

機関番号：11501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～ 2010

課題番号：20590087

研究課題名 (和文) 高トリグリセリド血症による動脈硬化進展とウロテンシン2の重要性

研究課題名 (英文) Progression of atherosclerosis in hypertriglyceridemic rabbit

研究代表者

石幡 明 (ISHIHATA AKIRA)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：40232326

研究成果の概要 (和文)：

遺伝性高トリグリセリド血症家兎 (PHT) を用いて動脈硬化の進展と動脈機能の変化を検討した。食後高トリグリセリド血症によって内皮細胞機能異常が起こった。アンジオテンシンやウロテンシン反応性には有意差がなかった。また、過酸化脂質は PHT の血漿および内臓脂肪組織において有意に増加していた。PHT では産生された peroxynitrite が血管内皮傷害をおこし動脈硬化発症の原因となる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Postprandial hypertriglyceridemic rabbits (PHT) showed vascular endothelial dysfunction. The vascular reactivity to angiotensin and urotensin was not significantly different. The lipid peroxidation was increased in plasma and visceral fat of PHT rabbits. The accumulation of peroxynitrite could be responsible for endothelial injury and atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,100,000	4,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：トリグリセリド、動脈硬化、ウサギ

1. 研究開始当初の背景

これまで脂質代謝異常による動脈硬化症進展の機序を研究するために、遺伝性に高コレステロール血症に加えて食後高トリグリセリド血症を呈するウサギ (TGH) と低トリグリセリド血症を呈するウサギ (TGL) を用いて血管病変との関連を検討したが、コレステロールの影響を排除するために中性脂肪のみが高値を示すモデル動物を用いることが必要になった。

2. 研究の目的

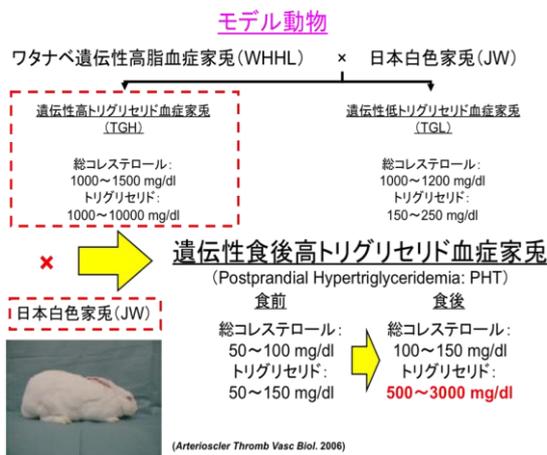
遺伝性高トリグリセリド血症家兎を用いて、動脈硬化の進展と動脈機能の変化、それらに対する各種因子の関与を明らかにする。また、高トリグリセリド血症による動脈硬化病変の形成および血管機能の異常とインスリン抵抗性の増加に伴う耐糖能異常の病態との関連を明らかにする。さらに PHT を用いて朝、昼、夕方の、①血小板凝集能の朝、昼および夕の経時的変化、②血小板凝集能に対する血漿中の TG の影響および血小板凝集抑制作用を持つ一酸化窒素 (NO) の経時的変化との関連

を検討する。

3. 研究の方法

26~31 週齢の遺伝性食後高トリグリセリド血症家兔 (PHT) と、同週齢の日本白色家兔 (JW) を用いた (次ページ図)。

血小板凝集測定では、血漿 TG および NO 測定のための採血は、耳動脈から朝 (6:00)、昼 (12:00)、夕方 (18:00) の 3 時点で行った。血小板凝集測定のために、最終濃度 0.38% のクエン酸ナトリウムを添加した。また、血漿脂質および NO 測定のための血漿は、遠心分離 (3000rpm, 15 分, 4°C) 後、上清を採取し、測定に用いた。血小板凝集能の測定は、全血血小板凝集測定装置 (WBA-4S, MC Medical Inc., Tokyo, Japan) を用いて測定した。採取した血液は 1 時間静置し、血小板凝集惹起物質である ADP がそれぞれ最終濃度 1、2、4 および 8 μM になるように添加し、反応した血液がマイクロメッシュフィルター (直径 30 μm 、300 個/mm²) を通過する時の陰圧度から、血小板凝集能を測定した。血漿



