

博士論文

エイコサペンタエン酸のマクロファージ LPL 発現抑制を
介する VLDL 炎症惹起性の抑制作用と Cide-a と Cide-c の
発現抑制を介する脂肪肝形成の抑制作用

平成 25 年 3 月

神野 泰隆

目次

目次	1
要旨	4
略語表	7
1 序論	9
2 方法	26
2.1 VLDL に対する EPA の影響の検討方法	26
2.1.1 材料	26
2.1.2 実験動物と飼育条件	26
2.1.3 マウスへの EPA の投与と VLDL の単離	26
2.1.4 脂質量とタンパク質量の測定, VLDL の粒子サイズと脂肪酸組成の分析	27
2.1.5 細胞株と培養条件	28
2.1.6 マクロファージからの RNA 抽出と遺伝子発現の測定	29
2.1.7 マクロファージの脂質含量の測定	30
2.1.8 LPL に対する VLDL の感受性の測定	30
2.1.9 マクロファージの LPL 分泌量の測定	31
2.1.10 VLDL のアポタンパク質の検出	32
2.1.11 統計解析	32
2.2 脂肪肝に対する EPA の影響の検討方法	33
2.2.1 材料	33
2.2.2 実験動物と飼育条件	33
2.2.3 マウスへの被検物質の投与と組織採取	33
2.2.4 肝臓の TG 含量と血漿 ALT 量の測定	34
2.2.5 肝臓からの RNA 抽出と遺伝子発現の測定	35
2.2.6 細胞株と培養条件	36
2.2.7 遺伝子発現プラスミドの作製	36
2.2.8 Cide-a と Cide-c のレポータープラスミドの作製	37

2.2.9	Cide-a と Cide-c を過剰発現した培養細胞の脂肪滴の染色.....	37
2.2.10	Cide-a と Cide-c の細胞障害性の測定	38
2.2.11	Cide-a と Cide-c のプロモーター活性に対する EPA の作用の測定	39
2.2.12	Cide-a と Cide-c のプロモーター活性に対する SREBP-1 の作用の測定.....	39
2.2.13	統計解析.....	40
3	結果.....	41
3.1	VLDL に対する EPA の影響の検討結果.....	41
3.1.1	マウスの血漿脂質量に対する EPA の作用.....	41
3.1.2	マクロファージの炎症性因子の発現に対する VLDL の作用	42
3.1.3	マクロファージの脂質含量に対する VLDL の作用.....	43
3.1.4	VLDL の脂肪酸組成に対する EPA の作用	44
3.1.5	VLDL の炎症惹起性に対する遊離体の EPA の作用.....	45
3.1.6	VLDL の炎症惹起性に対する LPL 阻害剤の作用.....	46
3.1.7	マクロファージの培養上清の FFA 濃度と LPL 量に対する VLDL の作用.....	47
3.1.8	LPL に受ける VLDL の加水分解に対する EPA の作用	48
3.1.9	VLDL の脂質含量と粒子サイズに対する EPA の作用	49
3.1.10	VLDL の apoCII と apoCIII の含量に対する EPA の作用.....	50
3.1.11	VLDL の各種アポタンパク質の含量に対する EPA の作用	51
3.2	脂肪肝に対する EPA の影響の検討結果	52
3.2.1	HF/HS 食投与による脂肪肝形成と EPA の作用	52
3.2.2	脂肪肝形成に伴う肝障害と EPA の作用.....	53
3.2.3	脂肪肝の発症進展に関与する新規候補因子の選抜	54
3.2.4	脂肪肝の SREBP-1 と PPAR γ の発現とこれらに対する EPA の作用.....	56
3.2.5	HF/HS 食投与による肝臓の TG 蓄積と肝障害, Cide-a と Cide-c の発現の経時変化.....	57
3.2.6	HF/HS 食投与による肝臓の SREBP-1 と PPAR γ の発現の経時変化	58
3.2.7	遺伝性肥満マウスの肝臓の TG 蓄積と肝障害, Cide-a と Cide-c の発現	59

3.2.8	肝障害に影響する因子の統計的解析	60
3.2.9	培養細胞に対する Cide-a と Cide-c の作用	61
3.2.10	Cide-a と Cide-c のプロモーター活性に対する EPA の作用.....	62
3.2.11	Cide-a と Cide-c のプロモーター活性に対する SREBP-1 の作用	63
4	考察	64
5	引用文献	76
	謝辞	83

要旨

動脈硬化とは血管壁の内層に脂質が沈着し、血管内腔の狭窄を引き起こし、遂には狭心症や致命的な心筋梗塞などの虚血性心疾患（心血管イベント）を発症する疾患である。虚血性心疾患は発症するとその患者の生活の質を著しく低下させるだけでなく、医療経済的にも大きな負担を社会に強いる。近年のライフスタイルの西欧化や高齢化に伴い、我が国において虚血性心疾患の頻度は今後増加することが確実視されており、有効な予防法や治療法の確立は緊急の課題とされる。動脈硬化の発症進展には複数の危険因子が関与するため、これらの包括的管理は動脈硬化性疾患の予防や治療において重要である。魚油に多く含まれる必須脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（EPA）は、抗動脈硬化作用を持つことが知られているが、その機序には不明な点を残している。この機序を明らかにすることは、動脈硬化性疾患の有効な予防法や治療法の確立に寄与する知見の提供に繋がるものと考えられる。この様な観点から、以下の2点についての検討を行った。

1) VLDL の炎症惹起性に対する EPA の抑制作用とその作用機序

血中の超低比重リポタンパク質（VLDL）の増加をきたした高中性脂肪血症は、心血管イベントの危険因子である。肝臓で合成され血中に分泌される VLDL は、中性脂肪を末梢組織へ運搬・供給するリポタンパク質である。近年、VLDL の炎症惹起性が明らかになり、動脈硬化の発症進展への関与が疑われている。そこで VLDL の炎症惹起性に対する EPA の作用を検討した。VLDL を通常食で飼育したマウス（Ctrl-VLDL）、または EPA を投与

したマウス (EPA-VLDL) の血漿から単離し, これらを THP-1 マクロファージに添加した.

Ctrl-VLDL の添加によってマクロファージの炎症性因子 (IL-1 β , TNF- α , MCP-1) の発現は増加した. 一方, EPA-VLDL の添加ではこの炎症惹起性が顕著に減弱していた. また, VLDL の加水分解酵素であるリポ蛋白リパーゼ (LPL) の阻害は, VLDL の炎症惹起性を抑制した. このことから VLDL の炎症惹起性には, LPL によるその加水分解作用が必要であることが示された. そこでマクロファージまたは精製 LPL による VLDL の加水分解の受け易さを比較した所, EPA-VLDL は Ctrl-VLDL に比べこれらによる加水分解を受け難かった. またマクロファージの LPL 分泌量を測定した所, Ctrl-VLDL の添加でこれは変動を受けなかったが, EPA-VLDL の添加では減少していた. また EPA-VLDL では, その小型化やアポタンパク質である apoCII と apoCIII の含量比 (apoCII/apoCIII) の減少など, LPL に加水分解を受け難い性状への変化が認められた. EPA の投与は, VLDL の性状を変化させ LPL に加水分解を受け難くし, さらにマクロファージ LPL 分泌発現を抑制することで, VLDL の炎症惹起性を減弱させる可能性が示された.

2) 脂肪肝の発症進展に関与する因子の選抜と機能解析, これらに対する EPA の抑制作用

脂肪肝は心血管イベントの危険因子である. 脂肪肝は肝臓への脂肪蓄積と肝障害を特徴とする疾患であるが, その形成機序とこれらに対する EPA の作用については不明な点を残している. そこで通常食 (健常群), 高脂肪-高シヨ糖食 (脂肪肝群), EPA を混ぜた高脂肪-高シヨ糖食 (EPA 群) を投与したマウスを比較した. 20 週間投与した脂肪肝群は肝臓

への中性脂肪の蓄積と肝障害を伴った脂肪肝を呈し、EPA 群ではこれらが顕著に抑制されていた。この際、脂肪合成を促進する転写因子である SREBP-1 の肝臓における発現も脂肪肝群で増加しており、EPA 群でこれが抑制されていた。また、肝臓の遺伝子発現の網羅的な解析により、健常群と比較して脂肪肝群で発現が増加し、これが EPA 群で減少していた因子として Cide-a と Cide-c を選抜した。Cide-a と Cide-c の機能を解析するため、これらを培養細胞に過剰発現させた。すると細胞内の脂肪滴の肥大化や細胞死の誘導が認められ、これらの肝臓での脂肪蓄積や肝障害への関与が示唆された。またレポーターアッセイにより、Cide-a のプロモーター活性に対する EPA の抑制作用、SREBP-1 の促進作用が認められた。一方、Cide-c のプロモーター活性に対してはこれらの作用がほとんど認められなかった。脂肪肝形成に対する EPA の抑制作用には、SREBP-1 制御を介する Cide-a に対する直接的な抑制作用と、Cide-c に対する間接的な抑制作用が寄与している可能性が示された。

以上のように、VLDL の炎症惹起性と脂肪肝形成に対する EPA の抑制作用をこれらの機序とともに提示した。EPA は、心血管イベントの危険因子である高中性脂肪血症または脂肪肝を併発した動脈硬化症患者に有効である可能性が示された。

略語表

ALT	Alanine aminotransferase
AP-1	Activator protein 1
ATCC	American type culture collection
BSA	Bovine serum albumin
CBB	Coomassie brilliant blue
CE	Cholesterol ester
cDNA	Complementary DNA
ChREBP	Carbohydrate response element binding protein
Cide	Cell death-inducing DNA fragmentation factor-alpha-like effector
CRP	C-reactive protein
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPA	Eicosapentaenoic acid
EPA-E	Ethyl eicosapentaenoate
EPA-Na	Eicosapentaenoic acid sodium salt
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FBS	Fetal bovine serum
FFA	Free fatty acid
HDL-C	High-density lipoprotein-cholesterol
HF/HS	High-fat/high-sucrose
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase
HPLC	High performance liquid chromatography
IDL	Intermediate-density lipoprotein

IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
IPG	Immobilized pH gradient
LDH	Lactate dehydrogenase
LDL-C	Low-density lipoprotein-cholesterol
LPL	Lipoprotein lipase
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
PA-E	Ethyl palmitate
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PL	Phospholipid
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPIB	Peptidylprolyl isomerase B
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
RPMI	Roswell park memorial institute
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SPF	Specific pathogen free
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
TC	Total cholesterol
TG	Triglyceride
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
VLDL	Very-low-density lipoprotein

1 序論

我が国の平成 23 年の死因別死亡総数のうち、心疾患（高血圧性を除く）による日本人の死亡は 19 万 4,926 人で全体の 15.5%を占めており、悪性新生物に次いで第 2 位に位置している（図 1）。このうち急性心筋梗塞による死亡が 4 万 3,265 人、その他の虚血性疾患による死亡が 3 万 4,576 人と、心疾患の中で大きな比重を占めている¹。我が国の平成 20 年度の虚血性心疾患の総患者数は 80 万 8,000 人（男性 46 万 4,000 人、女性 34 万 8,000 人）に上り、1 日の外来通院患者は 6 万 8,000 人、入院患者数は 1 万 8,900 人と推定されている²。また平成 22 年度の医科診療医療費を主傷別にみると、循環器系の疾患が約 5.7 兆円と最も多く、ついで新生物が約 3.5 兆円である³。

虚血性心疾患は一度発症すると、その患者の生活の質（QOL）を著しく低下させるだけでなく、医療経済的にも大きな負担を社会に強いることになる。我が国における虚血性心疾患の発症率、死亡率は諸外国と比較すると低値であることが報告されている。しかし近年のライフスタイルの西欧化や高齢化の進行に伴い、今後その頻度や循環器系疾患の医療費の増加が予想されるため、有効な予防法の確立は緊急の課題である^{1,4}（図 2）。

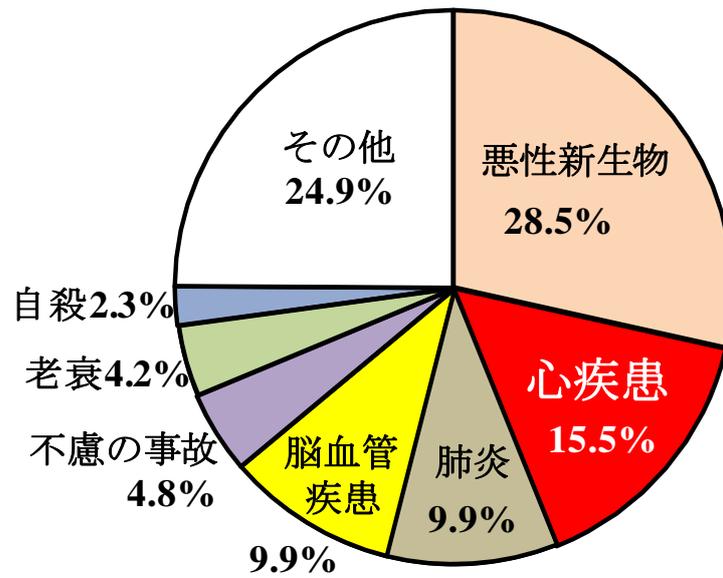


図 1. 我が国における主な死因の死亡数の割合 (平成 23 年)

引用文献 1 より引用

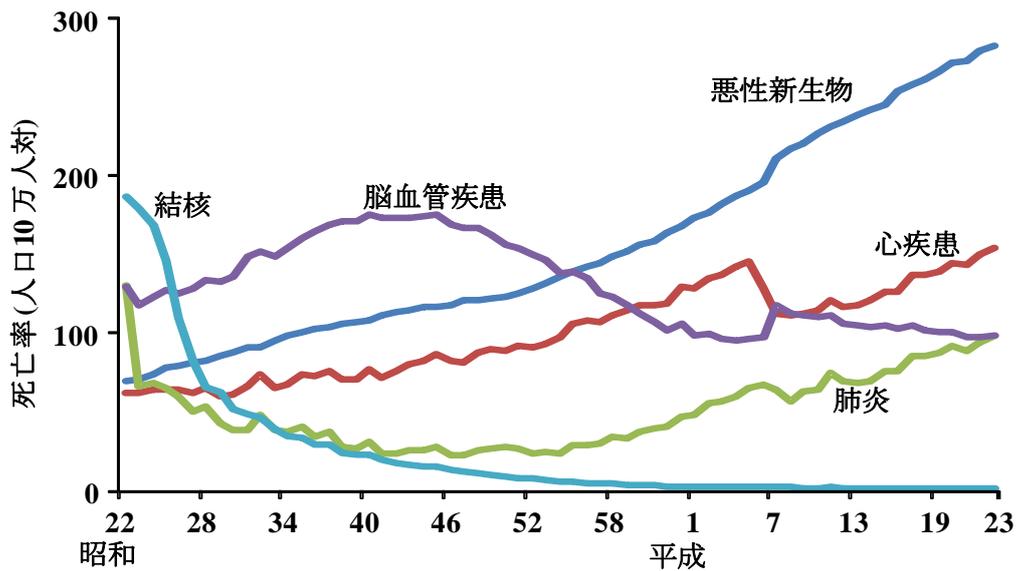


図 2. 我が国における主な死因別にみた死亡率の年次推移

引用文献 1 より引用

動脈硬化とは、脂質を主な構成成分とする粥状（アテローム性）の隆起（プラーク）が血管内腔で成長し、血管内腔の狭窄を引き起こし、遂には狭心症や致命的な心筋梗塞などの虚血性心疾患を発症する疾患である（図3）。初期段階として血管の内皮細胞がシェアストレス、高血糖、脂質異常、酸化ストレス、感染などのなんらかのストレスにより障害を受け、細胞表面に接着因子を発現する。これに血液中の単球やTリンパ球が接着し、内皮細胞下へ侵入する。侵入した単球は、障害を受けた内皮細胞から産生されたマクロファージ分化・増殖因子によってマクロファージへと分化する。さらに障害を受けた内皮の隙間からは、低比重リポタンパク質（LDL）などのリポタンパク質が侵入し、酸化などの変性を受ける。これをマクロファージが細胞内に取り込むことによって、泡沫細胞へと変態する。動脈硬化が進行して沈着される血管内腔の脂質は、集積したマクロファージなどを由来とする泡沫細胞によって形成される。また泡沫化したマクロファージはIL-1 β 、TNF α 、MCP-1などのサイトカインを放出し、さらにTリンパ球や中膜平滑筋細胞の内膜への遊走、これらの増殖や泡沫化を促すことで動脈硬化プラークの形成を進展させる（図4）。さらに活性化されたマクロファージや平滑筋細胞は細胞外基質分解酵素を産生し、繊維性皮膜を脆弱化させることでプラークの崩壊を促す。このような一連の炎症反応が動脈硬化の発症進展に関与することから、近年では動脈硬化は慢性炎症性の疾患と考えられている^{5,6}。

成長したプラークの崩壊が起こると血栓が形成され、血管内腔の狭い冠動脈が閉塞し、致命的な虚血性心疾患を発症する（図3）。

非表示

非表示

血中の脂質であるコレステロール（主に LDL-C, HDL-C）や中性脂肪（TG）が異常値を示す脂質異常症は、動脈硬化巢に脂質を蓄積させる直接の原因と考えられているため、動脈硬化性疾患の最も重要な危険因子と捉えられている。血中の LDL-C や TG が大きいほど、また HDL-C が小さいほど、心血管イベントの発症率が大きいことが欧米のみならず我が国においても疫学調査で示されている⁴。その管理は動脈硬化性疾患の予防や治療において極めて重要な位置を占めており、生活習慣の改善、食事療法、運動療法、薬物療法によって行われている。様々な疫学研究や治療エビデンスから、LDL-C（いわゆる悪玉コレステロール）の増加は動脈硬化性疾患の最も重要な危険因子と捉えられており、脂質異常症の診断基準やその管理は LDL-C を中心に行われている。一方で、その他の介入可能な危険因子、即ち喫煙、糖尿、高血圧、肥満などに対する包括的な管理も脂質異常症のそれと同様に重要である⁴。近年、我が国において動脈硬化性疾患の危険因子である脂質異常症や糖尿病などの生活習慣病が著明に増加していることから、虚血性心疾患の増加が懸念されている⁷。

