

氏 名	石 角 篤
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 3 4 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 3 年 3 月 1 0 日
学 位 論 文 題 目	Low concentration of 4-hydroxy hexenal increases heme oxygenase-1 expression through activation of Nrf2 and antioxidative activity in vascular endothelial cells  (低濃度の 4-hydroxy hexenal は血管内皮細胞で Nrf2 の活性化を介した HO-1 発現と抗酸化活性を増加させる)
審 査 委 員	主 査 教 授 木 村 博  副 査 教 授 寺 田 智 祐  副 査 教 授 野 崎 和 彦

## 論文内容要旨

※整理番号	639	氏名 (ふりがな)	いしかど あつし 石角 篤
学位論文題目	Low concentration of 4-hydroxy hexenal increases heme oxygenase-1 expression through activation of Nrf2 and antioxidative activity in vascular endothelial cells (低濃度の 4-hydroxy hexenal は血管内皮細胞で Nrf2 の活性化を介した HO-1 発現と抗酸化活性を増加させる)		
<p><b>【目的】</b></p> <p>疫学研究や大規模介入研究より eicosapentaenoic acid (EPA) や docosahexaenoic acid (DHA) などの n-3 系多価不飽和脂肪酸 (n-3 PUFA) が心血管イベントを低下させることが示されてきたが、その作用機序については不明な点が多い。また、近年、DHA の摂取により n-3 PUFA の過酸化生成物である 4-hydroxy hexenal (4-HHE) の血中濃度が増加することが報告されてきたが、その血管組織に対する役割は不明である。</p> <p>レドックス感受性の転写因子 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) は、抗酸化酵素や第二相解毒酵素の発現調節を司るマスターレギュレータであり、内皮細胞のレドックスバランスを調節する。特に、Nrf2 によって発現調節を受ける heme oxygenase-1 (HO-1) は、抗動脈硬化作用に重要な役割を果たすことが示されてきた。</p> <p>本研究では、血管内皮において、n-3 PUFA の過酸化生成物である 4-HHE が転写因子 Nrf2 を介して HO-1 を誘導し細胞を酸化ストレスから防御しているとの仮説を立て、培養血管内皮細胞を用いた実験により検証した。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>ヒト培養血管内皮細胞 (HUVEC; human umbilical vein endothelial cell) に 4-HHE および n-6 系多価不飽和脂肪酸の過酸化生成物である 4-hydroxy nonenal (4-HNE) を添加することにより検討を行った。細胞毒性の判定は MTT アッセイにより行った。遺伝子発現変化はリアルタイム RT-PCR、タンパク発現変化はウエスタンブロッティングを用いて解析した。Nrf2 の関与を明らかにするために、siRNA を用いた Nrf2 のノックダウンを行った。</p> <p><b>【結果】</b></p> <p>① 50 μM の 4-HHE、25-50 μM の 4-HNE の HUVEC への 24 時間の処置は有意な細胞毒性を示したが、5-25 μM の 4-HHE、5-10 μM の 4-HNE は細胞生存に影響を与えなかった。</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)

- ② 4-HHE (1-10  $\mu$ M) は 4-HNE (1-10  $\mu$ M) と同様に、Nrf2 下流の遺伝子である HO-1 および NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) の発現を mRNA、タンパクレベルで増加させた (2-24 h)。
- ③ 4-HHE (5  $\mu$ M) は 4-HNE (5  $\mu$ M) と同様に、Nrf2 の核内へのトランスロケーション、コンセンサス配列への DNA 結合を増加させた。一方、Nrf2 の mRNA 発現に影響を与えなかった。
- ④ 4-HHE (5-10  $\mu$ M) および 4-HNE (5  $\mu$ M) によって増加する HO-1 発現は、siRNA による Nrf2 のノックダウンにより mRNA、タンパクレベルで低下した。
- ⑤ 4-HHE (5-10  $\mu$ M)、4-HNE (5  $\mu$ M) で HUVEC を前処置することによって、酸化ストレス誘導剤である *tert*-butyl hydroperoxide (tBHP) によって誘導される細胞毒性が軽減された。

#### 【考察】

n-3 PUFA の過酸化生成物である 4-HHE は 4-HNE と同様に、DNA、タンパク、リン脂質との付加体を形成する毒性物質として認識されてきた。実際、4-HHE は内皮細胞を含むいくつかの細胞において、細胞毒性やアポトーシスを誘導することが報告されている。本検討においても、4-HHE は 50  $\mu$ M の濃度において HUVEC に対して細胞死を誘導した。しかしながら、魚油の摂取にともなうより低いレベルでの血中 4-HHE の増加が、動脈硬化に対して防御的に機能することは十分に考えられ得る。

本研究では、細胞毒性を示さない低濃度 (1-10  $\mu$ M) の 4-HHE が 4-HNE と同様に、血管内皮細胞において、転写因子 Nrf2 を介して抗酸化酵素 HO-1 を誘導すること、また、酸化ストレスに対する細胞毒性に対して防御作用を示すことを新たに明らかにした。近年の研究により、血管内皮における HO-1 発現が動脈硬化形成防御に重要な役割を果たしていることが示されてきた。4-HHE の抗動脈硬化作用に対する *in vivo* でのさらなる研究が必要であるけれども、4-HHE は HO-1 誘導作用を介して n-3 PUFA の心血管保護作用の一部を担っている可能性が十分に考えられる。

本研究では、4-HHE が Nrf2 を介して HO-1 を誘導することを Nrf2 の silencing により証明したけれども、4-HHE が Nrf2 を活性化する作用機序については不明である。N-3 PUFA の臨床的意義を考察する上で、今後、4-HHE の Nrf2 活性化機序を明らかにすることは重要な課題である。

#### 【結論】

本研究では、4-HHE が血管内皮細胞において、HO-1 のような Nrf2 依存的な抗動脈硬化因子を誘導し、酸化ストレスによって誘導される細胞毒性を抑制することを明らかにした。4-HHE による Nrf2 を介した抗酸化ストレス作用は、n-3 PUFA が臨床的に示す抗動脈硬化作用に一定の役割を果たしていると考えられる。

### 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	639	氏名	石角 篤
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>n-3系多価不飽和脂肪酸が心血管疾患を予防することが示されてきたが、その分子メカニズムについては、いまだ不明な点が多いのが現状である。本研究は、n-3系多価不飽和脂肪酸の過酸化生成物である 4-hydroxy hexenal (4-HHE) が血管内皮細胞において、低濃度で Nrf2 を活性化し酸化ストレス防御作用を発揮するのではないかという仮説を検討したものである。</p> <p>ヒト培養血管内皮細胞に 4-HHE および n-6系多価不飽和脂肪酸の過酸化生成物である 4-hydroxy nonenal (4-HNE) を添加することにより検討を行った。</p> <p>4-HHE は 4-HNE と同様に、低濃度で Nrf2 を活性化し、その標的遺伝子である抗酸化酵素 HO-1 の発現を増加させた。4-HHE と 4-HNE による HO-1 誘導作用に Nrf2 が関与していることが Nrf2 のノックダウンにより証明された。また、4-HHE は 4-HNE と同様に、Nrf2 を介して血管内皮の酸化ストレスに対する細胞毒性を低減させた。</p> <p>本論文は血管内皮細胞において低濃度の 4-HHE が Nrf2 を介して抗酸化酵素 HO-1 を誘導し血管内皮を酸化ストレスから保護するという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、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 555 字)</p>			
(平成 23 年 1 月 25 日)			