TG は、スポットケム EZ-4430 (Arkray, Inc., Kyoto, Japan) を用いて測定した。試験紙は、スポットケム TMII トリグリセリドを用いた。血漿 NO は、HPLC-Griess system を使用した酸化窒素分析装置 (ENO-20:, Eicom, Co., Kyoto, Japan) を用いた。NO の代謝産物である NO₂⁻、および NO₃⁻ を HPLC で分離還元後、それぞれ Griess 試薬との反応で生じるアゾ化合物の 540nm での吸光度を求めることによって (NO₂⁻+NO₃⁻) のトータル量より NO 量を測定した。

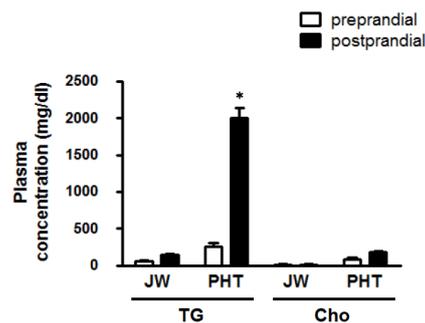
血管機能についての実験では、胸部大動脈を摘出し、血管リング標本を作製した。標本を、混合ガス (95%O₂、5%CO₂) を通気した Krebs-Henseleit 液 (37±0.1°C) を満たした 10ml の organ bath に懸垂し、等尺性トランスデューサーを用いて収縮張力を測定した。

内皮機能についてはアセチルコリン、血管平滑筋の収縮性はフェニレフリンおよびアンジオテンシン II、血管平滑筋の弛緩性はニトロプルシドを用いて検討した。

また、食後高トリグリセリド血症による血管機能の異常に関与すると考えられる酸化ストレスの増加、NO の変化を検討した。得られたデータは、2 群間の比較では等分散の検定を行った後、等分散の場合は Student's t 検定、不等分散の場合は Welch's t 検定を行った。3 群間の比較では反復測定一元配置分散分析、Tukey の多重比較検定を行った。それぞれの値はすべて平均値±標準誤差で示した。危険率 P < 0.05 の場合を有意とした。

4. 研究成果

高トリグリセリド血症による AII の血管収縮作用の変化: AII による血管収縮反応は、両群ともに 10⁻⁸~3×10⁻⁸M でピークに達した。JW に比べ PHT の方が収縮が弱い傾向があったが、有意差はなかった。JW における AII の血管収縮反応は、L-NAME 存在下で有意に増強したが、PHT では有意差はなかった。一方、diclofenac 存在下では両群ともに収縮は増強しなかった。PHT では L-NAME の効果がなかったことから、内皮細胞からの NO 産生遊離機能が減弱している可能性があると考えられた。また、AII 単独投与の収縮反応は、JW に比べて PHT の方が弱い傾向があった。PHT でも AT1 受容体を介した血管収縮に拮抗した血管拡張のメカニズムが存在する可能性があると考えられた。高トリグリセリド血症は血管内皮細胞の NO 産生遊離機能を減弱する可能性があること、またそれらに拮抗する代償機構が発達する可能性があることが示唆された。



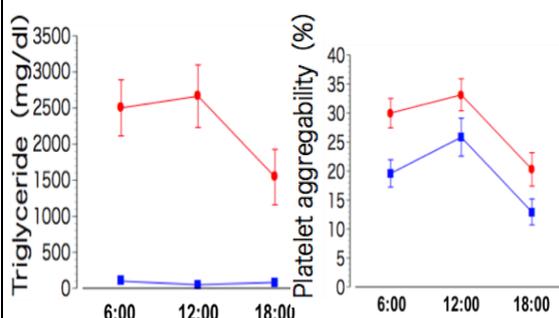
PHT 家兔では、正常な JW ウサギに比較して腸間膜、後腹膜、精巣周囲の各内臓脂肪量の著明な増加が認められ、トリグリセリド値は空腹時では正常にもかかわらず食後は JW より数倍増加した (上図)。PHT における過酸化脂質

