

令和元年6月11日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09434

研究課題名(和文) 脂肪酸が不整脈と血栓形成に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Role of Fatty acids in the pathogenesis of arrhythmia and thrombosis

研究代表者

福沢 公二 (Fukuzawa, Koji)

神戸大学・医学研究科・特命准教授

研究者番号：70535856

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)：1. 質量分析を用いて血中脂肪酸および脂質メディエーター・プロファイルと心房細動との関連を解明する。結果、心房細動患者において、血中エライジン酸が高値であることが明らかになった。2. 各種脂肪酸投与後4週でDVTを作成し、DVTサイズを比較検討する。2. 実際にエライジン酸負荷およびコントロールとしてオレイン酸負荷を4週間の後に、下大静脈結紮をエライジン酸(n=10)、オレイン酸(n=10)で行った。周術期に予想に反してN=6のマウスが死亡してしまった。そのためか、エライジン酸負荷により血栓サイズが上昇しているような傾向があるように思われたが、統計学的有意差は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1) 心房細動患者群では非心房細動患者群に比べ、血中トランス脂肪酸濃度が高く、逆に善玉脂肪酸濃度が低い。またレゾルピンをはじめとした脂質メディエーターのバランスが異なる。2) マウスにトランス脂肪酸を経口投与すると、血管内皮細胞膜リン脂質のトランス脂肪酸が増加するとともに、内皮細胞の表現型が抗血栓から向血栓へと変化し、血栓形成を促進する。3) 善玉脂肪酸(EPA, DHA)を投与すると逆に抗血栓性、抗炎症性、抗不整脈性に变化する。以上のような統合的研究によって、食生活の欧米化が疾病構造の変化に及ぼす影響を解明することで本研究が今後の健康対策に広く貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We observed significant increase of serum trans-fatty acids in patients with atrial fibrillation when compared with normal sinus rhythm. We compared the DVT size after IVC ligation between mice fed with elaidic acids and control oleic acids. We did not observe significant difference in the size of DVT among them, likely because 30-40% of mice died after the IVC ligation.

研究分野：循環器内科学

キーワード：トランス脂肪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中データバンク2009によると、我が国における脳梗塞の病型別割合はラクナ梗塞が減少し、一方で食生活の欧米化や高齢化に伴う心房細動の増加により、アテローム血栓性脳梗塞および心原性脳塞栓症が増加傾向にある。特に心原性脳塞栓症は非常に予後の悪い重症脳梗塞となり、超高齢化社会を迎えた我が国において非常に重要な“Common”Disease となっている。「2015年日本人の食事摂取基準」では脂質についてその摂取量のみならず脂肪酸のバランスを含めて包括的に管理することが重要とされている。n-3系不飽和脂肪酸であるEPA(エイコサペンタエン酸)およびDHA(ドコサヘキサエン酸)は「善玉脂肪酸」と考えられ、多彩な抗炎症作用や抗血小板作用を有することがすでに明らかにされているが、最近ではレゾルピンをはじめとした能動的に炎症を収束させる脂質メディエーターに代謝され、その病態生理学的意義が非常に注目されている。疫学的にもこれまでに我が国で行われたJELIS試験において冠動脈疾患の予防に有効であることが証明されており、またGISSI-Prevenzione trialでは抗不整脈効果と突然死の予防効果が報告されている。一方、「超悪玉脂肪酸」として知られるトランス脂肪酸は、植物油の加工過程で副産物として生じ、その摂取量が急性心筋梗塞の発症と相関することが欧米の臨床試験によって証明されている。最近、我々は本邦でもトランス脂肪酸が特に脂質摂取量が多い若年層において冠動脈疾患のリスクとなっていることを報告した(Mori K. Circ J. 2015;79:2017-25.)。その機序としてこれまでに脂質代謝への影響や血管での炎症惹起、さらに血管内皮機能低下などが示唆されてきたが、我々はトランス脂肪酸が血栓形成に促進的であることを明らかにしてきた(Kondo K. Mol Nutr Food Res. 2015;59:729-40.)。

脂肪酸はエネルギー源としてのみならず、諸臓器の細胞膜のリン脂質に広く分布して膜安定化の制御に大きな役割を果たすとともに、脂肪酸由来の代謝物が多彩な生理活性を有することより、心房細動をはじめとした不整脈の発症機序や、またその合併症としての血栓症の発生に関与している可能性が十分に考えられる。本研究では臨床研究ならびに動物および細胞実験を通じて、血中および細胞膜のリン脂質に存在する脂肪酸のバランスが不整脈とその血栓性合併症にどのような影響を及ぼすか、統合的に評価する。

