

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21154

研究課題名(和文)トランス脂肪酸の深部静脈血栓症に及ぼす影響と分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)The role of Trans-fatty acids in deep venous thrombosis

研究代表者

中島 英人(Hideto, Nakajima)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70726992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：(1)5%エライジン酸を負荷し、血中濃度を測定したところ、負荷により血中エライジン酸が非負荷群に比べて約100倍上昇していることが確認された。すなわち、経口投与負荷により実際に血中濃度が上昇し、体内に取り込まれることが確認された。

(2)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、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。現在、再度、N=10ずつで負荷を行っている。

研究成果の概要(英文)：(1) Five percent of elaidic acid treatment increased the serum concentration of elaidic acid at almost 100-fold. This indicates oral elaidic acid treatment actually increase the circulating elaidic acid level and incorporated into the organs in mice.

(2) After the 4 weeks of treatment of elaidic acid or oleic acid as a control, we performed IVC ligation to induce deep venous thrombosis. Unfortunately, 6 mice died after the operation. We did not observe statistical significance, but there maybe a tendency that elaidic acid augments the DVT formation. We therefore add 10 more mice to have final conclusion.

研究分野：循環器内科

キーワード：血栓

1. 研究開始当初の背景

(i) 日本における深部静脈血栓症 (DVT) の増加

過去、DVT (deep venous thrombosis) は欧米に多く、日本を含めアジアではまれな疾患と考えられてきたが、近年、日本でもDVTが増加していることが報告されている (過去10年で2倍以上)。これは我が国における食事を代表とする生活様式の欧米化、高齢者の増加とそれに伴う整形外科的手術の増加などが原因と考えられている。それゆえ、トランス脂肪酸の過剰摂取が我が国でDVTが増加している原因の一つである可能性があり、特に手術後などで抗凝固療法が難しい症例において、食事介入やEPA (エイコサペンタエン酸) やDHA (ドコサヘキサエン酸) などの善玉脂肪酸の薬剤投与でDVTの発症を抑制できればその影響は大きい。

(ii) トランス脂肪酸とDVTの関連性

植物油の加工過程で副産物として生じるトランス脂肪酸

(図1)の摂取量の増加により、動脈硬化性疾患の発症頻度が増加することが欧米の疫学研究・介入試験によって証明され、WHO、FAO、FDA等のガイドラインではその摂取量の上限目標が設定されている。トランス脂肪酸の動脈硬化惹起作用のメカニズムは悪玉コレステロールであるLDLコレステロールを上昇させ、逆に善玉コレステロールであるHDLコレステロールを減少させることによると推察されてきたが、近年の基礎研究の成果により、トランス脂肪酸は血管壁での炎症を惹起したり、血栓形成を促進するなどの直接作用も有することが明らかになった。我々は、経口摂取されたトランス脂肪酸はリポ蛋白に取込まれ運搬された後、諸臓器の細胞膜のリン脂質に広く分布し蓄積することを見いだした。細胞膜の脂質構成成分にトランス脂肪酸が増加することは、多彩な生理活性を有する細胞膜機能を阻害あるいは促進し、心血管病形成過

程に対して複雑な影響を及ぼすことが推察される。このように脂肪酸は細胞膜の生理活性や膜安定化作用を制御することにより心血管疾患の成因に大きく関与していると考えられる。それゆえ、脂肪酸が(1)静脈壁の血管内皮細胞における抗血栓作用、(2)血小板の活性化、(3)循環血液中の凝固因子の活性化、等を制御することにより、DVTの発症に関与していると推測される。さらに、DVT発症に(4)血液中の好中球が大きく関与していることが最近の基礎研究で明らかになったが、脂肪酸は好中球の活性化等にも関与している。このように、種々の経路によってトランス脂肪酸がDVT発症に深く関与していることが強く推測され、この関連性を明らかにすることは意義が大きい。本研究では臨床サンプルを用い脂肪酸プロファイルとDVT発症の関連性を明らかにし、それと同時に動物実験および細胞実験を駆使して、トランス脂肪酸摂取によるDVTへの影響とその分子学的メカニズムを複数の疾患モデルや新しい分子イメージング技術を用いて統合的に評価することを目指す。

