

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590116

研究課題名(和文)n-3系多価不飽和脂肪酸の意外な作用：血管弛緩に関わる新しい機序

研究課題名(英文)Unexpected pharmacological effects of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs): A new mechanism by which n-3 PUFAs produce blood vessel relaxation

研究代表者

田中 芳夫(TANAKA, Yoshio)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：60188349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：n-3系多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)の血管弛緩作用とその機序について検討した。その結果、DHAがTP受容体やFP受容体アゴニストによる収縮を選択的かつ強力に弛緩させ、その作用にCYP依存性エポキシゲナーゼ代謝物とK⁺チャンネルの活性化が関与する可能性を見出した。この血管弛緩作用は、これまでに疫学的調査により示された魚油やDHA、EPAなどのn-3系多価不飽和脂肪酸による循環保護効果の一端を担うと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The present study was carried out to have better understanding of the blood vessel relaxant effect of an omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) docosahexaenoic acid (DHA) and its mechanism. In rat aorta and mesenteric artery, DHA was found to selectively and potently relax the vessels that were contracted with the agonists for TP and FP receptors. Furthermore, it was suggested that these DHA-induced vascular relaxant effects are partly mediated through CYP-dependent epoxygenase products of DHA and some potassium channels. These prostanoid receptor-selective blood vessel relaxations to DHA may partly account for circulatory-protective effects of omega-3 PUFAs such as DHA and eicosapentaenoic acid (EPA) which have been proposed by many epidemiological investigations.

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：ドコサヘキサエン酸 エイコサペンタエン酸 n-3系多価不飽和脂肪酸 血管平滑筋 血管弛緩作用 TP
受容体 気管平滑筋 弛緩機序

1. 研究開始当初の背景

(1) ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) は、脂質を構成する脂肪酸の一種であり、構造上不飽和脂肪酸 (多価不飽和脂肪酸; n 3系) に分類される。コレステロール値を低下させるとされるリノール酸なども、分類上は多価不飽和脂肪酸であるが、二重結合の位置により n 6系に細分類され、サラダ油などの植物性食品の油脂に含有される。これに対して、DHA・EPAなどの n 3系多価不飽和脂肪酸は、主として魚介類の油に含有されている。特に、いわし、まぐろ (脂身)、ぶり、さば、さんまなどのいわゆる青み魚やうなぎに豊富であり、とりわけ、いわしは一年中出回っていることや低価格であることから、最も DHA・EPA を取りやすい供給源であるとされている。

(2) DHA・EPA には、脳血栓・心筋梗塞の予防効果、降圧効果、血管壁にコレステロールを沈着させる LDL (低密度リポ蛋白質) を減少させる作用、肥満の原因となる中性脂肪を減少させる作用、高脂血症の改善効果など、循環系に対する保護効果が数多く報告されている。また、DHA には、脳の機能低下を防ぎ、脳血管型認知症・アルツハイマー型認知症にも有効であるという可能性、アレルギー性疾患 (気管支喘息・アトピー性皮膚炎・アレルギー性鼻炎・食物アレルギー・花粉症) に対する抑制効果、大腸がん・乳がんの発生を抑制する効果などの可能性も報告されている。これらの報告は、昔から魚を多く食べてきた日本人の食文化の優秀性の根拠の一端を説明するとともに、65歳以上の人口の占める割合が 21%を超え、超高齢社会に突入した日本における食生活を見直す際の重要なヒントを示唆している可能性があり、非常に興味もたれるところである。

