

|         |  |
|---------|--|
| 氏 名     | 楠 知里   |
| 学位の種類   | 博士 (医学)  |
| 学位記番号   | 博士 甲第 679 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 2 5 年 3 月 7 日   |
| 学位論文題目  | Omega-3 polyunsaturated fatty acid has an anti-oxidant effect via the Nrf-2/HO-1 pathway in 3T3-L1 adipocytes<br><br>(3T3-L1 脂肪細胞において $\omega$ -3 系不飽和脂肪酸は Nrf-2/HO-1 経路を介し抗酸化作用を発揮する) |
| 審査委員    | 主査 教授 岡村 富夫<br><br>副査 教授 堀池 喜八郎<br><br>副査 教授 三浦 克之   |

## 論文内容要旨

|  |   |              |              |
|--|---|--------------|--------------|
| *整理番号  | 684   | (ふりがな)<br>氏名 | くすのき<br>桶 知里 |
| 学位論文題目   | <p style="text-align: center;"><b>Omega-3 polyunsaturated fatty acid has an anti-oxidant effect via the Nrf-2/HO-1 pathway in 3T3-L1 adipocytes</b></p> <p>(3T3-L1 脂肪細胞において<math>\omega</math>-3 系不飽和脂肪酸は Nrf-2/HO-1 経路を介し抗酸化作用を発揮する)</p> |              |              |
| <p><b>【目的】</b></p> <p>脂肪組織における酸化ストレスの増強は、脂肪組織のみならず全身のインスリン抵抗性の原因であり、その軽減はインスリン抵抗性に対する治療標的の一つと考えられている。</p> <p><math>\omega</math>3 系不飽和脂肪酸(<math>\omega</math>3-PUFA)を多く含む魚食が、臨床的に抗血栓形成・抗炎症作用や血管内皮機能改善作用などを有すると報告されているが、インスリン抵抗性の改善をもたらすとの報告が近年なされた。我々もマウスを用いた検討にて、<math>\omega</math>3-PUFA を多く含む魚食が有意にインスリン抵抗性を改善することを確認した。また、<math>\omega</math>3-PUFA の酸化代謝産物である 4-hydroxy hexenal(4-HHE)が、ヒト臍帯静脈内皮細胞において抗酸化作用を示すことを報告した。<math>\omega</math>3-PUFA によるインスリン抵抗性の改善機構として肝、骨格筋や炎症細胞に対する作用が明らかとされているが、脂肪細胞に対する直接的な作用は報告されていない。そこで、本研究では、<math>\omega</math>3-PUFA のインスリン抵抗性改善機構を脂肪細胞における抗酸化ストレス機構に着目し検討した。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>マウス培養 3T3-L1 脂肪細胞における <math>\omega</math>3-PUFA の抗酸化作用機構を検討するため、エイコサペンタエン酸(EPA)ならびにドコサヘキサエン酸(DHA)が抗酸化酵素群の発現に及ぼす影響を、定量的 real-time PCR 法による mRNA 発現量および Western Blot 法による細胞内蛋白発現量にて網羅的に検索した。<math>\omega</math>3-PUFA の代謝産物やその受容体である G-タンパク質共役受容体 (GPR) のアゴニストを用いて、同様に抗酸化酵素発現に及ぼす影響を検討した。</p> <p>次に EPA、DHA とその酸化代謝産物である 4-HHE が誘導する抗酸化酵素 HO-1 の発現誘導における転写因子 Nrf-2 の役割を、RNA 干渉法を用い定量的 real-time PCR 法ならびに Western Blot 法を用い検討した。またマウス培養 3T3-L1 脂肪細胞に対する EPA ならびに DHA の抗酸化効果を検討するため、過酸化水素による細胞毒性を軽減しうるかを Nitro Blue Tetrazolium assay 法を用い検討した。</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。

