

【原著論文】

## L-NAME誘発性高血圧ラットの endothelial 機能不全と 心臓リモデリングに対する魚油摂取の効果

藺田 邦博<sup>i)</sup>      河野 有華<sup>i)</sup>  
大竹 一男<sup>ii)</sup>      竹之内康広<sup>iii)</sup>      柴 祥子<sup>ii)</sup>  
小林 順<sup>iv)</sup>      加園 恵三<sup>ii)</sup>

<sup>i)</sup> 金城学院大学 生活環境学部 食環境栄養学科

<sup>ii)</sup> 城西大学 薬学部 薬学科

<sup>iii)</sup> 川崎医科大学 医学部 医学科

<sup>iv)</sup> 城西大学 薬学部 医療栄養学科

### Effect of Dietary Fish oil on the Endothelial Dysfunction and Cardiac Remodeling in L-NAME-Induced Hypertension Rat

Kunihiro SONODA<sup>i)</sup>,      Yuka KONO<sup>i)</sup>  
Kazuo OHTAKE<sup>ii)</sup>,      Yasuhiro TAKENOUCI<sup>iii)</sup>,      Sachiko SHIBA<sup>ii)</sup>  
Jun KOBAYASHI<sup>iv)</sup>,      Keizo KASONO<sup>ii)</sup>

<sup>i)</sup> Department of Food and Nutritional Environment, College of Human Life and Environment, Kinjo Gakuin University, Nagoya, Japan.

<sup>ii)</sup> Division of Physiology, School of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Josai University, Saitama, Japan.

<sup>iii)</sup> Department of Pharmacology, Kawasaki Medical School, Okayama, Japan.

<sup>iv)</sup> Department of Clinical Dietetics and Human Nutrition, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Josai University, Saitama, Japan.

#### 要約

【背景・目的】 n-3系多価不飽和脂肪酸であるEPAやDHAを含む魚油の摂取は血管内皮機能を改善することで心血管疾患の死亡リスクを低下させる。本研究では、内因性の一酸化窒素（以下、NO）の減少が魚油摂取による心血管機能改善効果に与える影響を明らかにすることを目的とし、内因性NO合成を阻害したL-NAME誘発性高血圧ラットに魚油を摂取させ内皮機能および心臓リモデリングに与える影響を検討した。【方法】 7週齢の雄性Sprague-DawleyラットをControl群、NO合成阻害剤（L-NAME）を与えたL-NAME群、L-NAMEと魚油を与えた魚油群、L-NAMEとACE阻害剤のCaptoprilを与えたCaptopril群に分け8週間飼育した。解剖前に麻酔下で動脈血圧を測定した後、心臓、胸部大動脈を摘出した。心臓は病理標本を作製して心肥大と線維化の評価およびRT-PCR法を用いて線維化関連因子と心臓マーカーのmRNA発

現レベルの評価を行った。また、解剖時に摘出した胸部大動脈を用い血管弛緩反応の評価を行った。【結果・考察】 L-NAME処置は、血圧上昇、心肥大、線維化に関わるmRNA発現レベルを増加した。魚油摂取は、これらを抑制しなかったがCaptoprilはすべての測定項目でControl群と同程度まで改善した。また、L-NAME処置による内皮機能の低下については魚油摂取とCaptoprilともに改善しなかった。【結論】 内因性NO合成が阻害される条件下では、魚油摂取による心血管機能改善効果が減弱することが示唆された。

キーワード：N3-PUFA、魚油、一酸化窒素、心臓リモデリング、血管内皮機能

## 1) はじめに

高血圧は、全世界の主要な死因となっている心血管疾患（冠状動脈性心疾患や脳卒中など）の危険因子<sup>1)</sup>であり、世界の高血圧有病率は、2019年時点で女性32%（6億2,600万人）、男性34%（6億5,200万人）と推定されている<sup>2)</sup>。

高血圧や心疾患の発症や病態進展に関わる主要な生体内物質に一酸化窒素（Nitric Oxide：NO）がある。NOは、血管拡張作用、抗炎症作用、抗酸化作用、抗血栓作用などの生理作用を有するガス状物質であり、生体では血管内皮細胞においてL-アルギニンを基質としてNO合成酵素（NO synthase：NOS）によって産生されている。産生されたNOは、血管平滑筋細胞に拡散されると可溶性グアニル酸シクラーゼ（Soluble guanylate cyclase：sGC）に結合して活性化させると、環状グアノシン1リン酸（Cyclic guanosine monophosphate：cGMP）を産生し、さらにプロテインキナーゼG（Protein kinase G：PKG）を活性化することで様々な生理作用を示す。また、NOはsGC-cGMP経路だけでなく、タンパク質のシステイン残基に結合することでS-ニトロシル化タンパク質やチオール類（システインやグルタチオンなど）とS-ニトロシル化チオールを形成し、種々のタンパク質を制御して心臓保護的に働いていることが明らかになってきている<sup>3, 4)</sup>。しかしながら、加齢や喫煙、生活習慣病により血管内皮細胞が障害されると血管内皮機能不全を引き起こし、NOS由来NO産生が低下する。この生体内における血管内皮細胞でのNOS由来NO産生の低下が心血管疾患の発症や病態進展に深く関与していると考えられている<sup>5)</sup>。これらのことから、動物実験ではNO合成阻害剤であるN(G)-nitro-L-arginine methyl ester（L-NAME）を使用したL-NAME誘発性高血圧モデル動物がNO産生低下に伴う心血管疾患および腎臓疾患の確立したモデル動物として用いられている<sup>6)</sup>。L-NAME誘発性高血圧モデル動物では、ヒトの心疾患の病態と同様に内皮機能不全、炎症、血管周囲の線維化、心筋肥大、心筋線維化などの心臓リモデリングを引き起こす<sup>6, 7)</sup>。このL-NAMEによる心血管疾患の発症メカニズムには、NO産生低下による血圧の上昇だけでなくレニン-アンジオテンシン系（Renin-angiotensin system：RAS）、交感神経系、プロスタグランジン、およびスーパーオキシドアニオンが関与していることが示唆されている<sup>6)</sup>。