(3) DHA・EPA には、上述したように、循環系に対する保護効果が数多く報告されてきたが、血管の収縮・弛緩機能に対する直接効果を検討した研究は実はそれほど多くない。また、報告された論文の研究結果を詳細に検討してみても、DHA・EPA が著明に血管を拡張させたという結果には程遠いものが多い。即ち、比較的高濃度を用いたとしても、得られた血管拡張作用は収縮に対してせいぜい 2 割程度である。申請者は、長年この点に疑問を抱いており、DHA・EPA の循環系保護作用というのは、これら多価不飽和脂肪酸を継続的に摂取した場合にのみ得られる効果であり、仮に保護効果があったとしても、その機序の解明は事実上困難ではないかという印象を抱いていた。実際、DHA や EPA を入手して、各種小動物の摘出血管の収縮反応に対する抑制効果を検討しても、報告された研究結果を上回るような顕著な収縮抑制効果を得ることはできなかった (ネスレ科学振興会第 9 回研究助成にて実施)。

(4)ところが、ある日、申請者が指導していた卒研生から、「DHA が、U46619 (= トロンボ

キサン A₂(TXA₂)安定誘導体)による収縮を著明に抑制するという結果が得られた」という報告を受けた。最初は、何かの間違ひではないかと思っていたが、追試を重ねるうちに、

DHA が比較的低濃度で、TXA₂受容体 (TP 受容体) 刺激による収縮を非常に強力に抑制すること、DHA による収縮抑制効果は、 α -アドレナリン受容体 (α -受容体) や高カリウムによる脱分極性収縮に対してはほとんど認められないこと、などが明らかとなった (Biol. Pharm. Bull. 28(7): 1298-1300, 2005)。また、血管に高い密度で発現していることなどから、血管の緊張性制御に重要な役割を担っていると考えられているある種のイオンチャネル (大コンダクタンス K チャネル = BK チャネル) に対する DHA の影響を検討したところ、DHA が BK チャネルを非常に強力に活性化させることも見出した。さらに、申請者の留学先の指導者と進めていた共同研究の結果、TP 受容体と BK チャネルが強い相互作用を及ぼしあっていることも明らかになり、TP 受容体を介した血管収縮作用の一部に、このチャネルに対する抑制制御が関与することが示された (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107(44): 19096-19101, 2010)。これら一連の実験結果から、申請者は、DHA は、(1)TP 受容体をはじめとするエイコサノイド受容体に対する遮断作用をもつ可能性、(2)BK チャネルを活性化する可能性を有し、(1)と(2)が独立に、もしくは、(1)と(2)が連関することにより、血管の拡張効果をもたらす、これが DHA の循環保護効果の一端を担うのではないかという考えを抱くに至った。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、n 3系多価不飽和脂肪酸による循環系保護効果に関わる分子基盤の構築を目指すことであるが、今回は、以下の 2 つを到達目的に掲げた。

(1) 血管を主たる対象として、n 3系多価不飽和脂肪酸である DHA ならびに EPA がエイコサノイド受容体を介した収縮反応を選択的に抑制する可能性を検証する。

(2) DHA や EPA の血管収縮抑制作用に関わる機序を追究する。特に、血管内皮の役割、K⁺チャネル活性化が関与する可能性、DHA の代謝物の役割を解明する。

3. 研究の方法

Wistar 系雄性ラット (8~9 週齢) より胸部大動脈、腸間膜動脈を摘出し、結合組織と内皮細胞を除去した後、約 2 mm 幅の輪状標本作製し、95% O₂ - 5% CO₂ を通気した Normal Tyrode's 液 (35 °C、pH = 7.4) を満たした器官槽内に懸垂して、張力変動を等尺性に記録した。内皮の役割を検討する場合は、内皮保持標本を使用した。多価不飽和脂肪酸の弛緩作用は、収縮薬によってもたらされる張力変化に対する抑制率として評価した。

4. 研究成果

(1) DHA の血管弛緩作用に対する血管内皮の役割

ラットの胸部大動脈、腸間膜動脈のいずれにおいても、TP 受容体アゴニストである U46619 により収縮させた標本に対して DHA (10^{-5} M) はこれを強力に弛緩させた。