血中には TG、リン脂質（PL）、コレステロール、脂肪酸など脂質と呼ばれる物質が含まれ、これらは栄養成分として食事によって摂取されるか、または体内で合成される。TG は体内にいわゆる脂肪として貯蔵されるエネルギー源である。脂肪酸とグリセリンのエステル体であり、そのほとんどが血中ではトリグリセリドとして存在している。PL は組織の細胞膜の主要な構成成分である。また各種酵素による PL の分解によって生じる生理活性

物質は、細胞のシグナル伝達において重要な役割を担う。コレステロールについても細胞膜の構成成分であるだけでなく、各種ホルモンなどの原料になる。TG やコレステロールは水にほとんど溶けないため、血中においてはリポタンパク質の内部に取り込まれた形で存在する。リポタンパク質は共通の構造を持つ。すなわち TG と、コレステロールに脂肪酸が結合したコレステロールエステル (CE) からなる疎水性の中心部分と、その周囲を PL とタンパク質によって取り囲んだ構造である⁸ (図 5)。リポタンパク質を構成するタンパク質は一般にアポタンパク質と呼ばれ、リポタンパク質の機能や脂質代謝に関与する。リポタンパク質はその大きさや含まれる成分の割合に応じて、主にカイロミクロン、超低比重リポタンパク質 (VLDL)、中間比重リポタンパク質 (IDL)、LDL、高比重リポタンパク質 (HDL) に分類される⁸ (表 1)。

非表示

表 1. 主なリポタンパク質の特徴

	カイロミクロン	VLDL	IDL	LDL	HDL
比重	<0.96	0.96-1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.063-1.210
分子量	1-10x10 ⁹	5-100x10 ⁵	3-4x10 ⁶	2-3x10 ⁶	15-36x10 ⁴
直径(nm)	80-1,000	30-75	20-30	19-22	7.0-8.5
中性脂肪	85%	55%	24%	10%	4-5%
コレステロール エステル	5%	12%	33%	37%	12-18%
遊離コレステ ロール	2%	7%	13%	8%	3-6%
リン脂質	6%	18%	12%	22%	23-29%
タンパク質	2%	8%	18%	23%	42-58%

引用文献 8 より改変して引用

TG, PL, CE はそれらに脂肪酸を構成成分として含んでおり、これらの組成は日常摂取する脂肪酸の種類に影響を受ける。脂肪酸はその種類によって生理作用が異なることが知られている。脂肪酸は構造的に二重結合を持たない飽和脂肪酸と、二重結合を持つ不飽和脂肪酸に大別される。さらに不飽和脂肪酸は、一価の不飽和脂肪酸、そしてエイコサペンタエン酸（EPA）のような n-3 系と、二重結合の付く位置が異なる n-6 系の多価不飽和脂肪酸（PUFA）とに分けられる。n-6 PUFA の代表であるアラキドン酸の代謝物は炎症惹起性を持ち、これに対して n-3 PUFA が拮抗作用を持つ（図 6）。

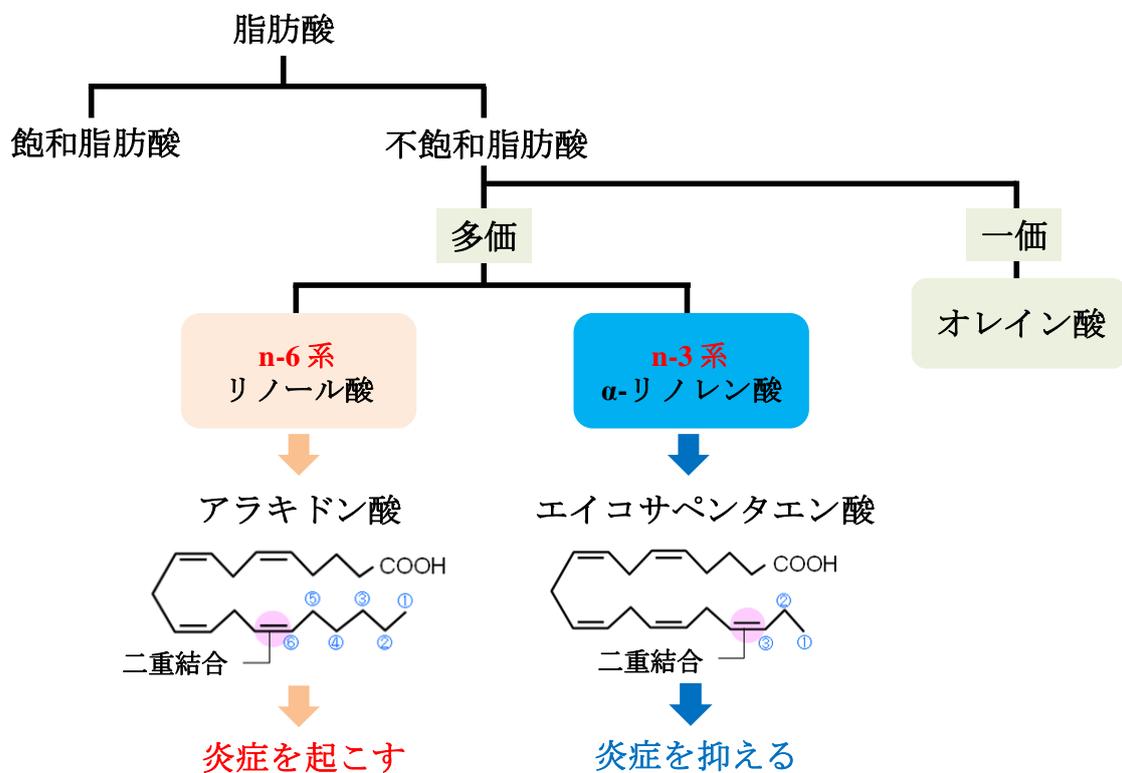


図 6. 脂肪酸の分類

EPA を代表とする n-3 PUFA は青魚などの食品に多く含まれる。多くの疫学研究や大規模臨床試験により、n-3 PUFA の摂取が動脈硬化性疾患の予防効果を持つことが証明されている⁹⁻¹⁴。しかし純粋な一つの脂肪酸として、心血管イベント低下作用のエビデンスを持つ n-3 PUFA は EPA だけである。高純度 EPA 製剤(エイコサペンタエン酸エチル(EPA-E))は、我が国において高脂血症や閉塞性動脈硬化症の治療薬として臨床で使用されている。

大規模無作為比較試験 Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS) は、HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンを服用している日本人高コレステロール血症患者において、EPA による心血管イベントの予防効果を検討した臨床試験である¹⁵。この試験によって EPA は患者の血清 LDL-C 値を低下させること無く、主要冠動脈イベントの累積発症率を 19% 低下させることが示された (図 7)。LDL-C 値の低下が最も強く動脈硬化症の予防に寄与することが証明されてきた中で、JELIS においては EPA が患者の血清 LDL-C 値に影響を及ぼさなかったことから、EPA の LDL-C 非依存的な抗動脈硬化作用の存在が浮かび上がった。この作用の機序を明らかにすることは、動脈硬化性疾患の新たな治療・予防の戦略を構築していく上で重要である。EPA 投与の副作用としては胃腸障害 (悪心、嘔吐、胃不快感、下痢、便秘など)、皮膚障害 (発疹、痒痒症など)、出血傾向 (皮下出血、鼻血など) が挙げられる。また EPA は血小板凝集抑制作用を持つため¹⁶、出血している患者への投与は禁忌である。これまでに EPA は、内膜肥厚抑制作用、抗糖尿病作用を持つ血中アディポネクチンの増加作用や^{17,18}、エイコサノイド代謝や NF-κB 経路を介した抗炎症作用を持つこと

が報告されている^{18,19}。このような薬理作用が抗動脈硬化作用に働いている可能性が考えられているが、これらの詳細な機序や、動脈硬化性疾患の病態生理に対する作用については不明な点を残している。

非表示

経口投与された EPA は小腸内で吸収され、小腸上皮細胞において TG に組み込まれ、胸管リンパを経て血中に入り、次いでカイロミクロンまたは VLDL として血中より各種臓器に分布する²⁰。肝臓で合成され血中に分泌される TG 含量の大きい VLDL は、TG を末梢組織に運搬・供給する働きを持つ。血中の VLDL は、脂肪組織や筋肉の毛細血管壁へのパラニン硫酸と非共有結合しているリポ蛋白リパーゼ (LPL) による作用で、その TG の大部分がグリセロールと脂肪酸に加水分解され、中間比重リポタンパク (IDL) になる。残った IDL の TG は肝臓で肝性トリグリセリドリパーゼによる分解を受け、コレステロール含量の大きい LDL になる。LDL は末梢組織にコレステロールを運搬・供給する働きを持つ。LDL は受容体を介して肝臓または肝外組織に取り込まれる。HDL は主に肝臓や小腸で合成、血中に分泌され、末梢組織の余分なコレステロールを回収し、肝臓に運搬して胆汁中に分泌処理する⁸ (図 8)。

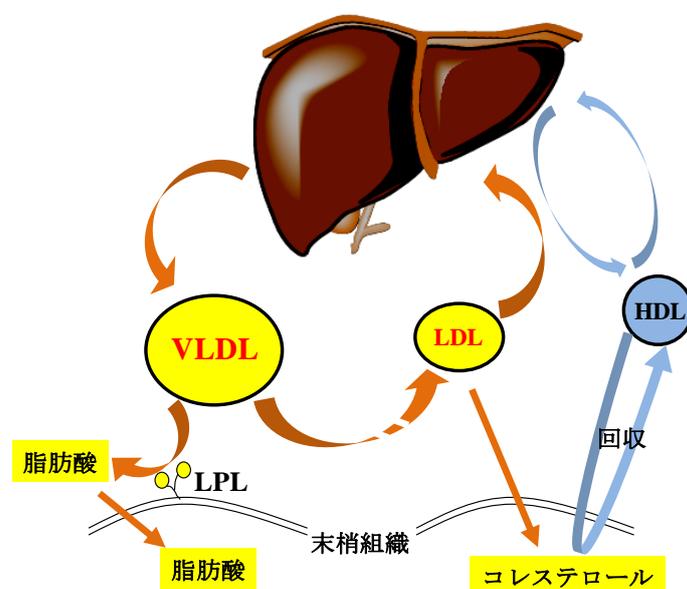


図 8. 各種リポタンパク質の役割

血中のカイロミクロンや VLDL が過剰となった状態を示す高 TG 血症は、心血管イベントの重要な危険因子と考えられている²¹。高 TG 血症は TG の合成亢進と異化低下により発症する。TG の肝臓における合成亢進は、インスリン抵抗性を基盤とした血糖（グルコース）の増加と、脂肪組織を由来とする遊離脂肪酸（FFA）の肝臓への供給過剰により生じる（図 9）。TG の異化には、主に LPL によるカイロミロンや VLDL の加水分解が関与する。LPL によるこれらの異化作用の低下は、血中におけるカイロミロンや VLDL の停滞を引き起こし、高 TG 血症を引き起こす。血中の VLDL の増加は心血管イベントと関連することが報告されている²²。また VLDL の量やサイズが炎症マーカーである CRP、炎症性サイトカインの産生量と相関するという報告もされており^{23,24}、血管壁の慢性炎症への関与が指摘されている。さらに動脈硬化巣に VLDL が存在していることや²⁵、VLDL がマクロファージに対して泡沫化や炎症性サイトカイン産生を促すことが報告されていることから、VLDL の直接的な動脈硬化の発症進展への関与が疑われている²⁶⁻²⁸（図 10）。

EPA は VLDL に搭載されて末梢組織に運搬されることから、EPA の作用は VLDL を介して起こっている可能性が考えられる。このことから VLDL の炎症惹起性に対する EPA の影響を検討することは、EPA の抗動脈硬化作用の機序を考える上で重要である。これまでにラットにおいて、EPA の投与が VLDL のサイズやそのアポタンパク質の比率などの性状を変化させることが報告されている²⁹。著者は本研究で、EPA の投与が VLDL の性状を変化させ、マクロファージに対するその炎症惹起性を減弱させることを見出した。こ

これは臨床で使用されている薬剤が、VLDL の炎症惹起性に影響を及ぼすことを示した最初の例であり、EPA の LDL-C に依存しない抗動脈硬化作用機序の新たな可能性を示すものである（図 11）。

血中 VLDL 増加の原因の一つとして、TG が肝臓に蓄積した状態、いわゆる脂肪肝を呈した肝臓における VLDL の合成と分泌の亢進が挙げられる³⁰。健康な肝臓は 3-5%の脂肪を含んでいるが、様々な要因によって処理し切れなくなった脂肪が肝細胞に蓄積されると、脂肪肝を発症する。脂肪が蓄積した肝臓においては、肝細胞内に脂肪滴という球状の脂肪が形成されており、この脂肪滴が肝細胞の 30%以上を占めた状態を脂肪肝という。我が国においては成人の 10-30%が脂肪肝であると推測されており、さらにライフスタイルの西欧化に伴いこの頻度は今後も増加すると予想されている³¹。脂肪肝は大きくアルコール性のものと非アルコール性のものに大別される。非アルコール性脂肪肝（NAFLD）はインスリン抵抗性を示す糖尿病、肥満、高脂血症など様々な成因而より発症する。NAFLD は肝臓への過剰な TG 蓄積と肝障害を特徴とする疾患であるが、その形成機序には不明な点を残している。肝臓の TG 含量は、脂肪酸の取り込み、脂肪酸の新規合成（*de novo* 合成）、脂肪酸β酸化、VLDL-TG としての脂肪酸分泌の 4 つの大きな代謝経路の複雑な相互作用によって調節されている（図 9）。NAFLD 発症の最も上流に位置する要因は、過食や運動不足に起因する過栄養状態による生体内への脂肪蓄積である。また過栄養状態ではインスリ

ン抵抗性により脂肪組織において TG の分解が亢進し、これによって生じた大量の FFA が肝臓へ流入する。一方で、インスリン抵抗性でもたらされる高血糖と高インスリン血症により、肝臓における脂肪酸の *de novo* 合成が亢進する。このようにインスリン抵抗性が基盤となり、肝臓への TG 蓄積が促進される。過食や肥満、インスリン抵抗性に伴う肝臓の TG 蓄積は、主に白色脂肪組織からの FFA の供給の増加と、肝臓での脂肪酸の *de novo* 合成の亢進によるものであり、脂肪酸 β 酸化や VLDL 放出の低下の影響は少ないと考えられている³²。脂肪酸の *de novo* 合成の亢進は、高血糖と高インスリン血症の状態では、肝臓において誘導される転写因子 SREBP-1c、ChREBP に由来すると考えられている。これらは脂肪酸合成系酵素群の遺伝子発現を増加させ、脂肪酸合成を促進することで NAFLD の発症進展に関与する³²。

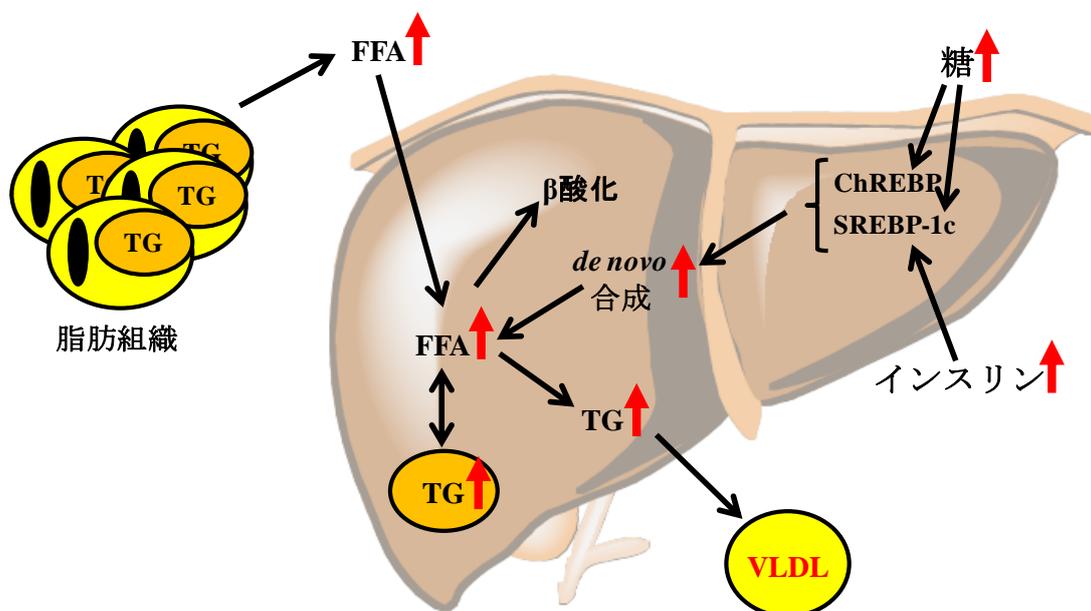


図 9. エネルギー代謝異常による脂肪肝の形成

引用文献 32 より改変して引用

近年、NAFLD を発症した患者においては冠動脈疾患、脳血管疾患、末梢動脈疾患などの動脈硬化性疾患の発症率が高いことが報告され、NAFLD が心血管イベントの独立した危険因子であると考えられるようになってきている³³ (図 10)。NAFLD を発症した患者の血中においては、肝臓を由来とする炎症性因子である CRP, IL-6, TNF- α や、血液凝固因子であるプラスミノゲン活性化抑制因子、フィブリノゲンが高値を示すことが知られている。また NAFLD においては、肝細胞内の過剰な TG 蓄積により、小胞体ストレスやミトコンドリア機能異常をきたし、これらの酸化ストレスによって肝細胞障害が引き起こされる。この際、活性酸素種が過剰に産生され、酸化 LDL などの動脈硬化を惹起する変性リポタンパク質が増加する。NAFLD においてはこれらの炎症性変化、血液凝固異常、酸化ストレスなどが関与し、動脈硬化形成が促進すると推察されている³¹。

