

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 16 日現在

機関番号：26201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2012

課題番号：21500788

研究課題名（和文） ドコサヘキサエン酸代謝物レゾルビン D1 の炎症収束作用による心疾患抑制に関する研究

研究課題名（英文） A Study of Suppressive Effect on Cardiopathy by Inflammation Resolution Effect of Resolvin D1, Metabolite of Docosahexaenoic Acid

研究代表者

山主 智子 (Tomoko T. Yamanushi)

香川県立保健医療大学・教養部・准教授

研究者番号：40382395

研究成果の概要（和文）：モノクロタリンにより誘発した炎症性右鬱血心不全（CHF）ラットに、レゾルビン D1 (RvD1) 0.1  $\mu$ g/day または 1  $\mu$ g/day を 8 日間腹腔内投与し、3 週間後に解剖した。RvD1 投与群では、肺動脈肥厚及び無気肺など CHF で見られた肺病態が抑制された。解剖時生存率は 43.3% (CHF)、63.9% (0.1  $\mu$ g/day RvD1 投与) 及び 72.3% (1  $\mu$ g/day RvD1 投与) であった。心電図、病理観察、心疾患マーカーにより評価された CHF の心臓病態は、RvD1 投与により抑制されなかった。

研究成果の概要（英文）：The rats induced inflammatory right-sided congestive heart failure (CHF) by monocrotaline, were intraperitoneally injected 0.1  $\mu$ g/day or 1  $\mu$ g/day resolvin D1 (RvD1) for 8 days. The rats were dissected after 3 weeks. The morbidities of lung, such as thickness of wall of pulmonary artery and atelectasis, were suppressed in RvD1 injected groups. The survival ratios were, 43.3% for CHF, 63.9% for 0.1  $\mu$ g/day and 72.3% for 1  $\mu$ g/day RvD1 injection. The morbidities of heart in CHF examined by electrocardiograph, pathological observation and marker of cardiopathy, were not suppressed by RvD1 injection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	0	0	0
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学、食生活学

キーワード：機能性脂質・心疾患・炎症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) n3 系不飽和脂肪酸には古くから抗炎症作用、心血管保護作用などが知られているが、その分子レベルでの作用機序は解明されていない。

(2) 最近、炎症収束期における包括的

メタボローム解析により、ドコサヘキサエン酸 (DHA) 及びエイコサペンタエン酸 (EPA) は炎症収束を促進するメドイエーター (レゾルビン (Rv) E1、プロテクチン D1、RvD1 等) へ代謝され、抗炎症作用を発揮する事が報告された (文献 1)。また、いくつかの炎症性病態

モデル(急性腹膜炎、炎症性大腸炎、脳梗塞等)において、炎症収束性メディエーターは有意に炎症を収束し、病態を抑制する事が分かった(文献1)。

(3)申請者らは、ラットに DHA 及び EPA これら脂肪酸を4週間経口投与したところ、心臓の脂肪酸組成は部位により異なる変化を受けており、この事は DHA または EPA 摂取と心臓機能の関連を示唆するものであった。

(4) (3)の結果と、DHA 代謝物 RvD1 は炎症収束活性を有し病態を抑制するという最近の報告から、RvD1 はより直接的に心臓に作用すると考え、本申請研究を着想するに至った。本研究では、RvD1 摂取による炎症性心不全の抑制効果について、モデル動物を用い検討する。これにより DHA 摂取と心血管疾患の関連が明らかになる事が期待される。

文献1 Schwab JM et al., "Resolvin E1 and Protectin D1 activate inflammation-resolution programmes" Nature 447, 869-875

## 2. 研究の目的

(1) RvD1 摂取による炎症性心不全の抑制効果について、炎症性右鬱血心不全(CHF)モデル動物を用い検討する事を本研究の目的とする。

(2) DHA は RvD1 へ代謝される事が知られている。DHA 及び RvD1 の濃度の変化より、これらの CHF に対する効果を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物と飼育方法

3週齢雄性 SD ラット、体重 35-55g を日本クレア株式会社(東京)より購入し、定温、定湿度、12時間の明暗サイクルで飼育した。ラットには普通飼料(オリエンタル酵母株式会社、東京)を与え、水は自由摂取とした。飼育期間中、週毎に体重の測定を行った。本研究は、香川県立保健医療大学実験動物委員会の承認を得て行った。

