1版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ５ 月　 ８ 日現在

機関番号：１３８０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：２６４６１０６５
研究課題名（和文）ω-3系多価不飽和脂肪酸による心保護作用についての研究

研究課題名（英文）Study for cardioprotection of omega-3 polyunsaturated fatty acid

研究代表者
佐藤　洋（Sato, Hiroshi）

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：３０２９３６３２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：（基礎研究）分化H9c2細胞のﾊﾟﾙﾐﾁﾝ酸(PAL)への暴露は、caspase活性化、ﾐﾄｺﾝﾄﾞﾘｱ膜電位脱分極、細胞内ATP枯渇と活性酸素種産生を促進し、ﾐﾄｺﾝﾄﾞﾘｱ細分化とdynamin-related protein 1の増加をきたした。ｴｲｺｻﾍﾟﾝﾀｲﾝ酸(EPA)は、AMP依存性経路を介してPALの脂肪毒性を軽減した。（臨床研究）冠動脈疾患患者にて、魚摂取3回／週以上では3回/週未満よりEPA、DHA値、EPA/AA比が高かった。魚摂取励行とEPA内服は、2年後のMDA-LDLを低下させたが、両群で差はなく、ω-3不飽和脂肪酸の増加と酸化LDLの低下に同等の効果であった。

研究成果の概要（英文）：(Basic study) When differentiated H9c2 myocytes were exposed to palmitate (PAL), the myocytes showed activation of caspases 3/7, depolarization of mitochondrial membrane potential, depletion of intracellular ATP, and enhancement of reactive oxygen species production. PAL enhanced mitochondrial fragmentation with increased dynamin-related protein-1 (Drp1) expression. Eicosapentaenoic acid (EPA) ameliorated the PAL-induced lipotoxicity via AMP-activated protein kinase activation, which suppressed mitochondrial fragmentation and Drp1 expression. (Clinical study) Patients with fish intake >=3 times/week showed higher EPA, DHA levels and EPA/AA ratio than those with <3 times/week. Both patients recommended fish intake and those treated with EPA showed decreases in serum MDA-LDLlevels after 2 years, but the extent did not differ. The increase in fish intake was as effective as the treatment with EPA for increases in serum omega-3 polyunsaturated fatty acids and a decrease in oxidative LDL.

研究分野：循環器内科

キーワード：不飽和脂肪酸　心筋細胞　冠動脈疾患　ミトコンドリア

１．研究開始当初の背景

脂質異常症は、動脈硬化を惹起することにより、心筋虚血をきたして心機能を低下させるが、心筋細胞の糖代謝異常を介して心機能を低下させることも知られている。また、心不全症例における交感神経活性の上昇は、血清遊離脂肪酸を上昇させて心筋細胞の糖利用を低下させると考えられている。この心筋の糖利用低下が酸素利用効率を低下させ、心不全の病態をさらに悪化させると考えられている (Metabolic vicious cycle)。心不全症例の心筋細胞において、糖利用障害が起こる機序については、細胞内での活性酸素種の産生と mitochondria の機能異常が考えられている。我々は、これまでの培養心筋細胞を用いた検討で、飽和脂肪酸の一種であるﾊﾟﾙﾐﾁﾝ酸(palmitate)の負荷が、活性酸素種の産生と mitochondria 機能異常を介して細胞内 insulin 信号経路と GLUT4 の細胞膜への移送を阻害して、細胞の insulin 抵抗性を惹起することを示した(1)。現在まで、虚血性心疾患にたいするスタチンを中心とした脂質低下療法の有効性は確立しているが、心不全にたいする脂質低下療法の効果には異論がある。ω-3 系多価不飽和脂肪酸(PUFA)のｴｲｺｻﾍﾟﾝﾀｲﾝ酸(EPA)とﾄﾞｺｻﾍｷｻｴﾝ酸(DHA)は、魚油の成分であり、虚血性心疾患による死亡率を減少させることが示されており、我が国をはじめ多くのガイドラインにて魚の摂取を推奨されている。また、EPA 製剤は、JELIS 試験において高脂血症患者の冠動脈イベント発症を減少させることが示されている(2)。ω-3 PUFA の心不全にたいする有効性については、いくつかの臨床研究で証明されているが、その効果は軽微である(3)。ω-3 PUFA の効果は、1) 致死性不整脈の減少、2) 血管内皮機能の改善 3) 心筋の収縮、拡張機能の改善が挙げられる。これらの作用は、心筋細胞や血管内皮細胞のエネルギー代謝を改善することによると思われるが、心筋細胞や心臓においてω-3 PUFA が、mitochondria 機能異常や insulin 抵抗性に対する保護効果があるのか、また、冠動脈疾患症例の脂質、糖代謝、心機能を改善させるのかについては、依然として不明である。

