

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700846

研究課題名(和文)n-3系多価不飽和脂肪酸の肺動脈性肺高血圧症治療薬の機能補助効果に関する研究

研究課題名(英文)Study on the effects of n-3 polyunsaturated fatty acid on the medication for pulmonary hypertension with the experimental animal model.

研究代表者

斉藤 麻希(Saito, Maki)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：40365185

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文):DHA や EPA といったn-3系多価不飽和脂肪酸(n-3脂肪酸)は、その効果や安全性が確立している上、比較的安価である。本研究は、難病である肺高血圧症に対してn-3脂肪酸が治療補助効果をもつか否かを明らかにすることを目的とした。肺高血圧ラットに n-3 脂肪酸として魚油を1日1回経口投与し、生命予後、血管機能、及び炎症関連因子の発現への影響を調べた。その結果、魚油投与単独では生存期間を延長できなかったが、肺血管機能異常を一部改善しうること、右心室において炎症関連因子の発現を抑制する傾向があることを見出した。以上から、n-3脂肪酸が肺高血圧症治療補助効果を有する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):In the present study, I investigated that the effect of n-3 polyunsaturated fatty acid (n-3PUFA), DHA and EPA, on the symptoms of pulmonary arterial hypertension using monocrotaline-induced pulmonary hypertensive (PH) rats. Fish oil was orally given as a source of n-3 PUFA once a day. Continuous administration of fish oil by itself failed to prolong the survival duration and to ameliorate the right ventricular hypertrophy of PH rats. In contrast, the treatment with fish oil partially improved the vascular function of the pulmonary artery isolated from PH rats. Moreover, the treatment with fish oil tended to attenuate the expression of interleukin (IL)-18 mRNA, a cytokine belonging to the IL-1 superfamily. These results suggest the possibility that n-3PUFA acts as an adjunctive agent in PH medication.

研究分野：分子薬理学

キーワード：肺高血圧症 n-3系多価不飽和脂肪酸 モノクロタリン

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、原因不明の肺血管攣縮や肺動脈中膜平滑筋の増殖などにより肺動脈抵抗が選択的に上昇する病態で、特定疾患治療研究事業対象疾患(難病)である。患者数はごくわずかとされるが、発症初期～中期は無症状であり症状が顕在化するまで長い年月を要することから、潜在的な患者は更に多いと考えられる。なお、進行性であり自覚症状が現れる時点では病態が進展していることが多い。診断時点からの生存期間は平均5年と予後不良である。死因の半数は右心不全である。

PAH 薬物療法のストラテジーの第一は肺動脈抵抗の軽減であるため、種々の血管拡張薬に主眼が置かれている。具体的には、血管収縮性ペプチドであるエンドセリンの受容体拮抗薬や、血管拡張性プロスタノイド関連化合物、一酸化窒素 (NO)、Ca²⁺ チャンネル遮断薬等が PAH 治療に用いられているが、副作用や、それら治療薬が奏功しない例もあるなど、いまだ薬物療法が十分確立できたとは言いきれない。また、PAH 治療薬は長期にわたり投薬される一方、その薬価は極めて効果である。PAH は全身的な慢性炎症を伴う膠原病に合併した場合、その生命予後が不良となることも知られている。以上の状況を鑑み、血管拡張以外の作用機序、例えば炎症収束作用を持つ薬剤あるいは機能性食品との併用を模索することで、治療効果の向上、副作用軽減、医療経済学的側面から新たな治療法を提案できるのではと考えた。そこで、健康食品あるいはスイッチ OTC 薬として安全性と一定の効果が確認されており、比較的安価である n-3 脂肪酸 (DHA, EPA) に着眼し、肺高血圧症治療補助薬としての可能性について調べることにした。

2. 研究の目的

難治性疾患である肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は全身性慢性炎症を伴う疾患である膠原病に高頻度に併発するなど、慢性炎症との関連が示唆されている。一方、n-3 系多価不飽和脂肪酸 (以下、n-3 脂肪酸) は魚油に多く含まれ、その摂取は心血管イベントや動脈硬化症、さらには敗血症など、慢性炎症を伴う疾患に対して有効であるとの報告が蓄積されている。申請者はこれまでに、PAH ラット肺動脈への力学刺激負荷が、炎症に関連する分泌型ホスホリパーゼ A₂ (sPLA₂) を介した血管収縮性プロスタノイ

