

氏 名 岡田 貴司

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲第803号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項

学 位 授 与 年 月 日 平成30年 3月 9日

学 位 論 文 題 目 N-3 Polyunsaturated Fatty Acids Decrease the Protein Expression of Soluble Epoxide Hydrolase via Oxidative Stress-Induced P38 Kinase in Rat Endothelial Cells

(N-3 多価不飽和脂肪酸はラット内皮細胞において酸化ストレスが誘導する P38 キナーゼを介して Soluble Epoxide Hydrolase のタンパク発現を減少させる)

審 査 委 員 主査 教授 西村 正樹

副査 教授 松浦 博

副査 教授 西 英一郎

## 論文内容要旨

※整理番号	810	(ふりがな) 氏名	おかだ たかし 岡田 貴司
学位論文題目	<b>N-3 Polyunsaturated Fatty Acids Decrease the Protein Expression of Soluble Epoxide Hydrolase via Oxidative Stress-Induced P38 Kinase in Rat Endothelial Cells</b> (n-3 多価不飽和脂肪酸はラット内皮細胞において酸化ストレスが誘導する p38 キナーゼを介して soluble epoxide hydrolase のタンパク発現を減少させる)		
<b>【目的】</b> 血管内皮機能障害は、喫煙、高血圧症、脂質異常症、糖尿病など様々な要因により引き起こされる。アセチルコリン依存性血管弛緩反応の調整因子として血管内皮で生成される NO (一酸化窒素)、PGI <sub>2</sub> が知られているが、これらの因子と独立して Endothelial dependent hyperpolarization factor (EDHF) が存在する。最近、アラキドン酸由来の代謝物である Epoxyeicosatrienoic acid (EET) が、EDHF として働くことが見い出された。Soluble epoxide hydrolase (sEH) は、EET を速やかに分解する酵素であり、sEH 阻害剤が新規降圧薬候補として現在第 2 相臨床治験が実施されている。我々は、糖尿病患者の魚食介入試験で、血管内皮機能の改善と並行して sEH 活性が低下していることを示唆する成績を得た。そこで、n-3 多価不飽和脂肪酸が sEH 活性に影響を与えるとの仮説をたて、実験する事とした。			
<b>【方法】</b> ① 魚食のアセチルコリン依存性血管弛緩反応、sEH タンパク発現に及ぼす影響の検討 8 週齢の SD ラットに 3 週間のコントロール食、魚食を給餌した。投与開始 3 週間後の体重変化を評価した。その後、深い鎮静下に胸部大動脈を取り出し、切片をマグヌス管につるし、アセチルコリン依存性血管弛緩反応を測定した。また、Western blot 法を用いて、胸部大動脈の sEH タンパク発現を評価した。 ② ラット大動脈血管内皮細胞(RAEC)における DHA、EPA、4-HHE の sEH の mRNA 発現、タンパク発現への影響および EET/DHET 比と過酸化脂質 4-HHE 濃度の変化検討 RAEC を培養後、DHA、EPA にて刺激を行いタンパク回収後、RT-qPCR 法を用いて sEH mRNA 発現を、Western blot 法を用いて sEH タンパク発現を確認した。LC-MS/MS を用いて、DHA、EPA 刺激による細胞内の 4-HHE 濃度の評価、DHA、EPA 刺激による細胞内の EET、DHET 濃度の評価を行った。 ③ sEH タンパク発現減少機序の検討 sEH タンパク発現減少における酸化ストレスの影響を評価するため、抗酸化剤 NAC を前孵置し、sEH タンパク発現への影響を検討した。また、抗酸化転写因子 Nrf2 の関与を検討するため、si Nrf2 によるノックダウンを行い、sEH タンパク発現への影響を検討した。また、ストレス応答性 p38 kinase の sEH タンパク発現への影響を検討するため、p38 阻害剤である SB203580 の前孵置を行い、sEH タンパク発現への影響を検討した。			

(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を用いて印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

**【結果】****① 魚食のアセチルコリン依存性血管弛緩反応、sEH タンパク発現に及ぼす影響の検討**

コントロール群と魚食群のラット間に体重差を認めなかった。魚食群でアセチルコリン依存性の血管弛緩反応は有意に増強した。また、胸部大動脈組織中の sEH タンパク発現は魚食群で低下した。