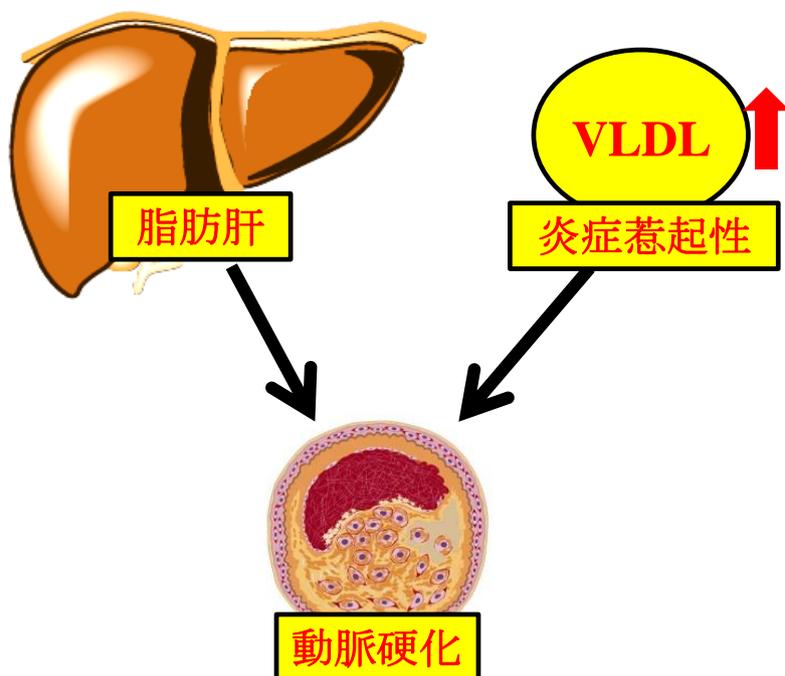


図 10. 動脈硬化の危険因子：脂肪肝と VLDL

NAFLD はそれ以上進行せず、重篤な病態には繋がらない疾患と考えられていたが、近年では放置すると非可逆性の線維化を伴う非アルコール性肝炎や肝硬変に移行する可能性のある疾患であることが判り、早期の治療が必要と考えられている。また NAFLD を呈した症例においては死亡比が高率になることも報告されており、生命予後が低下する原因である可能性も指摘されている³¹。NAFLD の診断および積極的治療介入による適切な管理は、動脈硬化性疾患の発症進展を予防するために重要である。NAFLD の治療法として未だ確立されたものは存在しないが、NAFLD 患者のほとんどはエネルギー摂取量が多い傾向にあるため、運動不足の解消や食事制限など生活習慣の改善が第一に行われている。薬物療法に関しては明確な治療効果を示すエビデンスが得られた薬剤はなく、NAFLD 患者で高率に合併する糖尿病、脂質異常症に対する薬物療法で行われている^{31,34}。

EPA は転写因子である SREBP-1 (SREBP-1a と SREBP-1c) の発現を抑制する³⁵。SREBP は SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2 の 3 つのアイソフォームが存在することが知られている。SREBP-1c は脂肪酸や TG 合成, SREBP-2 はコレステロール合成, SREBP-1a は脂肪酸とコレステロールの合成の両方を制御することが知られている³⁶。EPA の薬理作用の少なくとも一部は、SREBP-1 に対する抑制作用で説明されている³⁷。肝臓においても EPA は、SREBP-1 の発現抑制を介して脂肪酸や TG の合成を強力に抑制し、VLDL の分泌を抑制することが知られている³⁸。また近年、EPA の NAFLD に対する改善作用が報告され、NAFLD に対する有力な治療手段として注目されている³⁹。

著者は、高脂肪/高シヨ糖食の投与によりマウスに著明な脂肪肝を発症させ、これに EPA を投与すると脂肪肝の発症が顕著に抑制されることを見出した。さらに脂肪肝の発症進展に関与する新規候補因子を探索するため、肝臓の遺伝子発現を網羅的に解析し、Cide-a と Cide-c を見出した。Cide-a と Cide-c は培養細胞に過剰発現させるとアポトーシスを誘導する因子として発見された^{40,41}。Cide-c は脂肪組織に高発現していることから、fsp27 という別名を持つ。近年、これらの因子が脂肪組織において脂肪滴の形成や脂肪分解抑制に関与することが報告されるようになり⁴²⁻⁴⁷、アポトーシス誘導作用に加えて、脂質含量の制御を介したエネルギー代謝や生活習慣病との関連が注目されている。しかしこれらの因子と脂肪肝の病態との関連については不明な点を残している。著者は Cide-a と Cide-c の脂肪肝の発症進展への関与と、これらの発現に対する EPA と SREBP-1 の作用を検討した (図 11)。これは EPA の脂肪肝形成の抑制作用を介する抗動脈硬化作用の可能性を提示するのみならず、脂肪肝の発症進展機序に関する新たな知見を呈するものである。

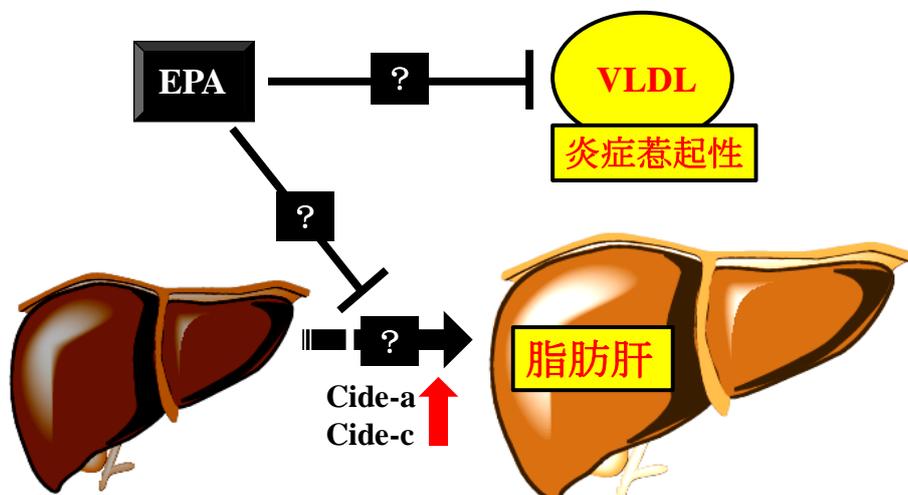


図 11. 動脈硬化の危険因子である VLDL と脂肪肝形成に対する EPA の推定抑制作用

2 方法

2.1 VLDL に対する EPA の影響の検討方法

2.1.1 材料

高純度 (>98%) の EPA-E は日本水産株式会社 (Tokyo, Japan) より入手した。EPA ナトリウム塩 (EPA-Na) は Nu-Chek Prep Inc. (MN, USA) から購入した。

2.1.2 実験動物と飼育条件

雄性 C57BL/6J マウスは日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。マウス育成用の固形飼料 CE-2 は日本クレアから購入した。放射線滅菌した魚粉抜き粉末飼料 F1 (以下, F1 食と表記する。) は, 株式会社フナバシファーム (Funabashi, Japan) から購入した。動物実験は持田製薬株式会社 (Tokyo, Japan) の SPF 環境を維持した動物飼育棟にて行った。マウスは自動飲水装置により自由摂水させた。全ての動物実験は持田製薬の動物実験指針に従って行った。

2.1.3 マウスへの EPA の投与と VLDL の単離

EPA-E を評量し, 5% (w/w) となるように F1 食に混合した。この EPA 混餌飼料をガラスの給餌器に入れ 11-18 週齢の C57BL/6J マウスに, 1 週間自由摂食させた。EPA 混餌作業と餌の交換は毎日行った。EPA を 1 週間混餌投与した後, マウスをジェチルエーテ

ル（和光純薬工業株式会社, Osaka, Japan）吸入によって全身麻酔に掛け開腹し，抗凝固剤として 100 mM EDTA を 20 μ L 入れた 26 G 針付きシリンジ（テルモ株式会社, Tokyo, Japan）を使用して下大静脈より全採血を行った．血液はマウス 1 匹より約 1 mL 採取し，採血後は放血によって安楽殺した．1,500 g, 4°C, 15 分の遠心分離によって血液から血漿を分離した．マウス 5 匹以上の血漿をプールし，引用文献の方法に従い²⁹，VLDL 分画（ $d < 1.006$ g/mL）を超遠心法によって単離した．VLDL の溶媒は分画分子量 3.5 k の透析膜（タカラバイオ株式会社, Tokyo, Japan）を用いた透析により PBS（タカラバイオ）に置換し，限外ろ過（メルク株式会社, Tokyo, Japan）によって濃縮した．以下，F1 食で飼育したマウスから単離した VLDL を Ctrl-VLDL, EPA を投与したマウスから単離した VLDL を EPA-VLDL と表記する．

2.1.4 脂質量とタンパク質量の測定，VLDL の粒子サイズと脂肪酸組成の分析

血漿と VLDL の脂質（TG, TC, PL）量の測定は，市販のキット（和光純薬）を用いて行った．タンパク質量の測定は，Pierce® BCA™ Protein Assay Kit（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社, Kanagawa, Japan）を用いて行った．VLDL は 2,000 μ g protein/mL または 6,000 μ g TG/mL 濃度に PBS を用いて希釈し，孔径 0.22 μ m フィルター（メルク）でろ過滅菌し，使用まで冷蔵保存した．VLDL の粒子サイズの分析は株式会社スカイライトバイオテック（Tokyo, Japan）に委託し，HPLC を用いて行った．VLDL の脂

脂肪酸組成解析は株式会社エスアールエル (Tokyo, Japan) に委託し、ガスクロマトグラフィーを用いて行った。

2.1.5 細胞株と培養条件

ヒト単球細胞株 THP-1 細胞は ATCC (VA, USA) から購入した。細胞培養は、56°Cの水浴に 30 分間置くことで非働化した FBS (株式会社ニチレイ, Tokyo, Japan) を 10% (v/v), ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 (Life Technologies Japan Ltd, Tokyo, Japan) を 1% (v/v) 含む RPMI 1640 (Sigma Aldrich Japan Inc, Tokyo, Japan. 以下, RPMI 完全培地と表記する.) を用いて、37°C, 5%CO₂ のインキュベーター内に細胞を置くことで行った。

THP-1 細胞は 1.0×10^6 cells/mL に RPMI 完全培地で調製し、これにエタノール (和光純薬) に溶かした 100 μ M PMA (Sigma Aldrich) を 100 nM PMA 濃度となるように添加し、これを 96 well 培養プレートに 1.0×10^5 cells/100 μ L/well 播種し、4 日間培養してマクロファージ様細胞 (以下, THP-1 マクロファージと表記する.) に分化させた。分化中, well の 100 nM PMA を含む RPMI 完全培地は毎日交換した。THP-1 細胞は分化 1 日間後には 96 well プレートの well 底に接着した。

VLDL は RPMI 完全培地に 100 μ g protein/mL または 300 μ g TG/mL になるよう添加し、これを THP-1 マクロファージに 100 μ L/well 添加して一晩培養した。対照群として VLDL の Vehicle である PBS を同量 5% (v/v) 添加した。

EPA-Na はエタノールに溶かし (10-50 mM), 0.1% (w/w) BSA (Sigma Aldrich) を含む RPMI 完全培地で 10-50 μ M になるよう希釈し, THP-1 マクロファージに 100 μ L/well 添加して一晩培養した. 対照群としてエタノールを同量 0.1% (v/v) 作用した.

Orlistat (Sigma Aldrich) は DMSO (和光純薬) に溶かし (2 mM), RPMI 完全培地で 2 μ M になるよう希釈し, THP-1 マクロファージに 100 μ L/well 添加し一晩培養した. 対照群として DMSO を同量 0.1% (v/v) 作用した.

2.1.6 マクロファージからの RNA 抽出と遺伝子発現の測定

THP-1 マクロファージに TRIzol® Reagent (Life Technologies) を 100 μ L/well 添加して回収し, 付属説明書の手順に従って Total RNA の抽出を行った. Total RNA の精製は Purelink™ Micro-to-Midi total RNA purification system (Life Technologies) を使用して行った. Total RNA からの cDNA 合成は SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Life Technologies) を使用して行った. 定量的リアルタイム PCR は各遺伝子の TaqMan® gene expression assay kit (IL-1 β /Hs00174097_m1, TNF- α /Hs00174128_m1, MCP-1/Hs00234140_m1, PPIB/Hs00168719_m1) と Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) を使用して行った. PPIB は内部標準として測定した.

2.1.7 マクロファージの脂質含量の測定

96 well 培養プレートの THP-1 マクロファージを PBS 200 μ L/well で 2 回洗浄し、引用文献の方法に従い脂質を抽出した⁴⁸。抽出した脂質の量は前述（方法 2.1.4）と同じ方法で測定した。脂質を抜いて残った細胞に 0.5 M NaOH 200 μ L を入れ、60°C に 10 分間置くことで溶かし、細胞タンパク質量を前述（方法 2.1.4）と同じ方法で測定した。細胞の脂質量はその細胞タンパク質量で補正した。

2.1.8 LPL に対する VLDL の感受性の測定

VLDL のマクロファージによる加水分解の受け易さを検討するために、VLDL 300 μ g TG/mL または 5% (v/v) PBS を含んだ RPMI 完全培地を、96 well 培養プレートの THP-1 マクロファージに 100 μ L/well 添加し培養した。培養開始から 1-16 時間後に、培養上清と 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma Aldrich) を混ぜて加水分解を停止させ、FFA 濃度を市販のキット（和光純薬）を使用して測定した。Background として空 well に VLDL または PBS を同濃度含んだ RPMI 完全培地を 100 μ L/well 添加し、同時間培養し、同様の Triton X-100 処理と FFA 濃度測定を行った。

VLDL の精製 LPL による加水分解の受け易さを検討するために、High binding ELISA 96 well プレート（イワキ株式会社, Tokyo, Japan）に、引用文献に従い⁴⁹、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（Sigma Aldrich）結合 bovine LPL（Sigma Aldrich）を固相した。これに VLDL

反応液（300 μg TG/mL, 0.1M Tris, pH8.5, 1% FFA-free BSA）を 100 μL /well 添加して 37°C でインキュベーションした。インキュベーション開始から 10-180 分後に、反応液と 1% (v/v) Triton X-100 を混ぜ、FFA 濃度を市販のキット（和光純薬）を使用して測定した。Background として空 well に VLDL 反応液を 100 μL /well 添加し、同時間インキュベーションし、同様の Triton X-100 処理と FFA 濃度測定を行った。

2.1.9 マクロファージの LPL 分泌量の測定

VLDL 300 μg TG/mL または 5% (v/v) PBS を含んだ RPMI 完全培地を、96 well 培養プレートに THP-1 マクロファージに 100 μL /well 添加し培養した。培養 16 時間後、細胞表面の LPL を遊離させるために、ヘパリン（持田製薬株式会社, Tokyo, Japan）を 10 U/mL 濃度となるように培養液に追加し、30 分間、継続して培養した。ヘパリン処理した培養培地を回収し、200 g, 4°C, 3 分間遠心して培養上清を回収した。培養上清の LPL 量の測定は、Markit-M LPL ELISA kit（DS ファーマバイオメディカル株式会社, Osaka, Japan）を使用して行った。Background として空 well に VLDL または PBS を含んだ RPMI 完全培地を 100 μL /well 添加し、同様のヘパリン処理と LPL 量の測定を行った。Well に残った細胞のタンパク質量の測定は前述（方法 2.1.7）と同じ方法で行った。培養上清の LPL 量は細胞タンパク質量で補正した。

2.1.10 VLDL のアポタンパク質の検出

ApoCII と apoCIII はそれらの分子量が約 10 kDa とほぼ一致するため、それらの等電点の違いから、等電点電気泳動法によって分離した。VLDL を IPG strip gel (pH 3-5.6, GE ヘルスケア・ジャパン株式会社, Tokyo, Japan) にローディングし、Isoelectric focusing system (GE ヘルスケア) を用いて電気泳動した。展開後のゲルには固定化処理と CBB (和光純薬) 染色処理を施し、ImageQuant TL software (GE ヘルスケア) を用いて apoCII と apoCIII のバンド強度を測定した。各バンド強度はローディングした VLDL のタンパク質量 (40-50 μg) で補正した。また VLDL 10 μg タンパク質量を SDS-PAGE loading buffer に混ぜ、95°C で 3 分間加熱し変性させ、これを室温に戻してからポリアクリルアミドゲル (5-20%, アトー株式会社, Osaka, Japan) を用いて電気泳動 (SDS-PAGE) した。展開後のゲルには固定化処理と CBB 染色処理を施した。

2.1.11 統計解析

2 群間の比較は Student または Aspin-Welch の t 検定を用いて行った。これらの解析には Statistical Analysis System in Mochida Pharmaceutical Research Center (持田製薬) を用いた。全ての解析は有意水準を 5% として行った。有意差を示す群間には * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) を図中に表記した。

