

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500851

研究課題名(和文) 種々の脂質摂取が大動脈機能に及ぼす効果についての検討

研究課題名(英文) The investigations of the effects of fatty acids administration on the functions of aorta

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：1. エイコサペンタエン酸エチルエステル(EPA-E)慢性投与によりKKay糖尿病マウス大動脈のacetylcholine累積弛緩反応が改善した。2. EPA-E慢性投与は大動脈のsodium nitro prusside累積弛緩反応に影響しなかった。3. EPA-E慢性投与は大動脈の収縮反応に影響しなかった。4. EPA-E(10 μ M)直接投与はPGF2による収縮に影響しなかった。エステル型でないEPA、DPAおよびDHA(すべて10 μ M)を直接投与すると、PGF2による収縮を顕著に弛緩させた。5. よって、EPA-E投与は、KKay糖尿病マウスの血管内皮機能障害に対して、治療効果を有する。

研究成果の概要(英文)：1. Chronic administration of eicosapentaenoic acid ethyl ester (EPA-E) improved Ach-induced relaxation reactivity in the aorta of KKay diabetic mice. 2. Chronic administration of EPA-E showed no effect on SNP-induced relaxation reactivity in the aorta. 3. Chronic administration of EPA-E showed no effect on the contraction reactivity in the aorta. 4. EPA-E(10 μ M) did not induce any effect. However, EPA, DPA or DHA(10 μ M) directly induced remarkable relaxation reaction after the contraction induced by PGF2- α . 5. In conclusion, EPA-E administration showed the therapeutic effect on the functional disorder of vascular endothelial cells in KKay diabetic mice.

研究分野：健康・スポーツ科学

科研費の分科・細目：応用健康科学

キーワード：血管内皮機能 エイコサペンタエン酸 血管収縮反応 血管弛緩反応 脂肪酸

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、以下のことを明らかにしてきた。(1)魚油の糖・脂質代謝改善作用は、n-3系多価不飽和脂肪酸(n-3 PUFA)で、魚油に多く含まれる docosahexaenoic acid (DHA) や eicosapentaenoic acid (EPA) によるところも多いが、一価不飽和脂肪酸の palmitoleic acid (C16:1)にも生理作用がある。(文献8)(2)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 依存性の部分と非依存性の部分があり、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ところも多い。(Lipids Health Dis., 9: 101-109, 2010)(3)2型糖尿病における大動脈弛緩反応の減弱は Akt の発現およびリン酸化が共に低下していることが一原因である。(J Pharmacol Sci 106:600-608, 2008)

以上の我々の得た知見に加え、これまでに、インスリン抵抗性や遊離脂肪酸の脂肪毒性による血管内皮機能障害による動脈硬化の進展や内皮細胞の一酸化窒素(NO)産生低下による高血圧の増悪などが報告されている。一方、n-3 PUFA 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。さらに、n-3 PUFA による血管内皮機能の改善も報告されている。しかし、2型糖尿病において、n-3 PUFA 摂取が血管弛緩反応に及ぼす影響やその機序については詳細な検討はなされていない。

2. 研究の目的

(1)2型糖尿病・肥満モデルマウスを用いて、DHA、EPA、C16:1摂取による胸部大動脈の血管弛緩反応を検討する。2型糖尿病・肥満モデルマウス(KKAy)に、DHA、EPA、C16:1を多く含有する餌を与え、一定期間の後、胸部

大動脈を摘出し、Magnus装置を用いて、PGF_{2 α} による血管収縮後のアセチルコリン(Ach)、Calcium ionophore (A23187) およびSNP (NO donor)による血管壁弛緩反応を検討する。

(2)DHA、EPA、C16:1摂取による胸部大動脈の血管弛緩反応の改善が確認できた場合には、その機序を検討する。

3. 研究の方法

(1)実験動物：C57Bl/6J 雄性マウス(6週齢)及び2型糖尿病モデルマウス(KKAy 雄性)(6週齢)を用い、KKAyには通常食餌を4週間・高脂肪食(HF食)を8週間負荷した後ランダムに2群に分け、HF食(KKAy-HF群)及びHF+EPA-E食(KKAy-HF+EPA-E群)を4週間負荷した。また、対照群として16週間通常食を負荷したC57Bl/6Jマウスを用いた。食餌は、それぞれ1日5gずつ与え、EPA-Eは130mg/day食餌中に混合し投与した⁴⁾。マウスは12時間の明暗サイクルのある飼育室で飼育し、水は自由摂取とした。本研究における動物実験は、城西大学実験動物規定に沿って計画し、全学実験動物管理委員会の承認を得て実施した。