２．研究の目的

A. 基礎研究：培養心筋細胞の分化 H9c2 細胞において、細胞の mitochondria 機能、動態と insulin 感受性に及ぼすω-3 PUFA の効果を比較検討する。
B: 臨床研究としては、冠動脈疾患を有する外来症例において、EPA の投与が、脂質代謝(特に過酸化脂質)、糖代謝、各種 cytokine に及ぼす効果、および心機能と心血管イベントに及ぼす影響を検討する。患者は、EPA 内服群、対照群（食事指導のみ）に分かれ、2 年間の観察における検査値の変化と心血管イベントの発生状況を調べる。

３．研究の方法

A. 基礎研究：ｳｼ血清による培養で分化させた H9c2 細胞を使用する。培養液に飽和脂肪酸のﾊﾟﾙﾐﾁﾝ酸 (PAL: 400 μM、24 時間)を加えて培養する。ｴｲｺｻﾍﾟﾝﾀｲﾝ酸(EPA: 50 μM) は、PAL と同時に投与する。Mitochondria 形態、mitochondria 膜電位は、それぞれ蛍光色素の Nile red、JC-10 を負荷し、レーザー顕微鏡(Zeiss: LSM520)にて蛍光強度を測定して評価する。
B. (1) 臨床研究：外来通院中の冠動脈疾患患者 143 名において、脂質（４分画）、糖質、NT-rpBNP を測定し、問診による魚摂取習慣により計測値を比較する。(2) 冠動脈疾患患者 84 名において、脂質（4 分画）と酸化 LDL を測定し、魚摂取の励行と EPA(1800mg/日)投与群に分けて２年後の計測値を比較する。

４．研究成果

A．基礎研究： (1) 分化 H9c2 細胞が PAL に暴露されると、caspase3/7 が活性化され(4.1±0.7 倍増加、p<0.01)、脂肪毒性が示された。PAL 処理心筋細胞は、また、dynamin-related protein 1(Drp1)の増加と mitochondria の細分化 (75.3±5.0% vs 9.2±3.2%, p<0.01)、mitochondria 膜電位の脱分極(JC-10 蛍光比：2.1±0.4 vs 4.5±0.3, p<0.01)を認め、mitochondria の動態変化と機能障害を示唆した。(2) PAL 処理細胞に EPA を付加すると、caspase 3/7 は減少し（1.5±0.3 倍、p<0.01）、Drp1 の発現と mitochondria 細分化は低下し(37.6±6.4%, p<0.01)、mitochondria 膜電位は保持された(2.9±0.2, p<0.01)。EPA の単独投与はまた、mitochondria の延長と Drp1 の減少をきたした。(3) EPA は AMPK を活性化しており、AMPK 活性化剤（AICAR）よっても EPA と同様の抑制効果が得られた。以上より、EPA は AMPK を介して PAL による Drp1 の増加と mitochondria 動態を抑制し、脂肪毒性を軽減させる可能性があることが示された。
B. 臨床研究： (1) 魚摂取習慣 3 回／週以上の患者は、3 回/週未満の症例に比較して、EPA, DHA 値、EPA/AA 比が高く、αリノール酸値が低かった(EPA: 79.6±44.3 対 57.8±38.9 μg/ml 、DHA:137.1±50.6 対 118.9±33.4 μg/ml、EPA/AA: 0.50±0.26 対 0.34±0.20, p<0.01)。(2) 魚類摂取励行群(n=44)、EPA 服用群(n=40)とも EPA 値、EPA/AA 比は増加したが、EPA 群の方が増加は大きかった。両群ともに LDL-ｺﾚｽﾃﾛｰﾙは不変であったが、MDA-LDL は減少し、その程度に群間で差はなかった。以上より、魚摂取習慣により脂質分画に差がみられること、魚摂取の励行は酸化 LDL に対して EPA 服用と同等の効果を有することが示された。

＜引用文献＞

1. Nobuhara M, Saotome, M, Watababe T, et al. Mitochondrial dysfunction caused by saturated fatty acid loading induces myocardial insulin-resistance in differentiated H9c2 myocytes: A novel ex vivo myocardial insulin-resistance model. Exp Cell Res 2013; 319: 955-66.
2. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis Lancet 2007; 369: 1090-8.
3. GISSI-HF investigators. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 2008; 372: 1223-30.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 11 件）