一方で、魚油に普遍的に含まれているn-3系多価不飽和脂肪酸（Omega-3 polyunsaturated fatty acids：N3-PUFA）の摂取が心血管疾患による死亡リスクを低下させることが報告されている<sup>8, 9)</sup>。N3-PUFAの中でも $\alpha$ -リノレン酸（Alpha-linolenic acid：ALA）、エイコサペンタエン酸（Eicosapentaenoic acid：EPA）、ドコサペンタエン酸（Docosapentaenoic acid：DPA）、ドコサヘキサエン酸（Docosahexaenoic acid：DHA）の摂取が心血管疾患の死亡リスク低下に関連していることが示唆されている<sup>8, 9)</sup>。N3-PUFAの摂取は、インスリン抵抗性の改善、全身の血管抵抗を軽減し、内皮機能不全、動脈壁のコンプライアンス、および血管拡張反応を改善する<sup>8)</sup>ことやメタボリックシンドローム患者の内皮機能や動脈硬化の改善、抗炎症作用を示す<sup>10)</sup>こと、収縮期血圧および拡張期血圧を低下させる<sup>11)</sup>ことが報告されている。N3-PUFAの摂取は、トリグリセリドを低下させるだけでなく血管炎症や血栓症からの保護、内皮機能の改善、血圧の低下作用を示すとされ、*in vitro*や*in vivo*の研究およびヒトを対象とした研究により、内皮依存性および内皮非依存性の両方の作用によって末梢の血流抵抗を改善することが示唆されている<sup>12)</sup>。以上のようにN3-PUFA摂取が心血管疾患に対して有益な効果を示す報告が多い。しかしながら、サプリメントによるN3-PUFA（EPAやDHA）の補給が心臓を含む循環器疾患に対してほとんど、またはまったく影響を及ぼさないことを示唆する結果も報告されている<sup>13)</sup>ことからN3-PUFA（EPAやDHA）が普遍的に含まれている魚油摂取による高血圧や心血管疾患に対する効果には不明な点が残る。特に*in vivo*で魚油摂取が内因性NOS阻害物質によるNO減少に伴う心血管系にどのような影響を与えるのか検証した報告は少ない。

本研究では、内因性NOS阻害物質の増加を想定して多くの研究で利用されているL-NAMEを用いたL-NAME誘発性高血圧ラットへの魚油摂取が血管内皮機能と心臓リモデリングに与える影響を検討したので報告する。

## 2) 方法

### 1. 実験動物

Sprague-Dawley系雄性ラット（7週齢、体重160-180g）を東京実験動物（株）より購入して用いた。飼育室の環境条件は、室温 $24 \pm 2$ ℃、湿度 $60 \pm 5$ %、明暗12時間（明期8：00～20：00／暗期20：00～8：00）サイクルで実施した。本実験は、城西大学に設置されているJosai Life Science Centerの実験動物委員会により承認（承認番号：第JU18036号）を受けており、アメリカ国立衛生研究所（NIH）による動物実験のケアおよび使用のガイドラインにしたがって実施した。

ラットは、次の4群に分けた。コントロール群（Control、n=7）、L-NAME群（L-NAME、n=10）、L-NAMEと魚油を与えたグループを魚油群（L-NAME+Fish oil、n=9）、L-NAMEとACE阻害剤のCaptoprilを与えたグループをCaptopril群（L-NAME+Captopril、n=7）とした。魚油を含む餌を与えると同時にL-NAME（1g/L）とCaptopril（100mg/L）を飲水に混ぜて

与え始め自由摂取で8週間飼育した。

動物飼料の組成をTable 1に示した。動物飼料の調製は、Iizukaらの方法に準じて実施した<sup>14)</sup>。エネルギーに占める割合を炭水化物60%、脂質20%、タンパク質20%となるように調整した。油脂の種類と配合割合(%)は、コントロール群、L-NAME群、Captopril群は20%の紅花油(紅花食品株式会社、東京、日本)を加えた飼料を用いた。魚油群は、10%の紅花油と10%の魚油(日本油脂株式会社、東京、日本)を混合した飼料を用いた。なお、魚油に含まれるN3-PUFAは重量割合でEPA(7%)、DHA(24%)であった。また、各飼料作製時に脂肪酸の酸化を防ぐためにt-ブチルヒドロキノン(富士フィルム和光純薬、大阪、日本)を添加し、使用するまで-30℃で保存した。

Table 1 Composition of experimental diets

Ingredients	Diet in safflower oil	Diet in fish oil
	g/kg	g/kg
Safflower oil	80	40
Fish oil	—	40
Casein	200	200
Sucrose	104	104
β-starch	518	518
Vitamin mix <sup>1, 2</sup>	10	10
Mineral mix <sup>1</sup>	35	35
Cellulose powder	50	50
L-cystin	3	3
t-Butylhydroquinone	0.016	0.016

<sup>1</sup> Vitamin and mineral mix were based on the AIN-93G formation.

<sup>2</sup> Vitamin mix substituted 0.25% sucrose for choline bitartrate.

## 2. 生化学パラメータの測定

解剖時に採血した血液中のグルコース(Glucose: GLU)、トリグリセリド(Triglycerides: TG)、総コレステロール(Total cholesterol: T-Chol)、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(Aspartate aminotransferase: AST)、アラニンアミノ基転移酵素(Alanine aminotransferase: ALT)、乳酸脱水素酵素(Lactate dehydrogenase: LDH)の測定は株式会社SRLに依頼した。インスリン濃度は、レビス インスリン-ラット(Tタイプ)のELISAキット(富士フィルム和光純薬)で測定した。

## 3. 血圧測定

イナクチン麻酔(80 mg/kg)後、鼠径部の動脈にカテーテルを留置し、BPトランスデューサー(MLT0670 Disposable; AD Instruments, 東京、日本)に接続し、動脈血圧を連続的に測定した。測定した血圧データを基にChart v5.2 for windows(AD Instruments)を用いて10分間の収縮期血圧(SBP)、平均血圧(MBP)、拡張期血圧(DBP)の平均値を算出した<sup>7)</sup>。

## 4. 組織標本作成と画像解析

解剖時に摘出した心臓は直ちに10%の中性ホルマリンで固定した後、パラフィン包埋を行い5μmの厚さに薄切して標本を作成した。作成した標本は、シリウスレッド染色を行ったのち

心臓全体像をスライドスキャナー（Prime Histo EX：株式会社アイテックス、東京、日本）を用いて撮影した。撮影画像を基に左心室の心筋面積と管腔面積（管腔内に明らかな乳頭筋が確認できた場合は除いて管腔面積として算出した）の比（Cardiac wall to lumen area ratio）、および左心室の全面積に占める線維化面積の割合（Cardiac fibrosis area、%）を算出した。画像の解析は、アメリカ国立衛生研究所（NIH、アメリカ）が提供している画像解析ソフトのImage Jを用いて行った。