(2)血管応答測定法：調製した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。この標本を95%O₂+5%CO₂の混合ガスを通気し、37℃に保温したKrebs-Henseleit Solution中に懸垂し、1.5gの静止張力をかけて等尺性に発生張力を記録した。反応は、prostaglandinF_{2 α} (PGF_{2 α} ; 10⁻⁶~5 \times 10⁻⁶M)により生じた最大張力上昇に対し、acetylcholine (ACh)、sodium nitro prusside (SNP)を累積投与して張力変化を測定した。なお、薬物前処理は反応測定の30分前に投与した。ethyl eicosapentaenoic acid (EPA-E)は

体内で eicosapentaenoic acid (EPA)、docosapentaenoic acid (DPA)、docosahexaenoic acid (DHA)に代謝される。また、EPA(10⁻⁵M)、EPA-E、DHA、DPA とこれらの試薬の溶媒である methanol を投与し弛緩反応を測定した。

(3) 血清 glucose、Triacylglyceride (TG)、total cholesterol (T-Cho)、HDL cholesterol (HDL-Cho)、insulin 測定法：標本抽出時に採取した血液を 4、290×g で 20 分間遠心し、得られた血清を各種成分測定用キットを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) EPA 慢性投与が体重、血糖値、血清脂質、インスリン値に与える影響：KKAy-HF 群において C57Bl/6J 群と比較して、体重、T-Cho、インスリン値に有意な増加が認められた。血糖値、TG、HDL-Cho では差異が認められなかった。これらの変化に対し、EPA-E 慢性投与は、T-Cho の減少が認められたが、それ以外の因子には影響を与えなかった (Table 1)。

Table 1 各種パラメーター

	C57Bl/6J	KKAy-HF	KKAy-HF+EPA-E
Weight (g)	36.7±0.95	54.56±1.75 **	52.78±2.14 **
Glucose (mg/dl)	164±14	259±23 **	269±19 **
HDL-Cholesterol (mg/dl)	66±9	103±22	92±15
Triglyceride (mg/dl)	104±11	162±18	139±26
Total cholesterol (mg/dl)	81±14	215±18 **	150±13 **
Insulin (ng/ml)	2.96±0.19	4.43±0.19 **	8.86±0.46 **

*p<0.05 vs C57Bl/6J mice, **p<0.01 vs C57Bl/6J mice
#p<0.05 vs KKAy-HF mice

(2) EPA-E 慢性投与 aorta における acetylcholine(ACh) 累積弛緩反応への影響：PGF_{2α} による最大張力に ACh を累積的に投与したところ、C57Bl/6J 群と比べて、KKAy-HF 群で有意な弛緩率の減弱が見られた。EPA-E を慢性投与した KKAy-HF+EPA 群においては KKAy-HF と比べて顕著な弛緩率の増加が見られた。PGF_{2α} による収縮上昇を 100%とするとそれぞれの最大弛緩率は C57Bl/6J で 79%、KKAy-HF で 69%、KKAy-HF+EPA-E で 87%と

なった (Fig 1)。

(3) EPA-E 慢性投与 aorta における sodium nitro prusside(SNP) 累積弛緩反応への影響：PGF_{2α} による最大張力に SNP を累積的に投与したところ、いずれの群においても用量依存的な弛緩反応が検出されたが 3 群間で有意な差が認められなかった (Fig 2)。

Fig. 1.

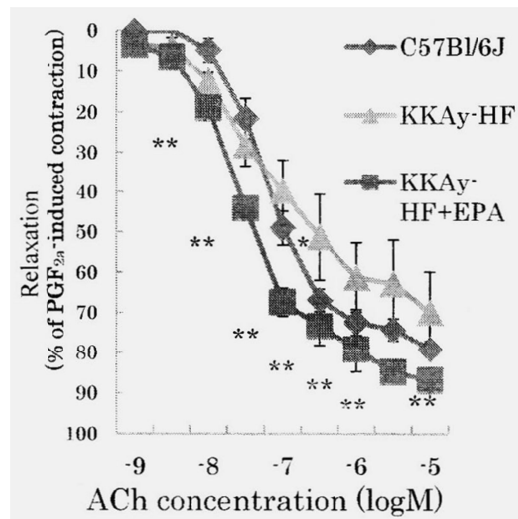


Fig.1 Effect of ACh on PGF_{2α}-induced Force development in aorta. Mouse aorta were isolated from C57Bl/6J, KKAy-HF and KKAy-HF+EPA-E mice. Each value represents mean±SEM. *p<0.05vs C57Bl/6J mice, **p<0.01vs KKAy-HF.