値は、血漿および内臓脂肪組織において有意に増加していた。さらに血漿中のsuperoxide dismutase (SOD)活性とGSHは有意に高値を示し、グルタチオンペルオキシダーゼ活性は増加傾向を示した。PHTの血管は内皮依存性弛緩反応の低下がみられたが、さらに、生体内で実際にNOがどのように変化するか、HPLC法により定量したところ、血漿NO₂⁻、NO₃⁻は反対に著明に増加していた。さらに血管の組織学的検討によりニトロ化蛋白質の増加がみられた。結論：PHT家兎では、増加した内臓脂肪蓄積から大量の活性酸素種が産生され、それらが細胞の蛋白質や脂質と反応して機能異常をもたらしていると考えられる。一方、NOや抗酸化に関わるSOD, GSH, グルタチオンペルオキシダーゼ等が代償性増加をおこすものの、産生されたperoxynitriteは血管内皮への傷害をおこし動脈硬化発症の原因となっている可能性が示唆された。

また、ピセアタンノールなどのポリフェノールがこれら心血管機能に対して改善効果を示すかどうか検討した。動脈硬化症の改善を生理的指標で見るために、摘出血管を用いて、内皮依存性弛緩反応の大きさをコントロール群と比較した。ピセアタンノールは血管弛緩反応と虚血心臓の機能改善効果を示し、それらは血管拡張効果に加えてフリーラジカル等の酸化ストレスの除去によるものと推察された。

血小板凝集能の経時的変化：血小板凝集能は、朝、昼および夕方の各時点におけるADP最大濃度8 μM添加後の血小板凝集能を評価した。朝は、JWでは18.6±2.4%、PHTでは29.3±4.2%、昼は、JWでは25.4±5.3%、PHTでは34.8±3.8%、夕方は、JWでは14.8±3.0%、PHTでは18.1±3.5%であった。JWの血小板凝集能は、朝、昼、夕方の各時点で有意な差を示さなかった。PHTの血小板凝集能は、朝、昼、夕方で比較すると、昼から夕方にかけて有意に低下していた。食餌自由摂取時における血漿TG値の経時的変化は、朝（PHTが血中TG値高値を示す食後約18時間後）は、JWでは121.0±26.5 mg/dl、PHTでは2346.7±205.8 mg/dl、昼は、JWでは59.7±12.7 mg/dl、PHTでは2743.3±153.4 mg/dl、夕方は、JWでは94.3±29.7 mg/dl、PHTでは1510.0±220.3 mg/dlであった。JWの血漿TGは、朝、昼、夕方の各時点で有意な差を示さなかった。PHTの血漿TGは、朝・昼から夕方にかけて有意に減少した血漿NOは、朝は、JWでは56.5±8.1、PHTでは97.6±24.19 μM、昼は、JWでは35.8±2.61、PHTでは104.9±12.1 μMであった。JW、PHTいずれにおいても、朝、昼、夕方で比較すると、昼から夕方にか

けて有意に低下した（下図）。



PHTでは血小板凝集能および血漿TGが昼から夕方にかけて有意に低下する変化を示し、血漿NOは、昼から夕方にかけて有意に増加したことから、PHTにおける血小板凝集能の変化には、血漿TGおよびNOが関与している可能性が示唆された。PHTにおける血小板凝集能が有意に低下する昼から夕方にかけて血漿NO産生が代償的に促進していることによって、血小板凝集を抑制していることが考えられる。血小板凝集能が有意に変化しなかったJWも同様に昼から夕方にかけて有意に低下したことから、今後NOの日内変動やその作用メカニズムについて、更なる検討が必要である。

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7件)

①S.Sano, K. Sugiyama, T. Ito,

Y. Katano, A. Ishihata. Identification of the strong vasorelaxing substance scirpusin B, a dimer of piceatannol, from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 査読有、59: 6209-6213, 2011.