2.2 脂肪肝に対する EPA の影響の検討方法

2.2.1 材料

高純度 (>98%) の EPA-E は日本水産より入手した。高純度 (>95%) のパルミチン酸エチル (PA-E) は和光純薬から購入した。EPA-Na は Nu-Chek Prep から購入した。オレイン酸ナトリウムは Sigma Aldrich から購入した。

2.2.2 実験動物と飼育条件

雄性の C57BL/6J マウスまたは KK-A^y/Ta Jcl マウスは日本クレアから購入した。雄性の ob/ob マウスは日本チャールス・リバー株式会社 (Kanagawa, Japan) から購入した。通常の餌である CE-2 食は日本クレアから、F1 食 (4.4% (w/w) 脂肪含む) はフナバシファームから購入し、高脂肪/高シヨ糖含有飼料 TD88137 (21.2% (w/w) 脂肪と 34.1% (w/w) シヨ糖を含む。以下 HF/HS 食と表記する。) は Harlan Laboratories Inc. (WI, USA) から購入した。動物実験は持田製薬の SPF 環境を維持した動物飼育棟にて行った。マウスは自動飲水装置により自由摂水させた。全ての動物実験は持田製薬の動物実験指針に従って行った。

2.2.3 マウスへの被検物質の投与と組織採取

HF/HS 食投与モデルの実験では、PA-E または EPA-E を評量し、5% (w/w) となるように HF/HS 食に混合した。パルミチン酸は体内に最も多く存在する飽和脂肪酸であり、

EPA-E を混ぜた餌とカロリーを合わせるために使用した。これらの混餌飼料をガラスの給餌器に入れ、10 週齢の C57BL/6J マウスに 1-20 週間、自由接食させた。PA-E と EPA-E の混餌作業と餌の交換は毎日行った。以下、F1 食のみを投与したマウス群を健常群、PA-E を HF/HS 食に混餌して投与したマウス群を脂肪肝群、EPA-E を HF/HS 食に混餌して投与したマウス群を EPA 群と表記する。

肥満モデルマウスの実験では、7 週齢の C57BL/6J マウスまたは ob/ob マウス、9 週齢の KK-A^y/Ta Jcl マウスを CE-2 食で 2 週間飼育してから解剖した。

解剖は、マウスをジエチルエーテル吸入によって全身麻酔に掛け開腹し、抗凝固剤としてヘパリン処理した 26 G 針付きシリンジを使用して下大静脈より全採血を行った。採血後は放血によって安楽殺した。放血直後に肝臓を摘出し液体窒素に浸け凍結し、使用まで -80°C に保存した。1,500 g, 4°C, 15 分の遠心分離によって血液から血漿を分離し、使用まで -80°C に保存した。

2.2.4 肝臓の TG 含量と血漿 ALT 量の測定

肝臓からの脂質の抽出は Folch 法で行った⁵⁰。肝臓の TG 量の測定は市販のキット（和光純薬）を使用して行った。肝臓の TG 量は脂質の抽出に使用した肝臓の重量で補正した。肝障害マーカーである血漿 ALT 量の測定は、市販のキット（和光純薬）を使用して行った。

2.2.5 肝臓からの RNA 抽出と遺伝子発現の測定

肝臓の欠片に TRIzol® Reagent を 1 mL 添加して、肝臓をビーズ式ホモジナイザーで破碎した。12,000 g, 4°C, 15 分間、遠心して上清を回収し、付属説明書の手順に従って Total RNA の抽出を行った。Total RNA の精製は Purelink™ Micro-to-Midi total RNA purification system を使用して行った。Total RNA からの cDNA 合成は SuperScript™ III First-Strand Synthesis System を使用して行った。

遺伝子発現の網羅的解析には HF/HS 食投与モデル（方法 2.2.3）の 20 週間投与したマウスの肝臓 total RNA を使用した。株式会社バイオマトリックス研究所（Chiba, Japan）に委託し、DNA マイクロアレイ解析を Gene Chip® mouse genome 430 2.0 array (Affymetrix Inc. CA, USA) を使用して行った。

定量的リアルタイム PCR は Applied Biosystems 7000/7500 Real-Time PCR System を使用して行った。Cide-a と Cide-c の遺伝子発現の測定は、Life Technologies の TaqMan® gene expression assay kit (Cide-a/ Mm00432554_m1, Cide-c/ Mm00617672_m1) を使用して行った。SREBP-1c, SREBP-1a, PPAR γ の遺伝子発現の測定は、(表 2) に表示したプライマープロンプセット (Life Technologies) を使用して行った。rRNA は内部標準として TaqMan® ribosomal RNA control reagents (Life Technologies) を使用して測定した。

表 2. 定量的リアルタイム PCR に使用したプライマーとプローブの配列

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Probe (5'-3')
SREBP-1c	CGGCGCGGAAGCTGT	TGCAATCCATGGCTCCGT	CGTCTGCACGCCCTA
SREBP-1a	AGGCGGCTCTGGAACAGA	TCAAACCGCTGTGTCCAGTT	ACTGGCCGAGATGTG
PPAR γ	TTCCACTATGGAGTTCATG CTTGT	TCCGGCAGTTAAGATCACACC TA	TTTCCGAAGAACCATCCGA TTGAAGC

2.2.6 細胞株と培養条件

ラット肝臓由来細胞株 McA-RH7777 細胞とアフリカミドリザル腎臓由来細胞株 Cos-1 細胞は ATCC から購入した. 細胞培養は, 56°C の水浴に 30 分間置くことで非働化した FBS を 10% (v/v), ペニシリン/ストレプトマイシン溶液を 1% (v/v) 含む DMEM (Sigma Aldrich. 以下, DMEM 完全培地と表記する.) を用いて, 37°C, 5%CO₂ のインキュベーター内に細胞を置くことを行った.

2.2.7 遺伝子発現プラスミドの作製

Cide-a と Cide-c の発現プラスミドは, マウス cDNA から PCR で増幅した Cide-a または Cide-c のコーディング領域を, 哺乳動物細胞用の発現プラスミドである ptk2435 プラスミド (持田製薬) の Elongation factor プロモーター制御下に挿入することで作製されたもの (持田製薬) を使用した.

SREBP-1a または SREBP-1c の発現プラスミドは, ヒト cDNA から PCR で増幅した

SREBP-1a または SREBP-1c の活性化体をコードする領域を pCI Mammalian Expression プラスミド (プロメガ株式会社, Tokyo, Japan) の T7 プロモーター制御下に挿入することで作製されたもの (持田製薬) を使用した.

2.2.8 Cide-a と Cide-c のレポータープラスミドの作製

Cide-a と Cide-c の遺伝子プロモーターの塩基配列と転写開始点 (+1) は引用文献に従い決定した^{51,52}. Cide-a プロモーターは-2179~+738 を, Cide-c プロモーターは-1629~+1269 をクローニングした. これらのプロモーター領域を pGL4.17 プラスミド (プロメガ) のホタルルシフェラーゼ遺伝子 luc2 の上流に挿入することで作製した.

2.2.9 Cide-a と Cide-c を過剰発現した培養細胞の脂肪滴の染色

肝臓を由来とする McA-RH7777 細胞と遺伝子導入効率に優れる Cos-1 細胞を 5.0×10^4 cells/mL に DMEM 完全培地で調製し, 24 well 培養プレートに 2.5×10^4 cells/500 μ L/well 播種した. 一晚培養後, 0.5 μ g/well の Cide-a または Cide-c の発現プラスミドを, FuGENE® 6 Transfection Reagent (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, Tokyo, Japan) を用い, 付属説明書に従って細胞に導入した. 対照 (Control) として ptk2435 プラスミドを同様に導入した. 導入から 4 時間後, 培養細胞の培養培地を, 200 μ M オレイン酸ナトリウムと 0.5% (w/v) FFA free BSA を含む DMEM 完全培地 500 μ L/well と交換し, さらに 1 日間培

養した。培養後、培養培地を除き、細胞を 3.7% (v/v) ホルマリン (Sigma Aldrich) で 15 分間処理して固定し、1.8 g/L Oil Red O (Sigma Aldrich) を含む 60% イソプロパノール (和光純薬) で処理して脂肪滴を染色した。細胞を観察しやすくするために、ヘマトキシリン (武藤化学株式会社, Tokyo, Japan) で 20 分間処理して核を染色した。オレイン酸ナトリウムは 200 mM 濃度にメタノール (和光純薬) で溶かしたものを使用した。

2.2.10 Cide-a と Cide-c の細胞障害性の測定

Cos-1 細胞を 8.0×10^4 cells/mL に DMEM 完全培地で調製し、12 well 培養プレートに 8.0×10^4 cells/1000 μ L/well 播種した。一晚培養後、1.0 μ g/well の Cide-a または Cide-c の発現プラスミドを、FuGENE® 6 Transfection Reagent を用いて細胞に導入した。対照 (Control) として ptk2435 プラスミドを同様に導入した。導入から 4 時間後、培養細胞の培養培地を、200 μ M オレイン酸ナトリウムと 0.5% (w/v) FFA free BSA を含む DMEM 完全培地 1000 μ L/well と交換し、さらに 2 日間培養した。培養後、培養培地を 200 g, 室温, 2 分間遠心分離し、この培養上清の、死細胞から放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を Cytotoxicity Detection Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いて測定した。生細胞のカウントは 12 well 培養プレートの底に接着した細胞をトリプシン (Life Technologies) 処理して剥がし、血球計算板を用いて行った。死細胞はトリパンブルー (Life Technologies) で染色してカウントより除いた。

2.2.11 Cide-a と Cide-c のプロモーター活性に対する EPA の作用の測定

McA-RH7777 細胞と Cos-1 細胞を 5.0×10^4 cells/mL に DMEM 完全培地で調製し、24 well 培養プレートに 2.5×10^4 cells/500 μ L/well 播種した。一晚培養後、0.5 μ g/well の Cide-a または Cide-c のレポータープラスミドを、FuGENE® 6 Transfection Reagent を用いて細胞に導入した。内部標準として、0.04 μ g/well のウミシイタケルシフェラーゼを発現する pRL-SV40 プラスミド（プロメガ）を同時に導入した。導入から 4 時間後、培養細胞の培養培地を、50 μ M EPA-Na と 0.5% (w/v) FFA free BSA を含む、DMEM 培地（脂質除去処理済みの非働化 FBS を 10% (v/v) , ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 1% (v/v) を含む）500 μ L/well と交換し、さらに 1 日間培養した。非働化 FBS からの脂質除去は引用文献に従った⁵³。培養後、ホタルルシフェラーゼ活性とウミシイタケルシフェラーゼ活性の測定は、Dual-Glo Luciferase assay kit（プロメガ）を使用して行った。ホタルルシフェラーゼ活性はウミシイタケルシフェラーゼ活性で補正した。

2.2.12 Cide-a と Cide-c のプロモーター活性に対する SREBP-1 の作用の測定

McA-RH7777 細胞と Cos-1 細胞を 5.0×10^4 cells/mL に DMEM 完全培地で調製し、24 well 培養プレートに 2.5×10^4 cells/500 μ L/well 播種した。一晚培養後、0.5 μ g/well の Cide-a または Cide-c のレポータープラスミドと、SREBP-1a または SREBP-1c の発現プラスミドを、FuGENE® 6 Transfection Reagent を用いて培養細胞に導入した。SREBP-1a と SREBP-1c の

発現プラスミドの対照 (Control) として pCI プラスミドを同様に導入した。内部標準として、0.04 $\mu\text{g}/\text{well}$ の pRL-SV40 プラスミドを同時に導入した。導入から 4 時間後、培養細胞の培養培地を、DMEM 完全培地 500 $\mu\text{L}/\text{well}$ と交換し、さらに 1 日間培養した。培養後、ホタルルシフェラーゼ活性とウミシイタケルシフェラーゼ活性の測定は、Dual-Glo Luciferase assay kit を使用して行った。ホタルルシフェラーゼ活性はウミシイタケルシフェラーゼ活性で補正した。

2.2.13 統計解析

2 群間の比較は t 検定を用いて行った。血漿 ALT 量と他の肝臓パラメーター (Cide-a, Cide-c, SREBP-1a, SREBP-1c, PPAR γ の遺伝子発現, TG の含量) との関連は、ステップワイズ法を用いた重回帰分析により検定した。これらの解析には Statistical Analysis System in Mochida Pharmaceutical Research Center を用いた。全ての解析は有意水準を 5% として行った。有意差を示す群間には * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) を図中に表記した。

3 結果

3.1 VLDL に対する EPA の影響の検討結果

3.1.1 マウスの血漿脂質量に対する EPA の作用

EPA は血漿脂質をラットにおいて減少させることが報告されている⁵⁴. 本研究でも, EPA によるマウス血漿脂質の減少作用を検討した. F1 食で飼育したマウスと比較して, 5% (w/w) EPA-E を 1 週間投与したマウスの血漿の TG, TC, PL の量は有意に小さかった ($p < 0.01$) (図 12).

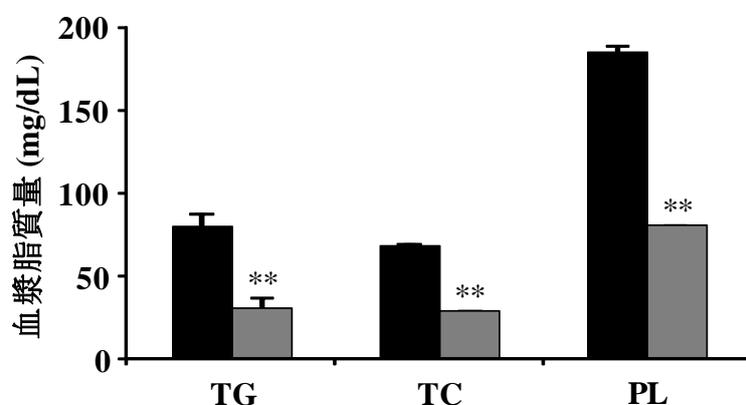


図 12. マウス血漿脂質量

F1 食で飼育したマウス (■) のまたは EPA-E を F1 食に 5% (w/w) 混ぜて 1 週間投与したマウス (■) の血漿の脂質量を比較した. 血漿は 5 匹のマウスから採取したものをプールし 1 検体とした. 各群 4 検体の平均値と標準誤差を示した.

3.1.2 マクロファージの炎症性因子の発現に対する VLDL の作用

VLDL の炎症惹起性に対する EPA の影響を検討するため、THP-1 マクロファージに 100 $\mu\text{g protein/mL}$ の Ctrl-VLDL または EPA-VLDL を添加して一晩培養した。Ctrl-VLDL は、THP-1 マクロファージの炎症性因子である IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1 の遺伝子発現を有意に増加させた ($p < 0.05$)。一方、EPA-VLDL ではこの炎症惹起性が顕著に抑制されていた ($p < 0.01$) (図 13A)。300 $\mu\text{g TG/mL}$ の濃度で VLDL を添加しても同様の結果であった (図 13B)。EPA の投与により、VLDL のマクロファージに対する炎症惹起性が減弱することが示された。

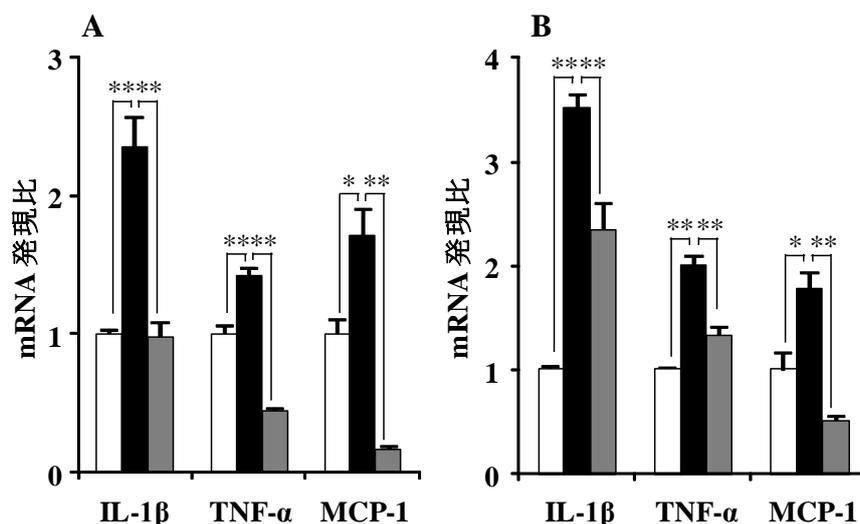


図 13. THP-1 マクロファージの炎症性因子の発現

THP-1 マクロファージに Vehicle (□), Ctrl-VLDL (■), EPA-VLDL (■) を添加し一晩培養した際の炎症性因子の遺伝子発現を比較した。VLDL は 100 $\mu\text{g protein/mL}$ (A) または 300 $\mu\text{g TG/mL}$ (B) の濃度で添加した。各群 4 検体の平均値と標準誤差を示した。

3.1.3 マクロファージの脂質含量に対する VLDL の作用

VLDL の脂質蓄積作用に対する EPA の影響を検討するために、300 μg TG/mL の Ctrl-VLDL または EPA-VLDL を THP-1 マクロファージに添加し、一晚培養した。Ctrl-VLDL を添加した細胞の TG 含量は、Vehicle を添加したそれと比較して顕著に増加した ($p < 0.01$)。一方、EPA-VLDL を添加した細胞の TG 含量は、Ctrl-VLDL を添加したそれよりも有意に小さかった ($p < 0.01$) (図 14)。これらの結果は、EPA-VLDL の TG が、Ctrl-VLDL のそれよりも THP-1 マクロファージに取り込まれ難いことを示している。また、細胞の TC 含量は VLDL の添加によって有意な変化を認めなかった。