Fig. 2.

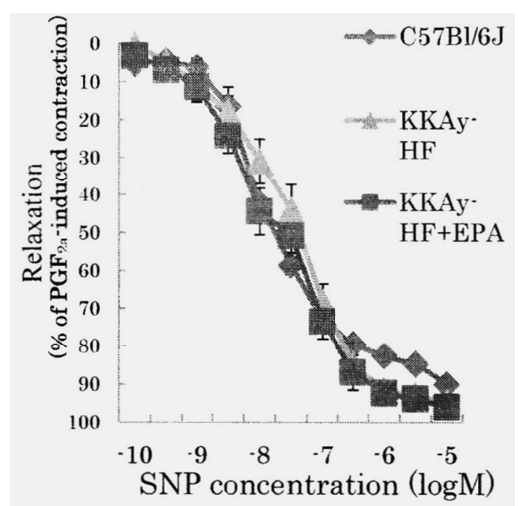


Fig.2 Effect of SNP on PGF_{2α}-induced Force development in aorta. Mouse aorta were isolated from C57Bl/6J, KKAy-HF and KKAy-HF+EPA-E mice. Each value represents mean±SEM.

(4) EPA-E の慢性投与が大動脈における収縮反応に及ぼす影響; L-NNA 存在下、非存在下で、Phe の累積投与を行った。L-NNA 非存在下において KKAY-HF 群は C57Bl/6J 群に比べ有意に収縮力が増強した。KKAY-HF+EPA 群においては EPA-E の慢性投与による影響を認めなかった (Fig.3A)。L-NNA 存在下ではこれらの有意差は消失した (Fig.3B)。

Fig. 3.

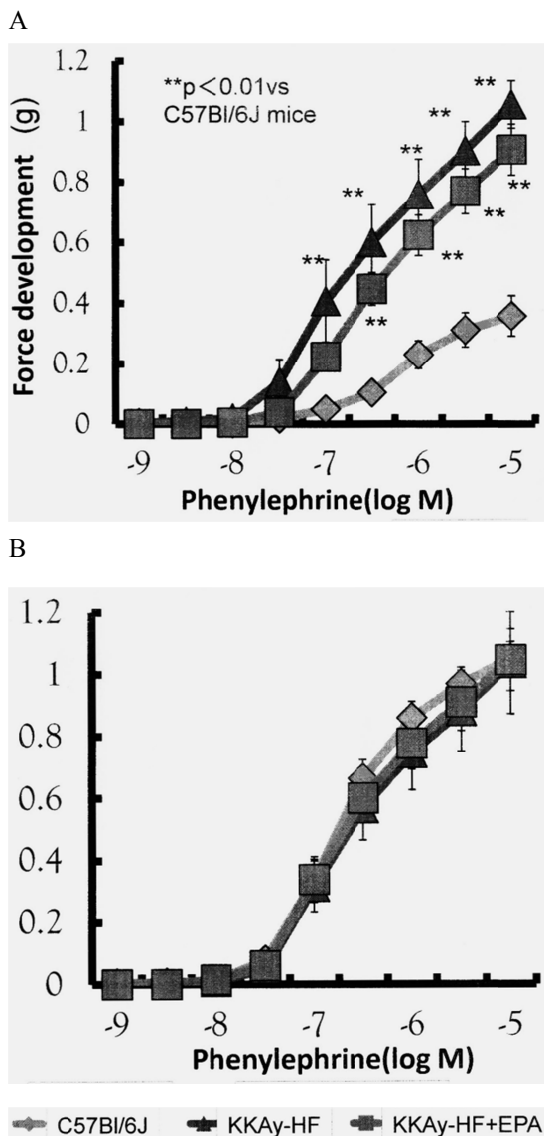


Fig.3. Effect of EPA-E on phenylephrine-induced force development in aorta in the presence or absence of L-NNA. Each values represents mean \pm SEM. **p < 0.01 vs C57Bl/6J mice.