DHA の弛緩作用に対する内皮の役割を検討したところ、DHA (10^{-5} M) の弛緩作用は内皮保持標本、内皮剥離標本のいずれにおいても認められ、また、インドメタシン (Indo, 3×10^{-6} M) や *N*-ニトロ-L-アルギニン (L-NNA, 5×10^{-5} M) によっても影響を受けなかった。一方、腸間膜動脈では、ノルアドレナリン (NA) により収縮させた内皮保持標本において、アセチルコリン (ACh) は Indo と L-NNA に抵抗性を示し、カリプトトキシン (ChTX) とアパミンの同時処置により抑制される弛緩反応を誘発した。しかし、DHA (10^{-5} M) はそのような弛緩作用を示さなかった。

以上の結果から、TP 受容体アゴニストで収縮させたラットの血管 (胸部大動脈、腸間膜動脈) でもたらされる DHA による弛緩反応は、プロスタサイクリン (PGI_2)、NO、内皮由来過分極因子などの内皮由来弛緩因子 (EDHF) を介したのではなく、血管平滑筋に対する DHA の直接的な作用を介したものであることが示された。

(2) TP 受容体アゴニストで収縮させた標本を選択的に弛緩させる可能性

DHA は、U46619 で収縮させた胸部大動脈標本のほか、 PGF_2 で収縮させた標本も 10^{-5} M 以下の濃度で強力に弛緩させた。しかし、フェニレフリン (PE)、高カリウム (80 mM KCl) 溶液で収縮させた標本はほとんど弛緩させなかった。腸間膜動脈でもほぼ同様の結果であった。また、U46619 と PGF_2 による収縮反応は、DHA (10^{-5} M) を前処置することによっても著明に抑制された。しかし、PE や高カリウムによる収縮反応のほか、NA、セロトニン (5-HT) による収縮反応は、DHA の前処置により有意に抑制されなかった。興味深いことに、モルモット気管標本で予備検討したところ、DHA は ACh やヒスタミン (His) による収縮反応を抑制せずに U46619 による収縮反応を有意に抑制した。

以上の結果から、DHA が TP 受容体、FP 受容体などのプロスタノイド受容体アゴニストにより収縮させた血管標本を強力に弛緩させることが明らかとなり、これが DHA の循環保護効果の一端を担う可能性が強く示唆された。また、予備検討の段階ではあるが、モルモット気管標本においてもほぼ同様の傾向が認められたことを踏まえると、DHA による TP 受容体を介した興奮反応の抑制効果は、血管平滑筋のみで認められる特殊な効果ではなく、他の組織でも成立する普遍的な効果である可能性も示唆された。

(3) エイコサペンタエン酸 (EPA)、リノール酸 (LA) の作用との比較

DHA と同様、n-3 系多価不飽和脂肪酸に分類される EPA も、胸部大動脈と腸間膜動脈の両者で、U46619 ならびに PGF_2 により収縮させた標本を 10^{-5} M 以下の濃度で強く弛緩させた。DHA と EPA では、その弛緩作用の効力に差はあまり認められなかった。また、EPA は、PE や高カリウムにより収縮させた標本を弛緩させなかった。これに対して、n-6 系多価不飽和脂肪酸である LA は、胸部大動脈と腸間膜動脈で、いずれの刺激により収縮させた標本も有意に弛緩させなかった。

以上の結果から、食物に多く含有される多価不飽和脂肪酸という視点に立つと、プロスタノイド受容体刺激により収縮させた標本でもたらされる弛緩作用は、n-6 系よりも n-3 系多価不飽和脂肪酸で強く発揮される可能性が示唆された。ただし、構造上は n-6 系多価不飽和脂肪酸に分類されるアラキドン酸 (AA) の影響を検討したところ、DHA や EPA と同様、U46619 により収縮させた大動脈標本を強く弛緩させる可能性があることが判明した。この点については、今後の重要な検討課題として残った。

