

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591336

研究課題名(和文) 多価不飽和脂肪酸を用いた血管内皮抗酸化システムの活性化戦略の意義を明らかにする。

研究課題名(英文) The effects of omega-3 PUFA on vascular function

研究代表者

西尾 善彦(Nishio, Yoshihiko)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：40281084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：n-3 PUFAs、なかでもDHAが転写因子Nrf2を活性化することにより、内皮細胞における抗酸化ストレス作用を示すことを示した。さらに、DHAによるNrf2の活性化作用は、DHAの末端の2重結合が酸化されて生成される4-hydroxy hexenal (4-HHE)による作用であることが明らかになった。興味深いことに、n-6 PUFAsであるアラキドン酸(ARA)より同様の機序で生成される4-hydroxy nonenal (4-HNE)にも同様の作用が認められ4-HHEや4-HNEは培養内皮細胞を酸化ストレスから保護する作用が認められた。

研究成果の概要(英文)：We tested whether n-3 PUFAs showed antioxidant activity through the activation of Nrf2, a master transcriptional factor for antioxidant genes. C57BL/6 or Nrf2^{-/-} mice were fed a fish-oil diet. Fish-oil diet significantly increased the expression of heme oxygenase-1 (HO-1), and endothelium-dependent vasodilation in the aorta of C57BL/6 mice, but not in Nrf2^{-/-} mice. Furthermore, we observed that 4-hydroxy hexenal (4-HHE), an end-product of n-3 PUFA peroxidation, was significantly increased in the aorta of C57BL/6 mice, accompanied by intra-aortic predominant increase in DHA rather than that in EPA. Human umbilical vein endothelial cells were incubated with DHA or EPA. We found that DHA, but not EPA, markedly increased intracellular 4-HHE, and nuclear expression and DNA binding of Nrf2. Both DHA and 4-HHE also increased the expressions of Nrf2 target genes including HO-1. Furthermore, DHA prevented oxidant-induced cellular damage and this effect was disappeared by the siRNA of Nrf2.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：酸化ストレス 血管内皮

1. 研究開始当初の背景

インスリン抵抗性/メタボリックシンドロームにおける血管障害において血管内皮での酸化ストレスの蓄積の重要性が明らかにされている。しかしながら、抗酸化剤による治療はこれまでのところ有効性を示せていない。

2. 研究の目的

本研究ではインスリン抵抗性状態に起因する血管障害における細胞の抗酸化システムのマスターレギュレーターである Nrf2 活性化の意義を明らかにし、Nrf2 の活性化を分子標的とする治療戦略の有用性を示す。

3. 研究の方法

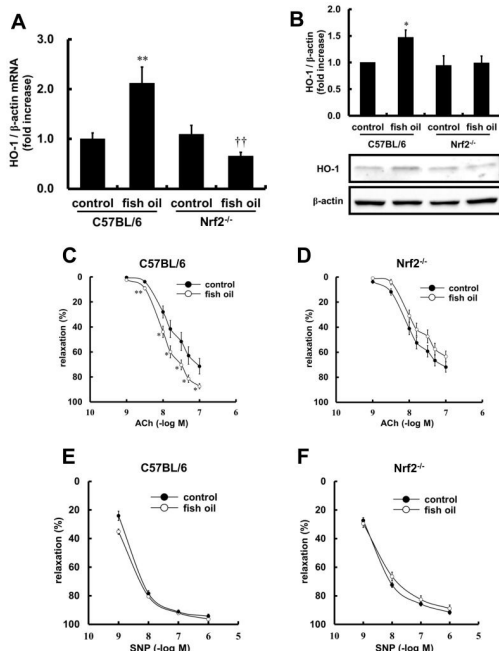
n-3 PUFAs を Keep1-Nrf2 システムの活性化薬として使用し、Nrf2 ノックアウトマウスを用いて、インスリン抵抗性/高インスリン血症状態での内皮機能障害および血管炎症反応が亢進していることを明らかにする。

