

氏 名	長山 浩二
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博士 甲第746号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成28年 3月 10日
学位論文題目	Duality of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Mcp-1 Expression in Vascular Smooth Muscle: A Potential Role of 4-Hydroxy Hexenal (血管平滑筋における Mcp-1 発現に対する n-3 多価不飽和脂肪酸の2面性:4-Hydroxy Hexenal の役割)
審査委員	主査 教授 松浦 博 副査 教授 谷 眞至 副査 教授 古荘 義雄

論文内容要旨

*整理番号	753	氏名	ながやま こうじ 長山 浩二
学位論文題目	Duality of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Mcp-1 Expression in Vascular Smooth Muscle: A Potential Role of 4-Hydroxy Hexenal (血管平滑筋における Mcp-1 発現に対する n-3 多価不飽和脂肪酸の 2 面性: 4-Hydroxy Hexenal の役割)		
<p>【目的】疫学的に魚食が動脈硬化性疾患発症を抑制することが知られている。そのメカニズムとして魚に含まれる docosahexaenoic acid (DHA) や eicosapentaenoic acid (EPA) といった n-3 多価不飽和脂肪酸の血管内皮機能改善効果や抗炎症効果が示唆されている。血管内皮細胞において DHA と EPA には細胞保護作用に差があり、その理由として、DHA においては、その代謝産物である 4-hydroxy hexenal (4-HHE) が Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) 経路を活性化する事を報告した。しかしながら、炎症性サイトカインである Monocyte Chemoattractant Protein -1 (Mcp-1) の血管平滑筋における直接効果については不明である。</p> <p>本研究では、血管平滑筋におけるに DHA と EPA の抗動脈硬化作用が、これらから生成する 4-HHE により調節されるとの仮説を立て、血管組織および培養血管平滑筋細胞を用いた実験により検証した。</p> <p>【方法】ラットから摘出した血管組織 および、ラット培養血管平滑筋細胞 (VSMCs ; vascular smooth muscle cells) に、DHA、EPA および 4-HHE を添加することにより検討を行った。細胞生存率の判定は MTT assay を、遺伝子発現変化は定量的 real-time PCR 法を、アポトーシスは Western Blot 法による切断化 Caspase-3 の蛋白量定量を、細胞内 reactive oxygen species (ROS) 産生は H₂DCFDA 法を、組織内 4-HHE 含量は LC-MS/MS を用いて解析した。Nrf2 および抗酸化酵素 Hemoxxygenase-1 (Hmox1) の関与を明らかにするため、siRNA を用いたノックダウンを行った。</p> <p>【結果】</p> <p>① ラット摘出血管において、DHA の孵置は、濃度依存性 (50-100μm) に Mcp-1 mRNA を強く抑制したが、EPA はほとんど効果がなかった。組織内 4-HHE 量は DHA では増加したが、EPA での増加は極めて軽度であった。4-HHE (25-50μm) は、Mcp-1 mRNA 発現を抑制した。</p> <p>② ラット摘出血管において、DHA と 4-HHE の孵置は Hmox-1 mRNA 発現を誘導したが、EPA には効果がなかった。内皮細胞をはがした血管でも同様の結果であったことから、仮説通りに平滑筋においても DHA は 4-HHE を介して Nrf2 を活性化している事が示唆された。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

一方でラット VSMCs においては、

- ③ DHA (25-100 μ m)、EPA (25-100 μ m)、および 4-HHE (10-50 μ m) は、Mcp-1 mRNA の発現を濃度依存性に増加させ、これは Primary VSMCs でも同様であった。
- ④ DHA (50 μ m)、EPA (50 μ m)、および 4-HHE (25 μ m) は、MAPキナーゼである p38, ERK, JNK のリン酸化を増加させた。Mcp-1 mRNA は p38 阻害薬である SB203580 により完全に、ERK 阻害薬である PD98059 により部分的に抑制されたが、JNK 阻害薬である SP600125 では抑制されなかった。
- ⑤ ROS 産生は、DHA (50 μ m)、EPA (50 μ m) により増加し、抗酸化剤である NAC (10mM) の前孵置により DHA による ROS 産生は完全に抑制された。同時に NAC (10mM) の前孵置により、DHA、EPA、および 4-HHE による Mcp-1 mRNA 発現は完全に抑制された。
- ⑥ DHA の代謝産物である 4-HHE (25 μ m) により誘導された Mcp-1 mRNA の発現は、siRNA による Nrf2 のノックダウンや NAC 前孵置により減少した。
- ⑦ DHA (150 μ m) および 4-HHE (50 μ m) は、MTT assay による測定で、細胞生存率を低下させたが、EPA では効果がなかった。DHA (150 μ m) および 4-HHE (50 μ m) は、切断化 Caspase-3 のタンパク発現を増加させたことから、アポトーシスを誘導すると考えられた。

