

氏 名	山 田 英 人
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 9 5 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 1 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	In Vivo and In Vitro Inhibition of Monocyte Adhesion to Endothelial Cells and Endothelial Adhesion Molecules by Eicosapentaenoic Acid (イコサペンタエン酸は血管内皮細胞における単球接着と接着分子の発現を抑制する)
審 査 委 員	主 査 教 授 野 崎 和 彦 副 査 教 授 山 本 学 副 査 教 授 岡 村 富 夫

論文内容要旨

*整理番号	600	(ふりがな) 氏名	(やまだ ひでと) 山田 英人
学位論文題目	<p style="text-align: center;">In Vivo and In Vitro Inhibition of Monocyte Adhesion to Endothelial Cells and Endothelial Adhesion Molecules by Eicosapentaenoic Acid (イコサペンタエン酸は血管内皮細胞における単球接着と接着分子の発現を抑制する)</p>		
<p>(目的)</p> <p>近年、生活習慣の欧米化に伴って、動脈硬化の前駆段階であるメタボリックシンドロームの罹患率は増加の一途を辿っており、メタボリックシンドロームとこれに続発する動脈硬化性疾患の成因の解明と新しい予防・治療法の開発は極めて重要である。動脈硬化の発症・進展には血管壁の炎症性変化が大きく関与することが知られている。飽和遊離脂肪酸は、自然免疫に関連する TLR4 を介して炎症性変化をもたらすことが知られているが、肥満に伴う高中性脂肪血症では、しばしば飽和遊離脂肪酸濃度が上昇しており、飽和遊離脂肪酸のもたらす炎症性変化が動脈硬化病変形成に関与する可能性がある。一方、イコサペンタエン酸 (EPA) のような <i>n-3</i> 多価不飽和脂肪酸がこの炎症性変化に対して拮抗作用を有することが知られている。本研究では、動脈硬化の初期病変と考えられる単球の血管壁の接着現象に着目し、個体レベルおよび細胞レベルにおいて単球の血管内皮細胞接着における EPA の抑制作用を検討した。</p> <p>(方法)</p> <p>1) NEMOes 法と共焦点顕微鏡による基礎研究</p> <p>EPA を一週間投与したマウスに、TLR4 リガンドであるリポポリサッカライド (LPS) を投与して 24 時間後、大動脈を長軸切開して血管壁全面を展開し、顕微鏡観察下で得られる各視野を撮影した。得られた情報をコンピュータソフトにより再構成することにより、展開した大動脈全面を観察し (New En face Method for Optimal Observation of Endothelial Surface; NEMOes 法) (Biochem. Biophys. Res. Commun. 309: 384-390, 2003)、抗単球抗体 (Mac-2) を用いた免疫染色により血管壁に接着する単球の数を部位別に測定した。同様に展開した大動脈血管を用いて、接着因子 ICAM-1、VCAM-1 あるいは細胞内シグナル分子である NF-κB を構成する p65 に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を施行し、共焦点顕微鏡にて観察した。</p> <p>2) フローアッセイ法による基礎研究</p> <p>EPA24 時間前処置後、LPS あるいはパルミチン酸により処理したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) をガラスプレート上に固定培養して一定の張り応力の下において一定速度で流入する単球の接着する数を計測する (フローアッセイ法) (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21: 1165-1171, 2001)。同様に処置した HUVEC を用いて、接着分子 ICAM-1 と VCAM-1 に対する抗体を用いた蛍光免疫染色とともにウエスタンブロッティング法により NF-κB p65 のリン酸化と核内移行を検討した。</p>			

(続 紙)

3) 臨床研究

メタボリックシンドロームの診断基準を満たす成人 60 名を、任意に EPA 投与群と非投与群の 30 名ずつに分けて、投与前と投与 3 か月後の血中 EPA 濃度、代謝関連パラメータ (BMI、腹囲、収縮期血圧、空腹時血糖、中性脂肪、総コレステロール、LDL および HDL コレステロール)、可溶性接着分子 (sICAM-1、sVCAM-1) の血中濃度を測定した。多変量解析により他の代謝パラメータと可溶性接着分子の変化の関連を検討した。

(結 果)

1) EPA 投与マウスでは非投与群と比較して、単球の血管内皮への接着が有意に抑制された。EPA 投与マウスでは血管内皮に発現する接着分子の発現と NF- κ B p65 の核内移行が有意に抑制された。

2) EPA 前処置後の HUVEC では非処置群と比較して、単球接着および接着分子発現が有意に抑制された。EPA 処置群において NF- κ B p65 のリン酸化は有意に抑制された。

3) EPA 投与群において非投与群と比較して、メタボリックシンドローム患者における sICAM-1 と sVCAM-1 の血中濃度は有意に抑制された。多変量解析により、sICAM-1 と sVCAM-1 の変化は血中 EPA 濃度の変化と有意に相関したが、他の代謝パラメータの変化とは明らかな相関関係は認められなかった。

(考 察)

上記の 1) と 2) により、TLR4 の代表的リガンドである LPS 刺激が、マウスの血管表面あるいは HUVEC の細胞表面に接着分子の発現と単球接着を誘導することを確認した。EPA はこれらの単球接着および接着分子の発現を抑制するとすることを明らかにした。上記の 3) では、メタボリックシンドローム患者において EPA 投与群では非投与群と比較して有意に血中可溶性接着分子の血中濃度が低下することが明らかになり、これは EPA の代謝調節作用とは独立した効果であることが示唆された。

メタボリックシンドロームは内臓脂肪型肥満を背景として発症するが、肥満に伴う高中性脂肪血症では、しばしば飽和遊離脂肪酸濃度の上昇が認められる。飽和遊離脂肪酸は、自然免疫に関連する TLR4 を介して炎症性変化をもたらす、動脈硬化病変形成に関与する可能性がある。本研究により、血管内皮において EPA が NF- κ B の活性化を抑制し、動脈硬化の初期病変である血管内皮への単球接着を抑制することにより抗動脈硬化作用をもたらす、これが EPA の心血管イベント抑制効果に関連することが示唆された。

(結 論)

臨床的にも確認されている *n-3* 多価不飽和脂肪酸の抗動脈硬化作用の少なくとも一部は血管内皮における単球接着抑制作用によることが示唆された。

- (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で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	600	氏名	山田 英人
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究では、マウス生体大動脈内皮細胞、培養ヒト臍帯静脈内皮細胞において、Eicosapentaenoic acid (EPA) が、lipopolysaccharide 刺激により誘導される単球接着と接着分子発現を抑制し、同時に内皮における NF-κB の活性化を抑制することを明らかにし、EPA が抗炎症作用を介して心血管イベント抑制効果をもたらす可能性を示唆した。</p> <p>さらに、メタボリックシンドロームに該当する患者において、EPA 投与後の血中可溶性接着分子の血中濃度が投与前と比較して有意に低下すること、その低下は血中 EPA 濃度の変化と相関するが他のパラメータとは相関しないこと、を多変量解析によって明らかにした。</p> <p>以上より、EPA が脂質低下作用のような代謝調節作用とは独立した機序を介して心血管イベントを抑制する可能性があることを示した。</p> <p>本研究は、EPA の動脈硬化予防の機序として、内皮における単球接着や接着因子発現の抑制の関与を <i>in vivo</i> において初めて明らかにしたものであり、博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は平成 21 年 2 月 4 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。</p>			
(平成 21 年 2 月 20 日)			