(5) EPA-E および、その代謝物直接投与による弛緩反応: EPA-E、EPA、DHA、DPA、methanol を aorta に投与した。EPA-E、methanol では弛緩が見られなかったが、EPA、DHA、DPA では弛緩がみられた (Fig. 4)。

Fig. 4.

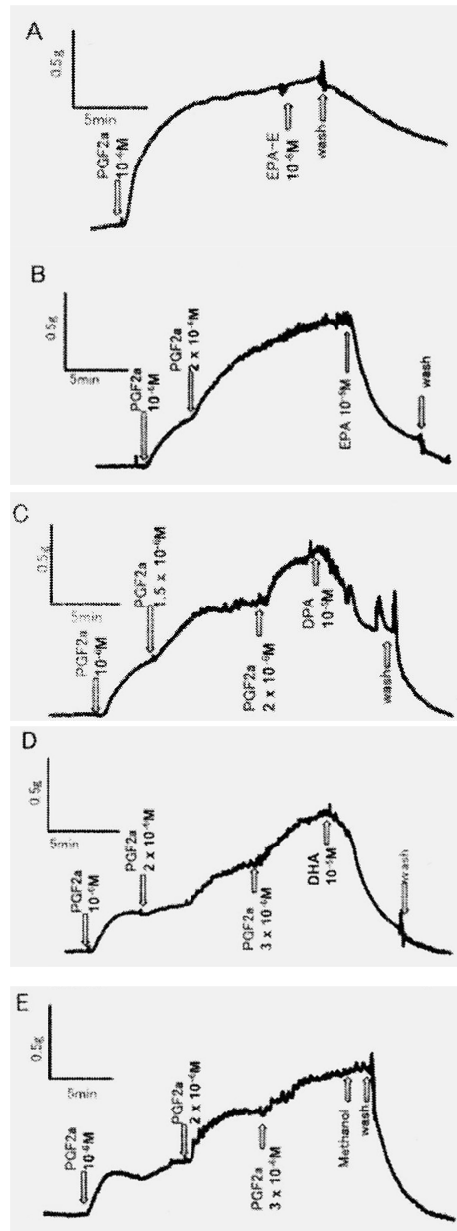


Fig. 4. Effects of EPA-E(A), EPA(B), DPA(C), DHA(D) or Methanol(E) on PGF_{2 α} -induced force development in the aorta isolated from C57Bl/6J mice.

以上より、KKAY-HF 群は、C57Bl/6J 群に比べ、内皮依存性である ACh による弛緩は減

弱し、内皮非依存性である SNP による弛緩は変化が認められなかったことから、2 型糖尿病においては血管内皮機能障害が生じていることが示唆された。この KKAY-HF 群において減弱していた ACh 累積弛緩反応は、EPA-E を慢性処置した KKAY-HF+EPA 群で、C57Bl/6J 群レベルまでの改善が見られ、EPA-E は血管内皮機能に対し治療効果を有することが示唆された。EPA-E は血中パラメータに対し、ほとんど影響を示さなかったことから、治療効果は EPA-E の血管への直接作用である可能性を検討したが、EPA-E の血管への直接作用は検出されなかった。そこで、EPA-E の代謝物である EPA、DPA、DHA による血管への直接作用を検討したところ、これらの代謝物による弛緩が認められた。このことから、血管に直接保護作用を示すのは EPA-E ではなく、その代謝物の EPA、DPA、DHA であることが明らかとなった。このことから、EPA-E は、代謝物である EPA、DPA、DHA の血管保護作用を介し血管内皮機能障害に治療効果を有し、糖尿病による動脈硬化性疾患のリスクを軽減することが明らかとなった。

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 9 件)