### (2) 動物群と投与・処置

① 予備飼育したラットを4群に分け、1) control 群(健常+生理食塩水腹腔内投与)、2) CHF 群(CHF 発症+生理食塩水腹腔内投与)、3) RvL 群(CHF 発症+RvD1 0.1  $\mu$ g/day 腹腔内投与)、4) RvH 群(CHF 発症+RvD1 1.0  $\mu$ g/day 腹腔内投与)とした。ラットに、

モノクロタリン(MCT) 60 mg/kg 体重を単回皮下投与し、予備飼育と同様の方法で3週間飼育し、CHFを発症させた。対照には同量の生理食塩水を投与した。MCT投与直前に、生理食塩水またはRvD1をラット腹腔内投与した。生理食塩水またはRvD1の腹腔内投与は、1日1回1週間継続した。

② 予備飼育したラットを4群に分け、1) control 群(健常+生理食塩水経口投与)、2) CHF 群(CHF 発症+生理食塩水経口投与)、3) EPA 群(CHF 発症+EPA 1g/body weight/day 経口投与)、4) DHA 群(CHF 発症+DHA 1g/body weight/day 経口投与)とした。MCT投与の3日前より解剖前日までの合計24日間ラットへ生理食塩水、EPA または DHA を1日1回経口投与した。その他の投与・処置は、全て①と同様に行った。

### (3) 試料の採取

MCT投与3週間後に、ペントバルビタール麻酔下にて、解剖を行った。右心房より採血し、白血球の計測を行った。また血清を分離し、-80度で凍結保存した。心臓及び肺を分離し、常温でホルマリン、または-80度で凍結保存した。

### (4) 心電図の記録と解析

前述の解剖時に麻酔下にて、心電図プロセッサインターフェース(EP95U-2、ソフトロン株式会社、東京)を搭載した小動物用心電計(SAP-2、ソフトロン株式会社)を用いて、四肢より心電図を記録した。計測は4秒間以上行い、個体当たり少なくとも6回繰り返した。記録後、心電図は保存し、心電図プロセッサSP-2000ソフトウエア(ソフトロン株式会社)にて、心電図の波間解析を行った。QT波間隔はBazzet法にて修正を行った。

### (5) 白血球計測

解剖翌日に、血液をチュルク液(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)にて1:10に希釈した。光学顕微鏡下にて、血球計算盤を用いて計測を行った。

### (6) 病理

ホルマリン固定1-2週間後に、心室中心部より3-4mm厚の切片を切り出し、パラフィンに埋包した。パラフィン埋包した試料より2-4  $\mu$ m 切片を薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。光学顕微鏡にて観察を行い、心室筋細胞の厚さ及び炎症性単核細胞の心室への浸潤を評価した。肺についても、肺動脈の肥厚及び無気肺について評価を行った。病理像は、正常1、軽度異常2、中度異常3、高度異常4の4

段階で評価を行った。

(7)脳性ナトリウムペプチド(BNP)の定量  
心臓機能の指標であるBNPはAssay Max rat BNP-32ELISA kit (Assaypro, MO, USA)を用いて定量を行った。

(8)脂肪酸及びRvD1濃度の定量  
脂肪酸及びRvD1の抽出は、Folch法を改変し行った。凍結した右心房を秤量し、内部標準としてマルガリン酸を含むクロロホルム：メタノール=2:1容量混和液中でホモジナイズした。クロロホルム層に抽出された総脂質を、ヘキササンに溶解した。さらに、メチル化キット(ナカライ、京都)を用いて、脂肪酸のメチル化を行った。メチル化した脂肪酸の分離には、ヘリウムガスをキャリアーとし、DB-5カラムを用いた。脂肪酸の分析には、GC-MS(Shimadzu GCMS-QP5050A、島津製作所、京都)を用いた。

(9)RNA抽出と定量PCR  
mRNAの定量は、メーカーのプロトコールに従い行った。Total RNAは、凍結右心房よりRNA purification kit (Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA)を用いて抽出した。1000 ng total RNAを用い、high-capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies Co.)にて逆転写を行い、cDNAを得た。リアルタイムPCRはTaqMan system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)にて行った。TaqMan Assay試薬、プライマー/プローブはApplied Biosystemsより購入した。リアルタイムPCRの増幅及び定量には、香川大学機器センターのABI StepOnePlus™ System (Applied Biosystems)を用いた。結果は、GAPDHを内部標準とし、相対的な発現量を $\Delta\Delta Ct$ 法にて算出した。

(10)統計  
統計解析には、Origin (Microcal Software Inc., USA), SPSS (IBM, USA) または Excel (Microsoft, USA) ソフトウェアを用いた。有意差は、one-way ANOVAにより検定した。データは平均値±SEMで表し、 $P \leq 0.05$  を有意、 $0.05 < P \leq 0.1$  を傾向とした。