1. Nonaka D, Katoh H, Kumazawa A, Satoh T, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H. Intracellular renin protects cardiomyocytes from ischemic injury in diabetic heart. J Cardiovasc Dis Diagn 2015; 3 (4): 215.
2. Satoh H. MRI and the exercise blood pressure response in dilated cardiomyopathy. Heart 2015; 101:747-8. doi: 10.4330/wjc.v6.i7.585.
3. Suwa K, Saitoh T, Takehara Y, Sano M, Nobuhara M, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Sugiyama M, Wakayama T, Alley M, Sakahara H, Hayashi H. Characteristics of intra-left atrial flow dynamics and factors affecting formation of the vortex flow. Circ J 2015; 79: 144-52. doi: 10.1253/circj.CJ-14-0562.
4. Sano M, Satoh H, Suwa K, Nobuhara M, Saitoh T, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Shimoyama K, Suzuki D, Ogawa N, Takehara Y, Sakahara H, Hayashi H. Characteristics and clinical relevance of late gadolinium enhancement in cardiac magnetic resonance in patients with systemic sclerosis. Heart Vessels 2015; 30 (6): 779-88. doi: 10.1007/s00380-014-0539-y.
5. Sakamoto A, Saotome M, Hasan P, Satoh T, Ohtani H, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H. Eicosapentaenoic acid ameliorates palmitate-induced lipotoxicity via the AMP kinase/dynamin-related protein-1 signaling pathway in differentiated H9c2 myocytes. Exp Cell Res 2017; 351 (1): 109-20. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.01.004.
6. Natsume K, Shiiya N, Takehara Y, Sugiyama M, Satoh H, Yamashita K, Washiyama N. Characterizing saccular aortic arch aneurysms from the geometry-flow dynamics relationship. J Thorac Cardiovasc Surg 2016 Nov 22. pii: S0022-5223(16)31626-9. doi: 10.1016/j.jtcvs.2016.11.032.
7. Di Marco A, Anguera I, Schmitt M, Klem I, Neilan T, White JA, Sramko M, Masci PG, Barison A, Mckenna P, Mordi I, Haugaa KH, Leyva F, Rodriguez Capitán J, Satoh H, Nabeta T, Dallaglio PD, Campbell NG, Sabaté X, Cequier Á: Late gadolinium enhancement and the risk for ventricular arrhythmias or sudden death in dilated cardiomyopathy: systematic review and meta-analysis. JACC Heart Fail 2016 pii: S2213-1779(16)30569-8. doi: 10.1016/ j.jchf.2016.09.017.
8. Suwa K, Saitoh T, Takehara Y, Sano M, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Sugiyama M, Wakayama T, Alley M, Sakahara H, Hayashi H. Intra-left ventricular flow dynamics in patients with preserved and impaired left ventricular function: analysis with three-dimensional cine phase contrast magnetic resonance imaging (4D-Flow). J Magn Reson Imaging 2016; 44: 1493–503. doi: 10.1002/jmri.25315.
9. Sano M, Satoh H, Suwa K, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Hayashi H, Saitoh T. Intra-cardiac distribution of late gadolinium enhancement in cardiac sarcoidosis and dilated cardiomyopathy. World J Cardiol 2016; 8 (9): 496-503. DOI:10.4330/ wjc.v8.i9.496
10. Sakamoto A, Saotome M, Hosoya N, Kageyama S, Yoshizaki T, Takeuchi R, Murata K, Nawada R, Onodera T, Takizawa A, Satoh H, Hayashi H. Aberrant serum polyunsaturated fatty acids profile is relevant with acute coronary syndrome. Heart Vessels 2016; 8:1209-17.

11, **佐藤　洋, 佐野　誠, 林　秀晴. 妊娠関連の急性心筋梗塞に対する集学的管理の重要性。循環器専門医「特集 II：第 79 回日本循環器学会学術集会」心疾患の妊娠と出産－チーム管理の重要性**　2016, 1: 21-6.

