

氏名(本籍)	ち さき けい ご 知 崎 圭 吾 (愛 知 県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 乙 第 1991 号		
学位授与年月日	平成 16 年 1 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 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 suppresses basal and insulin-stimulated endothelin-1 production in human endothelial cells (エイコサペンタエン酸は、ヒト内皮細胞において、インスリン刺激時・非刺激時いずれにおいてもエンドセリン-1産生を抑制する)		
主査	筑波大学教授	医学博士	住 田 孝 之
副査	筑波大学教授	医学博士	榊 原 謙
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	医学博士	川 上 康

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

エイコサペンタエン酸 (EPA) のような多価不飽和脂肪酸は、細胞膜に作用し様々な影響を与える。その一つとして、EPAには血管拡張作用のあることが知られている。血管の弛緩と収縮に重要な役割を果たす物質として、弛緩物質一酸化窒素 (NO) と収縮物質エンドセリン 1 (ET-1) がよく知られている。これまでの研究で、EPAは血管内皮細胞に対し NO の産生を促進することが解ってきた。一方、EPAの ET-1 産生に対する影響はこれまで研究されていない。本研究では、EPAの ET-1 産生に対する影響を検討し、併せてその作用機序を検討することを目的とした。

(対象と方法)

1) ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVECs) を液体培地 (EGM) で培養し、コンフルエントになったところで、EPA, ドコサヘキサエン酸 (DHA), アラキドン酸 (AA), リノール酸 (LNA), オレイン酸 (OA) を培地に添加 (100 $\mu\text{mol/L}$, EPAは 10-300 $\mu\text{mol/L}$) し、添加 1 時間後に産生した NO と ET-1 量を測定した。NO は Griess 法, ET-1 は ELISA 法により定量した。2) インスリン (1 $\mu\text{mol/L}$) を予め添加 (不飽和脂肪酸添加 2 時間前) した場合の ET-1 産生量も測定した。3) ET-1 産生に対する NO の影響を検討するために、NO 産生抑制物質 L-NAME (300 $\mu\text{mol/L}$, NOS 阻害剤), W-7 (300 $\mu\text{mol/L}$, カルモデュリン拮抗薬), EGTA (1 mmol/L, カルシウムキレート剤) を、それぞれ予め添加 (不飽和脂肪酸添加 2 時間前) した場合の ET-1 産生量も測定した。4) EPA (0-300 $\mu\text{mol/L}$) 添加後 1 時間の ET-1 mRNA 産生を RT-PCR 法により測定した。

(結果)

1) EPA, DHA, AA (100 $\mu\text{mol/L}$) は、非添加群に比べ有意に ET-1 産生を抑制した。特に EPA の作用は顕著であった。一方、LNA, OA (100 $\mu\text{mol/L}$) には殆ど効果が認められなかった。また、EPA の ET-1 産

生抑制作用には 10-300 $\mu\text{mol/L}$ の間で用量依存性があり, 100, 300 $\mu\text{mol/L}$ で非添加群に比べ有意差が認められた。2) 予めインスリン (1 $\mu\text{mol/L}$) を添加し ET-1 産生を亢進させた状態でもインスリン非添加時と同様, EPA, DHA, AA は, コントロール群 (インスリンのみ添加群) と比べ有意に ET-1 産生を抑制した。3) EPA (100 $\mu\text{mol/L}$) による ET-1 産生抑制効果は, L-NAME, W-7, EGTA 非添加時とほぼ同じ程度であった。4) EPA (30, 100 $\mu\text{mol/L}$) 添加時には, 添加後 60 分で ET-1 mRNA を検出したしたが, EPA (300 $\mu\text{mol/L}$) 添加時には検出されなかった。PCR のサイクル数を増加させると, EPA (300 $\mu\text{mol/L}$) でも mRNA のバンドが検出されるようになった。一方, インスリン刺激時での同様な検討を実施したところ, EPA (30, 100, 300 $\mu\text{mol/L}$) はいずれも ET-1 mRNA を検出したが, PCR のサイクル数を減少させると, EPA (300 $\mu\text{mol/L}$) ではバンドが薄くなった。

(考察)

以上の結果から, EPA が HUVECs において ET-1 産生を抑制することを明らかにした。また, ET-1 産生はトロンビンや TGF- β , インスリンなどにより亢進することは知られているが, EPA はインスリンにより ET-1 産生を亢進させた状態でも ET-1 産生を抑制した。しかし, インスリンにより ET-1 産生が亢進した状態では, インスリン非添加時と比べ ET-1 産生抑制作用は弱かったが, ET-1 抑制の絶対量 (pg/mg) はほぼ同じであった。これは, EPA の濃度が同じである場合, ET-1 産生が亢進していてもいなくても, EPA はほぼ同じ量の ET-1 産生を抑制するものと考えられる。このことから, EPA による ET-1 産生抑制は, ET-1 生成に対する直接的な作用と考えられる。

NO は ET-1 の産生を抑制する場合があることが知られているが, 本研究では EPA による NO 産生をほぼ完全に阻害する量の L-NAME や W-7, EGTA を予め添加しておいた状態でも, EPA による ET-1 産生はこれら阻害剤非添加時とほぼ同等に抑制したこと, さらに, ET-1 は ET-1 遺伝子から mRNA に転写され prepro-ET-1 に翻訳された後酵素的に切断され最終的に生成されるが, EPA は ET-1 遺伝子から mRNA への転写を阻害したことから, EPA による ET-1 産生抑制作用は, NO によるフィードバックによるものではなく, ET-1 生成に対する直接作用であることを裏付けている。

EPA は今回検討した不飽和脂肪酸 5 種の中で ET-1 産生を最も強く抑制したが, これは EPA の構造と細胞膜への親和性に因るものと思われるが, 詳細は不明である。一般的に, EPA のような長鎖脂肪酸は小腸から吸収され, トリグリセリドと結合したりリポプロテインとして血液中を循環する。リポプロテインとして血漿中に存在する EPA は, 細胞表面にあるリパーゼによりタンパクより分離され血管に作用すると考えられている。培養細胞を用いた研究では, EPA の添加とともに, 細胞に結合した AA は徐々に減少し, EPA から生合成された DPA が増加していくことがわかっている。EPA はこの細胞への結合の強さが他の脂肪酸より強いことが, 他の脂肪酸より効果が強いことに関係していると考えられる。

本研究結果より, EPA の血管拡張作用には, NO の産生亢進と ET-1 産生抑制が大きく関与していることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究の目的は, エイコサペンタエン酸 (EPA) によるエンドセリン-1 (ET-1) 産生に対する影響とその作用機序を明らかにすることである。結果として, EPA はインスリンの存在に関わらず ET-1 の産生を抑制し, その作用は, ET-1 遺伝子転写を直接抑制することであり, NO によるフィードバック調節ではないことを明かにした。EPA の ET-1 産生抑制機序に関する研究として, 世界的にも高く評価されている。

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。