## 5. Semi-quantitative reverse transcription PCR (semi-qPCR) による心臓組織中mRNAの発現レベルの評価

解剖時に摘出した心臓のTotal RNAはISOGEN II（ニッポンジーン株式会社、富山、日本）を用いて抽出し、PrimeScript II 1<sup>st</sup> strand cDNA synthesis kit（タカラバイオ株式会社、滋賀、日本）を用いてcDNA合成を行った。合成したcDNAサンプル1 uLをGene RED PCR Mix（ニッポンジーン株式会社）と各種プライマー（Table 2）を加えサーマルサイクラー（Gene atlas G02：株式会社アステック、福岡、日本）で増幅した。その後、エチジウムブロミドを加えた2%アガロースゲルを作成して電気泳動を行いゲル撮影装置（WSE-5200 Printgraph 2M：ATTO株式会社、東京、日本）で撮影を行った。バンドの定量は、画像解析ソフトのImage J（NIH）を用いて行った。

Table 2 Primers used for RT-PCR

Genes	Primers	bp	Annealing temperature (°C)	Cycle
Collagen type 1 $\alpha$ 2	Sense (5' → 3') TGTTCGTGGTTCAGGGTAG	254	55	35
	Antisense (3' → 5') TTGTCGTAGCAGGGTCTTTC			
Fibronectin	Sense (5' → 3') TTATGACGATGGGAAGACCTA	295	55	35
	Antisense (3' → 5') GTGGGGCTGGAAAGATTACTC			
TGF- $\beta$ 1	Sense (5' → 3') CCGCAACAACGCAATC	438	58	35
	Antisense (3' → 5') ATGAGGAGCAGGAAGGGT			
AT1R	Sense (5' → 3') ACCCTCTACAGCATCATCTTTGTGGTGGGG	452	62	35
	Antisense (3' → 5') GGGAGCGTCGAATCCGAGACTCATAATGA			
NADPH oxidase (p22phox)	Sense (5' → 3') GCGGTGTGGACAGAAGTACC	220	55	35
	Antisense (3' → 5') CTTGGGTTTAGGCTCAATGG			
eNOS	Sense (5' → 3') TTCCGGCTGCCACCTGATCCTAA	340	55	35
	Antisense (3' → 5') AACATGTGTCCTTGCTCGAGGCA			
BNP	Sense (5' → 3') CAGCTCTCAAAGGACCAAGG	256	62	35
	Antisense (3' → 5') AGAGCTGGGGAAAAGAAGAGC			
GAPDH	Sense (5' → 3') CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT	300	55	32
	Antisense (3' → 5') AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC			

TGF- $\beta$ 1: Transforming growth factor-beta 1, AT1R: Angiotensin II type 1 receptor, eNOS: Endothelial nitric oxide synthase, BNP: Brain natriuretic peptide, GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

## 6. 大動脈リングを用いた血管弛緩反応の評価

本実験は竹之内らの方法に準じて行った<sup>15-17)</sup>。解剖時に摘出した胸部大動脈は、直ちに周囲の結合組織から分離し、実体顕微鏡下で長さ2~3mmの大動脈リングに切断した。大動脈リングは、37℃、95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>でバブリングしたKrebs-Henseleit solution (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, and 11.1 mM glucose) に入れ、大動脈リングの一端を組織ホルダーに、もう一端を張力トランスデューサー (TB-611 T; 日本光電、東京、日本) に接続した。血管弛緩を評価するために、大動脈リングをノルエピネフリン (DL-Norepinephrine hydrochloride: NE) (10<sup>-6</sup>~3×10<sup>-6</sup> M) で前収縮させ、プラトーに達した後、アセチルコリン (Acetylcholine chloride: ACh) (10<sup>-9</sup>~10<sup>-5</sup> M)、またはニトロプルシドナトリウム二水和物 (Sodium nitroprusside dehydrate: SNP) (10<sup>-10</sup>~10<sup>-5</sup> M) を累積投与し、血管の弛緩率を評価した。大動脈リングの張力を張力トランスデューサーによって測定し、Lab Chart ソフト (AD Instruments) を使用して解析した。なお、AChとNEはSigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国)、SNPは富士フイルム和光純薬 (大阪、日本) から購入した。

## 7. 統計解析

値は、すべて平均値±標準誤差で示した。4つのグループ間の差異は、one-way ANOVAで評価した。有意差が検出された場合、Tukey testにより多重比較検定を使用してグループ間比較を行い、*p*<0.05を有意差有とした。これらの統計解析はStat Mate V (株式会社アトムス、東京、日本) を用いた。

## 3) 結果

### 1. 魚油摂取による体重への影響

L-NAMEおよび魚油を投与して8週目の体重をFig. 1に示した。Control群と比較してL-NAME群と魚油群は、有意な差が無かった。一方でCaptopril群は、Control群とL-NAME群に比べ有意に体重が減少していた。以上のことから、魚油の摂取は体重に影響を与えなかった。

### 2. 魚油摂取による生化学パラメータへの影響

L-NAMEおよび魚油を投与して8週目における生化学パラメータをTable 3に示した。GLU、AST、LDHについては各群で有意差は無かった。血中TGは、L-NAME群と比較して魚

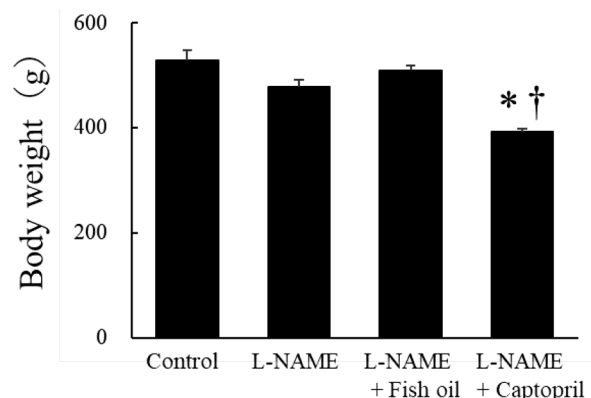


Fig. 1 Effect of dietary fish oil and captopril on body weight in L-NAME-induced hypertension rats.

\**p*<0.05 vs. the control group, control v.s., †*p*<0.05 vs. the L-NAME-treated group. The values are shown as the means±SE (n=6 to 9).