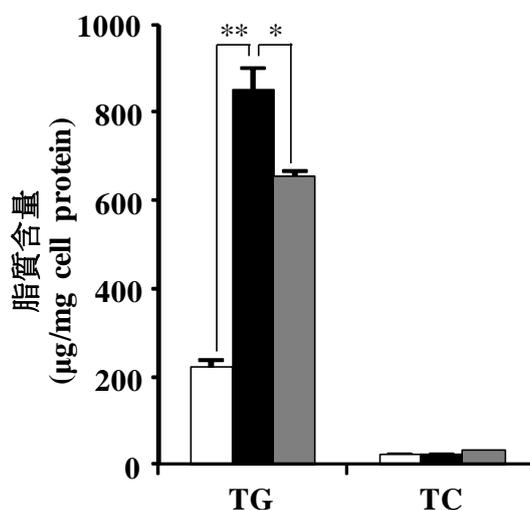


図 14. THP-1 マクロファージの脂質量

THP-1 マクロファージに Vehicle (□), Ctrl-VLDL (■), EPA-VLDL (■) を添加し、一晚培養した際の細胞の脂質含量を比較した。VLDL は 300 μg TG/mL の濃度で添加した。各群 4 検体の平均値と標準誤差を示した。

3.1.4 VLDL の脂肪酸組成に対する EPA の作用

EPA はラットにおいて VLDL 中の EPA 含量を増加させることが報告されている²⁹。本研究でも、EPA のマウス VLDL の脂肪酸組成に対する影響を検討した。EPA-VLDL では Ctrl-VLDL と比較して、その多くの脂肪酸が EPA に置き換わっていた (図 15)。

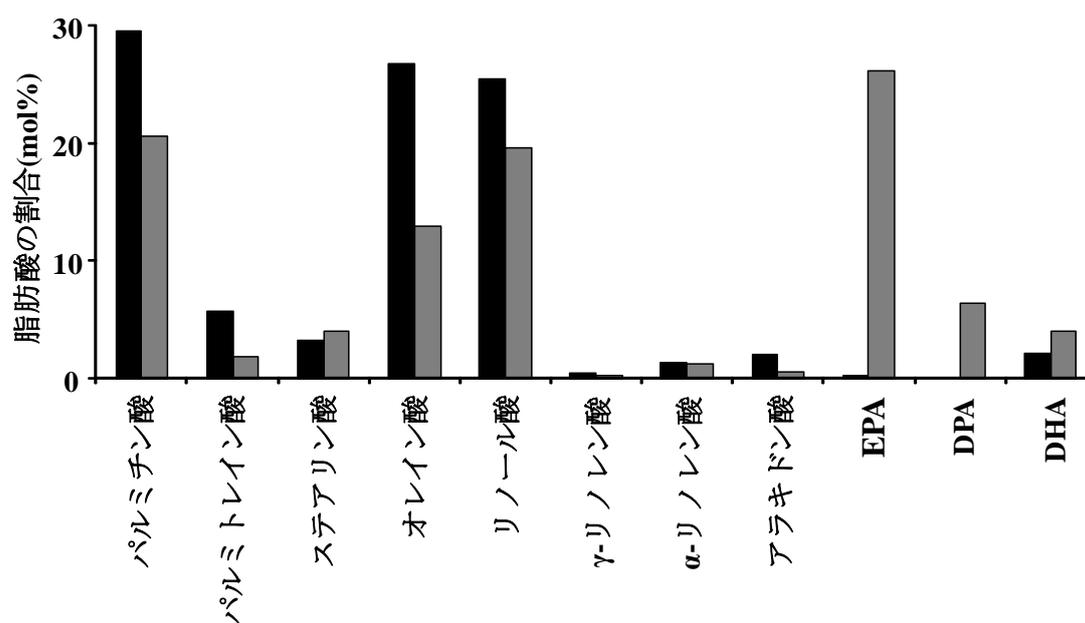


図 15. VLDL の脂肪酸組成

Ctrl-VLDL (■) と EPA-VLDL (■) の脂肪酸組成を比較した。VLDL は F1 食で飼育したマウス 15 匹または EPA-E を投与したマウス 25 匹からプールした血漿から単離した。

3.1.5 VLDL の炎症惹起性に対する遊離体の EPA の作用

遊離体の EPA は LPS や飽和脂肪酸によるマクロファージの活性化を *in vitro* で抑制することが報告されている¹⁸. このことから, EPA-VLDL で認められた炎症惹起性の減弱は, EPA-VLDL から遊離した EPA の作用である可能性が考えられた. この可能性を検討するために, VLDL の炎症惹起性に対する, 遊離体の EPA である EPA-Na の *in vitro* での添加の影響を検討した. しかし *in vitro* で添加した EPA-Na は, Ctrl-VLDL による IL-1 β 発現増加作用に影響しなかった (図 16). この結果より, EPA-VLDL で認められた炎症惹起性の減弱に, EPA-VLDL に含まれる EPA の寄与が小さいことが示唆された.

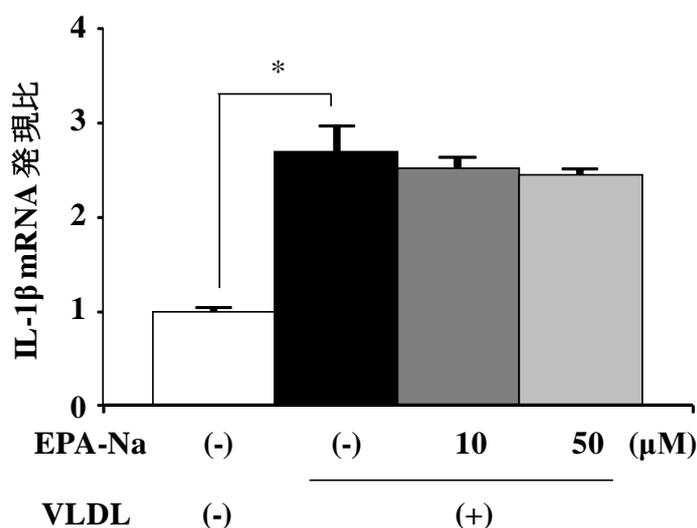


図 16. THP-1 マクロファージの IL-1 β 発現

THP-1 マクロファージに Ctrl-VLDL と EPA-Na を同時に添加し, 一晩培養した際の IL-1 β の遺伝子発現を測定した. Ctrl-VLDL は 100 μ g protein/mL, EPA-Na は 10-50 μ M 濃度で添加した. 各群 3 検体の平均値と標準誤差を示した.

3.1.6 VLDL の炎症惹起性に対する LPL 阻害剤の作用

VLDL のマクロファージに対する炎症惹起性には、LPL の作用が重要な役割を果たすことが報告されている²⁶。本研究においても、THP-1 マクロファージに対する VLDL の炎症惹起性に対する LPL の関与を検討した。LPL 阻害剤 (Orlistat) を Ctrl-VLDL と同時に添加すると、VLDL が加水分解を受けて起こる培養上清の FFA 濃度の増加が、ほぼ完全に抑制された (図 17A)。この際、LPL 阻害剤の添加により Ctrl-VLDL によるマクロファージの IL-1 β 発現の増加と TG 蓄積も顕著に抑制された (図 17BC)。THP-1 マクロファージで認められた VLDL の炎症惹起性に、LPL による VLDL の加水分解が必要であることが示された。

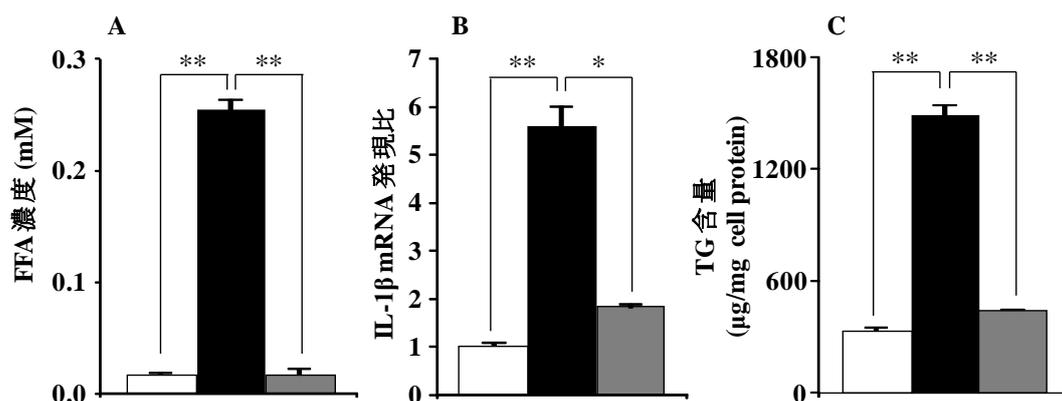


図 17. THP-1 マクロファージの培養上清の FFA 濃度, IL-1 β 発現, TG 含量

THP-1 マクロファージに Vehicle (□), Ctrl-VLDL (■), Ctrl-VLDL+Orlistat (▨) を添加し、一晚培養した際の培養上清の FFA 濃度 (A), IL-1 β の遺伝子発現 (B), TG 含量 (C) を比較した。Ctrl-VLDL は 100 μ g protein/mL, Orlistat は 2 μ M 濃度で添加した。各群 3 検体の平均値と標準誤差を示した。

3.1.7 マクロファージの培養上清の FFA 濃度と LPL 量に対する VLDL の作用

EPA-VLDL がマクロファージに加水分解を受け難くなっている可能性を検討するために、VLDL を添加した THP-1 マクロファージにおいて、培養上清の FFA 濃度と LPL 量を測定した。VLDL が加水分解されて経時的に増加する FFA 濃度は、EPA-VLDL の方が Ctrl-VLDL よりも有意に小さかった ($p < 0.01$) (図 18A)。これは、EPA-VLDL が Ctrl-VLDL よりもマクロファージに加水分解を受け難いことを示す。さらに培養上清の LPL 量は、EPA-VLDL の添加によって有意に減少していた (図 18B)。

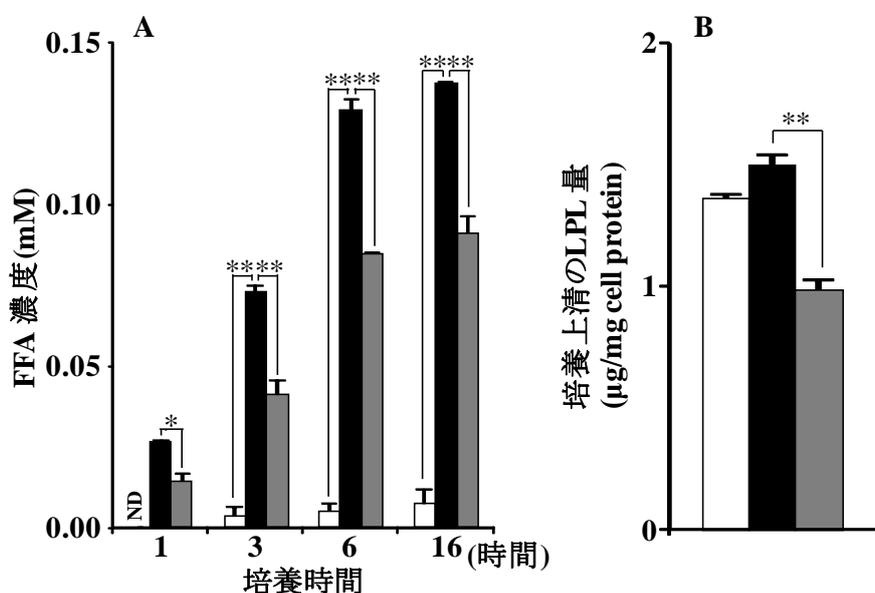


図 18. THP-1 マクロファージの培養上清の FFA 濃度と LPL 量

THP-1 マクロファージに Vehicle (□), Ctrl-VLDL (■), EPA-VLDL (▣) を添加し、1-16 時間培養した際の培養上清の FFA 濃度(A), 一晚培養した際の培養上清の LPL 量を比較した (B)。VLDL は 300 µg TG/mL の濃度で添加した。各群 3 検体の平均値と標準誤差を示した。ND (Not Determined) は未検出を示す。

3.1.8 LPL に受ける VLDL の加水分解に対する EPA の作用

EPA-VLDL 自体が LPL による加水分解を受け難くなっている可能性を検討するため、Ctrl-VLDL または EPA-VLDL を一定量の精製 LPL とインキュベーションし、VLDL が加水分解されて増加する FFA 濃度を比較した。EPA-VLDL が精製 LPL に加水分解を受けて増加する FFA 濃度は、Ctrl-VLDL のそれよりも有意に小さかった ($p<0.01$) (図 19)。この結果は、EPA-VLDL が Ctrl-VLDL よりも LPL による加水分解を受け難いことを示している。

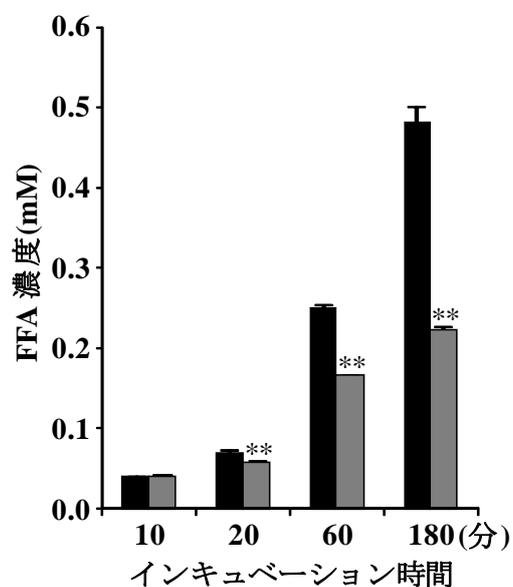


図 19. 精製 LPL によって VLDL が加水分解され増加する FFA 濃度

精製 LPL と、Ctrl-VLDL (■) または EPA-VLDL (■) を 10-180 分間インキュベーションし、VLDL が加水分解を受けて増加する FFA 濃度を比較した。VLDL は 300 $\mu\text{g TG/mL}$ の濃度で精製 LPL に添加した。各群 3 検体の平均値と標準誤差を示した。

3.1.9 VLDL の脂質含量と粒子サイズに対する EPA の作用

EPA はラットにおいて VLDL の脂質含量を減少させ、その粒子サイズを小さくすることが報告されている²⁹。本研究で EPA-VLDL が、Ctrl-VLDL と比較して LPL に加水分解を受け難くなった原因を検討するために、VLDL の脂質含量と粒子サイズを解析した。

EPA-VLDL では Ctrl-VLDL と比較して TG, TC, PL の含量が有意 ($p < 0.01$) に減少していた(図 20A)。さらに HPLC 解析によると、EPA-VLDL のリテンションタイムは Ctrl-VLDL より延長しており、EPA-VLDL が小型化していることが示された(図 20B)。

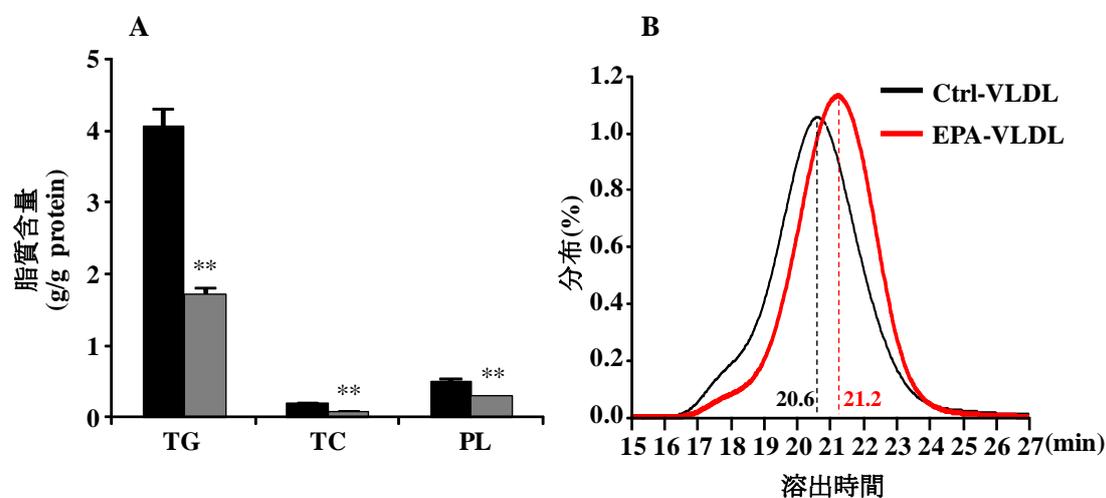


図 20. VLDL の脂質含量と粒子サイズ

Ctrl-VLDL (■) と EPA-VLDL (■) の脂質含量 (A) と、HPLC のリテンションタイム (B) を比較した。各群 4 検体の平均値と標準誤差を示した。

3.1.10 VLDL の apoCII と apoCIII の含量に対する EPA の作用

VLDL の表面のアポタンパク質である apoCII は LPL 活性を促進し, apoCIII は逆に抑制する. さらにこれらの含量比 (apoCII/apoCIII 比) の減少は LPL 活性減少に関連することが報告されている⁵⁵. また, EPA はラットにおいて VLDL の apoCII と apoCIII の含量を変化させることが知られている²⁹. 本研究でも, VLDL の apoCII と apoCIII の含量を解析した. EPA-VLDL の apoCII と apoCIII の含量は, Ctrl-VLDL よりも減少傾向 (図 21AB) を示し, さらに apoCII/apoCIII 比は有意な減少を示した ($p < 0.05$) (図 21C).

