

# 東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

|           |   |
|-----------|---|
| タイトル      | n 3系多価不飽和脂肪酸による胃底平滑筋の収縮抑制効果の機序の解明   |
| 作成者（著者）   | 徐, 可悦   |
| 公開者       | 東邦大学  |
| 発行日       | 2024.03.13  |
| 掲載情報      | 東邦大学大学院薬学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.   |
| 資料種別      | 学位論文  |
| 内容記述      | 主査: 高原, 章/  |
| 著者版フラグ    | none  |
| 報告番号      | 32661甲第1109号  |
| 学位記番号     | 甲第140号  |
| 学位授与年月日   | 2024.03.13  |
| 学位授与機関    | 東邦大学  |
| メタデータのURL | <a href="https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28225118">https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28225118</a> |

## 論文要旨

### n-3 系多価不飽和脂肪酸による胃底平滑筋の収縮抑制効果の機序の解明

薬物治療学分野 徐 可悦

#### 【背景と目的】

n-3 系多価不飽和脂肪酸は、n-3 位に二重結合を有する脂肪酸であり、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、エイコサペンタエン酸 (EPA) がその代表例である。多くの疫学調査や臨床研究から、DHA、EPA の長期的な摂取はプロスタノイドの過剰産生を抑制することにより、循環器系に対する保護効果などの有益な効果をもたらすことが数多く報告されていたが、これらの脂肪酸の即時的効果に関する検討は十分には行われていなかった。この点に関して、当教室では、DHA、EPA が U46619 (トロンボキサン A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 誘導体) 及びプロスタグランジン (PG) F<sub>2α</sub> による血管平滑筋の収縮反応を強力かつ即時的に抑制することを明らかにし、これらの作用にプロスタノイド TP 受容体拮抗作用が関与することを報告した。したがって、DHA、EPA は、長期摂取によるプロスタノイド産生抑制に加え、プロスタノイドを介した血管収縮を即時的に抑制することで循環器系に対する保護効果を示すと考えられる。

プロスタノイドは、血管などの持続性収縮を引き起こす平滑筋 (tonic 筋) だけでなく、消化管などの一過性収縮を引き起こす平滑筋 (phasic 筋) でもそれらの収縮機能の異常に関与している可能性がある。とりわけ、胃底平滑筋では、多くのプロスタノイドが収縮作用を示し、その過剰産生が胃の運動機能異常をもたらすことが知られている。各種プロスタノイドによる胃の収縮反応に TP 受容体が関与するとすれば、DHA、EPA がそれらの収縮を即時的に抑制することが期待される。しかし、胃底平滑筋のプロスタノイドによる収縮反応に対する DHA、EPA の即時的効果に関する検討は行われていなかった。

一方、当教室では、モルモット回腸・結腸縦走筋の収縮反応に対する DHA、EPA の抑制効果を検討した結果、プロスタノイド (PGF<sub>2α</sub>、PGD<sub>2</sub>) に加えて、アセチルコリン (ACh) やヒスタミンによる収縮反応も抑制することを見出した。また、これらの抑制作用の機序を検討した結果、DHA、EPA が電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネル (VDCC) に対して抑制をもたらす可能性を示した。腸管平滑筋と同様に、胃底平滑筋は、プロスタノイドに加えて、各種非プロスタノイド性物質によっても収縮が引き起こされる。したがって、胃底平滑筋においても、DHA が下部消化管平滑筋と同様の収縮抑制効果及び VDCC に対する抑制を示し、これが胃の運動機能に対する抑制をもたらす可能性が考えられた。