(4) DHA の血管弛緩作用に対する K^+ チャネルの関与の可能性

ある種の血管では、DHA やその代謝物の弛緩作用に大コンダクタンス Ca^{2+} 感受性 K^+ チャネル (BK チャネル、マキシ K^+ チャネル) が関与する可能性が示されている。しかし、TP 受容体アゴニストで収縮させた胸部大動脈の DHA の弛緩作用を慎重に吟味したところ、BK チャネルを抑制するイベリオトキシン (IbTX, 10^{-7} M) や ChTX (10^{-7} M) で影響を受けることはなかった。IbTX は膀胱平滑筋標本を収縮させ、ChTX は腸間膜動脈でアパミン (10^{-7} M) とともに ACh による弛緩反応を抑制することを確認しているため、これらの抑制薬がチャネルを抑制することは十分に示された。また、DHA の血管弛緩作用は、アパミン (10^{-7} M)、 10^{-3} M 4-アミノピリジン (4-AP) によっても影響を受けなかったことから、BK チャネルのほか、小コンダクタンス Ca^{2+} 感受性 K^+ チャネル (SK チャネル)、Kv1 ファミリーの関与も有意ではないと判断された。

一方、DHA の弛緩作用は K^+ チャネルを非選択的に抑制する 10^{-2} M テトラエチルアンモニウム (TEA) により著明に抑制されたため、その機序に何らかの K^+ チャネルの活性化が関与する可能性が示唆された。 K_{ATP} チャネルを抑制することが報告されており、クロマカリムの弛緩作用を強力に抑制することが確認された PNU-37883A (10^{-6} M) も DHA の弛緩作用を 10^{-2} M TEA による場合と同程度に抑制することを見出した。従って、PNU-37883A が K_{ATP} チャネルを選択的に抑制すると仮定するならば、DHA の弛緩作用に K_{ATP} チャネルが関与すると判断しても良いと考えられた。ただ

し、PNU-37883A の選択性についてはさらに慎重な検討が必要と考えている。

以上の結果から、TP 受容体アゴニストで収縮させた血管の DHA の弛緩作用には、何らかの K⁺チャンネルが関与するものの、残念ながらラット胸部大動脈では BK チャンネルが関与する可能性は低いと判断された。これらの結果は、TP 受容体と K⁺チャンネルが、TP 受容体刺激が K⁺チャンネルをトランス抑制するかたちで機能的に共役している可能性を示唆するものでもあった。

(5) DHA のシトクロム P450 (CYP) 代謝物の関与の可能性

DHA は、CYP 阻害作用を有する SKF-525A (10⁻⁵ M) やミコナゾール (10⁻⁵ M) 存在下でも U46619 により収縮させた胸部大動脈標本を強力に弛緩させた。しかし、これらの CYP 阻害薬存在下では、DHA の弛緩作用は 10⁻² M TEA や PNU-37883A (10⁻⁶ M) により抑制されなかった。

これらの結果から、DHA の弛緩作用は、CYP 阻害薬非感受性の成分 (恐らく DHA 本体によりもたらされると推定される作用) と CYP 阻害薬感受性の成分 (DHA の CYP 代謝物によりもたらされる作用) から成り、K⁺チャンネルの活性化を介した弛緩機序は主として後者 (DHA の CYP 代謝物によりもたらされる作用) によるものである可能性が示唆された。

(6) DHA の CYP 代謝物の作用

DHA の CYP 依存性エポキシゲナーゼ代謝物である 16,17-エポキシドコサペンタエン酸 (16,17-EpDPE) と 19,20-エポキシドコサペンタエン酸 (19,20-EpDPE) の弛緩作用を検討し、16,17-EpDPE が U46619 により収縮させた胸部大動脈標本を強力に弛緩させ、その作用が 10⁻² M TEA や PNU-37883A (10⁻⁶ M) により抑制されることを見出した。即ち、16,17-EpDPE が K⁺チャンネルの活性化をもたらす DHA の CYP 依存性エポキシゲナーゼ代謝物の有力な候補である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Sato K, Chino D, Nishioka N, Kanai K, Aoki M, Obara K, Miyauchi S, Tanaka Y. Pharmacological evidence showing significant roles for potassium channels and CYP epoxygenase metabolites in the relaxant effects of docosahexaenoic acid on the rat aorta contracted with U46619. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 査読有, 37(3), 2014, 394-403.
<http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b13-00746>