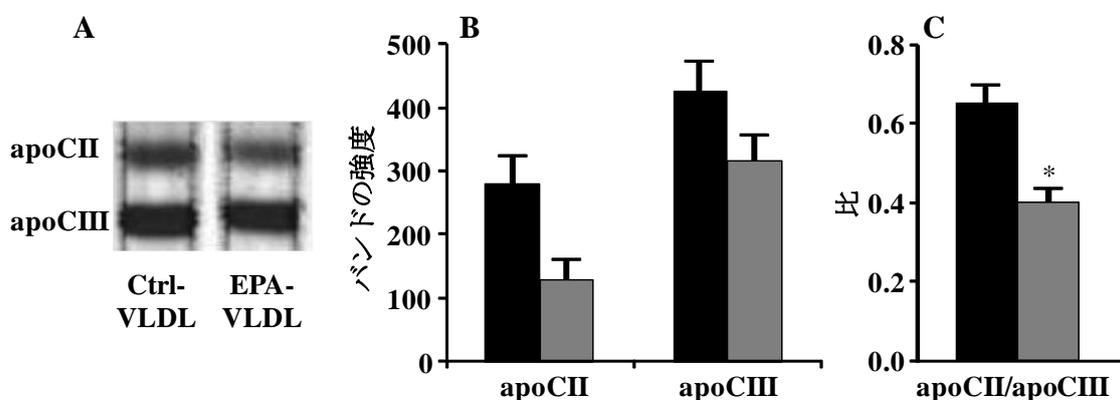


図 21. VLDL の apoCII と apoCIII の含量と apoCII/apoCIII 比

等電点電気泳動法により Ctrl-VLDL (■) と EPA-VLDL (■) の apoCII と apoCIII を分離し (A), これらの含量 (B) と apoCII/apoCIII 比 (C) を比較した. 各群 4 検体の平均値と標準誤差を示した.

3.1.11 VLDL の各種アポタンパク質の含量に対する EPA の作用

リポタンパク質を構成する種々のアポタンパク質は、それ自体が機能を持ち、リポタンパク質の機能や脂質代謝に関与する⁵⁶。VLDL のアポタンパク質組成に対する EPA の影響を検討するために、Ctrl-VLDL と EPA-VLDL のアポタンパク質組成を比較した。

EPA-VLDL においては apoAI と apoAIV の含量が顕著に増加した (図 22)。

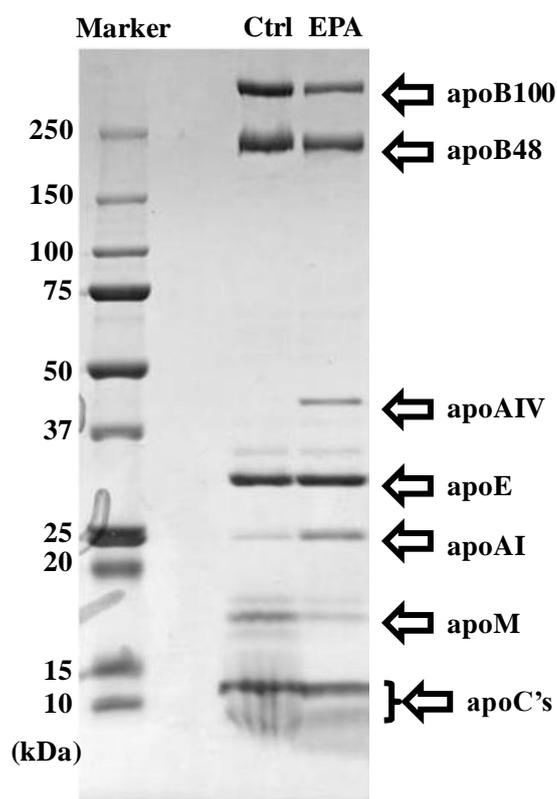


図 22. VLDL のアポタンパク質組成

Ctrl-VLDL (Ctrl) と EPA-VLDL (EPA) を SDS-PAGE で分離し、アポタンパク質の泳動像を比較した。各 10 μ g protein の VLDL を泳動し、CBB で染色した。VLDL は F1 食で飼育したマウス 6 匹または EPA-E を投与したマウス 11 匹からプールした血漿から単離した。

3.2 脂肪肝形成に対する EPA の影響の検討結果

3.2.1 HF/HS 食投与による脂肪肝形成と EPA の作用

脂肪肝の形成に対する EPA の影響を検討するため、20 週間投与した健常群、脂肪肝群、EPA 群のマウス肝臓の TG 含量を測定した。脂肪肝群は肝臓への顕著な TG 蓄積を伴う脂肪肝を形成し、EPA 群ではほぼ完全にこれが抑制されていた (図 23)。

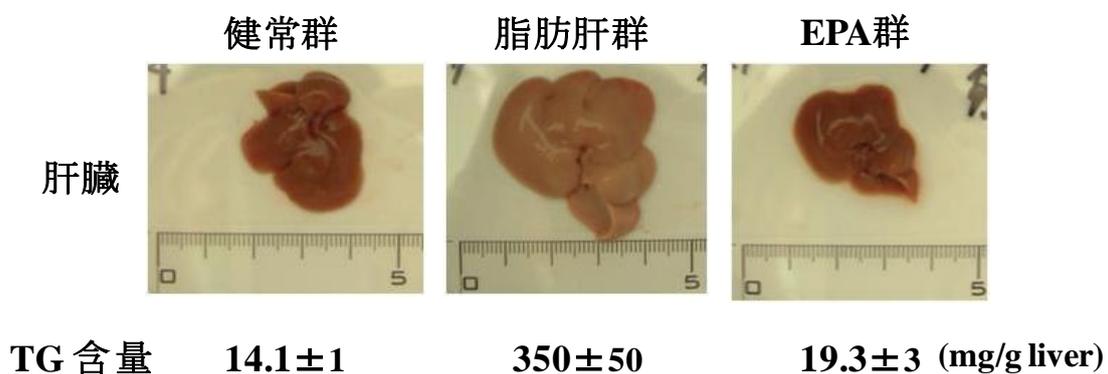


図 23. 肝臓の肉眼所見と TG 含量

20 週間投与した健常群 (10 匹)、脂肪肝群 (10 匹)、EPA 群 (7 匹) の肝臓の肉眼所見と TG 含量を測定した。各群 7-10 検体の平均値±標準誤差を示した。各写真中のメモリ数値の単位は cm である。

3.2.2 脂肪肝形成に伴う肝障害と EPA の作用

脂肪肝の形成には肝障害が伴う³⁸。これに対する EPA の影響を検討するため、20 週間投与した健常群, 脂肪肝群, EPA 群のマウスにおいて肝障害のマーカである血漿 ALT 量を比較した。脂肪肝群では血漿 ALT 量の増加が認められ ($p<0.01$), EPA 群ではこの増加が抑制されていた ($p<0.01$) (図 24)。

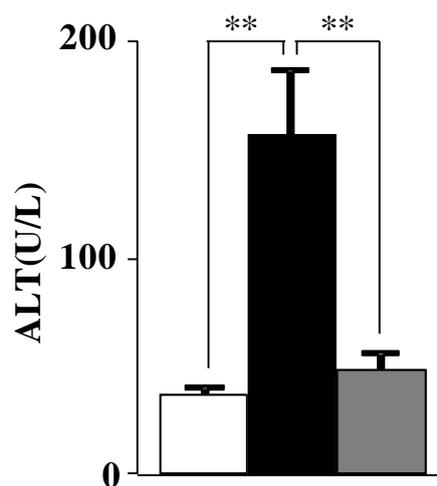


図 24. 血漿 ALT 量

20 週間投与した健常群 (□), 脂肪肝群 (■), EPA 群 (■) の血漿 ALT 量を比較した。各群 20 週間投与の 7-10 検体の平均値と標準誤差を示した。

3.2.3 脂肪肝の発症進展に関与する新規候補因子の選抜

脂肪肝の発症進展に関与する新規候補因子を見出すために、脂肪肝発症に伴い、また EPA によるその抑制に伴って変動する遺伝子群を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に測定した。20 週間投与したマウスの肝臓の遺伝子発現において、健常群と比較して脂肪肝群で増加し、かつ脂肪肝群と比較して EPA 群で減少した因子を選抜した。脂肪肝群で発現増加率が最も大きい遺伝子（496.2 倍）として Cide-a を選抜し、そのアイソフォームとして Cide-c（22.1 倍）も選抜した（図 25、表 3）。これらの発現は定量的リアルタイム PCR で確認した（図 26）。

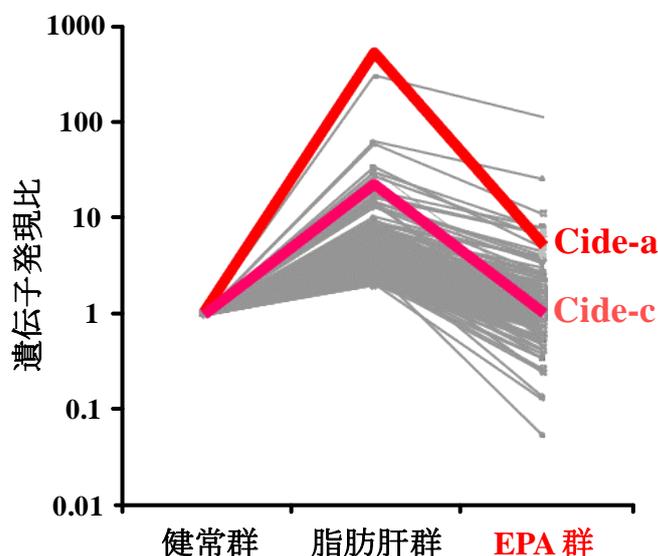


図 25. 脂肪肝の発症進展に関与する新規候補因子の選抜

20 週間投与した健常群、脂肪肝群または EPA 群の肝臓の遺伝子発現を DNA マイクロアレイによって網羅的に測定した。健常群に比べ脂肪肝群で 2 倍以上発現が増加し、かつ脂肪肝群と比べ EPA 群で 2 倍以上発現が減少した遺伝子を選抜した。各群 7-10 検体の肝臓 total RNA を同量プールし、DNA マイクロアレイに使用した。

表 3. 肝臓遺伝子発現の網羅的解析により選抜された因子

No.	倍率変化		遺伝子名
	脂肪肝群	EPA 群	
1	496.2	4.8	Cell death-inducing DFFA-like effector a (Cide-a)
2	307.2	111.0	Complement factor D (adipsin)
3	63.4	25.1	Sulfotransferase family 1E, member 1
4	59.8	11.1	Matrix metalloproteinase 12
5	34.4	4.9	Lymphocyte antigen 6 complex, locus D
6	31.1	1.6	Toll-like receptor 12
7	30.5	7.7	RIKEN cDNA 2310004N24 gene
8	27.2	6.3	Eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 3
9	22.1	1.0	Cell death-inducing DFFA-like effector c (Cide-c)
10	19.7	0.9	Oxysterol binding protein-like 3
11	19.3	7.8	Mannosidase 2, alpha B2
12	17.2	6.9	Steroidogenic acute regulatory protein
13	16.4	6.7	RIKEN cDNA 2610002J02 gene
14	15.3	0.5	Apolipoprotein AIV
15	15.0	4.0	Dual specificity phosphatase 5
16	15.0	3.7	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2
17	13.9	0.9	Glycoprotein (transmembrane) nmb
18	13.7	3.4	Matrix metalloproteinase 13
19	12.9	4.4	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 30
20	12.7	2.6	Solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2
21	10.4	3.6	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit D2

健常群と比較した脂肪肝群および EPA 群の肝臓遺伝子発現の倍率変化を示した。脂肪肝群で 10 倍以上その発現が増加した遺伝子を示した。

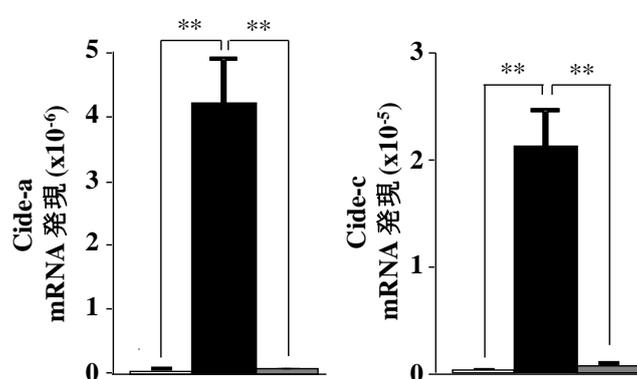


図 26. 肝臓の Cide-a と Cide-c の発現

20 週間投与した健常群 (□), 脂肪肝群 (■), EPA 群 (▨) の肝臓の Cide-a と Cide-c の遺伝子発現を定量的リアルタイム PCR で測定し比較した。各群 7-10 検体の平均値と標準誤差を示した。

3.2.4 脂肪肝の SREBP-1 と PPAR γ の発現とこれらに対する EPA の作用

脂肪合成を促進する転写因子である SREBP-1c, SREBP-1a, PPAR γ は, EPA によってその活性が影響を受けることが知られている. これらの肝臓における遺伝子発現を, 20 週間投与した健常群, 脂肪肝群, EPA 群において比較した. SREBP-1c と PPAR γ は脂肪肝群において有意な増加を認め ($p < 0.01$), EPA 群では顕著にこの増加が抑制されていた ($p < 0.05$). SREBP-1a についても同様の傾向を認めたが, 有意ではなかった (図 27).

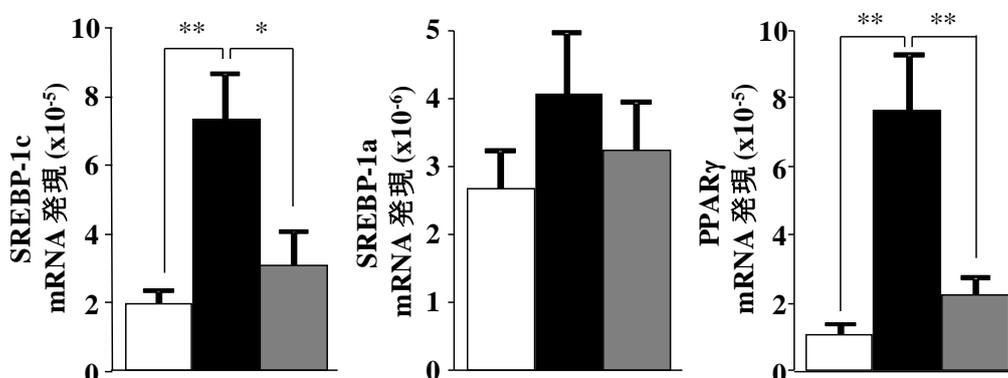


図 27. 肝臓の SREBP-1 と PPAR γ の発現

20 週間投与した健常群 (□), 脂肪肝群 (■), EPA 群 (▒) の SREBP-1c, SREBP-1a, PPAR γ の肝臓における遺伝子発現を比較した. 各群 7-10 検体の平均値と標準誤差を示した.

3.2.5 HF/HS 食投与による肝臓の TG 蓄積と肝障害, Cide-a と Cide-c の発現の経時変化

肝臓の Cide-a と Cide-c の発現と, TG 含量と血漿 ALT 量の関連性を検討するために, 健常群と脂肪肝群のマウスにおいて, これらを投与 14 週間まで経時的に測定した. 肝臓への有意な TG 蓄積は 1 週目より認め ($p<0.01$), Cide-a と Cide-c の発現と血漿 ALT 量についても, 肝臓にある程度 TG が蓄積するとこれらは急激に増加した (図 28).

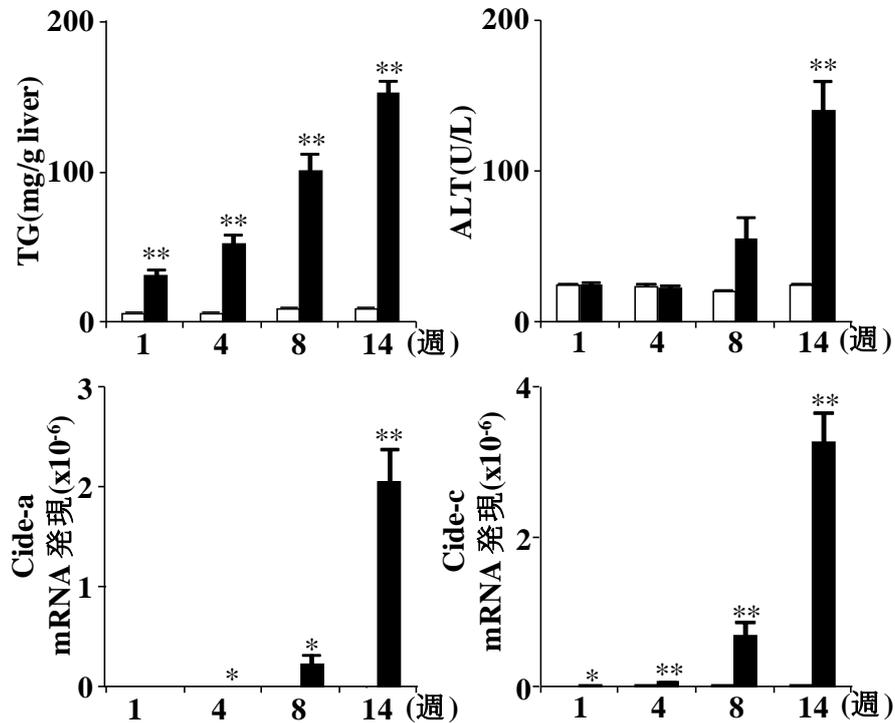


図 28. 肝臓の TG 含量と血漿 ALT 量, 肝臓の Cide-a と Cide-c の発現の経時変化

1-14 週間投与した健常群 (□) と脂肪肝群 (■) の肝臓の TG 含量と血漿 ALT 量, Cide-a と Cide-c の遺伝子発現を比較した. 1-8 週目は各群 7 検体, 14 週目は各群 10 検体の平均値と標準誤差を示した.