1. Koji Nobe, Akiko Fujii, Kiyomi Saito, Takaharu Negoro, Yasuo Ogawa, Yasuko Nakano, Terumasa Hashimoto, Kazuo Honda, Adiponectin enhances calcium-dependency of mouse bladder contraction mediated by protein kinase Ca expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 345:62-68, 2013.
2. Muraki Etsuko, Hiroshige Chiba, Keiko Taketani, Shohei Hoshino, Nobuaki Tsuge, Nobuyo Tsunoda, Keizo Kasono, Fenugreek with reduced bitterness prevents diet-induced metabolic disorders in rats. *Lipids Health Dis.*, 11:58-,2012.
3. Masaki Wakutsu, Nobuyo Tsunoda, Yasuki Mochi, Mitsuki Numajiri, Sachiko Shiba, Etsuko Muraki, Keizo Kasono, Improvement in the high-fat diet-induced dyslipidemia and adiponectin levels by fish oil feeding combined with food restriction in obese KKAY mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76(5):1011-1014,2012.
4. Terumasa Hashimoto, Mariko Kiya, Hisayuki Ohata, Takuro Miyazaki, Keita Shibata, Koji Nobe and Kazuo Honda, Spatiotemporal dynamics of intracellular calcium in the middle cerebral artery isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats., *Exp. Physiol.*, 97(2), 265-276, 2012.
5. Koji Nobe, Terumasa Hashimoto and Kazuo Honda, Two distinct dysfunctions in diabetic mouse mesenteric artery contraction are caused by changes in the Rho A-Rho kinase signaling pathway., *Eur. J. Pharmacol.*, 683(1-3), 217-225, 2012.
6. Etsuko Muraki, Yukie Hayashi, Hiroshige Chiba, Nobuyo Tsunoda, Keizo Kasono, Dose-dependent effects, safety and tolerability of fenugreek in diet-induced metabolic disorders in rats. *Lipids Health Dis* 10:240-, 2011
7. Sachiko Shiba, Nobuyo Tsunoda, Masaki Wakutsu, Etsuko Muraki, Mariko Sonoda, Phyllis S.Y. Tam, Yoko Fujiwara, Shinji Ikemoto, Keizo Kasono, Regulation of lipid metabolism by palmitoleate and eicosapentaenoic acid (EPA) in mice fed a high-fat diet, *Biosci Biotechnol Biochem.*,

75(12): 2401-2403, 2011

8. Etsuko Muraki, Hiroshige Chiba, Nobuyo Tsunoda, Keizo Kasono, Fenugreek improves diet-induced metabolic disorders in rats, *Horm Metab Res*, 43(13): 950-955, 2011
9. Sachiko Shiba, Nobuyo Tsunoda, Kanako Ito, Masaki Wakutsu, Etsuko Muraki, Mariko Sonoda, Phyllis. S. Y. Tam, Yoko Fujiwara, Shinji Ikemoto, Keizo Kasono, Unsaturated fatty acids in fish oil play a role in adequate fat distribution to plasma, liver and white adipose tissue, *J. Health Sci.*, 57(4): 341-349, 2011.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 山川裕子, 角田伸代, 村木悦子, 斎藤京子, 加園恵三, 温泉施設を利用した仲間づくりおよび健康増進プログラムの提供が生活習慣病リスク軽減に及ぼす影響, 第 58 回日本栄養改善学会学術総会, 2011.09, 広島.
2. Etsuko Muraki, Hiroshige Chiba, Shohei Hoshino, Keiko Taketani, Nobuaki Tsuge, Yasuhiro Takenouchi, Nobuyo Tsunoda, Keizo Kasono, Fenugreek with Reduced Bitterness Prevents Diet-induced Metabolic Disorders in Rats, American Diabetes Association's 71st Scientific Sessions, 2011.06, San Diego, America.
3. Nobuyo Tsunoda, Hiroko Miki, Yasuhiro Takenouchi, Etsuko Muraki, Keizo Kasono, Inverse Effects of Fish Oil and Thiazolodenedione Administration on Insulin Sensitivity under Lipoatrophy Induced by Restricted Food Intake, American Diabetes Association's 71st Scientific Sessions, 2011.06, San Diego, America.

〔図書〕(計 2 件)

1. 加園恵三、ETERNAL EXPLORER 症例人間病態論 京都廣川書店 2013 年
2. 加園恵三、人体の構造と機能および疾病の成り立ち 疾病の成因・病態・診断・治療 第 2 版 2—疾患治療の概要、竹中優(編)、p11~31、医歯薬出版株式会社、2014 年

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

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

野部 浩司 (NOBE KOUJI)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号 30276612

竹之内 康広 (TAKENOUCHI YASUHIRO)

城西大学・薬学部・助手

研究者番号 30582233