〔学会発表〕（計 11 件）

1. Hayashi H, Katoh H, Saotome M, Satoh H. Reperfusion arrhythmia and Ca^{2+} overload. The 80th Annual Meeting of Japanese Circulation Society, 2016.3, Sendai.
2. Kaneko Y, Satoh H, Sakakibara T, Sano M, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Hayashi H. Incomplete reduction in ^{18}F-fluoro deoxyglucose uptake on serial cardiac positron emission tomography (FDG-PET) by corticosteroid therapy in patients with cardiac sarcoidosis. The 80th Annual Meeting of Japanese Circulation Society, 2016.3, Sendai.
3. Sakakibara T, Suwa K, Saitoh T, Takehara Y, Kaneko Y, Sakakibara T, Sano M, Saotome M,

Urushida T, Katoh H, Satoh H, Sakahara H, Hayashi H. Changes in wall shear stress in pulmonary artery visualized with phase-resolved 3D cine phase contrast MRI (4D-Flow) in systemic sclerosis. The 80th Annual Meeting of Japanese Circulation Society, 2016.3, Sendai.

4. Sakakibara T, Suwa K, Saitoh T, Takehara Y, Kaneko Y, Sakakibara T, Sano M, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Sakahara H, Hayashi H. Quantitative evaluation of retrograde blood flow at ascending aorta in patients with aortic regurgitation by phase-resolved 3D-cine phase-contrast MRI (4D-Flow). The 80th Annual Meeting of Japanese Circulation Society, 2016.3, Sendai.
5. Sano M, Urushida T, Kaneko Y, Sakakibara T, Sato T, Sakamoto A, Ohtani H, Saitoh T, Saotome M, Katoh H, Satoh H, Hayashi H. Advantage and disadvantage of adaptive servo-ventilation on acute hemodynamic changes during pulmonary vein isolation with deep Sedation. The 80th Annual Meeting of Japanese Circulation Society, 2016.3, Sendai.
6. Saitoh T, Kanayama N , Niwayama M , Satoh H , Takahashi Y, Hozumi H, Saotome M , Urushida T , Katoh H , Uchida T , Hayashi H. Evaluation of tissue oxygen and hemoglobin on a novel near infra-red spectroscopy in emergency patients with poor general conditions. The 80th Annual Meeting of Japanese Circulation Society, 2016.3, Sendai.
7. Sakamoto A, Kaneko Y, Sakakibara T, Sato T, Sano M , Ohtani H , Saotome M, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H. The Novel risk scoring system P20-DAC2 can predict the functional significance of moderate stenosis in left anterior descending artery. The 80th Annual Meeting of Japanese Circulation Society, 2016.3, Sendai.
8. Yamashita S, Satoh H, Hayashi H, Urushida T, Saotome M , Ohtani H. A multidimensio nal approach using a dual biomarker method and cardiac imaging for the screening of Fabry disease with cardiac involvement. The 81th Annual Meeting of Japanese Circulation Society. 2017.3. Kanazawa.
9. Satoh T, Saotome M, Ohtani H, Urushida T, Satoh H, Hayashi H. Activation of mitochondrial ERK1/2 is involved in an intracellular renin-mediated ischemic resistance in diabetic hearts. The 81th Annual Meeting of Japanese Circulation Society. 2017.3. Kanazawa.
10. Sakakibara T, Suwa K, Saitoh T, Takehara Y, Kaneko Y, , Sano M, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Sakahara H, Hayashi H. Alterations in left ventricular (LV) flow dynamics in patients with intra-LV thrombus: Analysis with 3D-cine phase contrast MRI (4D-Flow). The 81th Annual Meeting of Japanese Circulation Society. 2017.3. Kanazawa.
11. Sakamoto A, Saotome M, Satoh T, Urushida T, Satoh H, Hayashi H. AMPK-activated protein kinase/dynamin-related protein-1 pathway contributes to eicosapentaenoic acid-mediated cardiac protection against lipotoxicity. The 81th Annual Meeting of Japanese Circulation Society. 2017.3. Kanazawa.

〔図書〕（計 2 件）

1. 佐藤　洋. いまさら訊けない！透析患者薬剤の考え方、使い方。加藤明彦編著。P115-118. III 循環器、脳血管　Question 1 透析患者の不整脈はどう診断し、どう治療すればよいですか？
2. 佐藤　洋.　透析患者診療に役立つ診断と重症度判定のためのアプローチ. II 臓器別アプローチ、循環器系、3. 心雑音 p124-125, 2016.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

６．研究組織

(1)研究代表者

佐藤　洋（SATO, Hiroshi）
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30293632

(2)研究分担者

早乙女　雅夫（SAOTOME Masao）
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：　70509512

(3) 研究分担者

漆田　毅（URUSHIDA Tsuyoshi）
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：20334980

(4) 研究分担者

加藤　秀樹（KATO Hideki）
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：80314029

(5) 研究分担者

林　秀晴（HAYASHI Hideharu）
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：50135258