ド産生を促し、炎症関連因子の増大が肺動脈機能異常に寄与することを見出した。さらに、他研究グループから、n-3 脂肪酸が炎症収束物質の原料となり得ることも報告された (Hong, et al., *J Biol Chem.* 278: 14677, 2003)。そこで本研究では、n-3 脂肪酸が PAH 病態肺動脈の機能異常や、PAH モデルの予後改善に寄与するか否かを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) モノクロタリン誘発肺高血圧症 (MCT-PAH) ラット摘出肺動脈を用いた血管機能に対する n-3 脂肪酸検討: Sprague-Dawley 系ラット (雄、4 週齢、日本 SLC) を購入し一週間馴化後、200 mg n-3 脂肪酸/kg 相当の魚油 (Sigma)、200 mg リノール酸 (n-6 脂肪酸)/kg 相当のコーン油を 1 日 1 回経口投与した。翌日、モノクロタリン (MCT, Sigma-Aldrich) 60 mg/kg を単回皮下投与し、PAH を誘導した。MCT 投与 2-3 週後にイソフルラン麻酔・人工呼吸下に心臓及び肺動脈を摘出した。心臓は右心室 (RV) と左心室+心室中隔 (LV+S) とに分け、湿重量を測定し、右心室肥大の指標である RV/(LV+S) 比を算出した。摘出肺動脈は Kiyoshi らの手法 (*Pflügers Arch Eur J Physiol.* 447:142, 2003) に従い、PAH 病態時の肺動脈内腔圧に相当する 15 mN の伸展刺激を与えた。申請者らの予備的検討によれば、PAH 病態ラット肺動脈では、脱分極性収縮能の低下および律動性収縮・持続的張力上昇といった機能異常が生じる。これらを指標に、n-3 脂肪酸投与により機能異常を解除可能か、マグヌス法により検討した。

(2) PAH ラット肺動脈異常収縮に対する炎症収束物質レゾルビンの即時的効果の有無に関する検討: モノクロタリン誘発 PAH ラット肺動脈リング標本に 15 mN の伸展刺激を与え、律動性収縮もしくは持続的張力上昇を引き起こした。ここにレゾルビン D1 を添加し、張力変動の有無を観察した。

(3) PAH ラット生命予後への n-3 脂肪酸長期投与の効果に関する検討: Sprague-Dawley 系ラットに 200 mg n-3 脂肪酸/kg 相当の魚油、200 mg リノール酸 (n-6 脂肪酸)/kg 相当のコーン油を 1 日 1 回の経口投与を開始した。翌日、MCT (60 mg/kg) を単回皮下投与し、PAH を誘

導後飼育・観察を継続した。

(4) PAH ラット心臓・肺組織の病理組織学的検討：摘出した心臓および肺組織を 4% パラホルムアルデヒドで固定後、常法に従いパラフィン包埋し、6- μm 厚の薄切切片を作製した。Elastica Masson-Goldner's (EM) 法により、弾性線維を黒紫色に、膠原線維を青緑色に、赤血球を橙赤色に染色した。また、炎症関連細胞の検出には、抗 CD11b/c 抗体による免疫組織化学的手法を用いた。

(5) PAH ラット心臓・肺組織における炎症性サイトカイン発現変動の検出：PAH ラットから摘出した心臓・肺組織から、常法に従い total RNA を抽出し、RT-PCR により炎症関連因子の発現変動を検出した。

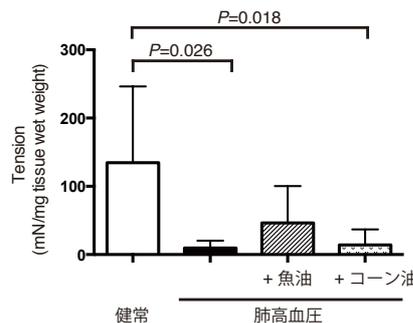
(6) PAH ラット生命予後改善の可能性を持つ薬物の効果に関する再現性の確認：分泌型ホスホリパーゼ A₂ (sPLA₂) やアンジオテンシンは炎症惹起に関わることが知られている。筆者はこれまでに、sPLA₂ 阻害薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) の長期投与が、PAH ラットの生存期間を延長する可能性を見出した。この効果について再現性を確認し、今後の n-3 脂肪酸との併用に備えることとした。sPLA₂ 阻害薬および ARB は浸透圧ミニポンプに充填し、ラットの背部皮下に留置することによって持続投与した。