**【結果】**

培養 3T3-L1 脂肪細胞において、EPA ならびに DHA による抗酸化酵素群の発現に対する効果を網羅的に検討した結果、Cu/ZnSOD、MnSOD、Catalase、GPx の発現には影響を及ぼさなかったが、抗酸化酵素 HO-1 および Nqo1 でのみ mRNA 発現ならびに細胞内蛋白発現レベルにおいて有意な発現誘導を確認した。この発現誘導は EPA、DHA ともに濃度依存的に増強することを確認し、EPA と比較し DHA の方が優位に HO-1 の発現を増強することを認めた。さらに、EPA、DHA の酸化代謝産物である 4-HHE も同様に HO-1 の発現を濃度依存的に増強させる事を確認した。一方、抗炎症作用を有することが報告されている EPA、DHA それぞれの代謝産物の一つである 18-HEPE や 10(S),17(S)-DiHDoHE は、抗酸化酵素である HO-1 の発現には関与していないことが判明した。また  $\omega$ 3-PUFA の受容体である GPR のアゴニストである GW9508 も HO-1 の発現増強を示さなかった。

EPA ならびに DHA により発現増強される HO-1 の制御機構を同定する目的で、RNA 干渉法を用いて転写因子 Nrf-2 の発現を抑制すると、EPA、DHA による HO-1 発現が完全に抑制された。一方、 $\omega$ 3-PUFA の受容体である GPR120 の発現抑制細胞では EPA ならびに DHA による HO-1 の発現増強に変化を認めなかった。

EPA、DHA の抗酸化効果が、過酸化水素による細胞毒性を軽減しうるかを Nitro Blue Tetrazolium assay を用い検討したところ、EPA、DHA ともに過酸化水素による酸化ストレス誘導性細胞毒性を有意に軽減した。しかし、この効果は抗酸化物質である N-acetylcysteine (NAC)の前処理で消失し、また RNA 干渉法を用いた HO-1 の発現抑制細胞でも消失する事がわかった。

**【考察】**

本研究により、培養 3T3-L1 脂肪細胞において  $\omega$ 3-PUFA が転写因子 Nrf-2 を活性化させ、抗酸化酵素 HO-1 の発現を誘導することが示された。脂肪細胞において、 $\omega$ 3-PUFA は、その受容体である GPR120 を介し、糖取り込みを増加させるという報告があるが、抗酸化作用に関しては、GPR120 とは独立して Nrf-2/HO-1 経路を活性化させ抗酸化作用を誘導することが判明した。 $\omega$ 3-PUFA による Nrf-2/HO-1 の活性化が、脂肪組織での酸化ストレスと、全身のインスリン抵抗性の改善に応用されると、新たなインスリン抵抗性改善の治療標的として期待される。

**【結論】**

培養 3T3-L1 脂肪細胞において  $\omega$ 3-PUFA が転写因子 Nrf-2 を活性化させ、抗酸化酵素 HO-1 の発現を誘導することで、脂肪細胞における酸化ストレスの軽減をもたらしうることを新たに明らかにした。

## 学位論文審査の結果の要旨

|   |     |    |      |
|---|-----|----|------|
| 整理番号  | 684 | 氏名 | 楠 知里 |
| 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>脂肪組織における酸化ストレスの増強はインスリン抵抗性の一因である。エイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの<math>\omega</math>3系不飽和脂肪酸を多く含む魚食が、臨床的にインスリン抵抗性を改善することが報告された。本研究は、同脂肪酸のインスリン抵抗性改善機序として、脂肪細胞における抗酸化ストレス機構に着目し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 培養脂肪細胞において、EPA 及び DHA は、Cu/Zn SOD、MnSOD、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼには影響が無く、抗酸化酵素である HO-1 の mRNA 及びタンパク発現を誘導した。</li> <li>2) EPA 及び DHA の酸化代謝物である 4-HHE は HO-1 の発現を増強したが、18-HEPE を含む他の代謝物では増強しなかった。</li> <li>3) 同脂肪酸による HO-1 の発現作用は、同受容体の機能を抑制しても影響を受けなかったが、RNA 干渉法を用いて転写因子 Nrf2 の発現を抑制すると消失した。他方、同受容体アゴニストも HO-1 を発現増強しなかった。</li> <li>4) 同脂肪酸は、過酸化水素が惹起する細胞毒性を軽減したが、同作用は抗酸化物質の前処理や HO-1 の発現抑制により消失した。</li> </ol> <p>本論文は、<math>\omega</math>3系不飽和脂肪酸の脂肪細胞における酸化ストレス軽減機構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 599字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 25年 1月 30日 )</p> |     |    |      |