油群で有意に低下した。T-Choについては、Captopril群はControl群に比べ有意に減少した。また、魚油群はControl群に比べASTが増加傾向にあり、ALTにおいては有意に増加した。血中のインスリン濃度はL-NAME群とCaptopril群はControl群に比べ有意に減少したが、魚油群はL-NAMEによるインスリン濃度の低下を一部改善した。

Table 3 Biochemical parameters of plasma

	Control	L-NAME	L-NAME + Fish oil	L-NAME + Captopril
GLU (mg/dL)	135.1 ± 2.2	129.3 ± 2.9	134.6 ± 3.4	134.0 ± 2.5
TG (mg/dL)	53.3 ± 9.2	95.1 ± 28.5	22.2 ± 8.1 †	32.3 ± 10.8
T-Cho (mg/dL)	97.4 ± 7.1	80.2 ± 8.6	72.0 ± 5.2	55.7 ± 1.5 *
AST (IU/L)	95.9 ± 11.9	90.3 ± 14.2	132.2 ± 17.8	100.2 ± 24.1
ALT (IU/L)	41.6 ± 4.7	59.1 ± 7.5	87.1 ± 11.1 *	73.8 ± 16.0
LDH (IU/L)	445.7 ± 75.2	307.4 ± 44.4	380.2 ± 43.6	369.8 ± 75.3
Insulin (ng/mL)	25.8 ± 5.8	12.1 ± 1.4 *	16.2 ± 2.5	11.3 ± 2.7 *

\* $p < 0.05$  vs. the control group, control v.s., † $p < 0.05$  vs. the L-NAME-treated group. The values are shown as the means ± SE (n=6 to 9). GLU: Glucose, TG: Triglycerides, T-Cho: Total cholesterol, AST: Aspartate aminotransferase, ALT: Alanine aminotransferase, LDH: Lactate dehydrogenase

### 3. 魚油摂取による動脈血圧に対する影響

L-NAMEおよび魚油を投与して8週目の動脈の収縮期血圧、平均血圧、拡張期血圧をFig. 2に示した。Control群に比べL-NAME群と魚油群で血圧が有意に上昇しており、さらにL-NAME群と魚油群には有意な差は無かった。一方で、Captopril群はL-NAMEによる血圧の上昇を有意に抑制した。

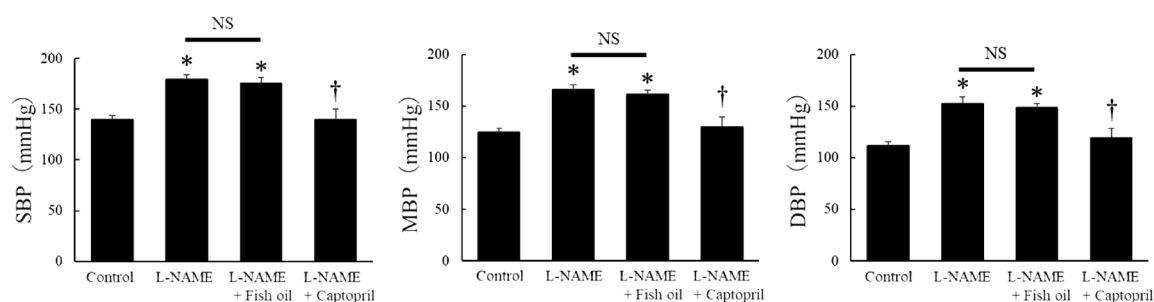


Fig. 2 Effect of dietary fish oil and captopril on blood pressure in L-NAME-induced hypertension rats.

The arterial blood pressure of the femoral artery was measured using a PowerLab™ data acquisition system. \* $p < 0.05$  vs. the control group, control v.s., † $p < 0.05$  vs. the L-NAME-treated group. The values are shown as the means ± SE (n=6 to 9). NS: Not significant, SBP: Systolic blood pressure, MBP: Mean blood pressure, DBP: Diastolic blood pressure

#### 4. 魚油摂取による心臓肥大、及び線維化に対する影響

L-NAMEおよび魚油を投与して8週目の心肥大と心臓線維化に対する病理学的評価の結果をFig. 3 (A-C) に示した。Control群に比べL-NAME群と魚油群では左心室の筋層と管腔の比が有意に増加したが、Captopril群はL-NAMEによる左心室の筋層と管腔の比の増加を抑制した (Fig. 3 A, B)。また、左心室の線維化については魚油群で増加傾向を示したものの各群で有意な差は無かった (Fig. 3 A, C)。

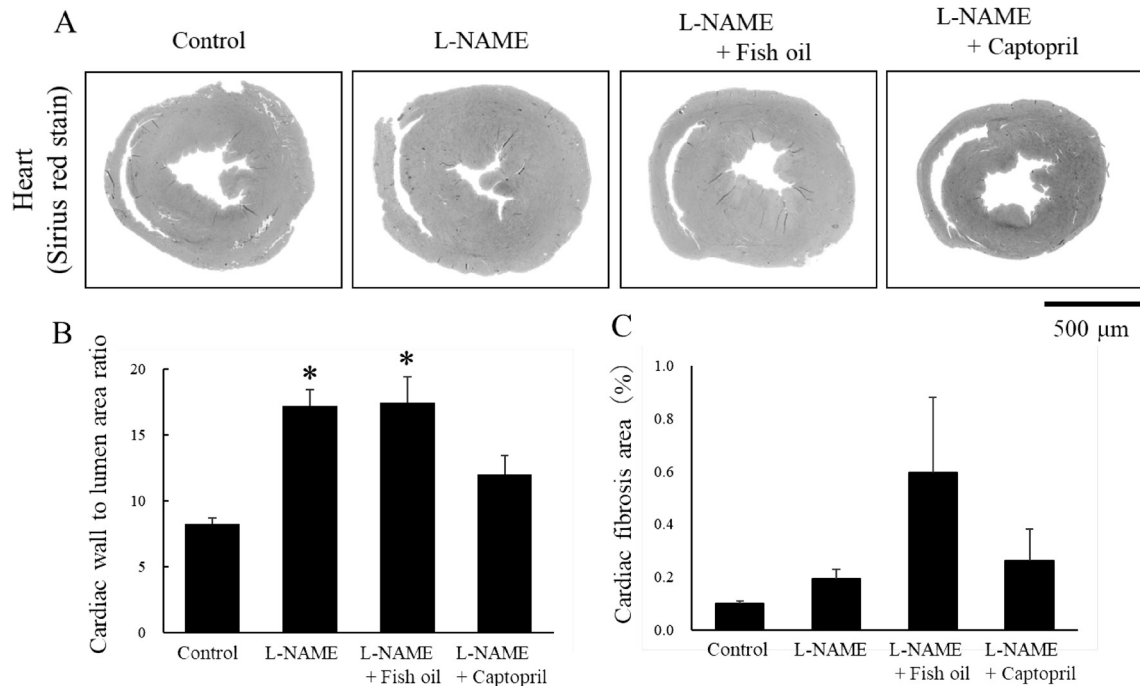


Fig. 3 Histological assessment of hypertrophy and fibrosis in the heart. Sirius red stain (A), Cardiac wall to lumen area ratio (B), Cardiac fibrosis area (%) (C).