(7) n-3 脂肪酸受容体 GPR120 強発現細胞の構築：摂取した n-3 脂肪酸は細胞膜の構成成分となり膜の流動性を変化させたり、アラキドン酸カスケードにおける基質となるなどして間接的に細胞機能を調節する一方、それ自身がリガンドとなり、その受容体である GPR120 に結合することによって直接的に細胞内シグナルを調節するとの報告がある (Hirasawa, et al., *Nat Med.* 11: 90, 2005)。肺高血圧時には、血管平滑筋に過剰な伸展刺激が負荷されることが想定される一方、力学刺激感受性に関する知見に乏しい。そこで、それを明らかにするために、GPR120 強発現細胞の樹立を試みた。カルボキシル末端に turbo GFP を融合した GPR120 発現プラスミドである pCMV6-AC-O3FAR1 (GPR120) (Origene) を ScreenFect A (和光純薬) を用いたりポフェクション法で HEK293 細胞に導入した。400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 存在下に培養す

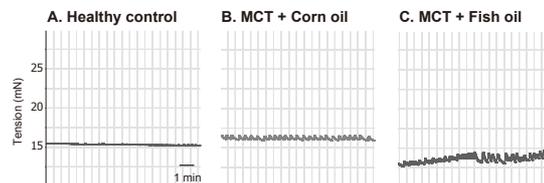
ることにより、形質導入の成功した細胞を選択した。

4. 研究成果

(1) PAH ラット肺動脈における脱分極性収縮能低下に対する魚油長期投与の効果：PAH ラットの肺動脈に 40 mM K⁺ による脱分極刺激を加えたところ、健常群に比べ有意に収縮反応が低下していた。この収縮反応の低下はコーン油長期では解除することが出来なかったが、魚油長期投与により、部分的には改善可能である可能性が示された。



(2) PAH ラット肺動脈における伸展誘発性律動性収縮に対する魚油長期投与の効果：下図に示すとおり、コーン油 (B) 及び魚油 (C) の長期投与は、PAH ラット肺動脈の伸展誘発性律動性収縮を抑制できなかった。



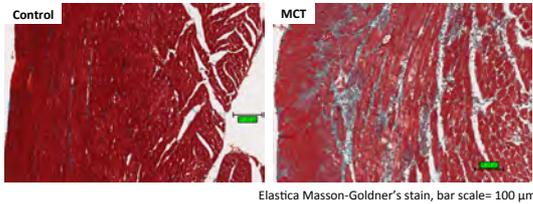
(3) PAH ラット肺動脈伸展誘発性律動性収縮に対するレゾルビン D1 の即時的効果：PAH ラット肺動脈に伸展刺激を負荷し律動性収縮を誘発した。そこに、レゾルビン D1 (100 μM) を添加したが、律動性収縮には影響を与えなかった。

(4) PAH ラット右心室肥大に対する魚油長期投与の効果：MCT 投与 2 週間後における RV/(LV+S) 比は PAH ラットで約 0.351 ± 0.07 (n=3) であった。一方、魚油を長期投与した PAH ラットでは 0.452 ± 0.12 (n=3) であり、心組織の湿重量を指標に検討した結果、右心室肥大に対する抑制効果は観察されなかった。

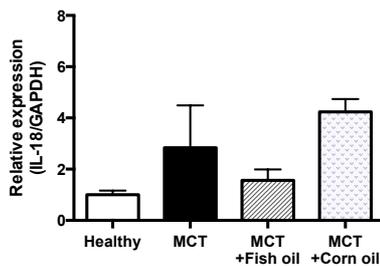
(5) PAH ラット生命予後への n-3 脂肪酸長期投与の効果に関する検討：各群の生存期間の中央値はそれぞれ MCT 群 26.0 日 (n=4), MCT+魚油群 26.5 日 (n=4), MCT+コーン油群 24.0 日 (n=3)であり、魚