**② ラット大動脈血管内皮細胞(RAEC)における DHA、EPA、4-HHE の sEH タンパク発現に及ぼす影響の検討**

- 1) DHA、EPA 刺激は sEH タンパク発現を減少させた。また、細胞内の 14,15-EET/DHET 比は BSA 刺激と比較して有意に増加しており、sEH 活性の低下が示唆された。
- 2) DHA、EPA 刺激は、細胞内の過酸化脂質 4-HHE 濃度を増加させた。
- 3) DHA、EPA、4-HHE 刺激は、sEH タンパク発現を減少させた。
- 4) DHA、EPA、4-HHE 刺激は、sEH mRNA 発現に影響しなかった。

以上の結果から、RAEC において DHA、EPA およびその代謝産物である 4-HHE は sEH タンパク発現を減少させるが、転写調節以外の機序が関与すると考えられた。

**③ sEH タンパク発現減少機序の検討**

- 1) 抗酸化剤 NAC の前孵置は DHA、EPA、4-HHE による sEH タンパク発現の減少を阻害した。
- 2) si Nrf2 を用いた実験では、DHA、EPA、4-HHE による sEH タンパク発現減少への影響が一定しなかった。
- 3) p38 阻害剤である SB203580 の前孵置は、DHA、EPA、4-HHE による sEH タンパク発現減少を阻害した。

以上の結果から、DHA、EPA、4-HHE による sEH タンパク発現の減少は NAC、SB203580 により抑制され、sEH タンパク発現減少の機序として酸化ストレスが引き起こす p38 kinase 活性化の関与が示唆された。

**【考察】**

DHA、EPA は 4-HHE を生成し、p38 kinase 活性化を介して sEH タンパク発現を減少させることが示唆された。喫煙や高血糖、脂質異常症は酸化ストレスを介して血管内皮機能障害を引き起こすとされており、ビタミンEなどの抗酸化剤は内皮機能障害を改善すると報告されている。一方で、運動は酸化ストレスを引き起こすにも関わらず血管内皮機能を改善することが報告されている。本研究においても、DHA、EPA は過酸化脂質 4-HHE の生成により酸化ストレスを介して血管内皮機能を改善している可能性が示された。酸化ストレスによる血管内皮機能改善のメカニズムとして、Nrf2 活性化を介した抗酸化作用による血管保護効果の他に、sEH タンパク発現の減少が関与する可能性が示唆された。本研究の結果は、糖尿病患者に対する魚食介入研究の結果と一致している。

**【結論】**

n-3 系多価不飽和脂肪酸の血管保護作用の一部は、sEH タンパク発現の減少を介するものである可能性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	810	氏名	岡田 貴司
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>本論文では、n-3 多価不飽和脂肪酸 (n-3 PUFA) が心血管系疾患に対して保護的に働く効果の解析として、アセチルコリン依存性血管弛緩への影響に着目し、なかでも血管内皮のもつ拡張因子 epoxyeicosatrienoic acid の分解酵素である soluble epoxide hydrolase (sEH) の発現レベルに与える影響とそのメカニズムについて、ラット個体及び大動脈内皮細胞を用いて解析し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) ラットを魚油食で 3 週間飼育すると、胸部大動脈のアセチルコリン依存性血管弛緩反応が増強し、組織中の sEH タンパク質レベルが減少した。</li><li>2) ラット大動脈内皮細胞の DHA ないし EPA 処理は、sEH タンパク質発現の減少、sEH 活性の低下、過酸化脂質 4-HHE の増加をきたした。</li><li>3) DHA, EPA, 4-HHE 処理による内皮細胞の sEH タンパク質減少は、sEH mRNA 発現減少を伴わず、抗酸化剤ないし p38 阻害剤での前処理により阻害されたことから、n-3 PUFA が引き起こす酸化ストレスによる p38 kinase 活性化を介した転写後制御による減少の可能性が示唆された。</li></ol> <p>本論文は、n-3 PUFA が動脈硬化に対して保護的にはたらく機序について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、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 30 年 1 月 29 日)</p>			