4. 研究成果 D

1) Nrf-2 を介する魚油の大動脈に対する効果について

転写因子 Nrf2 を介する魚油食の血管組織への効果を検討するために、我々は血管組織における HO-1 遺伝子の発現を検討した。

魚油食を投与したマウス群では対照食群のマウスに比較して軽度の体重の増加を認めしたが、対照マウス (C57BL/6) と Nrf2^{-/-} マウス間では差を認めなかった。血清中のトリグリセリド濃度は対照食群および魚油食群ともに Nrf2^{-/-} マウス群で上昇していたが、血糖値、総コレステロール値、遊離脂肪酸値には 4 群間で差を認めなかった。図 A に魚油食による胸部大動脈での HO-1 遺伝子の発現に対する効果を示した。魚油食は HO-1 遺伝子の発現を対照マウスにおいて有意に



増加させたものの、Nrf2^{-/-} マウスにおいてはその効果を認めなかった。

図 B に示すように、HO-1 蛋白の発現に関しても魚油食の効果を Nrf2^{-/-} マウスにおいて認めなかった。

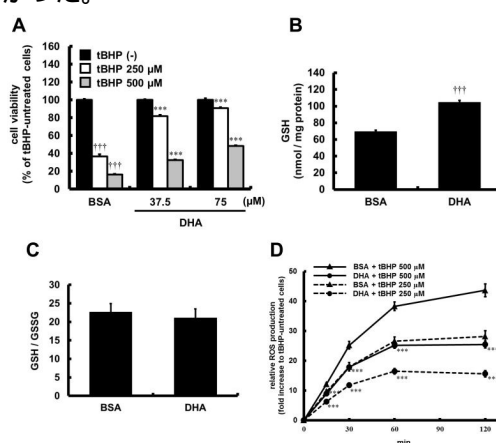
次に、魚油食が大動脈のアセチルコリン依存性血管弛緩反応に影響を与えるか否かについて検討を行った。対照マウスにおいて、魚油食は大動脈のアセチルコリン依存性血管弛緩反応を有意に増加させた。対照的に、Nrf2^{-/-} マウスにおいては魚油食の大動脈のアセチルコリン依存性血管弛緩反応に対する効果が消失していた (図 C、D)。魚油食による SNP 依存性の血管弛緩反応にたいする効果も検討したが、魚油食は SNP 依存性の血管弛緩反応に影響しなかった (図 E、F)。

このような結果から、魚油食は転写因子 Nrf2 を介して内皮依存性の血管弛緩反応を亢進させていると考えられた。

2) DHA による酸化ストレスを介した細胞障害抑制効果について

tBHP を介した酸化ストレスによる細胞障害を DHA が抑制するかをヒト臍帯静脈内皮細胞において検討した。図 A は tBHP による酸化ストレス誘導後 6 時間における細胞の生存率を MTT 解析にて検討した結果を示している。250 μM もしくは 500 μM の tBHP は濃度依存性の細胞毒性を示すが、DHA であらかじめ 16 時間処置しておいた場合は有意に tBHP の毒性が現弱していた。

図 B と C は細胞内の還元型グルタチオン (GSH) 濃度と還元型と酸化型グルタチオンの比をそれぞれ示している。内皮細胞を 16 時間 DHA と孵置することにより、細胞内 GSH 濃度は対照の 1.5 倍に増加した。還元型と酸化型グルタチオンの比には変化を認めなかった。

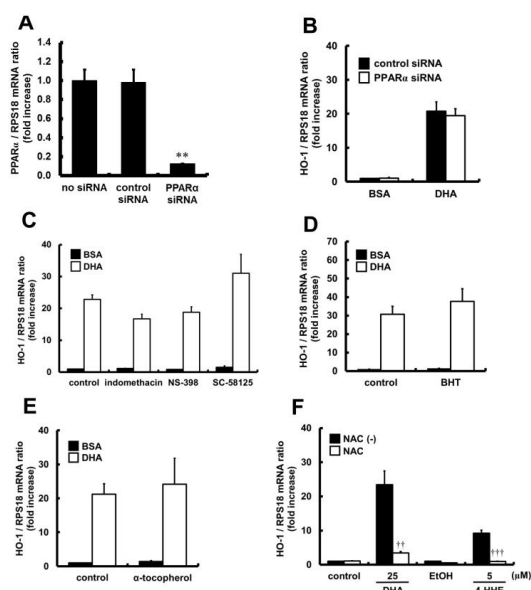


さらに、DHA の抗酸化活性を検討する目的で、tBHP で処理した内皮細胞における活性酸素種の合成を検討した。250 および 500 μM の tBHP で処理した細胞は図 D に示すように tBHP 濃度依存性に活性酸素種を合成した。一方、培養内皮細胞を DHA と 16 時間孵置することにより、活性酸素種の合成は有意に減少した。