2. 研究の目的

- #1. 臨床サンプルを用いてトランス脂肪酸がDVTのリスクであるか否かを明らかにする。
- #2. マウスDVTモデルを作成し、各種脂肪酸投与によるDVTサイズへの影響を明らかにする。
- #3. マウスDVT、マウス血清、培養細胞、及び単離したヒト血小板等を用いて、トランス脂肪酸の易血栓性作用の分子機序を解明する。

3. 研究の方法

- #1. 各種脂肪酸によるDVTの発症、進展に及ぼす影響の検討
- #1-1: 経口トランス脂肪酸投与による血中トランス脂肪酸濃度の上昇の確認。

野生型C57BL/6 マウスにトランス脂肪酸(エライジン酸5%)を4週間負荷する。質量分析を用いて血中エライジン酸濃度を測定し、経口負荷により血中濃度が上昇していることを確認する。同時にトランス脂肪酸以外の脂肪酸や水溶性代謝産物のメタボローム解析も行なう。対照としてオレイン酸を使用する。

#1-2: 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。

DVTは下大静脈結紮モデル(野生型C57BL/6マウスを麻酔下に開腹し、下大静脈を露出、肝静脈との合流部の直下において6-0ナイロン糸を用いて結紮する)を用いて作成する。DVT作成後7日後に安楽死させ、DVTを摘出する。DVTサイズはゴールド・スタンダードな評価項目であるmg/cm(重量を長径で補正したもの)を用いて比較検討する。投与する脂肪酸はオレイン酸(一価不飽和脂肪酸)、エライジン酸(トランス脂肪酸)を用いる。DVTのサイズを計測して、各種脂肪酸投与によるDVTのサイズの変化を検討する。

4. 研究成果

#1-1: 野生型C57BL/6 マウスにトランス脂肪酸(エライジン酸5%)を4週間負荷する。質量分析を用いて血中エライジン酸濃度を測定し、経口負荷により血中濃度が上昇していることを確認する。同時にトランス脂肪酸以外の脂肪酸や水溶性代謝産物のメタボローム解析も行なう。対照としてオレイン酸を使用する。実際に5%エライジン酸を負荷し、血中濃度を測定したところ、負荷により血中エライジン酸が非負荷群に比べて約100倍上昇していることが確認された。

すなわち、経口投与負荷により実際に血中濃度が上昇し、体内に取り込まれることが確認された。

#1-2: 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。現在、再度、N=10づつで負荷を行っている。

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 0件)

- (1) Nagao M, Toh R, Irino Y, Mori T, Nakajima H, Hara T, Honjo T, Satomi-Kobayashi S, Shinke T, Tanaka H, Ishida T, Hirata K. β -Hydroxybutyrate elevation as a compensatory response against oxidative stress in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016, in press.
- (2) Mori K, Ishida T, Yasuda T, Hasokawa M, Monguchi T, Sasaki M, Kondo K, Nakajima H, Shinohara M, Shinke T, Irino Y, Toh R, Nishimura K, Hirata K. Serum Trans-Fatty Acid Concentration Is Elevated in Young Patients With Coronary Artery Disease in Japan. *Circ J*. 2015;79(9):2017-25.
- (3) Kondo K, Ishida T, Yasuda T, Nakajima H, Mori K, Tanaka N, Mori T, Monguchi T, Shinohara M, Irino Y, Toh R, Rikitake Y, Kiyomizu K, Tomiyama Y, Yamamoto J, Hirata K. Trans-fatty acid promotes thrombus formation in mice by aggravating antithrombotic endothelial functions via Toll-like receptors. *Mol Nutr Food Res*. 2015 Apr;59(4):729-40.
- (4) Irino Y, Toh R, Nagao M, Mori T, Honjo T, Shinohara M, Tsuda S, Nakajima H,

Satomi-Kobayashi S, Shinke T, Tanaka H, Ishida T, Miyata O, Hirata KI.

2-Aminobutyric acid modulates glutathione homeostasis in the myocardium. Sci Rep.

2016 Nov 9;6:36749. doi:

10.1038/srep36749.

(5) 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 in press.

〔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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島英人 (Hideto Nakajima)

神戸大学, 医学研究科, 特命教授

研究者番号: 70726992

(2)研究分担者

()

なし

研究者番号:

(3)連携研究者

()

なし

研究者番号:

(4)研究協力者

杜隆嗣 (TOH RYUJI)

神戸大学, 医学研究科, 特命准教授

研究者番号: 50379418

石田達郎 (ISHIDA TATSUEO)

神戸大学, 医学研究科, 特命教授

研究者番号: 00379413