2. 研究の目的

1) 心房細動患者と非心房細動患者の血清脂肪酸プロファイルをガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて解析し、心房細動と脂肪酸バランスとの関連性を明らかにする。また同時に脂質メディエーターについて液体クロマトグラフィー質量分析計を用いて網羅的に解析する(臨床研究)

2) 種々の動物モデルを駆使して、脂肪酸の心房細動及び血栓症への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

#1. 心房細動患者と非心房細動患者の血清脂肪酸プロファイルおよび脂質メディエーターを質量分析を用いて網羅的に解析し、心房細動との関連性を明らかにする。(臨床研究)

#2. 各種脂肪酸を投与した野生型マウスに血栓を作成し、血栓サイズを比較検討する。

#3. 分子イメージング技術を用いて生体下で、炎症性細胞の接着や浸潤、血栓惹起性分子の発現をモニタリングし、より詳細に脂肪酸投与による向血栓性変化を観察する。

#4. 培養細胞や単離血小板に脂肪酸を投与し、向血栓性に性質が変化する分子メカニズムの詳細を明らかにする。(#2-4:基礎研究)

4. 研究成果

1. 質量分析を用いて血中脂肪酸および脂質メディエーター・プロファイルと心房細動との関連を解明する。神戸大学医学部附属病院において、慢性心房細動患者、発作性心房細動患者と非心房細動患者（対照群）より経時的に採血する。神戸大学医学部質量分析総合センターにおいて、血中トランス脂肪酸（エライジン酸、リノエライジン酸）を含む脂肪酸プロファイルについてはガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて測定する。結果、心房細動患者において、血中エライジン酸が高値であることが明らかになった。

2. トランス脂肪酸の心腔内血栓への影響の解明

【トランス脂肪酸負荷モデルの確立】野生型C57BL/6 マウスにトランス脂肪酸（エライジン酸 総カロリーの5%）を4週間負荷し、血清脂質の量と質の変化を解析する。また、質量分析を用いて血中エライジン酸濃度の上昇を確認したところ、血中濃度の約100倍の優位な上昇を確認できた。

2. 各種脂肪酸投与後4週でDVTを作成し、DVTサイズを比較検討する

実際にエライジン酸負荷およびコントロールとしてオレイン酸負荷を4週間の後に、下大静脈結紮をエライジン酸（n=10）、オレイン酸（n=10）で行った。周術期に予想に反してN=6のマウスが死亡してしまった。そのためか、エライジン酸負荷により血栓サイズが上昇しているような傾向があるように思われたが、統計学的有意差は認めなかった。

今後、再度、各種脂肪酸投与後にDVTを作成し、比較検討することによって、統計学的な差の有無を確認して行く予定としている。

3. 分子イメージング技術を用いた in vivo でのトランス脂肪酸投与による影響の検出

最近、我々は独自に生体分子イメージングに最適なマウスDVTモデルの開発に成功した。マウス大腿静脈の結紮による静脈血流速度が低下した状態で、蛍光顕微鏡で観察すると、自然発生的にリアルタイムで数十秒以内で血栓形成が開始されるという現象を発見した。この新規のモデルは下大静脈結紮モデルと異なり、体表近くでの血栓形成が可能であることから、蛍光顕微鏡や二光子顕微鏡での観察に優れており、これまでに好中球の血栓への流入や、血小板や白血球の血栓形成時の時空間的挙動を可視化することに成功している。今後、このモデルを本研究におけるトランス脂肪酸投与での各種細胞成分の影響を解明する予定としている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Jaffer FA, **Hara T**. PET/MR Illumination of Atherosclerosis Pathobiology: How a Nanobody Becomes Somebody. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2018; in press.
2. The limitations and potential adverse effects of the premature ventricular contraction response. Konishi H, **Fukuzawa K**, Mori S, Kiuchi K, Hirata KI. *J Arrhythm*. 2018 Jun 22;34(5):572-575.
3. **Hara T**, Tsukada N, Okano M, Ishida T, Hirata KI, Shiomi M. Progression of calcific aortic valve sclerosis in WHHLMI rabbits. *Atherosclerosis*. 2018;273:8-14.
4. The lesion characteristics assessed by LGE-MRI after the cryoballoon ablation and conventional radiofrequency ablation.

