

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：26201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350133

研究課題名(和文)ドコサヘキサエン酸による心臓拍動制御の変化に関する研究

研究課題名(英文)A Study of Effect on Cardiac Pacemaker Control by Docosahexaenoic Acid

研究代表者

山主 智子(YAMANUSHI, TOMOKO)

香川県立保健医療大学・教養部・准教授

研究者番号：40382395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：5週齢雄性右鬱血心不全(CHF)ラットに、1g/体重kg DHAエチルエステル(DHA-Et)または生理食塩水を1日1回24日間経口投与した。右心室及び洞房結節を採取し、カルシウムハンドリング、ナトリウム及びカリウムチャンネルmRNAを定量PCR法にて定量した。心不全右心室では、カルシウムハンドリングmRNA(Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2a, Cav1.2, Cav3.1, リアノジン受容体3、及びイノシトール3リン酸受容体2)発現異常が、DHA-Et摂取により回復していた。この現象は洞房結節では見られなかった。心不全による右心室内カルシウム濃度の異常は、DHA-Et摂取により緩和されたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Five-week-old male rats induced right-sided congestive heart failure (CHF), were orally administered daily either 1g/kg body weight DHA-ethyl ester (DHA-Et) or equal volume of saline for 24 days. The rats were killed and dissected right ventricle (RV) and sinoatrial node (SAN). The quantitative PCR was used to measure the expression of transcripts of calcium handling proteins and sodium and potassium channels. In RV, by DHA-Et administration, abnormal expression of calcium handling proteins mRNA (Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2a, Cav1.2, Cav3.1, ryanodine receptor 3 and inositol triphosphate receptor 2) was recovered. In SAN, this phenomenon was not observed. Administration of DHA-Et may improve abnormal Ca<sup>2+</sup> handling through recovery of the expression of these proteins.

研究分野：栄養生化学

キーワード：機能性脂質 DHA 心臓拍動 洞房結節

## 1. 研究開始当初の背景

(1) DHA を経口投与した動物に於いて、心拍数が減少する事を私達はこれまでに報告している(1)。心臓の活動電位発生開始領域である洞房結節は、心臓の拍動を制御している(2)。従って、DHAは洞房結節の機能を変化させる可能性がある事が考えられた。

(2) 心不全モデル動物では、洞房結節中の多くのイオンチャンネル遺伝子のダウンレギュレーションを私達は観察している(3)。このモデル動物の神経支配を除いた心臓では、心拍数が減少していた。これらの事から、洞房結節では、イオンチャンネルのリモデリングが起こり、洞房結節の機能に障害を引き起こし、心不全に至ったと推測した。

(3) Fads2 遺伝子ノックアウトマウス(Fads2K0)は、6 不飽和化酵素を欠損しており、体内で DHA の合成ができない(4)。Fads2K0 では心臓中 DHA 濃度が低下しているとの報告がある。そのため、Fads2K0 洞房結節では、イオンチャンネルのリモデリングが起き、それにより洞房結節の機能障害が起きている事が推測される。

## 2. 研究の目的

1. 研究開始当初の背景より、DHA は、洞房結節中のイオンチャンネルの発現を変化させ、洞房結節の機能に影響を与えたとの仮説を立てた。この仮説を、(1)DHA を経口投与した健常動物、(2)DHA を経口投与した心不全モデル動物(炎症性右鬱血心不全(CHF)モデル)、(3)Fads2K0 を用い、検証する事が本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

(1)DHA 経口投与した健常動物または心不全モデル動物を用いた研究

### 動物と飼育方法

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。

3 週齢雄性 SD ラットを日本クレア株式会社より購入し、定温、定湿度、12 時間の明暗サイクルで飼育した。ラットには実験動物用普通飼料(MF、オリエンタル酵母株式会社)を与え、水は自由摂取とした。

### 動物群、処置および試料採取

4 週齢時にラットを C(健常 + 生理食塩水投与、n=8)、D(健常 + DHA エチルエステル(DHA-Et)投与、n=8)、H(CHF + 生理食塩水投与、n=20)及び HD(CHF + DHA-Et 投与、n=20)の 4 群に分けた。CHF は 5 週齢 SD 系ラットにモノクロタリン(MCT)の皮下注射により誘発し、健常群には同量の生理食塩水を注射した。MCT 注射の 3 日前より、ラットに DHA-Et(1g / 体重 kg)または同量の生理食塩水を 1 日 1 回経口投与した。MCT 注射の 3 週間後、麻酔下に心臓採血後、右心室、右心房および洞房結節を摘出した。内因性心拍数の測定には、心臓を摘出した。

