

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

論文要旨

ドコサヘキサエン酸の血管弛緩作用とその機序に関する薬理学的研究

薬理学教室 佐藤 恭輔

【背景と目的】

ドコサヘキサエン酸 (DHA) は、魚油に多く含まれる n-3 系多価不飽和脂肪酸で、アテローム性動脈硬化症や高血圧症などの循環器系疾患に対して予防・改善効果を発揮することが知られている。これらの効果には、血小板凝集抑制や血管拡張が関与すると考えられるが、その詳細は十分には解明されていない。特に、血管の収縮・弛緩機能に対する DHA の即時的影響を検討した研究は意外に少なく、高濃度を用いても、得られる弛緩作用はそれほど強力とはいえない報告が多かった。

本研究では、DHA の血管緊張性に対する影響を検討する過程で、DHA がトロンボキサン A₂ (TXA₂) 受容体 (TP 受容体) アゴニストにより収縮させた血管を強力に弛緩させるという現象を見出し、DHA 以外の多価不飽和脂肪酸との効力を比較するとともに、その組織や動物種差を越えた普遍性の可能性と弛緩作用機序について検討した。

【実験方法】

1. 筋の機械的反応 : 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。気管標本で検討する場合は、Hartley 系雄性モルモット (4~6 週齢) より気管平滑筋を含む軟骨組織を摘出し、結合組織と気道上皮細胞を除去した後、約 2 mm 幅の輪状標本作製し、血管標本と同様に張力変動を等尺性に記録した。

2. 観血的血圧測定 : Wistar 系雄性ラット (8~10 週齢) をウレタンにて麻酔し、頸静脈から昇圧薬を持続注入することにより高血圧モデルを作製した。その後、DHA を大腿静脈に投与し、心血管系パラメータ (血圧、心拍数) の変化を観血的に記録した。

【結果および考察】

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、DHA (10^{-5} M) はTP受容体アゴニストであるU46619により収縮させた標本を強力に弛緩させた。DHAの弛緩作用は内皮保持標本、内皮剥離標本の両者で認められ、インドメタシン (Indo) や *N*^o-ニトロ-L-アルギニン (L-NNA) によって影響を受けなかった。ノルアドレナリン (NA) により収縮させた腸間膜動脈の内皮保持標本では、アセチルコリン (ACh) はIndoとL-NNAに抵抗性を示し、カリブドトキシン (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が、DHA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血管でもたらされるDHAによる弛緩反応は、PGI₂、NO、内皮由来過分極因子などの内皮由来弛緩因子を介したのではなく、血管平滑筋に対する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_{2α}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。腸間膜動脈でも同様の結果だった。U46619とPGF_{2α}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も、DHAは、AChやヒスタミン (His) による収縮反応を抑制しなかったが、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、モルモット気管標本においてもほぼ同様の現象が認められたことから、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_{2α}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ほとんど認められなかった。なお、EPA は、PE や高カリウムにより収縮させた標本は弛緩させなかった。一方、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。

4. DHA の血管弛緩作用に対する K⁺チャン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 Ca²⁺感受性 K⁺チャンネル (BK チャンネル、マキシ K チャンネル) 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 の弛緩作用は、BK チャンネルを抑制するイベリオトキシン (IbTX、10⁻⁷ M) や ChTX (10⁻⁷ M) で影響を受けなかった。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 チャンネルのほか、小コンダクタンス Ca²⁺感受性 K⁺チャンネル (SK チャンネル)、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⁺チャン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⁺チャンネルの活性化が関与することが示唆された。K_{ATP} チャン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} チャン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} チャンネルが関与すると判断しても良いと考えられた。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、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：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、DHA は 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（DHA 本体によりもたらされる作用）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、前述した 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ことが示された。

7. DHA の血圧に対する急性効果：ラットの静脈内に U46619 を持続注入して上昇した血圧は、DHA 投与により有意に下降した。DHA は、NA の持続注入により上昇した血圧は下降させなかった。また、生理食塩液を持続注入したラットの正常血圧にも影響しなかった。これらの結果から、TP 受容体アゴニストにより収縮させた血管の DHA による弛緩反応は、TP 受容体刺激が要因で上昇した血圧の下降に反映される可能性が示された。