- Kurose J, Kiuchi K, **Fukuzawa K**, Mori S, Ichibori H, Konishi H, Taniguchi Y, Hyogo K, Imada H, Suehiro H, Nagamatsu YI, Akita T, Takemoto M, Hirata KI, Shimoyama S, Watanabe Y, Nishii T, Negi N, Kyotani K. *J Arrhythm*. 2018 Jan 13;34(2):158-166.
5. Tsuda S, Shinohara M, Oshita T, Nagao M, Tanaka N, Mori T, **Hara T**, Irino Y, Toh R, Ishida T, Hirata KI. Novel mechanism of regulation of the 5-lipoxygenase/leukotriene B₄ pathway by high-density lipoprotein in macrophages. *Sci Rep*. 2017;7:12989.
 6. Nagao M, Toh R, Irino Y, Nakajima H, Oshita T, Tsuda S, **Hara T**, Shinohara M, Ishida T, Hirata KI. High-density lipoprotein protects cardiomyocytes from oxidative stress via the PI3K/mTOR signaling pathway. *FEBS Open Bio*. 2017;7:1402-1409.
 7. **Hara T**, Monguchi T, Iwamoto N, Akashi M, Mori K, Oshita T, Okano M, Toh R, Irino Y, Shinohara M, Yamashita Y, Shioi G, Furuse M, Ishida T, Hirata KI. Targeted Disruption of JCAD/KIAA1462, a Coronary Artery Disease-associated Gene Product, Inhibits Angiogenic Processes in Vitro and in Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:1667-1673.
 8. Feasibility of Imaging Inflammation in the Left Atrium Post AF Ablation Using PET Technology. Kiuchi K, **Fukuzawa K**, Mori S, Watanabe Y, Hirata KI. *JACC Clin Electrophysiol*. 2017 Dec 11;3(12):1466-1467.
 9. Percutaneous Pericardiocentesis for Epicardial Ventricular Tachycardia Ablation With the Anterior Approach Not Passing Through the Abdominal Cavity. **Fukuzawa K**, Mori S, Kiuchi K, Nishii T, Hirata KI. *JACC Clin Electrophysiol*. 2017 May;3(5):526-527.
 10. Tanaka N, Irino Y, Shinohara M, Tsuda S, Mori T, Nagao M, Oshita T, **Hara T**, Toh R, Ishida T, Hirata KI. Eicosapentaenoic Acid-Enriched High-Density Lipoproteins Exhibit Anti-Atherogenic Properties. *Circ J*. 2018;82:596-601.
 11. *Monguchi T, ***Hara T**, Hasokawa M, Nakajima H, Mori K, Toh R, Irino Y, Ishida T, Hirata KI, Shinohara M. Excessive intake of trans fatty acid accelerates atherosclerosis through promoting inflammation and oxidative stress in a mouse model of hyperlipidemia. *J Cardiol*. 2017;70:121-127. *TH; Co-first author and corresponding author.
 12. Stein-Merlob A, **Hara T**, McCarthy JR, Mauskapf A, Hamilton JA, Ntziachristos V, Libby P, Jaffer FA. Atheroma susceptible to thrombosis exhibit impaired endothelial permeability in vivo as assessed by nanoparticle-based fluorescence molecular imaging. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2017;10:e005813.
 13. Bozhko D, Osborn EA, Rosenthal A, Verjans JW, **Hara T**, Kellinberger S, Wissmeyer G, Ovsepian SV, McCarthy JR, Mauskapf A, Stein AF, Jaffer FA, Ntziachristos V. Quantitative intravascular biological fluorescence-ultrasound imaging of coronary and peripheral arteries in vivo. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2017;18:1253-1261.
 14. Calfon Press MA, Mallas G, Rosenthal A, **Hara T**, Mauskapf A, Nudelman RN, Sheehy A, Polyakov IV, Kolodgie F, Virmani R, Guerrero JL, Ntziachristos V, Jaffer FA. Everolimus-eluting stents stabilize plaque inflammation in vivo: assessment by intravascular fluorescence molecular imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2017;18:510-518.
 15. Mori K, Ishida T, Tsuda S, Oshita T, Shinohara M, **Hara T**, Irino Y, Toh R, Hirata KI. Enhanced impact of cholesterol absorption marker on new atherosclerotic lesion

progression after coronary intervention during statin therapy. *J Atheroscler Thromb.*

2017;24:123-132.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 杜 隆嗣

ローマ字氏名: TOH RYUJI

所属研究機関名: 神戸大学

部局名: 医学研究科

職名: 特命准教授

研究者番号(8桁): 50379418

研究分担者氏名: 原 哲也

ローマ字氏名: HARA TETSUYA

所属研究機関名: 神戸大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 助教

研究者番号(8桁): 70547504

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。