### RNA抽出と定量PCR

定量PCR 法によるmRNAの定量はTaqMan system (Thermo Fisher Scientific K.K.) を用いて行った。Total RNAは、凍結試料より RNA purification kit (Thermo

Fisher Scientific K.K.)を用いて抽出後、逆転写 kit(Thermo Fisher Scientific K.K.)を用いて逆転写を行い、cDNAを得た。リアルタイムPCRはStepOne Plus(Thermo Fisher Scientific K.K.)にて行った。結果は、GAPDHを内部標準とし、相対的な発現量を検量線法または $\Delta\Delta Ct$ 法にて算出した。

#### 内因性心拍数の測定

摘出した心臓をランゲンドルフ還流装置に装着し、37 の  $Ca^{2+}$ Tyrode バッファーを還流した。心臓に心電計プローブを装着し、30 分間心電図の記録の記録を行った。心電図から経時的な周期長を計算した。

#### 統計

統計解析には、Origin (Microcal Software Inc.)または Excel (Microsoft) 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  $\pm$  SEM で表し、 $P \leq 0.05$  を有意、 $0.05 < P \leq 0.1$  を傾向とした。

## (2) Fads2KO を用いた研究

### 動物と飼育及び繁殖方法

本研究は、香川県立保健医療大学実験動物委員会および香川県立保健医療大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て行った。

#### イリノイ大学中村教授が作製した

Fads2KO(4)は、イリノイ大学との譲渡の契約を締結後、2014年4月に麻布大学守口教授より香川県立保健医療大学本研究代表者に譲渡された。通常の飼育には普通飼料 MF を用い、繁殖時には MF に若干 DHA(DHASCO:DHA 海藻オイル(40%)、高オレインサンフラタワールオイル、トコフェロールパルミトレート、オレイン

酸パルミトレート)、ARA(ARASCO:ARA 海藻オイル(40%)、高オレインサンフラタワールオイル、トコフェロールパルミトレート、オレイン酸パルミトレート)を添加した。DHASCO 及び ARASCO は、Martek 社(MD,USA)より供与された。実験群の飼育には、AIN-93G 準拠食(オリエンタル酵母株式会社)に ARASCO 添加したものを DHA 欠乏食として、AIN-93G 準拠食に ARASCO 及び DHASCO を添加したものを DHA 添加食とした。その他の飼育条件は 1)のラットと同様に行った。ヘテロ遺伝子型(Fads2+/-)の雌雄マウスを交配し、繁殖を行った。子マウスは4週齢で離乳させ、尾部より Extract-N-Amp Tissue PCR kit(Sigma)を用いて DNA を抽出後、PCR 法にて増幅し、電気泳動法にて遺伝子型の同定を行った。

### 動物群と試料採取

4週齢オスマウスを N(Fads2+/+, DHA 欠乏食摂取)、ND(Fads2+/+, DHA 添加食摂取)、M(Fads2-/-、DHA 欠乏食摂取)、MD(Fads2-/-、DHA 添加食摂取)の4群に分け飼育した。20週齢時に sodium pentobarbital 麻酔後解剖し、体重及び心電図の記録を行い、以下の試料を採取した。血清(生化学用)、心臓全体(病理または脂肪酸測定用)、右心室、右心房、洞房結節(mRNA 定量用)。病理用心臓はホルマリン中に保存、それ以外は凍結保存した。交配により得られるマウスの数は限られているため、試料は随時採取し、最低各群8匹分確保した。

## 4. 研究成果

(1)健常及びCHFラット右心室イオンチャンネル mRNA 発現の変化

表 1 に右心室中の C 群と比較してのイオンチャンネル発現の変化を示した。右心室では、DHA を摂取した健常ラット (D

表1. 健常及びCHFラット右心室中のイオンチャンネル発現の変化 (C群と比較しての有意な変化を矢印で示した、-は変化なし)

