

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19590244  
 研究課題名 (和文) 虚血性脳卒中における血中遊離脂肪酸および 20-hydroxy-eicosatetraenoic acid (20-HETE) の関与  
 研究課題名 (英文) Involvement of free fatty acids and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in ischemic stroke  
 研究代表者  
 竹内 和彦 (TAKEUCHI KAZUHIKO)  
 浜松医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：00419425

研究成果の概要：主なヒト血中遊離脂肪酸中、 $\omega 6$  多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸とリノール酸は、血管内皮細胞内カルシウム応答の抑制を介して内皮依存性血管拡張因子（プロスタグランジン  $I_2$  及び NO）の産生を低下させた。しかし、他の遊離脂肪酸には、このような抑制効果はみられなかった。アラキドン酸による血管内皮機能抑制作用がアラキドン酸-20-HETE（脳血管攣縮への関与が報告されている）経路を介したものであるかを検討したが、有意な結果は得られなかった。これらの結果は、脳心血管イベントをはじめとする血管機能障害と遊離脂肪酸との関連を考える際に、遊離脂肪酸のプロファイルが重要であることが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：循環・虚血性脳卒中

## 1. 研究開始当初の背景

虚血性脳卒中をはじめとする心血管系イベントの発症頻度は、深夜から早朝に増加することが知られている。血中遊離脂肪酸濃度の変化は、虚血性脳卒中発症頻度の日内変動と類似したパターンを示し、特に糖尿病患者では深夜から早朝にかけて遊離脂肪酸の増加が顕著となる。さらに虚血性脳卒中リスクが高いとされるメタボリックシンドローム患者においても血中遊離脂肪酸濃度が上昇していることが知られている。塞栓性脳虚血を

除いた大部分の虚血性脳卒中は、動脈硬化性疾患の範疇に属し、その進展に血管内皮機能障害が深く関与している。最近、血管内皮障害に、アラキドン酸から代謝される 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) が関与することが注目され始めている。20-HETE は、アラキドン酸を基質とする 20-HETE 合成酵素 (Cytochrome P450 (CYP) 4A, 4F) により産生され、protein kinase C (PKC) や Rho/Rho-kinase の活性化によってセロトニンやアンジオテンシン II などの血管収縮

性アゴニストの作用を増強することが報告されている。Randriamboavonjyらは、20-HETEが内皮依存性血管拡張因子の一つである内皮由来過分極因子(EDHF)の作用を拮抗することをブタ冠動脈による実験で証明した。また、Wardらは、ヒトを対象とした血管内皮機能検査(Flow-Mediated Dilation測定法)によって、尿中20-HETE量の増加と血管内皮機能障害が相関すること報告している。20-HETE合成酵素は脳血管に豊富に存在することから、20-HETEが脳血管病態に関与する可能性が示唆されている。以上の知見より、アラキドン酸の上昇が、20-HETE産生を亢進し、深夜、早朝における脳虚血イベントの増加や、糖尿病、メタボリックシンドローム患者の虚血性脳卒中の発症に関与しているとの仮説に至った。

## 2. 研究の目的

遊離脂肪酸、アラキドン酸 - 20-HETE 経路が

- (1) 内皮依存性血管拡張反応に及ぼす影響、
- (2) 血管応答に及ぼす変化を検討する。

## 3. 研究の方法

初代培養ブタ大動脈血管内皮細胞、ラット脳底動脈を対象として、ブラジキニン刺激時の内皮細胞内  $Ca^{2+}$  応答、NO 産生、 $PGI_2$  産生、内皮依存性血管拡張反応に対する遊離脂肪酸および 20-HETE 合成酵素阻害剤(HET0016)の影響を検討した。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化および NO 産生はそれぞれ fura-2/AM、DAF-FM/DA を用いた蛍光色素測定法により評価した。また、 $PGI_2$  産生は EIA (酵素免疫抗体法) により、内皮依存性血管拡張反応は血管張力測定法により評価した。

## 4. 研究成果

(1) ヒト主要血中遊離脂肪酸において、アラキドン酸(AA)とリノール酸(LA)はブラジキニン誘発性カルシウム応答を濃度依存的に抑制したが(図1)、パルミチン酸(PA)、ステアリン酸(SA)、オレイン酸(OA)は内皮細胞内カルシウム応答に全く影響を与えなかった(図2)。

