

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00837

研究課題名(和文)n-3多価不飽和脂肪酸の炎症収束作用による肺高血圧症予後改善の可能性

研究課題名(英文)Prospects of inflammation resolving potential of n-3 polyunsaturated fatty acids for improvement of the prognosis in a rat model of pulmonary hypertension.

研究代表者

斉藤 麻希 (Saito, Maki)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：40365185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：魚油に含まれるEPAやDHAといったn-3系多価不飽和脂肪酸は、アスピリンなどでアセチル化されたシクロオキシゲナーゼ-2によって炎症収束物質であるレスルビン類に変換される。肺高血圧症の生命予後は慢性炎症の有無により左右される可能性があるが、魚油とアスピリンの併用が肺高血圧症の生命予後を改善しうるか否か、モデル動物を用いて検討した。

その結果、過剰に魚油を摂取した状態でアスピリンを併用すると、右心室肥大が増悪したり、炎症性サイトカイン発現が増強したりする可能性が示された。以上の結果は、安易な健康食品の過剰摂取やその状況下での薬物治療は、期待に反してむしろ有害事象をもたらすことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that n-3 polyunsaturated fatty acids, such as EPA and DHA, which are contained richly in fish oil, are converted into inflammation resolving molecules called "resolvins" by aspirin-acetylated cyclooxygenase-2. The aim of the present study is to clarify whether co-administration of fish oil and aspirin improves symptoms of pulmonary hypertension (PH) and inflammation in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rat model. Contrary to expectations, co-administration of fish oil and aspirin led to exacerbation of right ventricular hypertrophy in the monocrotaline-treated rats. Moreover, expression of inflammatory cytokines including IL-1 was augmented in the right ventricles. These results suggest that excessive intake of health food including EPA and DHA, may adversely affect proper pharmaceutical therapy.

研究分野：薬理学

キーワード：肺高血圧症 魚油 コーン油 アスピリン

1. 研究開始当初の背景

(1) 魚油に含まれる脂肪酸と炎症

セルフメディケーションという言葉が世間に広く浸透し、多くの健康食品がドラッグストアやコンビニエンスストアなどで入手可能となっている。その中で先駆的存在とも言えるのが、n-3系多価不飽和脂肪酸 (n-3PUFA) であるエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) であろう。青魚が健康によいとされるのは、これら n-3PUFA 含量の高さによる。

そもそも、魚やアザラシを食べる機会に富んだイヌイットの方々には、虚血性心疾患で亡くなる方が少ないということが 1970 年代の疫学調査で明らかとなったことに端を発する。さらなる調査によって、一般的な西洋的食事習慣の民族に比較して、イヌイットでは血中の EPA 濃度が有意に高いことも明らかとされた。

血小板凝集を促進的に制御するトロンボキサン A₂ (TXA₂) および逆に抑制的に制御するプロスタサイクリン (PGI₂) は食餌に含まれるアラキドン酸などの n-6系多価不飽和脂肪酸 (n-6PUFA) を出発物質とし、シクロオキシゲナーゼ (COX) による代謝を介して生成されることが知られている。一方で、EPA を始めとした n-3PUFA は COX に代謝を受けたのち、血小板凝集能の低い TXA₃ や、血管拡張作用や血小板凝集抑制作用の強い PGI₃ に変換されることが報告されることによって、n-3PUFA 摂取の有用性が説明されてきた。

近年、EPA や DHA はアスピリンによってアセチル化された COX-2 によって、炎症収束物質であるレゾルビン類に変換されることが報告された (Serhan, C. N., *et al.*, *J Exp Med*, 192: 1197, 2000)。さらに、レゾルビンは肺動脈への血管収縮性物質や炎症性サイトカイン曝露による血管反応性亢進を寛解することも報告された (Hiram, R., *et al.*, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307: H1547, 2014)。

(2) 肺高血圧症の生命予後と炎症

肺高血圧症は、原因不明の肺血管攣縮や肺動脈中膜平滑筋増殖などにより肺血管抵抗が選択的に上昇する病態である。進行性且つ難治性であり、無治療で経過すると代償性の右心室肥大によって右心機能が不全に陥り、予後は不良である。近年は、非常に高価ではあるが、エンドセリン受容体拮抗薬、プロスタサイクリン誘導體、一酸化窒素合成経路に関わる分子に作用する薬物など、効果的な薬物が開発され、5 年生存率も大幅に改善されつつある。一方で、膠原病など全身性慢性炎症を伴う疾患に肺高血圧症が合併した場合、それら薬物に無反応な例も増える経口にあり、生存率にはいまだ改善の余地を多く残している。