#### 4. 研究成果

##### (1)RvD1投与実験

方法(2)①に示した動物群を用いて行った実験結果について以下に述べる。

##### ①体重変化

MCT投与7日目より、CHF群、RvL群、RvH群では、control群に比較して有意な体重の低下が見られた。

##### ②心電図の波間解析

心電図の波間解析結果は、表1に示した。各群の心拍数、P波間隔、QRS波間隔、RR波間隔、PR波間隔に有意な相違は見られなかった。QT波間隔は、CHF群、RvL群、RvH群でcontrol群に比較して有意に延長していた。

表1. 心電図の波間解析結果

	Control (n=5)	CHF (n=6)	RvL (n=7)	RvH (n=7)
Heart Rate (bpm)	391.8 ± 16.1	374.5 ± 19.9	392.9 ± 15.5	359.5 ± 34.6
P duration (ms)	17.5 ± 0.6	13.4 ± 1.7	16.2 ± 1.1	15.0 ± 0.8
QRS interval (ms)	14.8 ± 0.4	14.8 ± 1.1	15.0 ± 1.5	17.2 ± 2.0
RR interval (ms)	154.3 ± 6.3	162.4 ± 8.2	154.2 ± 6.0	177.6 ± 18.1
PR interval (ms)	48.8 ± 0.8	40.3 ± 7.1	45.5 ± 1.6	49.9 ± 1.8
QT (ms)	68.0 ± 3.8	94.8 ± 0.9*	92.7 ± 2.3*	89.3 ± 5.4*

\* Controlに比較して有意であった。

##### ③白血球数の変化

解剖時の白血球数は、control群  $4.6 \pm 5.9$ 、CHF群  $11.0 \pm 1.3$ 、RvL群  $11.7 \pm 8.2$ 、RvH群  $13.6 \pm 1.0$  (単位:  $\times 10^6$  cells/mL)で、CHF群、RvL群、RvH群でcontrol群に比較して有意に増加していた。

##### ④病理

病理診断の結果は表2に示した。肺においては、CHF群で肺動脈の肥厚及び無気肺が見られたが、RvL群とRvH群ではこれらは見られなかった。心臓では、CHFによる心筋細胞の肥大は、RvL群及びRvH群でも見られた。また、CHFによる心筋組織への炎症細胞の浸潤は、RvL群及びRvH群でも見られた。

表2. Rv実験の病理診断結果

		control (n=5)	CHF (n=4)	RvL (n=5)	RvH (n=6)
肺	肺動脈肥厚	1.8 ± 0.4	3.0 ± 0.4 <sup>1)</sup>	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.2
	無気肺	1.7 ± 0.3	2.8 ± 0.4 <sup>2)</sup>	2.0 ± 0.3	2.3 ± 0.3
心臓	心筋細胞肥大	1.0 ± 0.0	1.8 ± 0.5	1.4 ± 0.2	1.8 ± 0.2
	心臓への炎症細胞浸潤	1.0 ± 0.0	1.8 ± 0.3	2.6 ± 0.2 <sup>3)</sup>	2.3 ± 0.4 <sup>2)</sup>

1) 他の群に比較して有意に高かった。2) control群に比較して有意に高かった。3) CHF群に比較して有意に高かった。

##### ⑤BNP濃度

BNP濃度は、control群  $0.22 \pm 0.02$  ng/mL、CHF群  $1.34 \pm 0.51$  ng/mL、RvL群  $1.23 \pm 0.04$  ng/mL、RvH群  $0.95 \pm 0.13$  ng/mLで、CHF群、RvL群、RvH群でcontrol群に比較して有意に高かった。

##### ⑥右心房中 mRNA 発現

各群の右心房中 TNF $\alpha$  及び TGF $\beta$  の mRNA 発現に有意な相違は見られなかった。

##### ⑦生存率

同様の実験を2回行った際の、解剖時(MCT

投与後 3 週間後)の生存率は、control 群 100.0%、CHF 群 43.3%、RvL 群 63.9%、RvH 群 72.3%であった。

### ⑧右心房中 RvD1 濃度

本学に設置されている GC-MS(方法(8))にて、右心房中 RvD1 濃度の定量を試みたが、検出されたピークが非常に小さく、定量の信頼性に欠けると判断し、RvD1 濃度の定量は断念した。