図 1

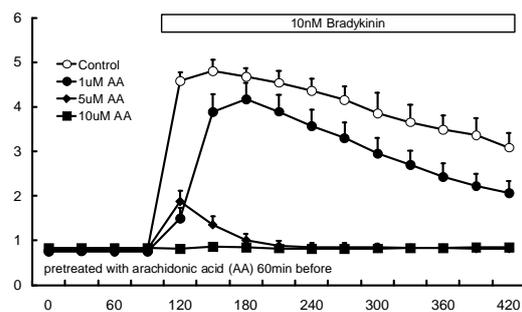
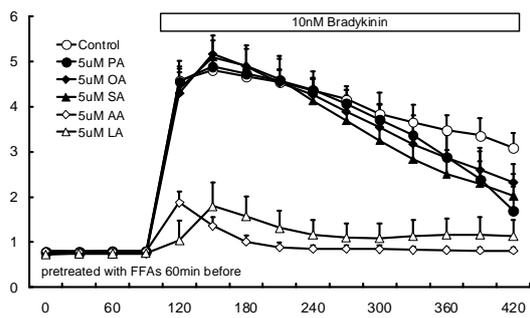
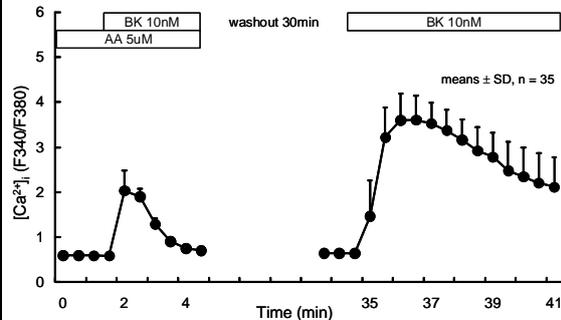


図 2



(2) アラキドン酸、リノール酸による内皮細胞内カルシウム応答抑制作用は、これら遊離脂肪酸の洗い出しによって回復した。したがって、これら脂肪酸による内皮細胞内カルシウム応答抑制作用は可逆的作用であることが確認された(図3)。

図 3



(3) アラキドン酸、リノール酸は、細胞内カルシウム貯蔵部位の  $Ca^{2+}$  ATPase 阻害剤である thapsigargin 誘発性のカルシウム応答も抑制した。したがって、これら脂肪酸のカルシウム抑制作用部位はブラジキニン受容体への直接作用ではなく、細胞内カルシウム貯蔵部位より下流のシグナル伝達に作用していることが推測された。

(4) DAF-FM を負荷した内皮細胞において、ブラジキニン刺激による  $F_{490}/F_{0490}$  の上昇は、NO 合成酵素(eNOS)阻害剤である L-NAME の先行投与およびゼロカルシウム溶液下で完全に抑制された。これらの結果より DAF-FM は NO 産生プローブとして妥当であること、ブラジキニン刺激による NO 産生はカルシウム依存的であることが確認された。

(5) アラキドン酸(AA)、リノール酸(LA)は、DAF-FM を負荷した内皮細胞において、ブラジキニン刺激による  $F_{490}/F_{0490}$  の上昇(NO 産生)を濃度依存的に抑制した(図4)。しかしながら、パルミチン酸(PA)、ステアリン酸(SA)、オレイン酸(OA)はブラジキニン刺激に

よる NO 産生に影響を及ぼさなかった(図 5)。

図 4

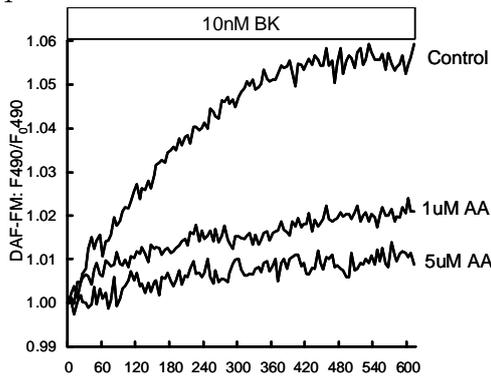
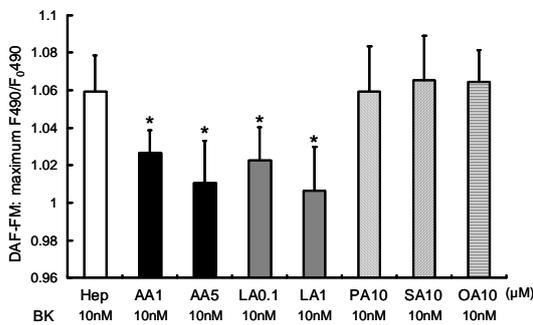
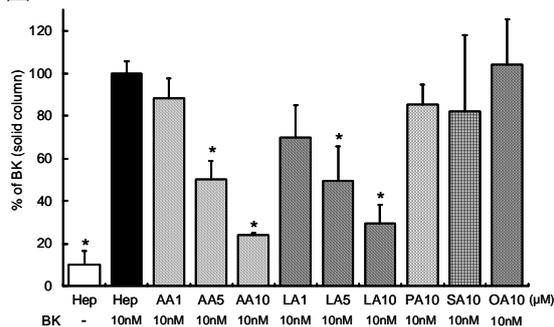