3) 培養血管内皮細胞における DHA による HO-1 遺伝子発現誘導の分子機構の検討

DHA による転写因子 Nrf2 の活性化の分子機構を検討するために、Nrf2 活性化の上流のシグナル経路を検討した。まず、内皮細胞に PPAR の siRNA を導入して PPAR 遺伝子発現の抑制を試みた。図 A は PPAR 遺伝子発現の抑制効果を示しているが、PPAR の遺伝子発現は 87% 抑制された。しかしながら、図 B に示すように DHA による HO-1 遺伝子のは PPAR 遺伝子発現を抑制しても変化しなかった。

次に、内皮細胞をシクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害薬あるいは抗酸化薬と孵置して DHA による HO-1 遺伝子の発現を検討した。その結果を図 C から E に示すが、COX1 や COX2 の阻害薬および抗酸化薬の BHT やビタミン E は HO-1 遺伝子の発現に影響しなかった。しかしながら、図 F に示すようにグルタチオンの前駆物質である N アセチルシステイン (NAC) は DHA による HO-1 遺伝子の発現を著明に抑制した。



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 6 件)

1: Kondo K, Morino K, Nishio Y, Kondo M, Nakao K, Nakagawa F, Ishikado A, Sekine O, Yoshizaki T, Kashiwagi A, Ugi S, Maegawa H. A fish-based diet intervention improves endothelial function in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus: A randomized crossover trial. Metabolism. In press 2014 (査読有り)

2: Nakagawa F, Morino K, Ugi S, Ishikado A, Kondo K, Sato D, Konno S, Nemoto K, Kusunoki C, Sekine O, Sunagawa A, Kawamura M, Inoue N, Nishio Y, Maegawa H.

4-Hydroxy hexenal derived from dietary n-3 polyunsaturated fatty acids induces anti-oxidative enzyme heme oxygenase-1 in multiple organs. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Jan 17;443(3):991-6. (査読有り)

3: Ishikado A, Morino K, Nishio Y, Nakagawa F, Mukose A, Sono Y, Yoshioka N, Kondo K, Sekine O, Yoshizaki T, Ugi S, Uzu T, Kawai H, Makino T, Okamura T, Yamamoto M, Kashiwagi A, Maegawa H. 4-Hydroxy hexenal derived from docosahexaenoic acid protects endothelial cells via Nrf2 activation. PLoS One. 2013 Jul 23;8(7):e69415. (査読有り)

4: Ushio M, Nishio Y, Sekine O, Nagai Y, Maeno Y, Ugi S, Yoshizaki T, Morino K, Kume S, Kashiwagi A, Maegawa H. Ezetimibe prevents hepatic steatosis induced by a high-fat but not a high-fructose diet. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2013 Jul 15;305(2):E293-304. (査読有り)

5: Kusunoki C, Yang L, Yoshizaki T, Nakagawa F, Ishikado A, Kondo M, Morino K, Sekine O, Ugi S, Nishio Y, Kashiwagi A, Maegawa H. Omega-3 polyunsaturated fatty acid has an anti-oxidant effect via the Nrf-2/HO-1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jan 4;430(1):225-30. (査読有り)

6: Yamamoto H, Morino K, Nishio Y, Ugi S, Yoshizaki T, Kashiwagi A, Maegawa H. MicroRNA-494 regulates mitochondrial biogenesis in skeletal muscle through mitochondrial transcription factor A and Forkhead box j3. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012 Dec 15;303(12):E1419-27 (査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 第 23 回日本糖尿病合併症学会 シンポジウム 3
血管内皮細胞機能改善をめざした治療戦略
西尾善彦
2013 年 9 月 13 日 旭川

2. 第 56 回日本糖尿病学会 Symposium 15 (Diabetes and Macrovascular Complications)
The effects of omega-3 PUFA on vascular function
西尾善彦
2013 年 5 月 18 日 熊本

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

6. 研究組織

(1)研究代表者

西尾 善彦 (Nishio Yoshihiko)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：40281084