2. 研究の目的

効果的、しかし高価な治療薬の開発により、不良であった肺高血圧症 (PH) の予後は改善されつつある。一方、これら治療薬が無効な例もあり、新たな観点から治療薬のあり方を考えねばならない。申請者は、更なる PH の予後改善および PH 治療薬の減量による医療費削減を究極目標に、本研究を立案した。まず、膠原病等の慢性炎症を伴う基礎疾患を有する PH 患者の予後が極めて不良であることから、炎症の有無が肺高血圧症の進展に大きく影響すると考え、抗炎症および炎症収束の側面から PH 薬物療法を考えることとした。即ち、より安全性が高く比較的安価で炎症収束作用をもつ“くすり”として、古くから用いられその作用と一定の安全性が確立されているアスピリンと n-3 多価不飽和脂肪酸を始めとした炎症収束作用をもつ機能性食品成分に着眼し、その PH に対する効果につき *in vivo* で検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 肺高血圧ラットモデルの作製 : Sprague-Dawley 系ラット (雄、4 週齢、日本 SLC) を購入し一週間馴化後、モノクロタリン (MCT, Sigma-Aldrich) 60 mg/kg を単回皮下投与し、PH を誘導した。同日より、アスピリン (ASA) および油脂の投与も開始した。アスピリンは 50 mg/mL エタノール溶液をストック溶液として作製し、用事生理食塩水 (大塚製薬) にて 5 mg/mL に希釈した。投与量が 10 mg/kg となるよう、投与容量は 0.2 mL/100 g 体重とし、一日一回皮下投与した。ASA の溶媒 (vehicle) は 9.95% エタノール生理食塩水溶液とし、ASA と同様の投与容量とした。油脂として、主に n-3PUFA のソースとして魚油 (fish oil from menhaden, Sigma)、n-6PUFA のソースとしてコーン油 (和光純薬) を用いた。油脂は、一日一回 1 mL 経口投与した。観察・飼養期間は 3 週間とした。

(2) 超音波画像診断装置を用いた右心室機能の測定 : MCT 投与から 3 週以内に、肺動脈圧を反映するパラメーターである右心室圧上昇や右心室肥大の兆候が観察されはじめる (Nakayama, *et al.*, *Jpn J Pharmacol*, 81:176, 1999)。ASA や油脂の投与が右心室機能にどのような影響を及ぼすか、臨床用超音波画像診断装置 (Prosound α7, 日立アロカ) を用いて心室の横断面を描出した。右心室収縮末期および拡張末期の外径を測定し、収縮末期 (mm)/拡張末期 (mm) を右心室収縮能の指標とした。

(3) 右心室圧の測定 : 肺高血圧症が成立する MCT 投与 3 週後、ラットにペントバルビタール (45 mg/kg, *i.p.*) で麻酔を掛け、人工呼吸器に接続した気管カニューレを挿入した。1 分間に 85 回、一回換気量 1 mL/100 g 体重での人工呼吸下に開胸し、圧トランスデューサーに接続した 21 G 注射針を心尖から右心室に刺入し、直接右心室圧を測定した。

(4) 右心室肥大に対する効果に関する評価：右心室圧測定後、直ちに心肺組織を摘出し、心臓を単離した。さらに、心房を取り除き、氷冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-)) 中で、慎重に右室自由壁 (RV) と心室中隔および左室自由壁 (LV+S) とに分け、血液をよく洗った後、キムワイプで水分を除去し、重量を量った。右室壁と心室中隔および左心室壁の重量比 (RV/LV+S) の値を右心室肥大の指標に用いた。

(5) 心肺組織における炎症性サイトカイン発現変動の検出：項目 3-(4) にて摘出した組織を RV、LV+S、および肺に分け、氷冷 PBS(-) 中で血液や脂肪組織および結合組織などを取り除き、キムワイプ上で水分を除去し幅 3-5 mm 程度に細切した後、液体窒素中に浸漬して凍結した。実験に供するまで、-80℃下で保存した。凍結した組織片に市販の RNA 抽出試薬 (Trizol, Invitrogen) を加え、ビーズ破碎機 (μT-12, タイテック) にてホモジェナイズした後、常法に従い total RNA を得た。一定量の total RNA を含む溶液を秤取し、逆転写反応により cDNA を合成して、PCR による炎症性サイトカイン発現の検出に用いた。

(6) 病理組織学的評価：項目 3-(4) にて単離した肺の一部を中性緩衝ホルマリンに浸漬して固定後、99.5% エタノール中で脱脂して、パラフィン標本を作製した。ミクロトームで 6-mm 厚に薄切し、常法に従い、ヘマトキシリン-エオシン染色、マッソン-トリクロム染色に供した。

4. 研究成果

(1) 各脂肪油およびアスピリンのモノクロタリン誘発肺高血圧ラット右心室機能に対する効果：まず、様々な脂質メデイエーターの発物質となる n-3PUFA および n-6PUFA を含む魚油およびコーン油の摂取や、それら脂肪油とアスピリンの併用が、肺高血圧症を改善しうるのか否かについて、肺動脈圧の指標となる右心室収縮期圧を測定した (図 1)。コーン油の摂取は、右心室の上昇を抑制することはできなかった (濃いグレーのカラム)。驚い