### ⑨考察

以上の結果から、RvD1 は CHF の、特に心臓の病態抑制に大きな効果を発揮しなかったと考えた。しかし、RvD1 投与した群では、生存率の向上が見られた。これは、病理の結果から、肺の病態が抑制されたためと推測した。本研究では、CHF 心疾患への RvD1 の効果について主に研究を行ったが、今後、同じモデルで、CHF の肺病態についての検討が期待される。

#### (2) EPA または DHA 投与実験

DHA 及び RvD1 の濃度の変化より、これらの CHF に対する効果を明らかにする事の検証を目的としていた。しかし、(1)⑧に述べたように、RvD1 濃度を定量する事は難しく、濃度の変化から効果を明らかにする事は難しかった。そこで、CHF へ DHA を投与し、RvD1 を投与した場合との効果の相違について明らかにする事とした。具体的には、方法(2) ②に示した動物群を用いて実験を行った。

#### ①体重変化

MCT 投与 7 日目より、CHF 群及び DHA 群では、control 群に比較して有意な体重の低下が見られた。

#### ②心電図の波間解析

心電図の波間解析結果は、表 3 に示した。各群の P 波間隔、RR 波間隔、PR 波間隔に有意な相違は見られなかった。DHA 群の QRS 波間

表3. DHA投与実験の心電図波間解析結果

	control (n=9)	CHF (n=15)	DHA (n=12)
P duration (ms)	17.6 ± 0.6	20.2 ± 1.1	16.4 ± 1.0
QRS interval (ms)	14.9 ± 0.4	19.7 ± 1.5	23.6 ± 1.7*
RR interval (ms)	141.8 ± 4.9	167.4 ± 9.6	164.2 ± 10.6
PR interval (ms)	49.6 ± 1.4	50.7 ± 1.7	46.8 ± 1.8
QT interval (ms)	69.0 ± 4.1	96.7 ± 3.1 <sup>ab</sup>	77.1 ± 3.1 <sup>ab</sup>

有意差が見られた：a: controlと比較して有意であった；b: DHAと比較して有意であった

隔は、control 群に比較して有意に広がった。QT 波間隔は、CHF 群で control 群と DHA 群に比較して有意に延長していた。control 群と DHA 群の QT 波間隔には、有意な差は見られなかった。

#### ③白血球数の変化

解剖時の白血球数は、control 群 5.7 ± 1.1、

CHF 群 11.7 ± 1.3、DHA 群 11.3 ± 0.6 (単位：X10<sup>6</sup> cells/mL)で、CHF 及び DHA 群で control 群に比較して有意に増加していた。

#### ④病理

病理診断の結果は表 4 に示した。肺においては、CHF 群で control 群に比較して有意な肺動脈の肥厚が見られた。DHA 群ではスコアが上昇していたが、有意な差ではなかった。無気肺に関しては、CHF 群及び DHA 群で control 群に比べて有意なスコアの上昇が見られた。心臓では、心筋細胞の肥大は、CHF 群及び DHA 群で、control 群に比較して有意にスコアが高かった。また心筋組織への炎症細胞の浸潤については、control 群に比較して CHF 群で有意にスコアが高かったが、DHA 群では有意なスコアの上昇は見られなかった。

#### ⑤BNP 濃度

表4. DHA投与実験の病理診断結果

		control (n=5)	CHF (n=7)	DHA (n=5)
肺	肺動脈肥厚	1.0 ± 0.0	3.0 ± 0.4*	2.2 ± 0.2
	無気肺	1.0 ± 0.0	3.8 ± 0.2*	2.8 ± 0.4*
心臓	心筋細胞肥大	1.0 ± 0.0	2.3 ± 0.3*	2.0 ± 0.4*
	心臓への炎症細胞浸潤	1.0 ± 0.0	2.1 ± 0.3*	1.2 ± 0.2

\* controlと比較して有意であった。

BNP 濃度は、control 群 0.11 ± 0.02 ng/mL、CHF 群 1.07 ± 0.29 ng/mL、DHA 群 0.74 ± 0.12 ng/mL で、CHF 群及び DHA 群で control 群に比較して有意に高かった。

#### ⑥右心房中 mRNA 発現

各群の右心房中 TNF α 及び TGF β の mRNA 発現に有意な相違は見られなかった。

#### ⑦生存率

同様の実験を 3 回行った際の、解剖時 (MCT 投与後 3 週間後)の生存率は、control 群 100.0%、CHF 群 74.5%、DHA 群 70.0%であった。

