

## 審査の結果の要旨

氏名 松本 美環

本研究は、n-3系多価不飽和脂肪酸(n-3polyunsaturated fatty acids; n-3PUFAs)の主要な成分であるイコサペンタエン酸(EPA)が動脈硬化領域の大きさと質に及ぼす影響を明らかにするため、高脂血症のモデルマウスであるApoE欠損マウスとLDL受容体欠損マウスを用いて検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. EPAによりApoE欠損マウスおよびLDL受容体欠損マウスにおいて動脈硬化性病変が有意に抑制されていた。また動脈硬化性プラークの構成成分を評価するためにApoE欠損マウスにおいて大動脈基部の横断切片による評価を行ったところ、EPA投与によりアテロームの間質中のコラーゲン量が増加することが示された。抗 $\alpha$ -SMA抗体による免疫組織学的解析により、EPAが有意に動脈硬化性プラーク中の平滑筋細胞を増加させることが認められた。さらに抗F4/80抗体による解析で、動脈硬化病変へのマクロファージの浸潤がEPA投与により抑制されることが確認された。以上の結果から、EPAには動脈硬化性病変部を物理的に安定させる効果があることが示唆された。

2. TNF $\alpha$ の刺激によりヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVECs)のVCAM-1、ICAM-1 mRNAの発現が著明に上昇することが認められたが、刺激前にHUVECsをEPA処理することで、VCAM-1、ICAM-1の発現が有意に抑制されることがreal-time PCRを使った解析で明らかになった。またHUVECsによるMCP-1分泌を測定したところ、TNF $\alpha$ 刺激前のEPA処理によって、HUVECsからのMCP-1分泌の上昇が抑制された。さらに大動脈抽出物のreal-time RT-PCR解析により、統計学的有意差はないもののin vivoにおいてEPAがMCP-1、VCAM-1、ICAM-1の発現を抑制する効果が認められた。こうした結果から、EPAが炎症細胞と血管内皮細胞の相互作用を抑制することが示唆された。さらに、経口投与したEPAがApoE欠損マウスでのチオグコレート投与誘導性腹膜炎モデルにて腹腔内に浸潤するマクロファージを減少させる効果が認められた。これらのことから、EPAにより動脈硬化進展に関わる炎症細胞の浸潤が抑制される可能性が示された。

3. TNF $\alpha$ の刺激によりRAW264.7細胞でのMMP-2及びMMP-9の発現上昇が認められた。一方、TNF $\alpha$ 刺激前のEPA投与により、RAW264.7細胞でのMMP-2及びMMP-9の発現上昇が抑えられることがreal-time PCRによる解析で明らかになった。以上の結果は、TNF $\alpha$ 刺激前のEPA処理が、サイトカインに反応したマクロファージにおけるMMPsの発現を減弱させることを示していた。こうしたin vitroの結果と同様に、EPAの4週間投与後のApoE欠損マウスの大動脈でのMMP-2及びMMP-9の発現が抑制されることを確認した。これらの結果から、EPA投与により、マクロファージによるMMPsの産生が抑制され、プラーク破綻の回避に関与している可能性が示さ

れた。

4. マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞を EPA 処理すると、用量依存的に PPAR $\alpha$  の発現が上昇した。EPA の抗炎症作用における PPAR $\alpha$  の関与の可能性について調べるために、PPAR $\alpha$  の発現を small interference RNA (siRNA) にて抑制する実験を行ったところ、スクランブル siRNA を HUVECs に導入すると、EPA の投与により TNF $\alpha$  によって誘導される NF- $\kappa$ B の活性化は抑制されるが、特異的 siRNA により PPAR $\alpha$  の発現を抑えると、EPA の NF- $\kappa$ B 抑制効果は認められなくなった。同様に、分化させた THP-1 細胞において、siRNA によって PPAR $\alpha$  の発現を抑制すると、TNF $\alpha$  刺激に対する MMPs 発現を EPA が抑制する効果は認められなかった。これらの結果から、EPA の抗炎症作用には少なくとも一部分は PPAR $\alpha$  依存性の NF- $\kappa$ B による抑制が関係している可能性が示唆された

以上、本論文は高脂血症のモデルマウスにおいて EPA の抗動脈硬化作用には、脂質代謝改善効果以外にも抗炎症作用が寄与している可能性とその分子基盤を示したものである。本研究は、動脈硬化患者において、心疾患発症の予防として高純度 EPA の使用が有用である可能性を示唆していると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。