小原圭将、相川直己、佐藤恭輔、茅野大介、田中芳夫、モルモット下部尿路の収

縮機能に対するジスチグミンとベタネコールの作用の比較、*応用薬理*、査読有、85(5-6)、2013、101-114

<http://mol.medicalonline.jp/library/archive/search?jo=ef4oyoya&ye=2013&vo=85&issue=5%2F6&UserID=202.16.208.251>

Sato K, Chino D, Kobayashi T, Obara K, Miyauchi S, Tanaka Y. Selective and potent inhibitory effect of docosahexaenoic acid (DHA) on U46619-induced contraction in rat aorta. *Journal of Smooth Muscle Research*, 査読有, 49, 2013, 63-77.

<http://dx.doi.org/10.1540/jsmr.49.63>

Chino D, Masuda H, Goto Y, Sato K, Obara K, Kitazawa N, Kanie K, Tanaka Y., Watanabe Y. Induction of endothelium-dependent relaxation in rat aorta via nitric oxide production caused by the aqueous extract of *Astragalus membranaceus* Bunge leaves. *Journal of Traditional Medicines*, 査読有, 30(1), 2013, 41-50.

<http://dx.doi.org/10.11339/jtm.30.41>

Tanaka Y., Takahashi H, Shibata S, Namiki K, Kimura S, Koike K, Kasuya Y. Journal of Receptors and Signal Transduction, 査読有, 31(6), 2011, 395-401.

DOI:10.3109/10799893.2011.610109

田中芳夫、受容体の臓器分布と生理活性、*ICU と CCU*、査読無、35(10)、2011、785-790.

http://www.igakutosho.co.jp/magazine/icu_ccu/2011/zi3510.html

[学会発表] (計 17 件)

小原圭将、片寄亜耶、金木瑛理子、佐藤恭輔、茅野大介、田中芳夫、モルモット膀胱収縮機能に対するジスチグミンの長時間依存性増強効果 - コリンエステラーゼ (ChE) 阻害効果ならびに血漿中濃度との関連性 -、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 20 日、仙台国際センター (仙台市、宮城)

佐藤恭輔、西岡菜々子、金井啓祐、青木美歌、小原圭将、茅野大介、田中芳夫、ドコサヘキサエン酸 (DHA) の血管弛緩作用の機序に関する研究 - K⁺チャンネルと CYP 依存性エポキシゲナーゼ代謝物の関与の可能性 -、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日、仙台国際センター (仙台市、宮城)

佐藤恭輔、西岡菜々子、金井啓祐、青木美歌、小原圭将、茅野大介、田中芳夫、ドコサヘキサエン酸 (DHA) の血管弛緩作用とその機序に関する薬理的検討、第 7 回先端分子薬理研究会、2013 年 12 月 7 日、東京慈恵会医科大学 (港区、東京)

上野明恵、友松拓哉、宇野準二、佐藤恭輔、小原圭将、茅野大介、田中芳夫、マウス血管の弛緩反応に關与するアドレナリン受容体の薬理学的性質、第57回日本薬学会関東支部大会、2013年10月26日、帝京大学板橋キャンパス(板橋、東京)

佐藤恭輔、中村聡妙、小原圭将、茅野大介、田中芳夫、不飽和脂肪酸によるTP受容体選択的血管収縮抑制とその機序に關する基礎的検討、第57回日本薬学会関東支部大会、2013年10月26日、帝京大学板橋キャンパス(板橋、東京)

小原圭将、片寄亜耶、金木瑛理子、佐藤恭輔、茅野大介、田中芳夫、ジスチグミンによる長時間持続性の膀胱収縮機能増強効果 - コリンエステラーゼ(ChE)阻害ならびに血中濃度との関連性 -、第129回日本薬理学会関東大会、2013年10月19日、順天堂大学本郷キャンパス(文京区、東京)