\* $p < 0.05$  vs. the control group, control v.s., † $p < 0.05$  vs. the L-NAME-treated group. The values are shown as the means  $\pm$  SE (n = 6 to 10).

#### 5. 魚油摂取による心臓組織中のmRNA発現レベル

L-NAMEおよび魚油を投与して8週目における心臓組織中のCollagen type $\alpha$ 2、Fibronectin、線維芽細胞増殖因子 (Transforming growth factor-beta1 : TGF- $\beta$ 1)、NADPH oxidase (p22phox)、アンジオテンシンII受容体1型 (AT1R)、血管内皮型NOS (Endothelial NOS : eNOS)、脳性ナトリウム利尿ペプチド (Brain natriuretic peptide : BNP) のmRNA発現レベルをFig. 4 (A-G) に示した。

線維化に関わるCollagen type $\alpha$ 2とFibronectinのmRNA発現レベルを測定した (Fig. 4 A, B)。L-NAMEを与えることによりCollagen type $\alpha$ 2とFibronectinのmRNA発現レベルがControl群と比べて有意に増加した (Fig. 4 A, B)。魚油群はControl群に比べCollagen type $\alpha$ 2の発現レベルが増加傾向にあり、FibronectinのmRNA発現レベルは有意に増加した (Fig. 4 A, B)。Captoprilの投与は、Collagen type $\alpha$ 2とFibronectinの発現レベルをControl群と同程度ま



で改善した (Fig. 4 A, B)。また、TGF- $\beta$ 1については各群に有意な差はなかったもののL-NAME群と魚油群で増加傾向にあった (Fig. 4 C)。

次に、細胞膜上に発現しており、活性酸素を産生する酵素の1つであるNADPH oxidaseのサブユニットp22phoxとアンジオテンシンIIの1型受容体であるAT1RのmRNA発現レベルを測定した (Fig. 4 D, E)。NADPH oxidase (p22phox) とAT1RのmRNA発現レベルは各群で有意差はなかったが、L-NAME投与においては両方のmRNA発現レベルが増加傾向にあった。魚油群は、NADPH oxidase (p22phox) の発現レベルは増加傾向を示したが、AT1Rの発現レベルはL-NAME群に比べ減少傾向にあった。

血管内皮細胞に発現するeNOSのmRNAレベルを測定した (Fig. 4 F)。eNOSのmRNA発現レベルは各群で有意差はなかったが、L-NAME群と魚油群においては増加傾向にあった。

心臓障害の程度を示すマーカーの1つであるBNPのmRNA発現レベルを測定した (Fig. 4 G)。L-NAME群においてはControl群に比べ有意にBNPの発現レベルを増加したが、魚油群はControl群と有意な差はなかった。一方、Captopril群においてはL-NAME群に比べ有意にBNPの発現レベルが低下した。

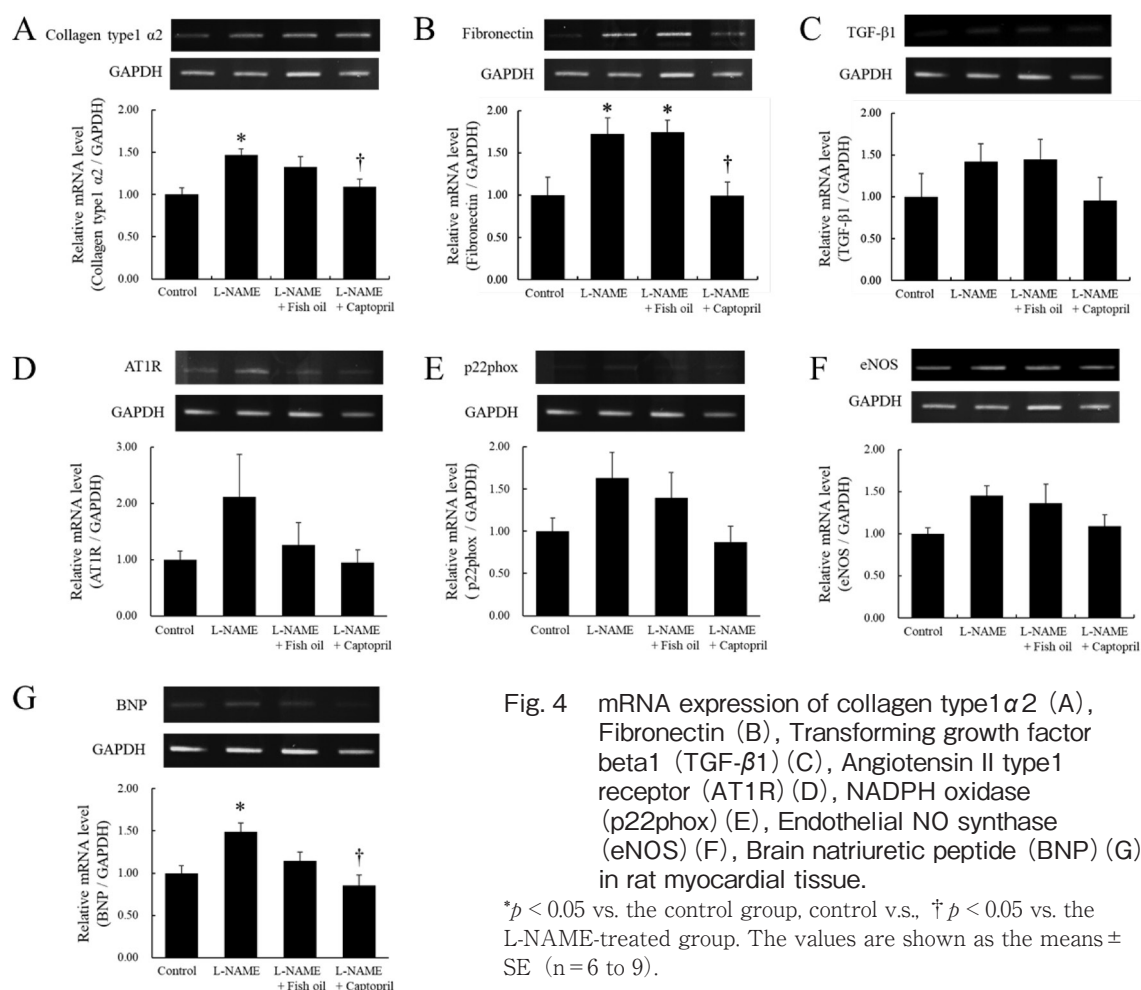


Fig. 4 mRNA expression of collagen type1 $\alpha$ 2 (A), Fibronectin (B), Transforming growth factor beta1 (TGF- $\beta$ 1) (C), Angiotensin II type1 receptor (AT1R) (D), NADPH oxidase (p22phox) (E), Endothelial NO synthase (eNOS) (F), Brain natriuretic peptide (BNP) (G) in rat myocardial tissue.