そこで、本研究では、胃底平滑筋の各種プロスタノイドによる収縮反応に対する DHA、EPA の即時的効果を明らかにするため、5 種類のプロスタノイド及び U46619 によるモルモット胃底平滑筋の収縮反応に対する DHA、EPA の抑制効果とその機序を薬理的に検討し、n-6 系多価不飽和脂肪酸であるリノール酸 (LA) の効果と比較した。また、モルモット胃底平滑筋において、ACh 誘導体であるカルバコール (CCh) と 21 種類の生理活性物質の収縮作用を評価し、CCh、アンジオテンシン II (Ang II)、ブラジキニン (BK) に検出可能で定量化に適する収縮効果を認めたので、これら 3 種類の収縮物質に対する DHA の抑制効果とその機序を薬理

学的に検討した。

### 【実験方法】

1. 筋の機械的反応の記録：Hartley 系雄性モルモットから胃を摘出し、胃底平滑筋標本を作製した。標本は、栄養液を満たした器官槽内に懸垂し、張力変動を等尺性に測定した。
2. mRNA 発現量の測定：摘出したモルモット胃底平滑筋標本から全 RNA を抽出した。RT-qPCR により、各種プロスタノイド受容体の mRNA の発現量を測定した。
3. 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変動の測定： $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬 (Fura-2) を用いて、培養細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を測定した。

### 【結果及び考察】

#### 1. 5 種類のプロスタノイド及び U46619 による胃底平滑筋の収縮反応に対する DHA、EPA、LA の影響の検討

DHA、EPA ( $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) は、検討したすべてのプロスタノイド [ $\text{PGA}_2$  ( $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ )、 $\text{PGD}_2$  ( $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ )、 $\text{PGE}_2$  ( $10^{-7} \text{ M}$ )、 $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $10^{-6} \text{ M}$ )、 $\text{PGI}_2$  ( $10^{-6} \text{ M}$ )] 及び U46619 ( $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) による胃底平滑筋の収縮反応を有意に抑制し、抑制の強さは以下のとおりだった： $\text{PGD}_2 \approx \text{U46619}$  (50–75%)  $\geq \text{PGI}_2 \approx \text{PGA}_2$  (40–60%)  $\geq \text{PGF}_{2\alpha} \approx \text{PGE}_2$  (30–40%)。LA ( $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) に関しては、統計的な有意差が認められたのは、 $\text{PGD}_2$ 、U46619 による収縮に対してのみであったが、DHA、EPA と同様の抑制傾向を示した。以上の結果から、DHA、EPA、LA は、プロスタノイド類の収縮を抑制するものの、抑制の程度には、プロスタノイドの種類により差があることが明らかとなり、これらの不飽和脂肪酸の抑制作用に TP 受容体拮抗が関与していると仮定すると、収縮に対する TP 受容体の寄与に差がある可能性が示唆された。

#### 2. 胃底平滑筋の収縮に関与するプロスタノイド受容体の分子種と DHA、EPA、LA の抑制効果の関連性の検討

プロスタノイド類による胃底平滑筋の収縮反応に対する TP 受容体及びそれ以外のプロスタノイド受容体の分子種の関与の可能性を検証する目的で、胃底平滑筋におけるプロスタノイド受容体の mRNA 発現量を測定した。その結果、収縮性のプロスタノイド受容体の mRNA 発現量は、 $\text{TP} \approx \text{EP}_3 \gg \text{FP} > \text{EP}_1$  の順に多く、TP 受容体及び  $\text{EP}_3$  受容体の関与が示唆された。そこで、各種プロスタノイド類による収縮反応に対するそれぞれの受容体の寄与率を明らかにする目的で、選択的拮抗薬による抑制効果を検討した。その結果、SQ 29,548 (TP 受容体拮抗薬、 $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) による抑制率は、 $\text{PGD}_2 \approx \text{U46619}$  (60–70%)  $> \text{PGI}_2 \approx \text{PGA}_2$  (25–40%)  $> \text{PGF}_{2\alpha} \approx \text{PGE}_2$  (約 5%) の順に大きかった。また、L-798,106 ( $\text{EP}_3$  受容体拮抗薬、 $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) による抑制率は、 $\text{PGA}_2$  (約 50%)  $> \text{PGE}_2 \approx \text{PGI}_2$  (約 35%)  $> \text{PGD}_2 \approx \text{PGF}_{2\alpha}$  (約 20%) の順に大きかった。これらの結果から、各種プロスタノイド類による収縮反応に対する SQ 29,548 の抑制率は、DHA、EPA、LA による抑制率と関連性が高く、L-798,106 による抑制率とは関連性が低い可能性が示された。実際、各種プロスタノイド類による収縮反応に対する DHA、EPA、LA の抑制率は SQ 29,548 の抑制率と正の相関が認められたが、L-798,106 の抑制率とは正の相関が認められなかった。