油投与単独では生存期間を十分延長し得ない可能性が示された。

(6) PAH ラット心臓の病理組織学的検討: ラット右心室では心筋細胞の拡張と、心筋細胞間隙に線維化を示す青緑色染色を認めた。

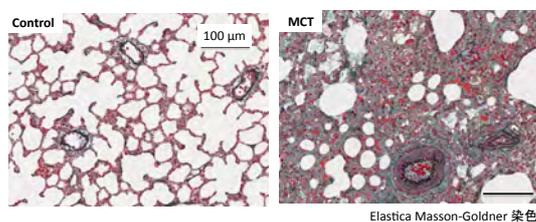


(7) PAH ラット右心室に発現する炎症関連因子の検出: PAH ラット右心室において、炎症関連サイトカインである IL-6 mRNA 発現が有意に増強していた。また、インフラマソーム関連サイトカインである IL-1 β および IL-18 の発現が増強の傾向にあった。なお、まだ予備検討の段階ではあるが、魚油長期投与によって IL-18 の発現が抑制される傾向が観察されている (下図参照)。なお、



caspase-1 に発現変動は観察されなかった。今後、その活性について蛋白レベルでの検討が必要であると考え。その他、組織線維化に関わる growth differentiation factor 15 mRNA の有意な増大も観察され、connective tissue growth factor も増大の傾向が観察された。Transforming growth factor- β 1 についても検討したが、データのバラツキが大きく、結論を導くためには更なる検討が必要であると考え。

(8) PAH ラット肺組織の病理組織学的検討: PAH ラット肺組織では、肺胞壁の肥厚および水腫様所見が観察されると共に、肺血管壁の肥厚も観察された。また、線維化を示す青緑色染色や赤血球の局在を示す橙赤色染色も観察された。さらに、健常ラ



ットに比べて CD11b/c 陽性細胞数も有意に増大していた。

(9) PAH 肺に発現する炎症関連因子の検出: PAH ラット肺組織では、IL-6 mRNA 発現が健常群に比べて 44.0 ± 17 倍増強していた ($n=7, P=0.011$)。

(10) 魚油長期投与ラット肺における GPR120 mRNA 発現: 健常ラットおよび PAH ラット間では、GPR120 mRNA 発現量に差は認められなかったが、魚油もしくはコーン油を長期投与したラット肺では、GPR120 mRNA 発現が増大しており、脂肪酸の負荷により GPR120 発現が誘導される可能性が示唆された。

(11) 抗炎症作用をもつ薬物の PAH 予後改善効果に関する再現性の確認: sPLA₂ および ARB 長期投与により、PAH ラットの生存期間が有意に延長することを見出した。sPLA₂ は炎症時のアラキドン酸カスケード活性化に関わる酵素である。また、アンギオテンシン受容体も活性酸素産生や MAP キナーゼカスケード活性化を介して、組織リモデリングに関与するだけでなく、NF- κ B を活性化し炎症性サイトカイン誘導に関わる事が報告されている (Brasier, et al., *Mol Cell Biochem.* 212: 155-69, 2000)。

(12) GPR120 強発現細胞の樹立: リポフェクション後の HEK293 細胞を 400 μ g/mL G418 含有 10% ウマ血清/MEM 培地中で培養した結果、GPR120-tGFP の緑色蛍光を発する細胞を得た。

(結語) 魚油の摂取のみでは肺高血圧ラットの生存期間の延長や、肺高血圧症で観察される伸展誘発性収縮反応や右心室肥大の抑制は出来なかった一方、脱分極刺激に対する機能異常を部分的に解除しうる可能性が示された。肺高血圧症病態下では肺血管抵抗が増大しているだけでなく、右心室や肺組織において IL-6 といった炎症関連因子 mRNA が増大することから、生命予後には炎症関連因子が少なからず寄与する可能性が考えられる。魚油長期投与によって、インフラマソーム関連炎症性サイトカインである IL-18 mRNA 発現が抑制される傾向にあったことから n-3 脂肪酸投与は肺高血圧症治療において補助的に働くことが推察される。n-3 脂肪酸は、アスピリンに修飾されたシクロオキシゲナーゼ-2 を介した経路を介して、より受容体親和性の高い炎症収束物質レゾルビンに変換されることが報告されている。アスピリンと n-3 脂肪酸との併用が肺高血圧症治療に有効か否かを検討する価値は高いと

考える。

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) Yoshihara T, Yonoki Y, Saito M, Nakahara T, Sakamoto K, Ishii K. Agonist-induced receptor internalization in Chinese hamster ovary cells stably co-expressing β_1 - and β_2 -adrenergic receptors. *Biol Pharm Bull.* 36(1):114-9, 2013
- (2) Tanabe Y, Saito-Tanji M, Morikawa Y, Kamataki A, Sawai T, Nakayama K. Role of Secretory Phospholipase A_2 in Rhythmic Contraction of Pulmonary Arteries of Rats with Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension. *J Pharmacol Sci.* 119:271-281, 2012.