3.2.6 HF/HS 食投与による肝臓の SREBP-1 と PPAR γ の発現の経時変化

肝臓の Cide-a と Cide-c の発現と、脂質合成を促進する転写因子である SREBP-1 と PPAR γ の発現の関連性を検討するために、健常群と脂肪肝群のマウスにおいて、これらを投与 14 週間まで経時的に測定した。いずれの因子においても脂肪肝の病態の進行とパラレルな変動を認めた (図 29)。

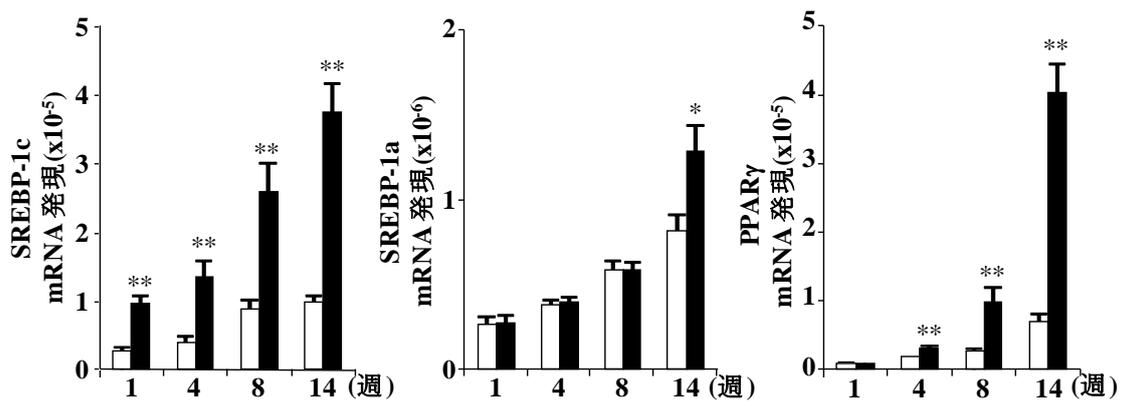


図 29. 肝臓の SREBP-1 と PPAR γ の発現の経時変化

1-14 週間投与した健常群 (□) と脂肪肝群 (■) の SREBP-1c, SREBP-1a, PPAR γ の肝臓における遺伝子発現を比較した。1-8 週目は各群 7 検体, 14 週目は各群 10 検体の平均値と標準誤差を示した。

3.2.7 遺伝性肥満マウスの肝臓の TG 蓄積と肝障害, Cide-a と Cide-c の発現

脂肪肝を形成する遺伝性肥満マウスにおいても, 肝臓の TG 含量や血漿 ALT 量, 肝臓の Cide-a と Cide-c の発現を測定した. C57BL/6J マウスと比較して, KK-A^y/Ta Jcl マウスと ob/ob マウスの肝臓の TG 含量, 血漿 ALT 量, 肝臓の Cide-a と Cide-c の発現は有意に大きかった ($p < 0.01$) (図 30). 脂肪肝の病態が最も進行した ob/ob マウスで, やはり Cide-a と Cide-c の発現が最も大きかった.

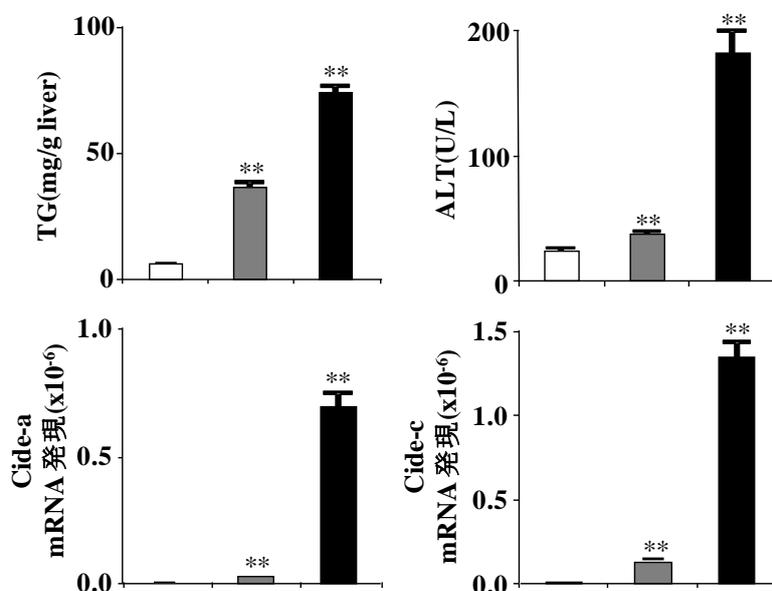


図 30. 肝臓の TG 含量と血漿 ALT 量, 肝臓の Cide-a と Cide-c の発現

健常モデルである C57BL/6J マウス (□) と, 脂肪肝を形成する遺伝性肥満マウスである KK-A^y/Ta Jcl マウス (■) と ob/ob マウス (■) の肝臓の TG 含量と血漿 ALT 量, 肝臓の Cide-a と Cide-c の遺伝子発現を比較した. C57BL/6J マウスと ob/ob マウスは 9 週齢を各群 7 検体, KK-A^y/Ta Jcl マウスは 11 週齢を各群 5 検体使用し, これらの平均値と標準誤差を示した.

3.2.8 肝障害に影響する因子の統計的解析

脂肪肝群においては、投与 8 週目で肝臓の Cide-a と Cide-c の発現と、血漿 ALT 量が増加していた (図 28)。Cide-a と Cide-c は培養細胞にアポトーシスを誘導することが知られているため、脂肪肝においても肝細胞の障害に寄与している可能性が考えられた。そこでこれらの発現と肝障害の関連性を検討するために、健常群と脂肪肝群のマウスにおいて血漿 ALT 量に有意に影響する因子を統計解析により選抜した (表 4)。血漿 ALT 量の変動に対する肝臓の Cide-a と Cide-c の発現の統計的な寄与は、肝臓の TG 含量のそれよりも大きかった。肝臓の PPAR γ の発現は血漿 ALT 量の変動に有意に影響していなかった。

表 4. 血漿 ALT 量と肝臓の各種因子との関連 (ステップワイズ重回帰分析)

Step	肝臓パラメーター	model R ²	P value
1	Cide-c mRNA	0.8074	<0.001
2	Cide-a mRNA	0.8762	<0.001
3	SREBP-1c mRNA	0.8952	0.002
4	Triglyceride content	0.9231	<0.001

健常群と脂肪肝群のマウス (1-14 週間投与 : 62 検体) について血漿 ALT 量と肝臓の各種パラメーター (TG 含量, Cide-a, Cide-c, SREBP-1a, SREBP-1c, PPAR γ の遺伝子発現) の関連を重回帰分析し、血漿 ALT 量と有意に関連する因子を選抜した。

Step の数字は血漿 ALT 量と関連性の大きいパラメーターの順位を示す。

3.2.9 培養細胞に対する Cide-a と Cide-c の作用

Cide-a と Cide-c は脂肪組織において脂肪滴形成に関与することや⁴²⁻⁴⁵, 培養細胞に過剰発現させるとアポトーシスを誘導することが報告されている^{40,41}. Cide-a と Cide-c の機能を検討するため, McA-RH7777 細胞または Cos-1 細胞にこれらを過剰発現させ, 細胞内の脂肪滴と細胞障害を観察した. Cide-a と Cide-c の過剰発現により, 細胞内に肥大化した脂肪滴の形成 (図 31A 矢印) と, 細胞死の誘導 (図 31BC) が認められた.

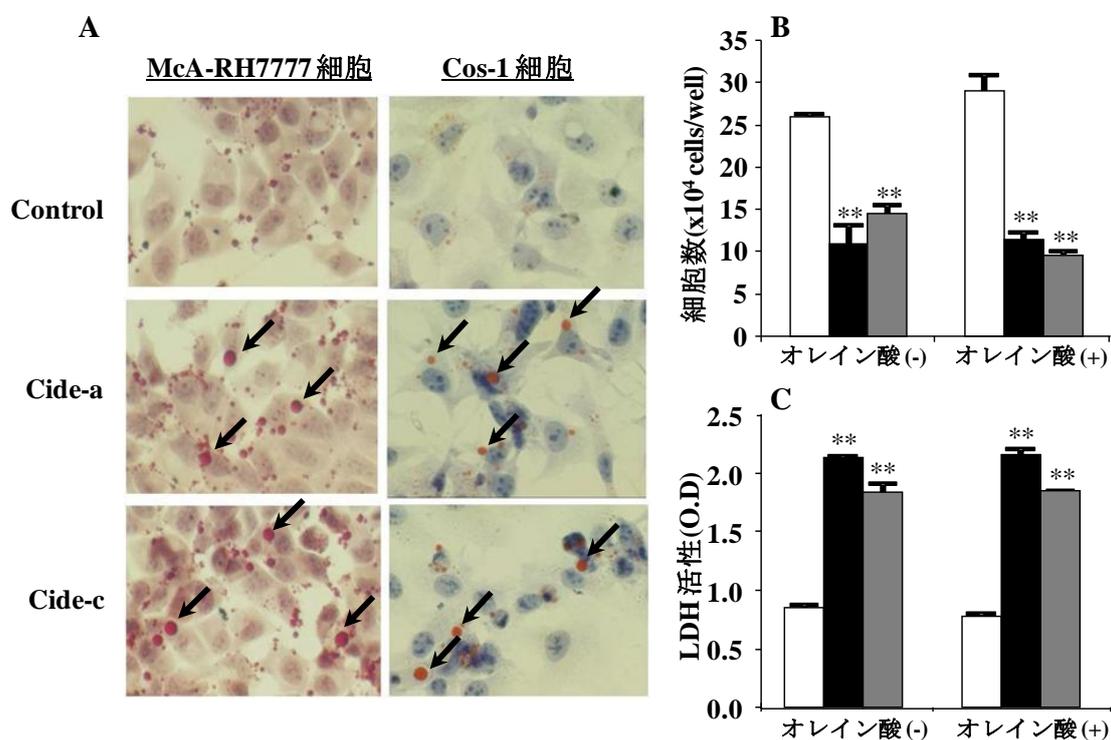


図 31. Cide-a と Cide-c を過剰発現させた培養細胞の脂肪滴形成と細胞障害

コントロール (□), Cide-a (■), Cide-c (■) の発現プラスミドを導入した McA-RH7777 細胞または Cos-1 細胞にオレイン酸ナトリウムを添加し, 1-2 日間培養した際の細胞内の脂肪滴 (A), 細胞数 (B), 培養上清の LDH 活性 (C) を観察した. オレイン酸ナトリウムは 200 μ M 濃度で添加した. 各群 3 検体の平均値と標準誤差を示した.

3.2.10 Cide-a と Cide-c のプロモーター活性に対する EPA の作用

EPA の投与により Cide-a と Cide-c の発現が抑制された結果（結果 3.2.3）を受け、EPA の Cide-a と Cide-c の遺伝子プロモーター活性に対する影響を McA-RH7777 細胞と Cos-1 細胞を用い、レポーターアッセイで検討した。EPA の添加は Cide-a プロモーター活性を有意に抑制した ($p < 0.01$)。この結果より Cide-a 発現に対する直接的な EPA の抑制作用が示唆された。一方、Cide-c プロモーター活性に EPA は影響を及ぼさなかった（図 32）。

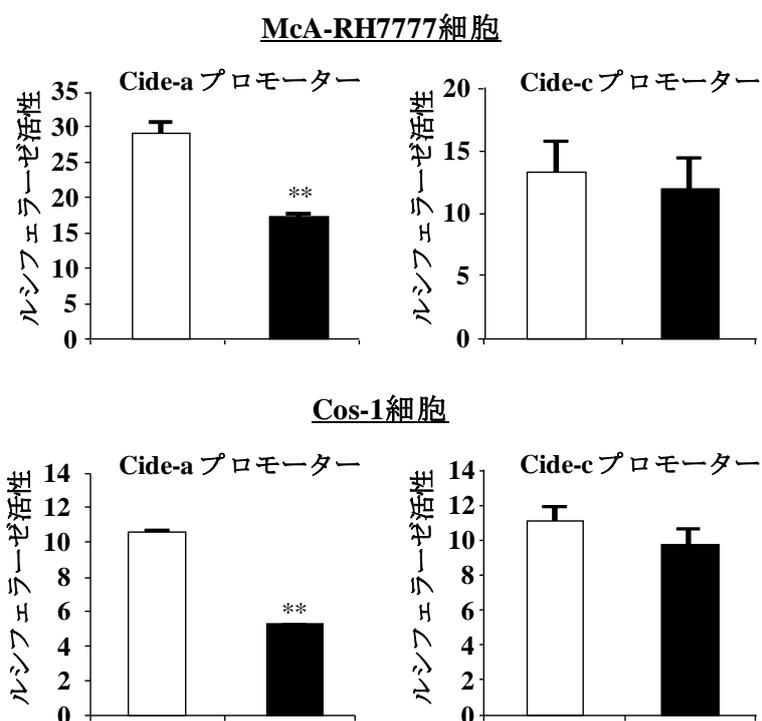


図 32. Cide-a と Cide-c のプロモーター活性に対する EPA の作用

Cide-a または Cide-c のレポータープラスミドを導入した McA-RH7777 細胞と Cos-1 細胞に Vehicle (□) または EPA-Na (■) を添加し、1 日培養した際のプロモーター活性を比較した。EPA-Na は 50 μ M 濃度で添加した。各群 3 検体の平均値と標準誤差を示した。

3.2.11 Cide-a と Cide-c のプロモーター活性に対する SREBP-1 の作用

EPA は SREBP-1 の発現を抑制することが報告されている³⁵。Cide-a と Cide-c の発現に対する SREBP-1 の影響を検討するため、Cide-a と Cide-c の遺伝子プロモーター活性に対する SREBP-1a と SREBP-1c の影響をレポーターアッセイで検討した。SREBP-1a または SREBP-1c を過剰発現した Cos-1 細胞において、Cide-a プロモーター活性は顕著に増加した。一方、Cide-c プロモーター活性は顕著な増加を示さなかった (図 33)。

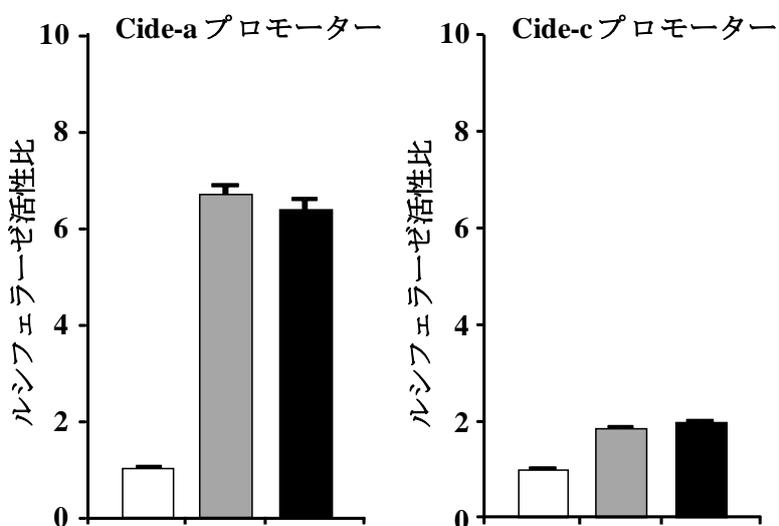


図 33. Cide-a と Cide-c のプロモーター活性に対する SREBP-1 の作用

コントロール (□), SREBP-1a (■), SREBP-1c (■) の発現プラスミドを、Cide-a または Cide-c のレポータープラスミドと同時に Cos-1 細胞に導入し、1 日間培養した際のプロモーター活性を測定した。各群 3 検体の平均値と標準誤差を示した。

4 考察

VLDL がマクロファージに TG や FFA の蓄積を引き起こし、AP-1 や ERK の活性化を介して IL-1 β や TNF- α などの炎症性因子の発現を誘導することは既に報告されている²⁶⁻²⁸. またこの VLDL の炎症惹起性に、LPL が重要な役割を果たすことも報告されている²⁶. 一方で、VLDL の炎症惹起性に対する介入を検討した報告は少ない. 魚油の投与により、VLDL によるコレステロールのエステル化亢進がマクロファージにおいて抑制されるという報告がある程度である⁵⁷. 著者は、EPA の投与が VLDL の炎症惹起性を著明に減弱させることを見出した. この現象は、EPA の投与により VLDL の性状が変化し、マクロファージの LPL に加水分解を受け難くなることによりもたらされる可能性を示した.

高純度 EPA 製剤は我が国において、高脂血症や閉塞性動脈硬化症の治療に臨床現場で使用されている. さらにこの高純度 EPA 製剤は、心血管イベントの発生を低下させるというエビデンスが大規模臨床試験で示されている¹⁵. これは著者の知る限りにおいて、臨床現場で使用されている薬剤が VLDL の性状を変化させ、その炎症惹起性に影響を及ぼすことを示した最初の報告である.

