) を利用した。血中乳酸値が 4 mmol/L に到達する地点を血中乳酸蓄積開始点 (Onset of Blood Lactate Accumulation; OBLA) とし、OBLA に到達する走行速度を推算し、これを SP-OBLA とし、持久力の客観的指標として用いた。

4. 研究成果

< 研究 1 >

体重、臓器重量および血清生化学検査: C57BL/6J 群に比べて KK-Ay 群で、体重、血糖、Insulin、HDL コレステロール、TG 値が

有意に増加した。糖尿病病態下で増加した血糖は POA 投与により有意に減少した (表 1)。

表-1 KK-Ay マウスの 2 群のデータ

	KK-Ay	
	Con	POA
体重(g)	46.17±0.96**	45.56±1.09**
肝重量 (mg)	71.28±4.39**	69.96±1.51**
WAT 重量 (mg/g)	31.23±1.960	31.72±0.809** #
血糖 (mg/dl)	615.00±62.54**	479.18±37.91
TC (mg/dl)	339 ± 31.54*	300 ±31.91
HDL-C (mg/dl)	100.27±13.46**	96.25±10.93**
TG (mg/dl)	491.25±45.53**	615.00±96.25**
NEFA (mEq/L)	0.645 ±0.119	0.623 ±0.090
Insulin (ng/mL)	25.33 ± 4.22**	28.40 ± 2.62**

肝臓重量および WAT 重量は、g 体重当たり。

Values are the means ±SD (n=10 ~ 11) .

*** significantly different from C57BL/6J mice

(*P<0.05, **P<0.01). #, significantly different from KK-Ay+Con mice (#P<0.05) .

^ significantly different from C57BL/6J+POA mice (P<0.05) .

PGF_{2α} 誘発収縮への ACh 累積処理の影響: C57BL/6J 群に比べて KK-Ay 群において弛緩に有意な減弱が見られたが、それぞれのマウスで Normal 群と POA 群の ACh に対する応答性に有意差は見られなかった (図-1A)。

PGF_{2α} 誘発収縮への SNP 累積処理の影響: 4 群間で有意差はなく、血管平滑筋の弛緩能は同等であると示唆された (図-1B)。

図-1A

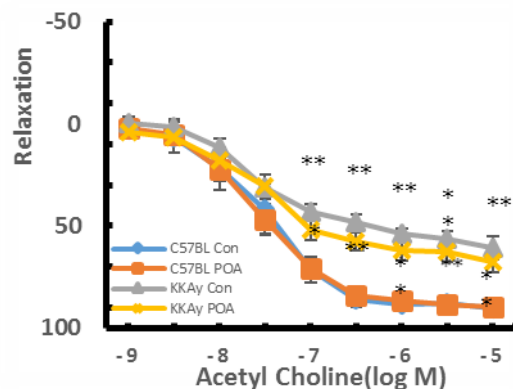
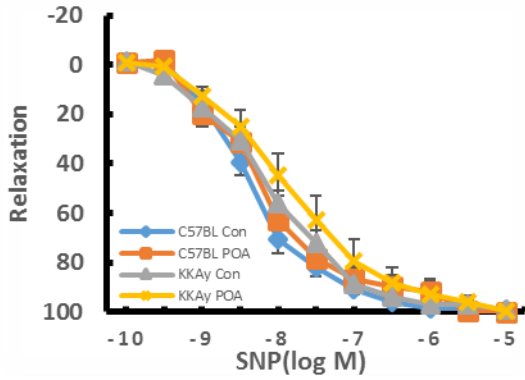


図-1B



PGF_{2α}誘発収縮へのPAR-2AP 累積処理の影響：4群間で差は見られず、PAR-2APによる弛緩は糖尿病やPOAによる影響は見られなかった(図-2A)。

PGF_{2α}誘発収縮へのPPAR-δ 累積処理の影響：GW0742(PPAR-δ 刺激薬)による弛緩反応はC57BL/6J群と比較し、KK-Ay群で弛緩が有意に増強した。C57BL/6J群のみPOA投与により有意に弛緩の増強が見られた(図-2B)。また、L-NAME前処置によりGW0742低濃度側においては弛緩の消失が見られたが、高濃度側では弛緩が認められた(data not shown)。