【考察】

本研究により、摘出血管組織において、DHA と EPA には Mcp-1 発現の抑制効果に差があり、少なくとも一部は代謝産物である 4-HHE が関与する事を明らかとした。この現象は培養平滑筋細胞では再現されず、DHA と EPA および 4-HHE のいずれも Mcp-1 mRNA 発現を上昇させた。また、この Mcp-1 発現誘導は、酸化ストレス・p38、Nrf2 経路を介していることを明らかにした。さらに、DHA や 4-HHE は平滑筋細胞にアポトーシスを誘導させることを見出した。

一見矛盾するこの現象は、培養血管平滑筋細胞は、正常血管の平滑筋とは異なり、活発に増殖している事に由来するのではないかとこの着想に至った。アテローム性動脈硬化巣では、形質転換した血管平滑筋細胞は活発に増殖している。DHA や EPA によって Mcp-1 mRNA が増加する事は、傷害された細胞からマクロファージへの、自己清浄化のためのシグナルである可能性がある。すなわち、正常血管では、DHA は Mcp-1 を抑制して抗炎症作用を示し、アテローム性病変組織においては、形質転換した平滑筋細胞をアポトーシスさせた上に、マクロファージを浸潤させている可能性がある。

本研究の限界として、動脈硬化症モデルでの検証ができなかった点がある。文献では、形質転換し酸化脂質を多く含んだ平滑筋が、Mcp-1 発現を増加させてアテローム形成促進をすることは知られているが、DHA や 4-HHE の関与についての知見は不十分であり、今後の研究課題である。また、理論上は EPA も 4-HHE を生成するはずであるが、我々の検討では DHA と EPA では 4-HHE の生成量に大きな差がある。この点に関しても今後の課題と考える。

【結論】

アテローム性動脈硬化症に対する n-3 多価不飽和脂肪酸の作用として、EPA と DHA の作用には差がある可能性が示唆された。また、正常血管と培養細胞では Mcp-1 調節に関して 2 面性を有している事、そのメカニズムの少なくとも一部は代謝産物である 4-HHE が関与する事を明らかにした。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	753	氏名	長山 浩二
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>疫学的に魚食が動脈硬化性疾患の発症を抑制することが知られている。そのメカニズムとして、魚に含まれる docosahexaenoic acid (DHA) や icosapentaenoic acid (IPA) 等の n-3 多不飽和脂肪酸の血管内皮機能改善効果や抗炎症効果が示唆されているが、血管平滑筋における抗動脈硬化作用については不明である。</p> <p>本研究は、血管平滑筋において DHA と IPA、これらの代謝産物である 4-hydroxy hexenal (4-HHE) が、抗動脈硬化作用を有するかを、単球走化蛋白 (Mcp-1) を指標として、ラット摘出血管と培養血管平滑筋細胞を用いて効果を比較し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 摘出血管では、DHA と IPA には Mcp-1 発現の抑制効果に差があり、その一部は 4-HHE が関与すること。 2) 培養血管平滑筋細胞では、摘出血管とは対照的に、DHA、IPA、4-HHE が Mcp-1 mRNA 発現を誘導すること。 3) 培養血管平滑筋細胞での Mcp-1 発現誘導は、酸化ストレス、p38、Nrf2 経路を介すること。 4) DHA や 4-HHE が、培養血管平滑筋細胞にアポトーシスを誘導すること。 <p>本論文は、血管平滑筋における n-3 多不飽和脂肪酸による抗動脈硬化作用について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 598 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 28 年 1 月 27 日)</p>			