### 3. DHA、EPA、LA の TP 受容体に対する阻害様式の検討

これまでの結果から、DHA、EPA、LA が TP 受容体を標的として、これを抑制する可能性が示唆されたので、その機序をさらに検討することにした。DHA、EPA ( $10^{-5}$  M、 $3 \times 10^{-5}$  M) は U46619 の濃度反応曲線 ( $10^{-9}$ – $3 \times 10^{-6}$  M) を濃度依存性に抑制し、シルドプロットの回帰直線の傾きは、DHA、EPA いずれも 1 と有意な差が認められなかったことから、TP 受容体における競合的拮抗が示された。なお、 $pA_2$  値は、DHA (5.13) と EPA (4.92) で差が認められなかった。また、LA ( $10^{-5}$  M、 $3 \times 10^{-5}$  M) も U46619 による収縮反応に対して抑制作用を示し、TP 受容体を標的としてこれを抑制する可能性が考えられた。しかし、LA ( $3 \times 10^{-5}$  M) は、TP 受容体発現細胞における U46619 ( $10^{-8}$  M) による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇に対して、U46619 による収縮反応に対する抑制効果を十分に説明できるほど強力な抑制を示さなかった。したがって、仮に、LA に TP 受容体拮抗作用があったとしても、その収縮抑制作用の主たる機序ではないと判断した。以上の結果から、DHA、EPA による TP 受容体を介した収縮反応の抑制効果は、血管平滑筋などの tonic 筋で認められる限定的な効果ではなく、胃底平滑筋などの phasic 筋でも成立する普遍的な効果である可能性が示された。

### 4. 胃底平滑筋のプロスタノイド類による収縮に対する VDCC の寄与と VDCC を介した収縮反応に対する DHA、EPA、LA の効果

これまでの結果から、胃底平滑筋においても、DHA、EPA のプロスタノイド類による収縮の抑制に TP 受容体拮抗が関与することが明らかとなった。しかし、DHA、EPA は、TP 受容体拮抗薬によりほとんど抑制されない収縮に対しても抑制効果を示したことから、TP 受容体拮抗以外の抑制機序の関与が示唆された。また、DHA、EPA が U46619 の濃度反応曲線の最大を抑制したことから、非競合的拮抗作用、例えば VDCC に対する抑制の可能性が示唆された。そこで、プロスタノイド類による収縮反応に VDCC が関与する可能性を検証する目的で verapamil ( $10^{-5}$  M) の抑制効果を検討し、40–85%の抑制を認めた。また、LA は 80 mM KCl による収縮を抑制しなかったが、DHA、EPA には、20–40%の抑制を認めたので、VDCC が DHA、EPA の標的になることが示唆され、当教室の回腸・結腸の結果と一致した。

### 5. プロスタノイド類に対する LA の抑制作用の機序の検討

LA は、今回検討したプロスタノイド類のうち、特に、TP 受容体の関与が大きいと考えられる  $PGD_2$  及び U46619 による収縮に対して強い抑制効果を示したが、これまでの結果から、TP 受容体拮抗、VDCC 抑制が関与する可能性は低いと判断された。一方、verapamil 存在下で残存した U46619 による収縮成分が LA ( $3 \times 10^{-5}$  M) により有意に抑制されたほか、ストア作動性  $Ca^{2+}$  チャンネル (SOCC) 抑制作用を有する SKF 96365 ( $3 \times 10^{-5}$  M) により有意に抑制されたことから、LA による TP 受容体を介した収縮の抑制に SOCC に対する抑制が関与する可能性が示唆された。