\* $p < 0.05$  vs. the control group, control v.s., † $p < 0.05$  vs. the L-NAME-treated group. The values are shown as the means  $\pm$  SE (n = 6 to 9).

## 6. 魚油摂取による血管内皮機能への影響

L-NAMEおよび魚油を投与して8週目に解剖時に摘出した胸部大動脈リングによる血管弛緩反応の結果をFig. 5 (A, B) に示した。NEで収縮させた大動脈リングにAChまたはSNPを加えた際の血管弛緩反応を測定した。内皮依存的弛緩反応に関与するAChによる血管弛緩反応は、Control群に比べL-NAME群、魚油群、Captopril群ともに著しく低下した。一方で、内皮非依存的弛緩反応に関与するSNPによる血管弛緩反応は各群で大きな差は見られなかった。

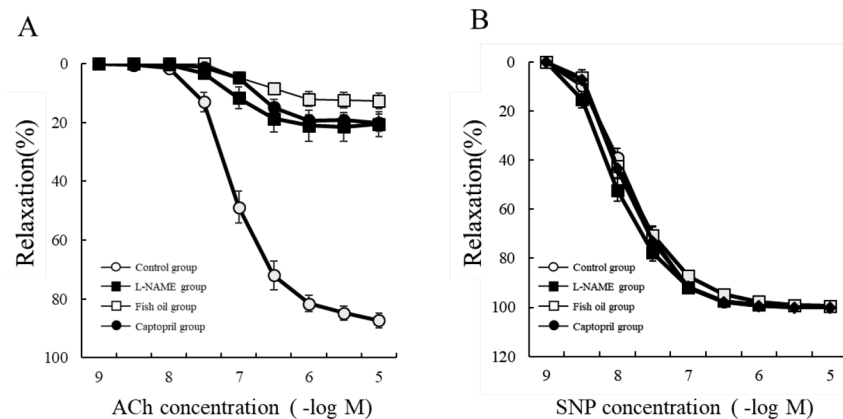


Fig. 5 Concentration-response curves for ACh (A), SNP (B) induced vasorelaxation of isolated aortic rings in L-NAME-induced hypertension rats.

\* $p < 0.05$  vs. the control group, control v.s., † $p < 0.05$  vs. the L-NAME-treated group. The values are shown as the means  $\pm$  SE (n=6 to 9).

## 4) 考察

食事からの魚油摂取が心血管疾患の予防に有効であることが疫学調査からも明らかになりつつあるが、その一方で有効性に対して否定的な調査結果も示されている。そこで本研究では、L-NAME誘発性高血圧モデルラットの心臓リモデリングに対する食事性魚油摂取の影響について、心臓リモデリングに有効性が確認されているACE阻害剤のCaptoprilを用いて比較検討した。

L-NAME投与と魚油の摂取は動物の体重に影響を与えなかった (Fig. 1)。EPA摂取が血中TGの上昇を改善し、冠動脈疾患のリスクを低下させることが日本での大規模臨床試験から示唆されている<sup>18)</sup>。本研究においても、魚油摂取は血中のTGを減少させた (Table 3)。また、L-NAME投与により血漿インスリン量が減少したが、魚油摂取により一部改善した (Table 3)。一方で、血中のGLU濃度は各群で有意な差は見られなかった (Table 3)。ラットを用いた研究では、L-NAMEを処置することでインスリン分泌量は減るが、インスリン感受性は増大することが報告されている<sup>19)</sup>。したがって、本研究においてもL-NAME処置によりインスリン分泌量は減少するもののインスリン感受性が増大することにより血糖値が一定に維持されていたと考えられた。

心疾患は、心筋や冠動脈の肥大から心筋細胞のアポトーシスが起これると、それをリモデリングする形で心臓の細胞外マトリックスの増加が起これり病理学的な特徴が現れる<sup>20)</sup>。我々の以前の研究<sup>7)</sup> と他の研究<sup>21, 22)</sup> から、L-NAME誘発性高血圧モデルラットは血圧の上昇から心肥大を引き起こし、心臓線維化が進行していることやCollagen type1<sup>7, 23)</sup>、Fibronectin<sup>7)</sup>、TGF- $\beta$ 1<sup>7, 22)</sup> の発現レベルが増加することが報告されている。本研究においても、L-NAMEを8週間投与すると血圧上昇と心肥大を引き起こした (Fig. 2, Fig. 3 A, B)。このL-NAME投与による血圧上昇と心肥大に対してCaptoprilは抑制したが、魚油摂取では抑制しなかった (Fig. 2, Fig. 3 A, B)。また、L-NAME群と魚油群は線維化に関わるCollagen type $\alpha$ 2とFibronectinのmRNA発現レベルが増加したが、Captopril群は抑制した (Fig. 4 A, B)。線維化の進行に関わるTGF- $\beta$ 1のmRNA発現レベルについては、各群で有意な差はなかったもののL-NAME群と魚油群で増加傾向にあった (Fig. 4 C)。一方で、これまでに報告された研究結果<sup>7, 21, 22)</sup> と異なり、本研究ではL-NAME投与による病理学的な心筋線維化は確認できなかった (Fig. 3 A, C)。この原因は明らかに出来ていないが、心臓線維化に関わるCollagen type $\alpha$ 2やFibronectin のmRNA発現レベルが増加していたことから、心臓の線維化は進行しているものの病理学的に線維化を確認できる段階ではなかったと考えられた。

心不全のバイオマーカーであるBNPのmRNA発現レベルはL-NAME群で増加し、魚油摂取では抑制傾向を示した (Fig. 4 G) が、肝臓障害や心臓障害の血液マーカーとなるALTやASTがL-NAMEを処置した魚油群で上昇していた (Table 3)。Liらは、ラットにL-NAMEを投与すると肝臓の脂肪酸代謝異常と微小循環障害から肝臓障害を引き起こし、ALTやASTが増加することを報告している<sup>24)</sup>。したがって、本研究における魚油群のALTやASTの上昇はL-NAME処置による肝臓障害に関連している可能性がある。しかし、ASTは肝臓だけでなく心筋や筋肉に発現しており、心筋梗塞など心筋障害でも増加する。ASTが増加傾向を示した魚油群では心筋の線維化が増加傾向 (Fig. 3 C) にあり、線維化関連遺伝子が増加していた (Fig. 4 A, B) ことから、このASTの増加は肝臓障害だけでなく心筋障害が一部関係している可能性もある。