②Effect of passion fruit seed polyphenols in rat heart. Y. Matsumoto, S. Sano, K. Sugiyama, Y. Abe, Y. Katano, A. Ishihata, J. Japan Mibyou System Association, 査読有、16(2): 267-271, 2010

③新しい赤ワインポリフェノール成分の分離およびその血管弛緩作用機序の解析. 山崎理美, 岩田宏紀, 片野由美, 石幡明. *日本未病システム学会雑誌*, 査読有、16(2): 311-314, 2010

④Passion fruit seed extract induces endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. S. Aoi, Y. Matsumoto, K. Sugiyama, M. Kamei, T. Ito, Y. Katano, A. Ishihata. *FAV Health 2009 3rd International Symposium on Human Health*

Effects of Fruits and Vegetables. 査読有,
p178-178.

⑤食餌性高コレステロール血症ラットの血小板機能に対する赤ワインポリフェノール成分長期摂取の効果. 小林優子,山田晃子,村田恵理,清水良美,利美賀子,下田智子,會田智美,伊藤恒賢,石幡明,片野由美. 山形医学 第26 巻第2号、査読有、(2008) 061-068

⑥高コレステロール血症ラット血小板機能に対する赤ワイン凍結乾燥品の長期投与効果. 小林優子, 山田晃子, 利美賀子, 下田智子, 會田智美, 伊藤恒賢, 石幡明, 片野由美. 日本薬理学会雑誌, 査読有、131(1): 9, 2008.

⑦赤ワイン凍結乾燥品の長期投与による食餌性高コレステロール血症ラット血管機能の変化. 清水良美, 五十嵐祐子, 利美賀子, 會田智美, 下田智子, 石幡明, 片野由美. 日本未病システム学会雑誌、 査読有, 14(2): 192-193, 2008.

[学会発表] (計 15 件)

①Y. Abe, S. Hishinuma, Y. Matsumoto, T. Ito, Y. Katano, A. Ishihata. Functional changes in vasorelaxation of hereditary postprandial hypertriglyceridemic (PHT) rabbits, a new model of metabolic syndrome. 第84回日本薬理学会年会. 2011年3月23日 横浜、パシフィコ横浜

②S. Hishinuma, Y. Abe, T. Ito, Y. Katano, A. Ishihata. Diurnal variation of platelet aggregability, plasma triglyceride and nitric oxide in hereditary postprandial hypertriglyceridemic rabbits. 第84回日本薬理学会年会. 2011年3月23日 横浜、パシフィコ横浜

③ Ishihata A, Y. Igarashi, Y. Shimizu, Y. Kobayashi, A. Yamada, S. Hishinuma, T. Hosoda, Y. Katano. Effects of polyphenolic compounds on glutathione level and endothelial NO production in hypercholesterolemic rats. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology. 2010年7月30日, Copenhagen, Denmark.

④ Katano Y, Ishihata A. Effects of polyphenolic compounds on oxidative stress and vascular function in dietary-induced hypercholesterolemic rats. The 26th Annual Meeting of ISHR Japanese Section 2009年12月4日 札幌、ロイトン札幌

⑤ Aoi S, Matsumoto Y, Sugiyama K, Kamei M, Ito T, Katano Y and Ishihata A. Passion Fruit Seed Extract Induces Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Rat Aorta. FAV HEALTH 2009, 2009年10月19日, アビニョン、フランス

⑥ 五十嵐祐子, 清水良美, 片野由美, 石幡

明 ウサギ血管機能に対する食後高トリグリセリド血症の影響 第16回日本未病システム学会学術総会 2009年10月31日 大阪、大阪市ガスビルホール

⑦ Shimizu Y, Igarashi Y, Fukuda N, Ito T, A. Ishihata, Katano Y: Effect of aging on insulin resistance and endothelial function in PHT rabbit. 第回日本薬理学会年会、2009年3月17日、横浜、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石幡 明 (ISHIHATA AKIRA)
山形大学・医学部・教授
研究者番号: 40232326

(2) 研究分担者

片野 由美 (KATANO YUMI)
山形大学・医学部・名誉教授
研究者番号: 0018696
伊藤 恒賢 (ITO TSUNEKATA)
山形大学・医学部・助手
研究者番号: 80241719