### 6. 非プロスタノイドによる胃底平滑筋の収縮反応に対する DHA の影響の検討

DHA ( $3 \times 10^{-5}$  M) は、CCh ( $6 \times 10^{-8}$  M)、Ang II ( $10^{-7}$  M)、BK ( $10^{-6}$  M) による収縮のいずれに対しても抑制効果を示した。次に、これらの収縮に対する DHA の抑制効果の機序の可能性を追究する目的で、特に  $Ca^{2+}$  流入経路に着目して薬理的な解析を行った。その結果、いずれの収縮も外液  $Ca^{2+}$  を除去することでほぼ完全に抑制された。また、いずれの収縮も

verapamil ( $10^{-5}$  M) によって抑制されたが、抑制の程度は刺激によって差が認められた。とりわけ、BK による収縮は verapamil 存在下でも約 80% 残存した。Verapamil 存在下で残存した BK による収縮反応は、SKF 96365 ( $3 \times 10^{-5}$  M) により強力に抑制された。以上の結果から、プロスタノイド類による収縮に対する抑制効果と同様に、CCh、Ang II、BK による収縮に対する DHA の抑制効果に VDCC を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入の抑制が関与している可能性が示唆された。一方、BK による収縮反応に対する抑制では、DHA が SOCC を標的としてこれを抑制する可能性も示唆された。

#### 7. DHA が SOCC を標的とする可能性の検証

SOCC は (筋) 小胞体 (SER) の  $\text{Ca}^{2+}$  枯渇により活性化される  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路である。シクロピアゾン酸 (CPA) は SER  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 阻害薬で、SER の  $\text{Ca}^{2+}$  枯渇を引き起こすため、SOCC を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇とこれに伴う平滑筋の収縮を引き起こす。そこで、DHA が SOCC を標的とする可能性を検証する目的で、CPA による胃底平滑筋の収縮に対する DHA の抑制効果を検討した。その結果、DHA ( $3 \times 10^{-5}$  M) が CPA ( $3 \times 10^{-5}$  M) による収縮反応を有意に抑制することが示された。また、 $\text{Ca}^{2+}$  を含まない溶液中で CPA ( $10^{-5}$  M) を処置した 293T 細胞において、DHA ( $3 \times 10^{-5}$  M) は、 $\text{Ca}^{2+}$  (1.8 mM) 添加による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を有意に抑制した。なお、胃底平滑筋を用いて SOCC 関連分子を mRNA レベルで検討したところ、 $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの本体である Orai チャネルでは *Orai1*、*Orai3*、その活性化を制御する SER  $\text{Ca}^{2+}$  センサーである STIM では *Stim2* の高い発現を認めた。以上の結果から、DHA が SOCC を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入を抑制することが明らかとなり、この機序が DHA による胃底平滑筋の収縮抑制に反映される可能性が示された。

#### 【結 語】

本研究では、モルモット胃底平滑筋のプロスタノイド類及び非プロスタノイド類による収縮反応に対する n-3 系多価不飽和脂肪酸の抑制効果を検討し、以下の新知見を得た。

1. DHA、EPA はプロスタノイド類による収縮反応を抑制する。これらの抑制効果には、TP 受容体拮抗及び VDCC シグナリング抑制が関与する。
2. LA も TP 受容体を介した収縮反応を抑制する。この効果には SOCC に対する抑制が関与する。
3. DHA は、CCh、Ang II、BK による収縮反応を抑制する。これらの効果には VDCC シグナリング抑制が関与する。また、BK による収縮の抑制には、SOCC を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入の抑制が関与する。