以上のことから、Captoprilの摂取は、これまでに報告されている<sup>7, 22, 25)</sup> 内因性のNO合成が阻害された心臓リモデリングに対しても改善効果を示すという結果と一致したが、魚油については内因性NO合成が阻害されている条件下では心血管系に対する臓器保護効果が減弱することが示唆された。

RASは、心血管系の生理学的および病理学的反応の中心的な役割を果たしている<sup>26)</sup>。また、心血管系の病態進行にはNADPH oxidaseが産生する活性酸素種 (Reactive oxygen species : ROS) の増加による酸化ストレスの増大が関連している<sup>27)</sup>。L-NAME誘発性高血圧ラットで起こる心臓リモデリングは、NADPH oxidaseによる酸化ストレスの増大やRASの活性化によって起こることが示唆されている<sup>7, 21-23)</sup>。本研究では、細胞膜上に発現するAT1RとNADPH oxidaseのサブユニットの1つであるp22phoxのmRNA発現レベルを測定した。その結果、各

群で有意な差は見られなかったがL-NAME群ではAT1Rとp22phoxのmRNA発現レベルが増加傾向にあった (Fig. 4 D, E)。魚油については有意な差は無いもののAT1Rの発現レベルがL-NAME群に比べ減少傾向にあった (Fig. 4 D)。本研究ではNOS阻害剤を用いたが、NOS阻害剤を使用していないAng II誘発性高血圧ラットや閉経モデルラットを用いた研究では、N3-PUFAを与えることによりp22phoxの発現レベルを減少させ酸化ストレスを軽減することで内皮機能不全を改善することが報告されている<sup>28, 29)</sup>。したがって、魚油摂取によるp22phox調節や酸化ストレスの軽減には内因性のNOS由来NOが関与している可能性がある。また、魚油は血管内皮非依存的にAT1Rの発現を減少させる可能性があると考えられた。しかし、本結果のAT1Rの減少は有意な差ではなかったことから、より詳細な研究が必要である。

血管弛緩反応を胸部大動脈リングで評価したところ、AChによる血管拡張能をL-NAME群、魚油群、Captopril群はControl群に比べ著しく低下させた (Fig. 5 A)。慢性腎疾患ラットや卵巣摘出 (閉経モデル) ラットにN3-PUFA を与えた動物の大動脈にL-NAMEを処置することでAChによる血管弛緩反応が消失することが報告されており、本研究結果と一致していた<sup>28, 30)</sup>。AChによる血管弛緩反応は、主に、AChがムスカリン受容体に結合することでNOSを活性化させNO-sGC-cGMP経路を介して血管を弛緩させる。したがって、AChによる血管弛緩反応の低下は血管内皮依存的な機能低下を意味しており、魚油やCaptoprilはL-NAMEを与えた本実験系において、この低下を改善できないものと考えられた。一方で、直接NOを供給するNO供与体のSNPによる血管弛緩反応は、各群で有意な差がみられなかった (Fig. 5 B) ことから、本研究における内皮非依存的な血管拡張能はいずれの群においても変化していないことが示唆された。次に、心臓中のNOS発現調節に対する魚油摂取の影響を評価するため血管内皮細胞に存在するeNOSのmRNA発現レベルを測定した結果、各群で有意な差は無かったがL-NAME群と魚油群で増加傾向にあった (Fig. 4 F)。Niaziらは、Ang II誘発性高血圧ラットで血圧上昇に伴う代償的なeNOS増加を引き起こすが、EPAとDHAを摂取することで血圧が低下し、eNOS発現を抑制することを報告している<sup>29)</sup>。本研究においても血圧が高いL-NAME群と魚油群でeNOSの増加が起こったことから、血圧を低下させるため (NOによる血管弛緩を維持する) の代償機構が働いたと考えられた。また、本研究では魚油摂取によりeNOS発現を抑制しなかったことから、これまでに報告されている魚油のeNOS発現調節は魚油の直接的な作用ではなくNOを介した作用、または血圧に依存したものであることが示唆された。

本研究から内因性のNO合成が低下した条件下においては魚油による心血管機能の改善効果を減弱されることが示唆された。内因性のNOが減少する条件には、活性酸素の増加、eNOSの発現や活性の低下、内因性のNOS阻害物質の増加などがある。これまでの動物実験においても魚油摂取が活性酸素の増加、eNOSの発現や活性低下を改善することが報告されている<sup>28, 29)</sup>。一方で、内因性のNOS阻害物質の影響についてはあまり報告されていない。本研究では、広く心疾患や腎疾患のモデル作成に使用されている薬剤のL-NAMEを用いたが、生体内において産生される内因性NOS阻害物質として非対称性ジメチルアルギニン (Asymmetric

dimethylarginine : ADMA) の存在が知られている。ADMAは、L-NAMEと同様にL-アルギニンのアナログ型であり、血管内皮細胞でL-アルギニンと競合することでNOSによるNO合成を阻害する。生体内におけるADMAの増加は、心疾患<sup>31)</sup>、腎疾患<sup>32)</sup>、2型糖尿病<sup>33)</sup>、妊娠糖尿病<sup>34)</sup>の発症や病態に関連していることが報告されている。したがって、内因性NOS阻害物質であるADMAの増加を伴う疾患の発症予防や病態進行においては魚油の有効性が減弱する可能性がある。本研究ではADMAと魚油摂取の関連までは調査できなかったことから今後の研究に期待したい。

## 5) 結論

内因性のNO合成が阻害されている条件下における魚油摂取は心血管系に対する臓器保護効果が減弱することを明らかにした。したがって、これまでに報告されている魚油の心血管系に対する臓器保護効果はRAS制御の他に血管内皮保護によるNO産生増加が深く関連している可能性を示した。

## 6) 謝辞

本研究データの収集解析に協力いただいた金城学院大学生活環境学部食環境栄養学科の清水美来、藤本果南、並びに城西大学薬学部薬学科生理学研究室の正田美鈴、宮田智佳子に深く感謝する。