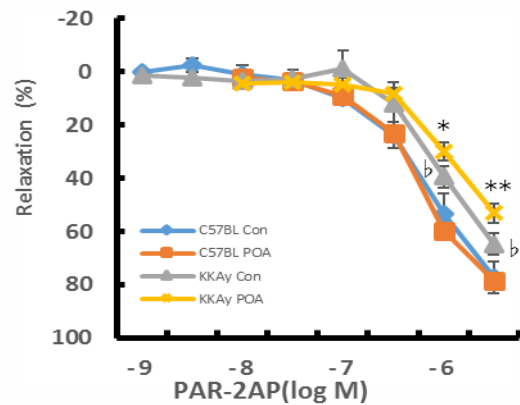
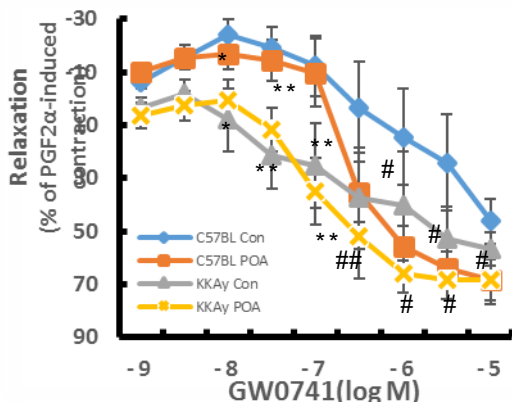


図 2B



Values are the means ±SD (n=7).

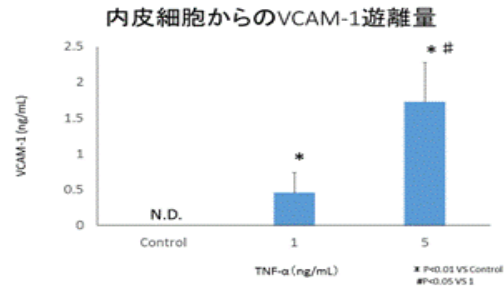
*** significantly different from C57BL/6J mice (*P<0.05, **P<0.01). #,## significantly different from C57BL/6J+Con mice (#p<0.05, ##p<0.01). significantly different from C57BL/6J+POA (p<0.05)

考察:体重や血清中パラメーターより、KK-Ay群の糖尿病を確認した。POA投与により血糖値が有意な低下したが、血中インスリン濃度は変化しなかったことより、インスリン抵抗性の改善が示唆された。また、パルミトオレイン酸の投与は糖尿病による内皮機能障害に対する治療効果はなかったが、PPAR-δによる弛緩を増強させることにより血管に対し有用な作用を及ぼすことが示唆された。

<研究2>

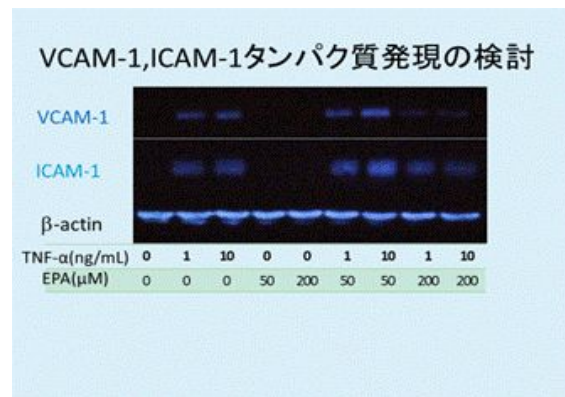
TNF-αは、MTTアッセイに影響を与えない濃度で、濃度依存的にHAECからのVCAM-1の培養液中への遊離量を増加させた(図-3)。

内皮細胞からのVCAM-1遊離量



EPAは濃度依存的に、TNF-αによって増加したVCAM-1およびICAM-1タンパク質発現量を抑制した。なお、EPAはTNF-α添加の4時間前に添加した(図-4)。