【結 語】

本研究では、ラット血管標本とモルモット気管標本での DHA の弛緩作用とその機序、さらには DHA の降圧作用を解析し、以下の新知見を得た。

1. DHA は、TP 受容体や FP 受容体の刺激により収縮させた血管や気管標本を強力に弛緩させ、その作用は主として平滑筋に対する作用によりもたらされる。
2. 上述した DHA の弛緩作用には、DHA 本体のほかその CYP 依存性エポキシゲナーゼ代謝物も関与し、後者の作用機序に K⁺チャンネルの活性化が関与する。
3. DHA による TP 受容体刺激により収縮させた血管の拡張作用は、血圧の即時的（急性的）な下降に反映されうる。

以上の作用は、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思われる。DHA は TP 受容体刺激を介した気管標本の収縮も抑制することから、TXA₂ を原因として発症する気管支ぜん息の予防や改善効果を発揮する可能性も期待される。

博士論文審査報告(課程)

佐藤 恭輔 氏 (論文題名:ドコサヘキサエン酸の血管弛緩作用と
その機序に関する薬理学的研究)

佐藤恭輔氏より提出された学位論文を審査し、以下のように評価する。

ドコサヘキサエン酸(DHA)は、n-3 系に分類される多価不飽和脂肪酸(PUFA)で、魚油に含有されている。DHA が多彩な生理活性を示し、また、各種循環器系疾患に対して有意な予防効果や改善効果を示す可能性については、数多くの報告がなされてきた。その機序として、血小板凝集抑制や血管拡張が関与すると推定されているが、依然としてその詳細については不明の点が多い。佐藤氏は、DHA が TP 受容体を介した血管収縮を強力に抑制しうる可能性に注目し、その作用の普遍性と機序の解明を追究した。

まず、佐藤氏は、ラットの導管動脈である大動脈を用いて DHA の弛緩作用を調べ、DHA が TP 受容体や FP 受容体などのプロスタノイド受容体を介した収縮を選択的に抑制する可能性を見出し、これが内皮を介さない平滑筋直接作用によるものであることを示した。また、プロスタノイド受容体選択的血管収縮抑制作用は、n-6 系 PUFA であるリノール酸(LA)では引き起こされないが、DHA と同様 n-3 系 PUFA に分類されるエイコサペンタエン酸(EPA)でももたらされることを見出した。さらに、ラット大動脈で見出した現象が、ラット腸間膜動脈やモルモット気管標本でも成立することを示し、導管動脈でのみ認められる特殊なものではなく、組織差や動物種差を越えて成立する普遍的なものであることを示した。

佐藤氏は、DHA の平滑筋弛緩作用の機序についても薬理学的に追究し、DHA 本体のほかに CYP 依存性エポキシゲナーゼ代謝物が関与し、その機序の一部に K^+ チャネルが関与することも見出した。また、DHA によるプロスタノイド受容体選択的血管収縮抑制作用が、即時的な血圧の低下につながる可能性も示した。

これら本論文の内容は、すでに3報の学術論文としてまとめられ、英文誌に掲載または受理済みである。このうち、Biological & Pharmaceutical Bulletin (BPB) に掲載された論文は、「Highlighted paper selected by Editor-in-Chief」に選定された。

以上、佐藤氏の論文は、n-3 系 PUFA の平滑筋組織での新しい薬理作用と機序を見出すとともに、これまで疫学的調査により示されてきた魚油や n-3 系 PUFA 摂取の循環保護効果の妥当性に対して科学的根拠を与えるものであり、薬理学や薬物治療学、生化学研究の進歩に寄与するとともに、社会的還元力も大であると考えられることから、博士(薬学)の学位を授与するに充分価するものと判断する。

2014年 2月 26日

薬理学教室
田中芳夫