## 7) 参考文献

- 1) Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK. et al. Heart disease and stroke statistics-2016 Update: a report from the american heart association. *Circulation*. 2016; 133:e38-e360.
- 2) NCD Risk Factor Collaboration. Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *Lancet*. 2021; 398 (10304):957-980
- 3) Sun J, Murphy E. Protein S-nitrosylation and cardioprotection. *Circ Res*. 2010; 5;106 (2):285-96.
- 4) Sun J, Steenbergen C, Murphy E. S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8(9-10):1693-705.
- 5) Torregrossa AC, Aranke M, Bryan NS. Nitric oxide and geriatrics: Implications in diagnostics and treatment of the elderly. *J Geriatr Cardiol*. 2011; 8(4):230-42.
- 6) Campbell DJ. L-NAME hypertension: trying to fit the pieces together. *J Hypertens*. 2006; 24(1):33-6.
- 7) Sonoda K, Ohtake K, Uchida H. et al. Dietary nitrite supplementation attenuates cardiac

- remodeling in L-NAME-induced hypertensive rats. *Nitric Oxide*. 2017; 1(67):1-9.
- 8) Weinberg R.L., Brook R.D., Rubenfire M. et al. Cardiovascular impact of nutritional supplementation with omega-3 fatty acids: JACC focus seminar. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2021; 77:593-608.
  - 9) Chen H, Leng X, Liu S. et al. Association between dietary intake of omega-3 polyunsaturated fatty acids and all-cause and cardiovascular mortality among hypertensive adults: Results from NHANES 1999-2018. *Clin Nutr*. 2023; 20; 42(12):2434-2442.
  - 10) Tousoulis D, Plastiras A, Siasos G. et al. Omega-3 PUFAs improved endothelial function and arterial stiffness with a parallel antiinflammatory effect in adults with metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2014; 232(1):10-6.
  - 11) Geleijnse JM, Giltay EJ, Grobbee DE. et al. Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *J Hypertens*. 2002; 20(8):1493-9.
  - 12) Brosolo G, Da Porto A, Marcante S. et al. Omega-3 fatty acids in arterial hypertension: Is there any good news? *Int J Mol Sci*. 2023; 30;24(11):9520.
  - 13) Abdelhamid AS, Brown TJ, Brainard JS. et al. Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018; 18;7(7):CD003177.
  - 14) Iizuka Y, Kim H, Izawa T. et al. Protective effects of fish oil and pioglitazone on pancreatic tissue in obese KK mice with type 2 diabetes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2016; 115:53-59.
  - 15) Takenouchi Y, Kobayashi T, Matsumoto T. et al. Gender differences in age-related endothelial function in the murine aorta. *Atherosclerosis*. 2009; 206:397-404.
  - 16) Takenouchi Y, Tsuboi K, Ohsuka K. et al. Chronic treatment with  $\alpha$ -lipoic acid improves endothelium-dependent vasorelaxation of aortas in high-fat diet-fed mice. *Biol Pharm Bull*. 2019; 42:1456-1463.
  - 17) Nobe K, Takenouchi Y, Kasono K. et al. Two types of overcontraction are involved in intrarenal artery dysfunction in type II diabetic mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014; 351:77-86.
  - 18) Saito Y, Yokoyama M, Origasa H. et al. Effects of EPA on coronary artery disease in hypercholesterolemic patients with multiple risk factors: sub-analysis of primary prevention cases from the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). *Atherosclerosis*. 2008;200(1):135-40.
  - 19) Juan CC, Chang CL, Chuang TY. et al. Insulin sensitivity and resistin expression in nitric oxide-deficient rats. *Diabetologia*. 2006;49(12):3017-26.

- 20) Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest.* 2007; 117(3):568-75.
- 21) Pechánová O, Bernátová I, Pelouch V, et al. L-NAME-induced protein remodeling and fibrosis in the rat heart. *Physiol Res.* 1999; 48(5):353-62.
- 22) Bunbupha S, Pakdeechote P, Maneesai P. et al. Carthamus Tinctorius L. extract attenuates cardiac remodeling in L-NAME-induced hypertensive rats by inhibiting the NADPH oxidase-mediated TGF- $\beta$ 1 and MMP-9 pathway. *Ann Anat.* 2019; 222:120-128.
- 23) Poasakate A, Maneesai P, Rattanakanokchai S. et al. Genistein prevents nitric oxide deficiency-Induced cardiac dysfunction and remodeling in rats. *Antioxidants (Basel).* 2021; 4;10(2):237.
- 24) Li B, He X, Lei SS. et al. Hypertensive rats treated chronically with *N*<sup>ω</sup>-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) induced disorder of hepatic fatty acid metabolism and intestinal pathophysiology. *Front Pharmacol.* 2020; 31:10:1677.
- 25) Simko F, Pechanova O, Pelouch V. et al. Continuous light and L-NAME-induced left ventricular remodelling: different protection with melatonin and captopril. *J Hypertens.* 2010; 28 Suppl 1:S13-8.
- 26) Mehta P.K., Griendling K.K. Angiotensin II cell signaling: Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007;292:C82-C97.
- 27) Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK. et al. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10(6):453-71.
- 28) Gortan Cappellari G, Losurdo P, Mazzucco S. et al. Treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental menopause. *J Nutr Biochem.* 2013;24(1):371-9.
- 29) Niazi ZR, Silva GC, Ribeiro TP. et al. EPA:DHA 6:1 prevents angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase- and COX-derived oxidative stress. *Hypertens Res.* 2017; 40(12):966-975.
- 30) Zanetti M, Gortan Cappellari G, Barbetta D. et al. Omega 3 polyunsaturated fatty acids improve endothelial dysfunction in chronic renal failure: role of eNOS activation and of oxidative stress. *Nutrients.* 2017;18;9(8):895.
- 31) Dowsett L, Higgins E, Alanazi S. et al. ADMA: A key player in the relationship between vascular dysfunction and inflammation in atherosclerosis. *J Clin Med.* 2020; 20;9(9):3026.
- 32) Au AYM, Mantik K, Bahadory F. et al. Plasma arginine metabolites in health and chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2023; 30;38(12):2767-2775.
- 33) Gajecki D, Gawryś J, Wiśniewski J. et al. A cross-talk between the erythrocyte L-Arginine/ADMA/Nitric Oxide metabolic pathway and the endothelial function in

- subjects with Type 2 diabetes mellitus. *Nutrients*. 2021; 4:13(7):2306.
- 34) Tiong P, Kosmider L, Lassi ZS, Arstall MA. et al. Asymmetric dimethylarginine and gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Endocrine*. 2023; 80(2):283-291.