図-4 VCAM-1 および ICAM-1 タンパク質発現量

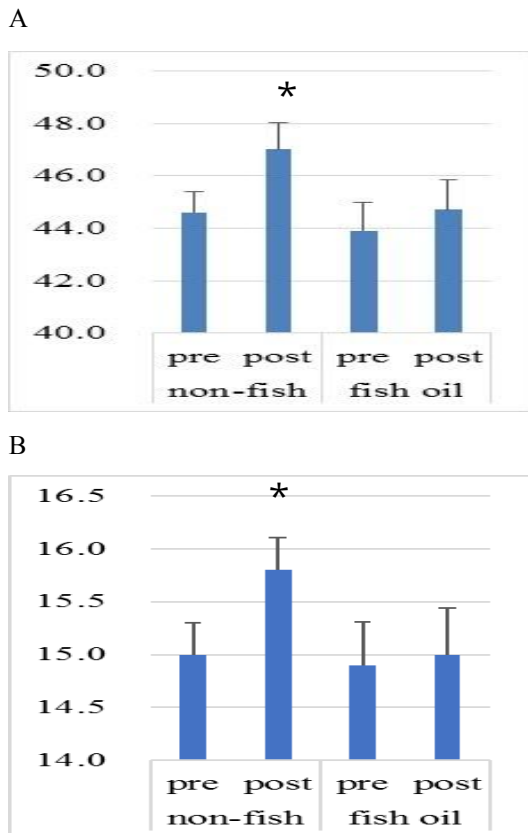


<研究3>

Ht値およびHb値:低酸素環境利用前後のHt値およびHb値を図-5に示した。Ht値は、非

魚油群では低酸素環境利用前後でそれぞれ、 44.6 ± 0.79 、 47.0 ± 1.01 % で、低酸素環境利用後に有意に上昇した。一方、魚油群では低酸素環境利用前後でそれぞれ、 43.9 ± 1.07 、 44.7 ± 1.16 % で、低酸素環境利用後で有意な差を認めなかった (図-5A)。Hb 値についても、非魚油群では低酸素環境利用後に有意に上昇した。一方、魚油群では低酸素環境利用前後で有意差を認めなかった (図-5B)。

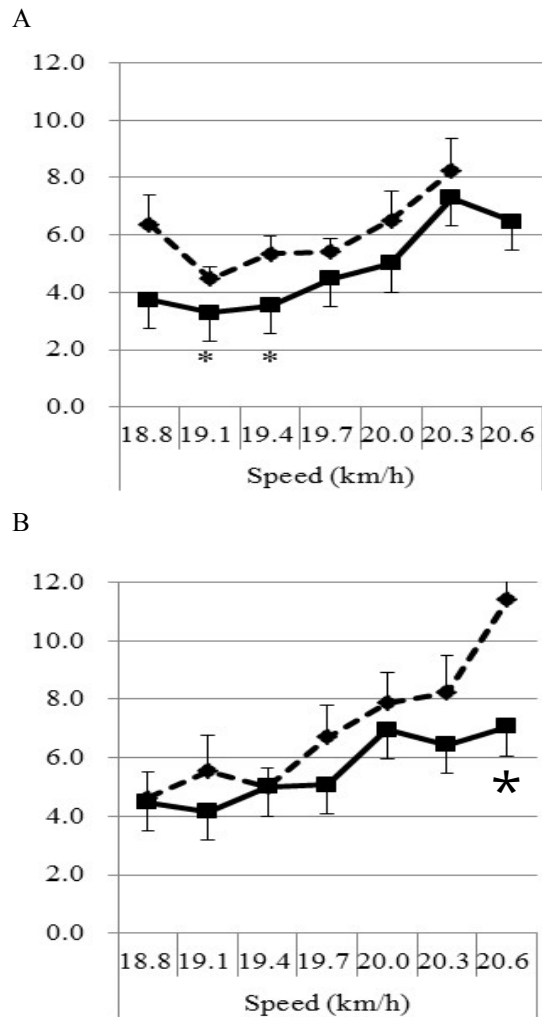
図-5 低酸素トレーニング前後における Ht 値 (A) および Hb 値 (B) * $p < 0.05$



総合的な乳酸値の結果：ランニングテストの総合的な結果を図-6 に示した。非魚油群および魚油群共に低酸素環境利用後でランニングテストにおける血中乳酸値が低下する傾向を認めた。非魚油群では、走行速度 18.8、19.1 および 19.4 km/h において低酸素トレーニング後の血中乳酸値がそれぞれ、低下幅 2.65、1.19 および 1.81 mmol/L で有意に低下したが、それ以上の走行速度では有意差を認めなかった (図-6A)。魚油群では、非魚油群と比較してより速い走行速度で低酸素環境利用後に血中乳酸値が下がる傾向を示し、走行速度 20.6 km/h では低酸素利用後に有意に低下した (図-6B)。