mRNA	群		
	D	H	HD
<b>Ca<sup>2+</sup>チャンネル関連</b>			
SERCA2a	-	↓	-
Ca <sub>v</sub> 1.2	-	↓	-
Ca <sub>v</sub> 3.1	-	↑	-
RYR2	-	-	-
RYR3	-	↑	-
IP <sub>3</sub> R2	-	↑	-
PLN	-	↓	↓
PMCA1	-	↑	↑
NCX1	-	-	-
CSQ2	-	-	-
<b>Na<sup>+</sup>チャンネル</b>			
Na <sub>v</sub> 1.1	-	-	-
Na <sub>v</sub> 1.3	-	-	-
Na <sub>v</sub> 1.5	-	-	↑
Na <sub>v</sub> β1	-	-	-
Na <sub>v</sub> β2	-	-	-
Na <sub>v</sub> β3	-	↑	↑
<b>K<sup>+</sup>チャンネル</b>			
K <sub>v</sub> 1.4	-	↓	↓
K <sub>v</sub> 1.5	-	↓	↓
K <sub>v</sub> beta subunit	-	-	-
K <sub>v</sub> 4.2	-	↓	↓
K <sub>v</sub> 4.3	-	↓	↓
K <sub>v</sub> 7.1	-	-	-
ERG1	-	-	↓
K <sub>ir</sub> 2.1	-	↓	↓
K <sub>ir</sub> 2.2	-	↓	↓
K <sub>ir</sub> 3.1	-	↓	↓
K <sub>ir</sub> 3.4	-	-	-
K <sub>ir</sub> 6.2	-	↓	↓
K <sub>v</sub> LQT1	-	-	-
KChAP	-	↑	↑
KChIP2	-	↓	↓(体前向)
HCN1	-	-	-
HCN4	-	-	-

SERCA2a:筋小胞体Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2a (筋小胞体へCa<sup>2+</sup>を戻すポンプ); Ca<sub>v</sub>1.2:L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルを構成; Ca<sub>v</sub>3.1:T型Ca<sup>2+</sup>チャンネルを構成; RYR2:筋小胞体リノジン受容体2(筋小胞体からCa<sup>2+</sup>を放出するチャンネルを形成、心筋型); RYR3:筋小胞体リノジン受容体3(一般型); IP<sub>3</sub>R:イノシトール3リン酸受容体(細胞内カルシウムチャンネル、筋小胞体からCa<sup>2+</sup>を放出する); PLN:ホスホランパン (SERCAを制御する筋小胞体膜結合タンパク質); PMCA1:原形質膜Ca<sup>2+</sup>-ATPase1(Ca<sup>2+</sup>トランスポーター); NCX1:Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換体1; CSQ2:カルセクレチン2(小胞体内Ca<sup>2+</sup>を結合/貯蔵タンパク質); Na<sub>v</sub>1.1、Na<sub>v</sub>1.3、Na<sub>v</sub>1.5:心筋に分布するNa<sup>+</sup>チャンネル; Na<sub>v</sub>β1、Na<sub>v</sub>β2、Na<sub>v</sub>β3:Na<sup>+</sup>チャンネルβサブユニット; K<sub>v</sub>1.4:Shaker関連型膜電位依存性K<sup>+</sup>チャンネル4; K<sub>v</sub>1.5:同5; K<sub>v</sub> beta subunit:同サブユニット; K<sub>v</sub>4.2:Shal関連型膜電位依存性K<sup>+</sup>チャンネル2; K<sub>v</sub>4.3:同3; K<sub>v</sub>7.1:同サブファミリー-Qメンバー1; ERG1:電位依存性K<sup>+</sup>チャンネルサブファミリー-Hメンバー1; K<sub>ir</sub>2.1:内向き整流K<sup>+</sup>チャンネルサブファミリー-Jメンバー2; K<sub>ir</sub>2.2:同メンバー12; K<sub>ir</sub>3.1:同メンバー3; K<sub>ir</sub>3.4:同メンバー5; K<sub>ir</sub>6.2:同メンバー11; K<sub>v</sub>LQT1:電位依存性K<sup>+</sup>チャンネルサブファミリー-Qメンバー1; KChAP:活性STAT3(転写因子)の阻害因子; KChIP2:K<sup>+</sup>チャンネル相互作用因子2; HCN1:過分極誘発陽イオンチャンネル1; HCN4:同4

群)では、対照の C 群と比較してのイ

オンチャンネル発現の変化は見られなかった。カルシウム関連チャンネルについては、筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2a (SERCA2a)、L型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルを構成する Ca<sub>v</sub>1.2、T型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルを構成する Ca<sub>v</sub>3.1、筋小胞体から Ca<sup>2+</sup>を放出するリノジン受容体 3(RYR3)、細胞内カルシウムチャンネルであるイノシトール 3リン酸受容体 2(IP<sub>3</sub>R2)に於いて、CHF 群 (H 群)で C 群と比較して見られた異常が、CHF に DHA 摂取させた群 (HD 群)では見られなかった。すなわち、CHF によるカルシウムハンドリング関連 mRNA 発現の異常が、DHA-Et 経口投与により部分的に回復していた。従って、CHF によるこれらのカルシウムハンドリング関連タンパク質のリモデリングは、DHA-Et 摂取により部分的に抑制されたと考えられる。以上の結果は、CHF による心筋細胞内のカルシウム濃度の異常は、DHA-Et 摂取により緩和される可能性を示唆するものである。ナトリウム及びカリウムチャンネルについては、H 群と同様の変化が HD 群に於いても観察された (Nav1.5 以外)。従って、CHF によるナトリウム及びカリウムチャンネル mRNA 発現の異常は、DHA-Et 経口摂取により抑制されなかったと考えられる。