#### ⑧右心房中脂肪酸濃度

DHA 群では、control 群及び CHF 群に比較して EPA 濃度の有意な上昇が見られた。DHA 濃度は、CHF 群で control 群及び DHA 群に比較して有意に低下していた。CHF 群、及び DHA 群では、control 群に比較してアラキドン酸 (ARA)濃度の低下が見られた。

#### ⑨考察

以上の結果から、DHA 投与により、DHA 及び EPA 濃度が上昇し、この事が CHF で見られた

心電図 QT 波間隔延長の抑制及び心臓組織への炎症細胞の浸潤の抑制に効果があったと推測した。DHA 投与により白血球数、BNP 濃度、生存率等は改善しなかったため、CHF 抑制効果は部分的な緩和で、CHF からの回復ではなかったと考えられた。

### (3)総括

CHF モデルに対する RvD1 の効果は、肺病態の改善に関わるようであった。CHF は肺動脈の炎症及び肥厚に始まる事が報告されており、また Rv 類は初期炎症の収束に効果を発揮すると考えられているため、このモデルにおいても RvD1 は CHF 炎症の初期に効果があったと推測される。しかし、CHF モデルに対する RvD1 の炎症収束効果は小さく、炎症は収束されず、病態の進行は食い止められなかったと考えられる。

RvD1 は DHA の代謝物であるが、CHF に対する DHA の効果は、RvD1 の効果と異なるものであった。DHA により、CHF の心臓病態の部分的な緩和が見られた。

以上のような心臓及び肺病態に関する RvD1 の効果の研究は、初めての報告であり、意義のあるものである。今後、肺及び心臓に対する DHA 及び RvD1 の作用についてさらなる詳細な研究が期待される。

### 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 2 件)

① Takayama F, Nakamoto K, Totani N, Yamanushi T, Kabuto H, Kaneyuki T, Mankura M. "Effects of Docosahexaenoic Acid in an Experimental Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis" *Journal of Oleo Science*, 59(8), 407-414 (2010) 査読有

② 万倉三正, 西岡功志, 加太英明, 山主智子, 戸谷永生, 中本賀寿夫, 金行孝雄, 高山房子 「DHA 製品の開発と機能性評価」 *ジャパンプードサイエンス*, 49(1), 45-52, (2010) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① 山主 智子, 加太 英明, 平川 栄一郎, ジャンジュア ナジマ, 高山 房子, 万倉 三正 「高純度ドコサヘキサエン酸投与によるラット肺高血圧症の予防」 2012年05月18日, 仙台市東北大学

② Tomoko T. Yamanushi, Joseph Yanni, Halina Dobrzynski, Hideaki Kabuto, Mark R. Boyett "Changes in ion channel expression in the rat sinoatrial node in right-sided

congestive heart failure" XXth World Congress of the International Society for Heart Research 2010, 13-16, May 2010, 京都市、国立京都国際会館

③ 山主智子, 加太英明, Janjua Najma, 高山房子, 万倉三正 「高純度エイコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸経口投与によるラット心臓機能の変化」 第64回日本栄養食糧学会大会、2010年5月22日、徳島市アステイ徳島

④ 山主智子, 加太英明, Janjua Najma, 高山房子, 万倉三正 「高純度エイコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸経口投与によるラット心臓機能の変化」 第64回日本栄養食糧学会大会、2010年5月22日、徳島市アステイ徳島 山主智子, 加太英明, 平川栄一郎 「ドコサヘキサエン酸代謝物レゾルビンD1 摂取によるラット炎症性右鬱血心不全の抑制効果」 日本脂質栄養学会第19回大会、2010年9月3日、犬山市名鉄犬山ホテル

⑤ J. Yanni, T. Yamanushi, H. Dobrzynski and M.R. Boyett "Remodeling of the extracellular matrix in the rat sinoatrial node in congestive heart failure" The Physiological Society meeting, 2009年7月, Dublin, UK

⑥ 山主智子, 加太英明, 万倉三正 「n3系不飽和脂肪酸DHA及びEPA経口投与によるラット心臓内脂肪酸組成の変化」 第18回日本脂質栄養学会大会、2009年9月4日、東京都港区コクヨホール

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

山主 智子 (Tomoko T. Yamanushi)  
香川県立保健医療大学・教養部・准教授  
研究者番号：40382395

#### (2) 研究分担者

加太 英明 (Hideaki Kabuto)  
香川県立保健医療大学・教養部・教授  
研究者番号：00321266

平川 栄一郎 (Eiichiro Hirakawa)  
香川県立保健医療大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：60238342