図-6 ランニングテストにおける血中乳酸値の推移 (A) 非魚油群、(B) 魚油群、破線

は低酸素環境利用前、実線は利用後。* $p < 0.05$

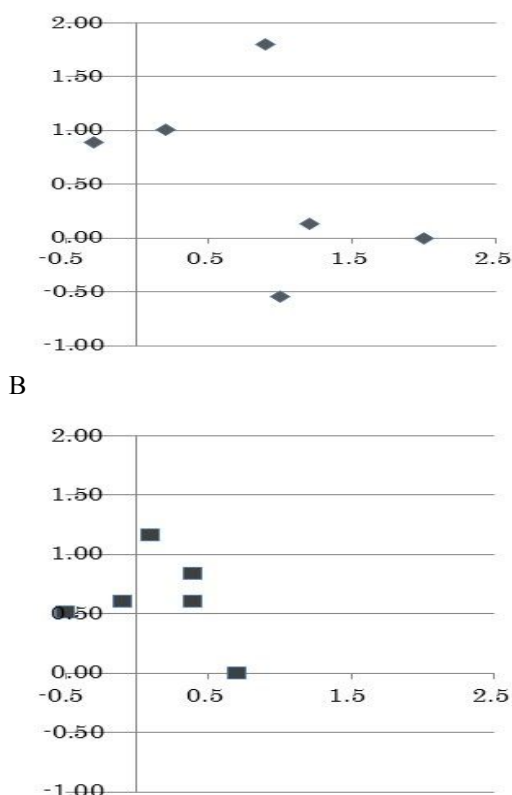


血中乳酸蓄積開始点 (Onset of Blood Lactate Accumulation ; OBLA) : OBLA は血中乳酸値が 4 mmol/L のレベルに達する運動強度とされる。本研究におけるランニングテストは、運動負荷の強度が走行速度 (km/h) で表示されるため、血中乳酸値が 4 mmol/L のレベルに達する走行速度を推算して、その速度を「SP-OBLA (km/h)」とした。12 名の選手の SP-OBLA の平均値は、非魚油群、魚油群共に低酸素環境利用後に上昇した。この上昇は有意傾向 (p 値はそれぞれ、0.08 および 0.06) であったが有意差を認めなかった。また、非魚油群と魚油群では SP-OBLA の改善度 (低酸素環境利用前後の差) において有意差を認めなかった。

SP-OBLA と Hb 値との関連：非魚油群 6 名、魚油群 6 名の計 12 名の選手について、低酸素環境利用前後の Hb 値変化量 ($Hb \text{ g/dL} = Hb$) と SP-OBLA 改善度 ($SP-OBLA \text{ km/h} = SP-OBLA$) をプロットした (図-7)。非魚油群では、低酸素環境利用後に Hb 値が上昇したが、このことが持久力の増強につなが

らないことが示された。一方、魚油群では低酸素環境利用前後で、Hb 値は有意差を認めなかったにもかかわらず、魚油群の6選手のうち5名で SP-OBLA が上昇していることがわかる。また、有意差はないものの SP-OBLA の平均値では魚油群が非魚油群を上回った (data not shown)。

図-7 SP-OBLA と Hb の関連 (A) 非魚油群、(B) 魚油群
横軸：Hb 値上昇量、縦軸： SP-OBLA



以上より、大学駅伝部選手のパフォーマンス向上を目的として、常圧下 Live High-Train Low の低酸素環境は安全に利用できることが示された。また、低酸素環境利用時に魚油製剤を服用することにより、低酸素環境利用によるデメリットを軽減しながら持久力の向上に寄与できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 榑部静二, 小林 悟, 竹之内康広, 金賢珠, 新井尚之, 野部浩司, 大竹一男, 白幡 晶, 加園恵三, 大学男子駅伝選手の常圧下低酸素環境を利用したトレーニングにおける魚油製剤摂取の効果, 脂質栄養学, 2016 25:61-74.

他 2 件投稿準備中

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 竹之内康広, 加藤貴也, 野部浩司, 加園恵三, 2 型糖尿病モデルマウス (KKAy) における血管機能障害に及ぼすエイコサペンタエン酸エチルの治療効果, 第 130 回日本薬理学会関東部会, 2014.7.5, 東京.
2. 榑部静二, 栗林涼, 小樽大介, 竹之内康広, 新井尚之, 野部浩司, 加園恵三, 大学男子駅伝部における常圧下 Living High Training Low を基本とした安全な低酸素トレーニングの有効性について, 第 27 回ランニング学会大会, 2015.02.28, 東京.
3. 榑部静二, 小林悟, 新井尚之, 浜崎景, 栗林涼, 竹之内康広, 金賢珠, 加園恵三, 低酸素環境下トレーニングにおけるヘモレオロジーに及ぼす魚油摂取の効果, 第 27 回ランニング学会大会, 2015.02.28, 東京.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

加園 恵三 (KASONO KEIZO)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：90177387

(2)研究分担者

平成 26 年度

野部 浩司 (NOBE KOUJI)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：30276612

平成 27~28 年度

大竹 一男 (OHTAKE KAZUO)

研究者番号：50337482

城西大学・薬学部・助教

平成 26~28 年度

竹之内 康広 (TAKENOUCHI YASUHIRO)

城西大学・薬学部・助手

研究者番号：30582233

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()