小原圭将、片寄亜耶、金木瑛理子、佐藤恭輔、茅野大介、田中芳夫、ジスチグミンによる膀胱収縮機能の長時間持続性増強効果とコリンエステラーゼ(ChE)活性阻害作用の関連性の検討 -、第55回日本平滑筋学会総会、2013年8月8日、旭川市大雪クリスタルホール(旭川市、北海道)

茅野大介、石川雄也、友松拓哉、上野明恵、椎名俊介、宇野準二、佐藤恭輔、小原圭将、田中芳夫、マウス平滑筋のプロプラノロール(Prop)感受性(typical)

アドレナリン受容体(-ADR)の薬理学的特性、第55回日本平滑筋学会総会、2013年8月7日、旭川市大雪クリスタルホール(旭川市、北海道)

青木美歌、佐藤恭輔、小原圭将、茅野大介、田中芳夫、ドコサヘキサエン酸(DHA)の血管収縮抑制効果に対するシトクロムP450依存性エポキシゲナーゼ代謝産物ならびにBKチャンネルの關与の可能性、第54回日本平滑筋学会総会、2012年8月2日、東京慈恵会医科大学(港区、東京)

小原圭将、相川直己、佐藤恭輔、茅野大介、田中芳夫、イミプラミンによる排尿障害に対するジスチグミンの改善効果、第54回日本平滑筋学会総会、2012年8月2日、東京慈恵会医科大学(港区、東京)

茅野大介、青木美歌、佐藤恭輔、小原圭将、田中芳夫、ドコサヘキサエン酸(DHA)による血管収縮抑制の機序：BKチャンネル活性化経路におけるCYP依存性エポキシゲナーゼ代謝産物の關与、第126回日本薬理学会関東支部会、2012年7月14日、北里大学薬学部(港区、東京都)

小原圭将、小林由里菜、佐藤恭輔、茅野大介、田中芳夫、ジスチグミンを中心とした各種副交感神経系作用薬の膀胱収縮機能に対する影響、第126回日本薬理学

会関東支部会、2012年7月14日、北里大学薬学部(港区、東京都)

椎名俊介、佐野慶行、小原圭将、茅野大介、田中芳夫、 α -アドレナリン受容体(α -ADR)を介したラット胸部大動脈の弛緩反応に關わるKチャンネルの薬理学的探索、第126回日本薬理学会関東支部会、2012年7月14日、北里大学薬学部(港区、東京都)

飯干祐里、重松舞衣、茅野大介、田中芳夫、腸間膜動脈の弛緩反応に關わるbeta-アドレナリン受容体サブタイプとKチャンネルとの共役の可能性の検討、第55回日本薬学会関東支部大会、2011年10月8日、東邦大学薬学部(船橋市)

佐野慶行、椎名俊介、茅野大介、田中芳夫、 α -受容体を介したラット胸部大動脈の弛緩反応に対するKチャンネルの役割に關する基礎的検討、第13回応用薬理シンポジウム、2011年9月4日、日本大学薬学部8号館(船橋市)

飯干祐里、重松舞衣、茅野大介、田中芳夫、ラット腸間膜動脈の α -受容体を介した弛緩反応機序、第13回応用薬理シンポジウム、2011年9月4日、日本大学薬学部8号館(船橋市)

佐藤恭輔、小林友也、茅野大介、田中芳夫、ドコサヘキサエン酸(DHA)の血管収縮抑制に關わる機序の解明を目指した基礎的検討 - エイコサノイド受容体を介した収縮に対する選択的抑制の可能性の再検証 -、第53回日本平滑筋学会総会、2011年8月3日、ゆうぽうと(東京都)

〔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〕
東邦大学薬学部薬理学教室紹介ページ
<http://www.phar.toho-u.ac.jp/lab/yakuri.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 芳夫(TANAKA, Yoshio)
東邦大学・薬学部・教授
研究者番号：60188349

(2) 研究分担者

該当なし
研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし
研究者番号：