## (2) 健常及び CHF ラット洞房結節イオンチャンネル mRNA 発現の変化

表 2 に洞房結節中の C 群と比較してのカルシウム関連チャンネル発現の変化を示した。洞房結節では、D 群に於けるイオンチャンネル発現の変化はナトリウム-カルシウム交換体 (NCX) でのみ見られた。H 群で C 群と比較して異常が見られたのは、IP<sub>3</sub>R2 のみで、これは HD 群で発現の回復は見られなかった。洞房結節では、CHF によるカルシウムハンドリング関連 mRNA 発現の異常はあまり見られず、DHA-Et 経口

投与によりむしろ異常が見られるようになった。

表2. 健常及びCHFラット洞房結節中のイオンチャネル発現の変化 (C群と比較しての有意な変化を矢印で示した、-は変化なし)

	群		
	D	H	HD
Ca <sup>2+</sup> チャネル関連			
SERCA2a	—	—	—
Cav1.2	—	—	—
Cav3.1	—	—	—
RYR2	—	—	—
RYR3	↑	—	—
IP3R2	—	↓	↓
PLN	—	—	↑
PMCA1	—	—	↑
NCX1	—	—	↑
CSQ2	—	—	↑

### (3) その他の結果と今後の展望について

本研究の期間内に、研究代表者が闘病するという予想しなかった事態が発生した。そのため、健常及びCHFラット洞房結節中のナトリウム及びカリウムチャネル mRNA、及び右心房中イオンチャネル mRNA 発現は現在までに定量を終える事が出来なかった。また内因性心拍数についても未だに解析中である。今後、これらの結果を得、DHAによる心臓拍動の制御について考察する事が可能であると確信している。

Fads2K0 を用いた研究については、現在までに必要な試料数を確保したが、研究資金不足のために未だに定量または解析ができない状況にある。今後、研究資金を確保し、研究を継続してゆくつもりである。

### 参考文献

- 1) Yamanushi TT, Kabuto H, Hirakawa E, et al., J Nutr. 144 (4): 467-474. (2014)
- 2) 「心筋細胞イオンチャネル」倉智嘉久著、文光堂、(2000)
- 3) J. Yanni, X. Cai, T. Yamanushi et al.

The 32nd Annual Scientific Sessions of Heart Rhythm Society 発表 (2011)

- 4) Stroud CK et al., J Lipid Res. 50(9):1870-80 (2009)

### 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1件)

Tomoko Yamanushi, Hideaki Kabuto, Kaoru Akiyama, Tadahiro Tsushima and Yoshihisa Misawa. “Effect of oral administration of DHA on the remodeling of calcium handling proteins in congestive heart failure in male rats” FASEB J April 2015 29:923.12 (April 2015; 29 (1 Supplement)) ([http://www.fasebj.org/content/29/1\\_Supplement.toc](http://www.fasebj.org/content/29/1_Supplement.toc))

[学会発表](計4件)

- (1) 山主智子、加太英明、小河佳織、高山房子、対馬忠広、三澤嘉久、万倉三正「鬱血性心不全ラット洞房結節のカルシウム制御遺伝子発現異常に対するDHA経口摂取の影響」第70回日本栄養・食糧学会大会、2016年5月、兵庫県西宮市 武庫川女子大学
- (2) 山主智子、加太英明、小河佳織、高山房子、対馬忠広、三澤嘉久、万倉三正「DHA経口摂取による右鬱血性心不全ラット心筋細胞イオンチャネル発現の変化」日本脂質栄養学会第24回大会、平成27年8月、佐賀県佐賀市ホテルグランデはがくれ
- (3) Tomoko Yamanushi, Hideaki Kabuto, Kaoru Akiyama, Tadahiro Tsushima, and Yoshihisa Misawa. “Effect of oral administration of DHA on the remodeling of calcium handling proteins in congestive heart failure

in male rats” EB2015 (Annual meeting of American Society for Nutrition)、平成 27 年 3 月-4 月、Boston Convention & Exhibition Center, Boston, MA, USA

- (4) Temple IP, Quigley GM, Schnieder H, Monfredi O, Cartwright E, Zi M, Yamanushi TT, Mahadevan VS, Hart G, Dobrzynski H, Boyett MR. ” Pulmonary Hypertension Leads to Widespread Ion Channel Remodelling Within the Atrioventricular Node” Heart Rhythm 2014、2014 年 5 月、The Moscone Center, San Francisco, USA,

## 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