図 5



(6) アラキドン酸(AA)、リノール酸(LA)は、ブラジキニン刺激による 6 ケト-プロスタグランジン  $F_{1\alpha}$  の上昇(PGI<sub>2</sub>産生)を濃度依存的に抑制した。しかしながら、パルミチン酸(PA)、ステアリン酸(SA)、オレイン酸(OA)は、ブラジキニン刺激による PGI<sub>2</sub>産生に影響を及ぼさなかった(図 6)。

図 6



(7) アラキドン酸、リノール酸による内皮細胞内カルシウム応答抑制作用は、20-HETE 合成阻害薬である HET0016 によって解除されなかった。

(8) ラット脳底動脈を用いた実験において、アラキドン酸はブラジキニンによる内皮依存性血管拡張反応を抑制する傾向を示した

が、この抑制作用は HET0016 によって解除されなかった。

以上の結果より、ヒト主要血中遊離脂肪酸の中で、 $\omega 6$  多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸とリノール酸のみが内皮細胞内カルシウム応答を抑制することにより NO、PGI<sub>2</sub> といった内皮依存性血管拡張因子の産生を低下させることが明らかになった。しかし、これら遊離脂肪酸による血管内皮機能抑制作用は 20-HETE を介したものではないと考えられた。

遊離脂肪酸の血中濃度は、糖尿病、肥満、喫煙などの脳心血管疾患の危険因子群で上昇していることが報告されており、脳心血管疾患発症と血中遊離脂肪酸の関連が示唆されている。しかしながら、遊離脂肪酸が血管イベント発症にどのように関与するのことは明らかになっておらず、我々の研究成果は、遊離脂肪酸による血管機能障害のメカニズムの一端を明らかにしたと考えられる。

興味深いことに、 $\omega 6$  多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸とリノール酸のみが血管内皮機能を抑制し、他の遊離脂肪酸ではその抑制作用は見られなかった。これらの結果は、脳心血管イベント発症と遊離脂肪酸との関連を考える際に、遊離脂肪酸のプロファイルが重要であることを示唆している。

$\omega 6$  多価不飽和脂肪酸による血管内皮カルシウム応答抑制作用のメカニズムにおいて、thapsigargin を用いた実験結果から細胞内  $Ca^{2+}$  ストア部位と  $Ca^{2+}$  流入チャネル間のシグナル伝達が関与していることが推測された。今後、これら遊離脂肪酸によるシグナル伝達の抑制メカニズムの解明は、脳心血管疾患に対する新たな治療戦略となることが期待される。また、本研究結果を礎に、実臨床の場において、血中遊離脂肪酸のプロファイルの違いが、脳心血管疾患発症や血管内皮機能にどのような影響を及ぼすのかを検討したい。

## 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 2 件)

①Asai M, Takeuchi K, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H, Watanabe H. Misinterpretation of the effect of amlodipine on cytosolic calcium concentration with fura-2 fluorospectrometry. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 査読有, 377 (4-6), 2008, 423-7.

②Asai M, Takeuchi K, Saotome M, Urushida

T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H, Watanabe H. Extracellular acidosis suppresses endothelial function by inhibiting store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry via non-selective cation channels. Cardiovascular Research. 査読有, in press, doi:10.1093/cvr/cvp105.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 竹内和彦、浅井正嘉、渡邊裕司. 酸性環境下における血管内皮機能. 第 9 回日本 NO 学会学術集会, 2009 年 5 月 9 日, 静岡.
- ② Takeuchi K, Watanabe H. Omega-6 polyunsaturated fatty acids, arachidonic and linoleic acids, but not other free fatty acids, suppress endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and functions. 第 73 回日本循環器学会学術総会, 2009 年 3 月 20 日, 大阪.
- ③ Takeuchi K, Watanabe H. Free fatty acids (FFAs), arachidonic and linoleic acids but not other FFAs, suppress endothelial function by inhibiting endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  responses. 第 73 回日本循環器学会学術総会, 2008 年 3 月 28 日, 福岡.

[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]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 和彦 (TAKEUCHI KAZUHIKO)

浜松医科大学・医学部・臨床薬理学・准教授  
研究者番号：00419425

### (2) 研究分担者

渡邊 裕司 (WATANABE HIROSHI)

浜松医科大学・医学部・臨床薬理学・教授  
研究者番号：50262803

### (3) 連携研究者