[学会発表] (計 11 件)

- (1) 齊藤麻希、田辺由幸、中山貢一. モノクロタリン肺高血圧ラット肺動脈における炎症性サイトカインの発現に対するオルメサルタンの抑制効果 (日本薬学会第 135 年会、平成 27 年 3 月 28 日、神戸)
- (2) 齊藤麻希、田辺由幸、鎌滝章央、菅野美紅、鈴木真奈美、山内真智子、津軽石玲於、澤井高志、弘瀬雅教、中山貢一. モノクロタリン肺高血圧ラット肺組織における炎症性サイトカインの発現に対するオルメサルタンの効果 (第 65 回日本薬理学会北部会、平成 26 年 9 月 27 日、福島)
- (3) 齊藤麻希、田辺由幸、鎌滝章央、菅野美紅、鈴木真奈美、津軽石玲於、澤井高志、弘瀬雅教、中山貢一. モノクロタリン誘発肺高血圧ラットへのオルメサルタン長期投与の効果 (次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2014、平成 26 年 8 月 30 日、大阪)
- (4) 齊藤麻希、田辺由幸、鎌滝章央、菅野美紅、鈴木真奈美、津軽石玲於、澤井高志、中山貢一. モノクロタリン誘発肺高血圧ラットに対するアンギオテンシン受容体拮抗薬 RNH6270 の生命予後改善効果 (日本薬学会第 134 年会、平成 26 年 3 月 28 日、熊本)
- (5) Leo Tsugaruishi, Maki Tanji Saito, Manami Suzuki, Miku Kanno, Yoshiyuki Tanabe, Akihisa Kamataki, Takashi Sawai, Koichi Nakayama. Continuous administration of olmesartan (RNH6270) attenuates lung expression of inflammatory factor(s) with reduced mortality but no-amelioration of pulmonary hypertension in monocrotaline-treated rats. (第 87 回日本薬理学会年会、平成 26 年 3 月 21 日、仙台)
- (6) Yoshiyuki Tanabe, Maki Tanji Saito, Akihisa Kamataki, Takashi Sawai, Koichi Nakayama. Systemic and local effects of abdominal vibration on high-fat diet-induced obese mice. (第 87 回日本薬理学会年会、平成 26 年 3 月 20 日、仙台)
- (7) 齊藤麻希、田辺由幸、鎌滝章央、澤井高志、中山貢一. モノクロタリン誘発肺高血圧ラット肺動脈にみられる伸展誘発性律動的収縮反応への分泌型ホスホリパーゼ A_2 の関与 (第 14 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、平成 25 年 6 月 1 日、東京)
- (8) Maki Saito-Tanji, Yoshiyuki Tanabe, Manami Suzuki, Miku Kanno, Akihisa Kamataki, Takashi Sawai, Masamichi Hirose, Koichi Nakayama. Involvement of secretory phospholipase A_2 in the rhythmic contraction of pulmonary arteries produced by stretching in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertensive rats and possible implication for the pathogenicity. (FAOBMB mini symposium, Apr. 6th 2013, Yahaba, Iwate)
- (9) 齊藤麻希、田辺由幸、鎌滝章央、澤井高志、中山貢一. Involvement of secretory phospholipase A_2 in the rhythmic contraction of pulmonary arteries produced by stretching in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertensive rats and possible implication for the pathogenicity. (第 86 回日本薬理学会年会、福岡、平成 25 年 3 月 22 日)
- (10) 田辺由幸、丹治 (齊藤) 麻希、鎌滝章央、澤井高志、中山貢一. 腹部振動刺激が肥満マウスの脂肪組織および代謝内分泌機能に及ぼす効果の解析 (日本薬理学会北部会、新潟、平成 24 年 9 月 14 日)
- (11) 田辺由幸、丹治 (齊藤) 麻希、鎌滝章

央、澤井高志、中山貢一. バイオメカニカルストレスによる脂肪細胞・組織での細胞分化・代謝機能制御の試み. (第13回 Pharmaco-Hematology symposium, 東京, 平成24年6月15日)

〔図書〕(計 1 件)

- (1) Tanabe Y, Saito MT, Nakayama K. Mechanical Stretching and Signaling Pathways in Adipogenesis. (Stud Mechanobiol Tissue Eng Biomat, 1-28, 2013, DOI:10.1007/8415_2013_169)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 麻希 (SAITO, Maki)
岩手医科大学薬学部・助教
研究者番号：40365185