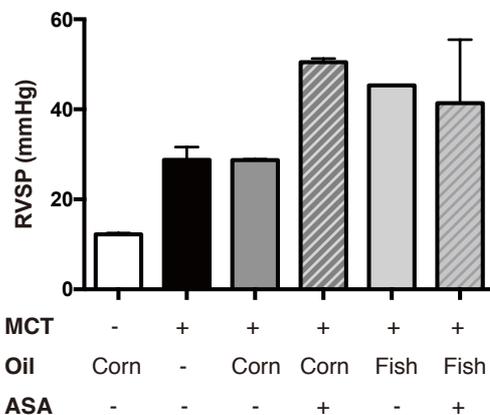


図 1 各脂肪油およびアスピリンのモノクロタリン誘発肺高血圧ラット右心室収縮期圧に対する効果

たことに、コーン油とアスピリンの併用 (濃いグレーのストライプのカラム)、魚油単独 (薄いグレーのカラム) および魚油とアスピリンの併用 (薄いグレーのストライプのカラム) は、寧ろ右心室収縮期圧を上昇させた。

肺高血圧下では、右心室に過度の力学刺激が負荷されるため、代償性に右心室壁の肥厚や右心室の拡大が生じ、やがて右心室の収縮能が不全に陥る。そこで、ヒトの診療に用いられている超音波診断装置をラットに応用することで、非侵襲的に右心室収縮能を測定可能か試みた (図 2)。その結果、MCT 肺高血圧ラットの右心室では、MCT を投与しないラットと比較して、右心室収縮能が減弱していることが示唆された。この右心室機能減弱は、どの脂肪油投与によっても、またアスピリン併用の有無によっても改善されない可能性が示唆された。

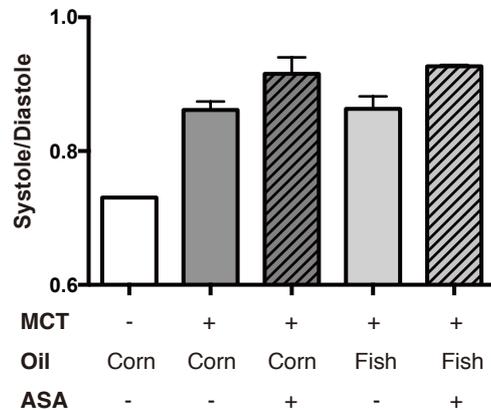
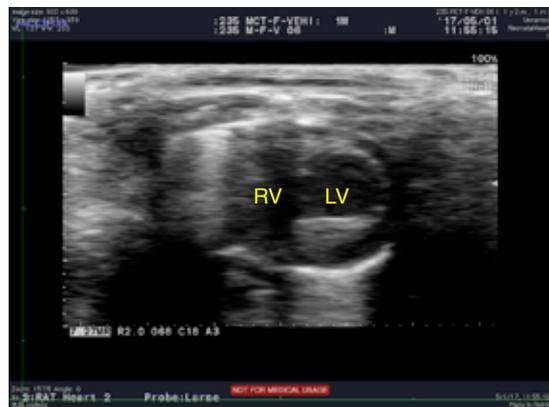


図 2 各脂肪油およびアスピリンのモノクロタリン誘発肺高血圧ラット右心室収縮末期/拡張末期径比

右心室肥大に関しても、右心室/左心室+心室中隔の湿重量比 (RV/LV+S) を指標に検討したところ、MCT 投与によって増大した RV/LV+S 値は各脂肪油投与により改善されず、寧ろ ASA との併用によって増大する傾向を示した (図 3)。

(2) 各脂肪油およびアスピリンのモノクロタリン誘発肺高血圧ラット肺における炎症性変化に対する効果：MCT 投与 3 週間前後では、肺組織にて水腫様病変や肺胞壁肥厚などが観察される。それらの指標として、体重当たりの肺湿重量を測定した結果、MCT 投与ラットではその値が健常群に比較し増大していたが、

斐美歩、弘瀬雅教. モノクロタリン肺高血圧ラットへのアンギオテンシン II AT₁ 受容体遮断薬オルメサルタン投与の有用性. 第26回日本循環薬理学会（松本）, 2016

⑥ 齊藤麻希、田辺由幸、鎌滝章央、神田健太郎、山下諒輔、澤井高志、中山貢一、衣斐美歩、弘瀬雅教. モノクロタリン肺高血圧ラット右心室線維化に対するオルメサルタンの抑制効果. 日本薬学会第136年会（横浜）, 2016

⑦ 齊藤麻希、田辺由幸、鎌滝章央、神田健太郎、山下諒輔、澤井高志、中山貢一、衣斐美歩、弘瀬雅教. Involvement of cardioprotective effect in a survival advantage of olmesartan for monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. 第89回日本薬理学会年会（横浜）, 2016

⑧ 神田健太郎、齊藤麻希、松下尚子、弘瀬雅教. 肺高血圧症治療薬探索のためのラット心肺機能評価系の構築. 第54回日本薬学会東北支部大会（矢巾）, 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 麻希 (SAITO, Maki)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：40365185

(2) 研究分担者

田辺 由幸 (TANABE, Yoshiyuki)
横浜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：10275109

鎌滝 章央 (KAMATAKI, Akihisa)
弘前大学・医学部・助教
研究者番号：60360004