#### 【対 象 論 文】

- 1) Xu K, Shimizu M, Murai C, Fujisawa M, Ito D, Saitoh N, Nakagome Y, Yamashita M, Murata A, Oikawa S, Ou G, Yoshioka K, Obara K, Tanaka Y. Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid strongly inhibit prostanoid TP receptor-dependent contractions of guinea pig gastric fundus smooth muscle. Pharmacol Res Perspect. 10(3): e00952, 2022. <http://doi.org/10.1002/prp2.952>

# 学位論文審査報告書

報告書記載: 2024年2月15日

|  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| 学位申請者名   | 徐 可悦                              |
| 論文題目   | n-3系多価不飽和脂肪酸による胃底平滑筋の収縮抑制効果の機序の解明 |
| 審査委員名  | 主査 高原 章<br>副査 田中 光<br>副査 宮内 正二    |
| 学位論文の審査結果の要旨：<br><p>n-3系多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸（DHA）およびエイコサペンタエン酸（EPA）がプロスタノイド類により惹起される胃底平滑筋収縮に対し即時的な抑制効果を発揮することを実験的に明らかにし、そのメカニズムを明確にした学位論文である。最初の研究で、DHAおよびEPAが5種類のプロスタノイドおよびプロスタノイド誘導体U46619による胃底平滑筋収縮反応を抑制し、その抑制強度はプロスタノイドの種類により異なり、PGD<sub>2</sub>およびU46619による収縮に対する抑制が強く認められることを示した。回腸平滑筋を用いた先行研究で得られているDHAおよびEPAがプロスタノイドTP受容体に作用するという知見に基づき、プロスタノイド類が胃底平滑筋収縮を収縮させる際のTP受容体の寄与はプロスタノイドの種類により差がある可能性を提示した。胃底平滑筋ではプロスタノイド受容体の中でTP受容体のmRNA発現量が最も多いという実験データ、ならびに、プロスタノイド類による胃底平滑筋収縮に対するTP受容体拮抗薬SQ29, 548の抑制強度の違いの序列がDHAおよびEPAを用いた結果と類似しているという薬理学的データを提示し、TP受容体の寄与を考察している。DHAおよびEPAは、U46619で誘発される胃底平滑筋収縮反応の濃度反応曲線に対して濃度依存的な抑制を示し、シルドプロット解析によりDHAおよびEPAはTP受容体に対し競合拮抗すると結論づけている。このように、n-3系多価不飽和脂肪酸がTP受容体に対して相互作用を示すことを多面的に裏付けている。加えて、DHAおよびEPAは、TP受容体拮抗作用に加えて、電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルに対する抑制作用を有することも確認している。引き続き行われた研究で、DHAがストア作動性Ca<sup>2+</sup>チャンネルに対し抑制作用を示すことをブラジキニンによる胃底平滑筋収縮反応の機序解析の中で明らかにし、ストア作動性Ca<sup>2+</sup>チャンネル関連分子のmRNA解析を通じてDHAのストア作動性Ca<sup>2+</sup>チャンネルへの相互作用を裏付けている。</p> <p>本研究は胃の運動機能調節機構を分子レベルで理解する上で重要な情報を含んでおり、研究の進展により薬物治療戦略の構築への貢献が期待される。研究目的は明確であり、その目標に向けた研究計画を論理的に組み立て、適切に実施している。得られた結果は公正に判断され、それに基づいて次なる実験を計画して研究成果を積み重ねてきたことが学位論文から判断される。審査委員との面談においても実験内容や結果の解釈についての説明は丁寧かつ科学的根拠に基づいていた。研究に対する姿勢は好感が持てるものであり、学術的な知識を含め審査委員全員が評価している。</p> <p>徐可悦氏の研究成果は今後の薬物治療戦略構築に向けた新しい情報と知見を与えうるものである。この学位論文の内容は既に学術論文英文誌に公表されている。以上より、本審査論文は博士（薬学）の学位に十分に値するものと評価する。</p> |                                   |