【286】

氏　名（本籍）	下條信威（茨城県）
学位の種類	博　士（医　学）
学位記番号	博甲第 4426 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	**Eicosapentaenoic acid prevents endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro through the suppression of TGF-β1 and phosphorylated JNK** （エイコサペンタエン酸はエンドセリンによる心肥大を TGF-β1 およびリン酸化 JNK を介した経路で抑制する）

主　査	筑波大学教授	博士（医学）	山縣邦弘
副　査	筑波大学助教授	医学博士	鬼塚正孝
副　査	筑波大学助教授	博士（医学）	堀米仁志
副　査	筑波大学講師	医学博士	石井幸雄

論文の内容の要旨

【目的】

魚油に含まれるエイコサペンタエン酸（EPA）などの不飽和脂肪酸の心血管疾患に対する予防効果はこれまでイヌイットやイタリア, 日本などの漁村を対象にした大規模研究や動物実験で数多く報告されている。近年，日本人に対する大規模研究においても魚油の心疾患予防効果の有用性を示すデータが示されている（Iso et al. Circulation, 2006）。しかし，EPA を含む不飽和脂肪酸の心保護作用のメカニズムについてはほとんど解明されていない。一方，エンドセリン（ET）-1 は，ヒトや動物実験で病的心肥大から心不全への進行に大きく関与する神経性液性因子として注目されている（Sakai et al. Nature, 1996）。近年，日本においても ET-1 antagonist の臨床での使用が可能になり，ET-1 のさらなる病態への関与の解明が進むものと期待される。今回，エンドセリン誘導性の心肥大を呈した培養心筋細胞を用いて，EPA の心肥大予防効果のメカニズムを検討した。

【対象と方法】

心筋細胞は生後 2 日の SD ラットから収集し，fatty acid-free BSA（0.1％）を含む D-MEM/Ham F12 で 3 日間培養し，心筋の収縮運動を確認後，各種刺激等を行った。まず，予備実験として細胞表面積および心筋細胞の総蛋白合成量を検討し，ET-1 および EPA の至適濃度を検討した。本実験では，培養 4 日目にコントロール群，EPA（10μM）投与群，ET-1（0.1nM）投与群，および EPA+ET-1 投与群（EPA の前投与）の 4 群に分けて培養を行った。ET-1 を加えて 24 時間後に細胞を回収し，各種測定を行った。

【結果】

ET-1 投与群の細胞表面積はコントロール群に比べ 90％の増加を示し，また心筋細胞の総蛋白合成の指標

である ^{14}C-leucine の取り込みは75％の増加を認めた。しかし，いずれも EPA の前投与により有意に抑制された。細胞骨格の１つである α-actinin は ET-1 投与群で有意に enhance されたが，それは EPA の前投与によって有意に抑制された。心肥大の分子マーカーである心房ナトリウム利尿ペプチド（ANP）および脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）mRNA の発現量は，ET-1 投与群において，２倍の増加を認めたが，EPA の前投与により，いずれも有意に抑制された。さらに，ET-1 投与群において増加した transforming growth factor（TGF）-β1 の発現は EPA 前投与により有意に減少し，MAPK の１つであるリン酸化 c-jun N-terminal kinase（JNK）の ET-1 による増加とその下流の c-jun の発現増加も EPA の前投与により有意に抑制された。

【考察】

本研究は，ET-1 により肥大した心筋培養細胞を用いて，EPA 投与による心肥大抑制効果のメカニズムを検討した初めての研究である。ラット新生児心筋細胞は，ET-1 の投与により形態学的に有意な心肥大を呈した。また，心肥大分子マーカーの上昇も認められ病的な心肥大の進行が示唆された。EPA の前投与は ET-1 投与による心肥大を有意に抑制した。また，ET-1 投与により増殖を促すサイトカインの１つである TGF-β1 の増加，および増殖や炎症に関与する MAPK の１つである JNK とその下流の c-jun の増加を認めた。これらは，EPA の前投与によっていずれも有意に抑制されたことから，EPA の心肥大抑制効果の機序としてこれら分子機構の関与が示唆された。EPA の心筋細胞への作用としては，EPA の代謝産物である Prostaglandin や Leukotriene などの Eicosanoid を介した作用が考えられる。また，近年，EPA 自体の直接作用として細胞膜の構成物質として raft を形成し，各種受容体やイオンチャンネルへの作用，さらには peroxisome proliferator-activated receptor（PPAR）-α のリガンドとして遺伝子発現へ直接作用も報告されている。本実験において，EPA 投与からの反応時間を考慮すると，EPA の代謝産物による作用より，むしろ EPA のこれら分子への直接的な作用の可能性が考えられる。我々は，ET-1 誘導性肥大心筋細胞に PPAR-α のアゴニストであるフェノフィブラート投与による肥大の抑制効果およびリン酸化 JNK の減少を報告した（Irukayama-Tomobe et al Circulation，2004）。これらのことから，本実験における JNK 抑制効果の機序として PPAR- α の関与の可能性も考えられる。

【結論】

これらの結果から ET-1 に誘導された肥大心筋細胞は EPA の前投与により抑制されることが示され，このメカニズムとして TGF-β1 の発現の減少とリン酸化 JNK の減少が関与していることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

著者は，ラット心筋細胞の培養系において，ET-1 によって惹起される心筋肥大ならびに蛋白合成刺激が EPA により抑制されることを示し，この EPA は，心筋細胞内での α-actinin，ANP，BNP，TGF β-1 の発現抑制ならびに MAPK の一種である JNK とその下流の c-jun の発現抑制によるものであることを示した。EPA の心血管系疾患の発症進展抑制効果は既に臨床的に明らかとなってきているが，その効果発現のメカニズムの一つとして，ET-1 刺激による心筋肥大と心筋内での分子機構から解明を試みた研究であり，今後の更なる発展が期待されるものである。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。