通常食で飼育したマウスを由来とする Ctrl-VLDL は、これまでの報告と同様にマクロファージに TG を蓄積させ、TNF- α , IL-1 β , MCP-1 などの炎症性因子の発現を増加させた. この VLDL の炎症惹起性がマクロファージの LPL を阻害することによって打ち消されたこともこれまでの報告と同様であった. これに対して、EPA を投与したマウスを由来とす

る EPA-VLDL は、その炎症惹起性が Ctrl-VLDL と比較して著明に減弱していた。この作用は VLDL のおおよその数（タンパク質濃度）を揃えて添加した実験においても、VLDL を構成する主要な脂質である TG の量を揃えて添加した実験においても同様に観察された。また EPA-VLDL では、それを構成する脂肪酸の多くが EPA に置き換わっていた。EPA はエイコサノイド代謝や NF- κ B 経路を介した抗炎症作用を持つことが知られている^{18,19}。

EPA-VLDL で認められた炎症惹起性の減弱は、VLDL から遊離した EPA の抗炎症作用に由来する可能性が考えられた。しかしながら、Ctrl-VLDL と同時に遊離体の EPA を THP-1 マクロファージに添加しても、Ctrl-VLDL の炎症惹起性はほとんど影響を受けなかった。この結果は、EPA-VLDL で認められた炎症惹起性の減弱に対し、EPA-VLDL 中の EPA の上記作用による寄与が小さいことを示している。

これまでの報告と同様に²⁶、本研究の実験においても VLDL のマクロファージに対する炎症惹起性には、LPL による VLDL の加水分解が必要であった。このことから EPA-VLDL で認められた炎症惹起性の減弱は、VLDL が LPL による加水分解を受け難くなったために起こった可能性が考えられた。この可能性を検討するために、マクロファージの LPL により加水分解を受け VLDL から放出されて増加する FFA 濃度を、Ctrl-VLDL と EPA-VLDL で比較した。マクロファージに VLDL を添加し経時的に増加する FFA 濃度は、Ctrl-VLDL に比べ EPA-VLDL で有意に小さかった。この結果をもたらした原因として、次の二つの可能性が考えられた。1: マクロファージの LPL 発現が EPA-VLDL の添加により

Ctrl-VLDL のそれより減少する。2: EPA-VLDL の LPL に対する感受性が Ctrl-VLDL のそれよりも小さい。まず 1 の可能性を検討するために、VLDL を添加したマクロファージの LPL 分泌発現量を比較した。Ctrl-VLDL を添加した際の培養上清の LPL 量は変化を示さなかったが、EPA-VLDL 添加時にはこれが減少していた。このことから EPA-VLDL がマクロファージの LPL 分泌発現を抑制し、EPA-VLDL が LPL による加水分解を受け難くすることで、その炎症惹起性が減弱された可能性が示唆された。また 2 の可能性を検討するために、一定量の精製 LPL と VLDL をインキュベートした。EPA-VLDL は Ctrl-VLDL と比較して、精製 LPL に加水分解を受けて放出する FFA 量が小さかった。これは EPA-VLDL 自身が LPL による加水分解を受け難くなっていることを意味する。続いて EPA-VLDL が LPL による加水分解を受け難くなった原因を明らかにするために、Ctrl-VLDL と EPA-VLDL の性状を比較した。EPA-VLDL では脂質 (TG, TC, PL) の含量が Ctrl-VLDL の約半分になっており、また HPLC 解析により、EPA-VLDL が Ctrl-VLDL よりも小型化していることが確認された。このことはラットに EPA を投与した報告と一致する²⁹。小型の VLDL は大型のそれよりも LPL による加水分解を受け難いことが報告されている⁵⁸。さらに EPA-VLDL では、apoCII/apoCIII 比が Ctrl-VLDL のそれよりも有意に小さかった。LPL 活性に対して apoCII は促進的に、apoCIII は抑制的に働くことが知られ、さらに apoCII/apoCIII 比の減少に伴い、apoCII の LPL 活性化作用が減少することが報告されている⁵⁵。今回の検討で認められた EPA-VLDL の apoCII/apoCIII 比の減少が、EPA-VLDL の

LPL に対する感受性低下に寄与した可能性がある。また EPA-VLDL では EPA の割合が著明に増加した。EPA で構成された TG は、体内に多く含まれるパルミチン酸やオレイン酸などで構成された TG よりも、LPL による加水分解を受け難いことが知られている⁵⁹。これらのことは EPA-VLDL の LPL に対する感受性低下を支持するものである。以上より EPA の投与は VLDL の性状を変化させ、LPL に対するその感受性を減少させ、さらにマクロファージの LPL 分泌発現を抑制することで、その炎症惹起性を減弱させた可能性が考えられた。

血中 VLDL の増加をきたした高 TG 血症は、心血管イベントの危険因子である²¹。血中の VLDL やカイロミクロンの TG を加水分解する血管壁の LPL は、このリスクを低下させることが知られている。実際に全身的な LPL の過剰発現は動脈硬化抑制的であり⁶⁰、欠損は動脈硬化促進的であることが報告されている⁶¹。ところがマクロファージの LPL については、その欠損は動脈硬化抑制的に働き^{62,63}、逆にその過剰発現は動脈硬化促進的に働くことが報告されている⁶⁴。このようなマクロファージの LPL の動脈硬化促進的な性質は、LPL が VLDL の加水分解を介して泡沫化や炎症性因子の発現を引き起こすことに起因すると考えられている。遊離体の EPA は、培養マクロファージの LPL のタンパク質発現やその分泌に対し影響しないことが報告されている⁶⁵。著者は、EPA の投与が LPL の基質である VLDL の組成を変化させ、マクロファージの LPL 発現抑制を介してその炎症惹起性を弱める可能性を提示した。このことはマクロファージ LPL も EPA の抗動脈硬化作用

の標的の一つである可能性を初めて指摘するものである。

一方で VLDL が LPL による加水分解を受け難くなることは、VLDL の血中クリアランスを低下させ、血中 TG 増加の要因となる。しかしながら本研究のマウスを用いた検討においては、EPA の投与により血漿 TG が増加することはなく、むしろ顕著に減少していた。また VLDL の TG 含量は、EPA の投与により半減していた。EPA は肝臓における TG 合成を抑制し、その結果として TG 分泌を抑制することが報告されている³⁸。この作用の影響が大きいため、LPL に対する VLDL の感受性低下による血漿 TG の増加が認められなかったと考えられる。また EPA を投与したラットにおいては、ヘパリン静注後に血中に増加する LPL の活性が促進していることが報告されている²⁹。また LPL の発現は組織によってその受ける制御が異なることが知られており、例えばインスリンは脂肪組織において LPL 活性を増加させるが、心筋などの筋肉に対してはそれを減少させることが報告されている⁶⁶。これらのことから、EPA の LPL に対する作用は、組織により異なる可能性が考えられる。

EPA-VLDL を添加したマクロファージの TNF- α や MCP-1 の発現は、Vehicle 添加のそれと比較して同等またはそれ以下のレベルまで低下していた。VLDL のアポタンパク質組成を解析すると、EPA-VLDL では Ctrl-VLDL と比較し apoAI と apoAIV の含量の増加が認められた。これらはマクロファージや単球に対して抗炎症作用を持つことや^{67,68}、これを過剰発現したマウスが動脈硬化形成に対し抵抗性を持つことが報告されている⁶⁹⁻⁷³。

EPA-VLDL を添加したマクロファージの炎症性因子の発現が、Vehicle 添加のそれよりも低レベルであったのは、LPL に対する VLDL の感受性低下だけでなく、apoAI や apoAIV のようなアポタンパク質の組成変化に由来する可能性も考えられる。

動脈硬化の発症進展にはマクロファージが中心的な役割を果たす。一方で、内皮細胞、血管平滑筋細胞、T リンパ球などの細胞もまたこれに関与することが知られている (図 4)。本研究においてはマクロファージを使用して VLDL の炎症惹起性の評価を行ったが、VLDL の催動脈硬化作用やこれに対する EPA の抑制作用の機序を明らかにするためには、他の細胞を使用した評価も必要になると考える。また動脈硬化の発症進展には VLDL だけでなく、他のリポタンパク質 (カイロミクロン, LDL, HDL) も関与する。EPA のこれらに対する作用を評価することも、上記をより明確にするためには必要であると考えられる。

著者は本研究で、EPA の投与により VLDL のマクロファージに対する炎症惹起性が減弱することを示した。この現象の少なくとも一部は、VLDL がマクロファージの LPL に加水分解を受け難くなることに起因していた。EPA 自身は抗炎症作用を持つ脂肪酸として知られている。しかしながら今回の検討で示された EPA の投与による VLDL の炎症惹起性の減弱は、EPA による直接的な抗炎症作用ではなく、EPA が VLDL の性状を変化させた結果であると推察される (図 34)。これらの結果は EPA の投与による炎症抑制作用の新しい機序と、EPA の抗動脈硬化作用を説明する機序の一つを提示するものであると考えられる。

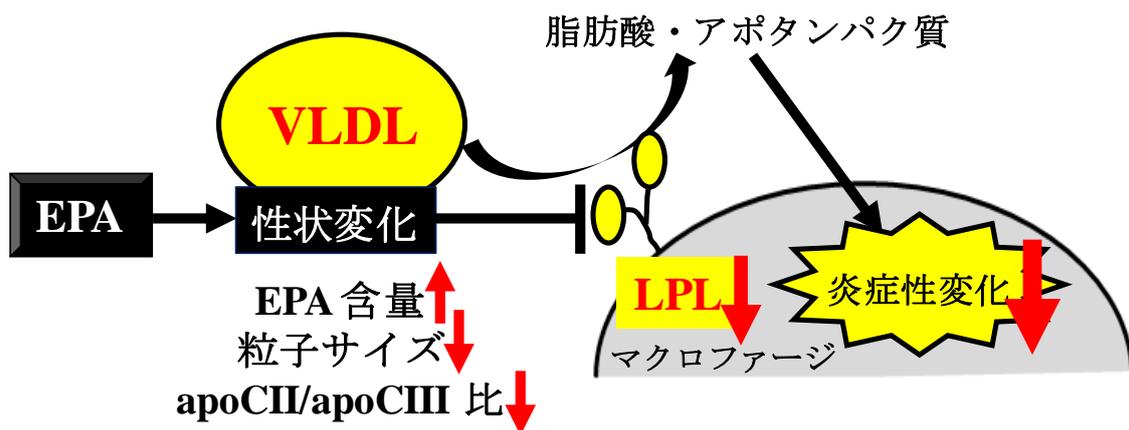


図 34. EPA による VLDL の炎症惹起性の抑制作用

血中 TG が増加する原因の一つとして、非アルコール性の脂肪肝における VLDL の合成と分泌の亢進が挙げられる³⁰。脂肪肝は、肝臓への TG 蓄積と肝障害を特徴とする疾患である。この機序として脂質代謝の中核である肝細胞において、脂質の摂取から VLDL の合成やその細胞内輸送、類洞への放出までの一連の脂質の代謝経路のうち、特に内因性の FFA の供給過多、ミトコンドリアにおける脂肪酸の β 酸化の障害、TG の合成亢進などが複合的に作用して発生していると考えられている³² (図 9)。しかし肝臓への脂質蓄積や、肝障害の発現機序については不明な点を残している。著者は本研究において、EPA の投与が脂肪肝形成を顕著に抑制することを確認した。また脂肪肝の病態に関与する新規候補因子を選抜するために、肝臓の遺伝子発現の網羅的な解析を行い、脂肪肝において発現が増加し、その増加が EPA によって抑制された因子として Cide-a と Cide-c を見出し、これらの脂肪肝の病態に関与する可能性を示した。

健常のマウスにおいては、Cide-a は褐色脂肪組織、Cide-c は白色脂肪組織で発現していることが知られている^{41,46}。また健常のマウスの肝臓ではこれらはほとんど発現しておらず、老齢のマウスや遺伝性肥満モデルである ob/ob マウスの肝臓で発現していることが報告されている^{47,74}。Cide-a と Cide-c は脂肪細胞において、その脂肪滴の形成に重要な役割を果たすことが報告されている⁴²⁻⁴⁵。また Cide-c は肝臓において脂肪の蓄積に関与する可能性が指摘されている⁴⁷。しかしながら脂肪肝の病態と、Cide-a と Cide-c の関連については不明であった。

本研究において、HF/HS 食を投与したマウスは肝臓への TG 蓄積と肝障害を伴う著しい脂肪肝を呈したが、HF/HS 食と同時に EPA を投与すると、これらはほぼ完全に抑制された。この際、肝臓の脂肪合成を促進する転写因子である SREBP-1c や PPAR γ の発現も同様の挙動を示しており、EPA はこれらの発現抑制を介して肝臓における脂肪合成を抑制し、脂肪肝の形成を抑制している可能性が示唆された。さらに肝臓の遺伝子発現の網羅的な解析により、Cide-a と Cide-c を選抜した。Cide family のもう一つのアイソフォームである Cide-b については、その発現はほとんど変動していなかった (data not shown)。さらに Cide-a と Cide-c は、HF/HS 食の投与期間が長くなり、肝臓の TG 含量や血漿 ALT 量が増えるほどそれらの発現は増加していた。遺伝性肥満モデルである KK-A^y/Ta Jel マウスと ob/ob マウスにおいても、肝臓の Cide-a と Cide-c の遺伝子発現の増加が認められ、これらは脂肪肝の病態が最も進行した ob/ob マウスにおいて最も大きく、これらのパターンは

よく一致していた。これらの事実は、Cide-a と Cide-c が脂肪肝の発症進展に関連する可能性を示唆している。これまでに PPAR α アゴニストである Wy-14,643 を投与したマウスの肝臓で、Cide-a の遺伝子発現が増加したにも関わらず、アポトーシスの誘導が認められなかったことが報告されている⁵¹。しかし、本研究では Cide-a と Cide-c の発現と血漿 ALT 量は平行に変化しており、さらに重回帰分析の結果によると血漿 ALT 量に対する Cide-a と Cide-c の発現の統計的な寄与は、肝臓の TG 含量のそれよりも大きかった。これらの結果は Cide-a と Cide-c が肝臓における TG 蓄積ばかりではなく、脂肪肝形成に伴う肝障害の発現にも寄与している可能性を示している。

Cide-a と Cide-c は脂肪細胞において脂肪滴の形成に重要な役割を果たし、脂肪の蓄積を制御することでエネルギーバランスやインスリン抵抗性を調節していると考えられている^{44,46}。これに対して、肝細胞における脂肪の蓄積に果たす Cide-a と Cide-c の役割については不明であった。これまでに Cide-c をマウスプライマリー肝細胞に過剰発現させると、細胞内に肥大化した脂肪滴が形成されるが、Cide-a を過剰発現させてもこの現象が認められないことが報告されている⁴⁷。一方で、Cos-1 細胞に Cide-a を過剰発現させると、細胞内に肥大化した脂肪滴が形成されることも報告されている⁴⁵。本研究においても Cide-a または Cide-c を過剰発現させた肝臓由来 McA-RH7777 細胞と Cos-1 細胞で形成される脂肪滴を観察した。するとどちらの細胞においても、細胞内に肥大化した脂肪滴が認められた。この結果より Cide-a は肝臓由来の細胞においても、脂肪滴の肥大化に関与している可能性

が考えられる。またこれらの過剰発現細胞においては、細胞数の減少や培養上清への LDH 漏洩の増加が認められ、Cide-a と Cide-c が細胞死を誘導する作用を持つことが確認された。これらの結果は、Cide-a と Cide-c の脂肪肝における TG 蓄積と、肝障害発現に対する関与を裏付けるものであると考えられる。

Cide-a と Cide-c の発現は、PPAR α または PPAR γ により制御を受けることが報告されている^{45,47,51}。本研究でも HF/HS 食を投与したマウスの肝臓において、Cide-a と Cide-c の発現と PPAR γ の発現は平行に変化していた。一方で HF/HS 食の投与により増加する Cide-a と Cide-c の発現は、EPA によって抑制された。EPA は PPAR α や PPAR γ を活性化することが報告されていることから、これらの結果の間には相違がある⁷⁵⁻⁷⁷。そこで Cide-a と Cide-c の発現に対する EPA の抑制作用をレポーターアッセイにより検討したところ、EPA は Cide-a プロモーター活性を抑制し、Cide-c プロモーター活性には影響しなかった。この結果は、EPA が Cide-a と Cide-c の発現に対して異なる影響を及ぼす可能性を示している。Cide-a と Cide-c の発現は PPAR γ により同様に制御を受けることが報告されていることから、EPA の Cide-a に対する発現抑制作用が PPAR γ を介したものであるとは考え難い。

SREBP-1 は EPA によってその発現が抑制されることが報告されている³⁵。本研究においても HF/HS 食を投与したマウスの肝臓において、Cide-a と Cide-c の発現は SREBP-1 の発現と平行に変化しており、EPA の投与はこれらを抑制していた。そこで Cide-a と

Cide-c のプロモーター活性に対する SREBP-1 の影響についても、レポーターアッセイにより検討した。SREBP-1 のアイソフォームである SREBP-1a または SREBP-1c を培養細胞に過剰発現させると、Cide-a プロモーター活性は顕著に増加したが、Cide-c プロモーター活性は顕著な増加を示さなかった。これらの結果は EPA の Cide-a と Cide-c のプロモーター活性に対する作用と一致しており、EPA の Cide-a プロモーター活性に対する抑制作用が SREBP-1 の抑制を介して起こったことを強く示唆している。

著者は本研究において、Cide-a と Cide-c の発現と脂肪肝の病態が密接に関連していることを示した。また培養細胞を用いた機能解析により、肝臓への TG 蓄積に伴い発現した Cide-a と Cide-c は、肝細胞に肥大化した脂肪滴を形成し、効率の良い脂肪の蓄積に寄与することで脂肪肝の病態を進展させている可能性が考えられた。一方で、Cide-a と Cide-c は細胞死を誘導する作用も持つ。脂肪の蓄積のために肝臓で誘導された Cide-a と Cide-c が細胞死を誘導し、肝障害を引き起こす可能性も考えられる。また本研究では脂肪肝の形成過程に対する EPA の抑制作用（予防的効果）を評価したが、EPA が脂肪肝を改善する作用（治療的効果）を持つことは既に報告されており³⁹、その機序の少なくとも一部は SREBP-1 の発現抑制を介した脂肪合成の抑制に由来すると考えられている^{38,78}。本研究で著者は、SREBP-1 が Cide-a の発現を促進する可能性を示した。脂肪肝形成に対する EPA の抑制作用には、SREBP-1 の制御を介した Cide-a の発現抑制が寄与している可能性が考えられる（図 35）。

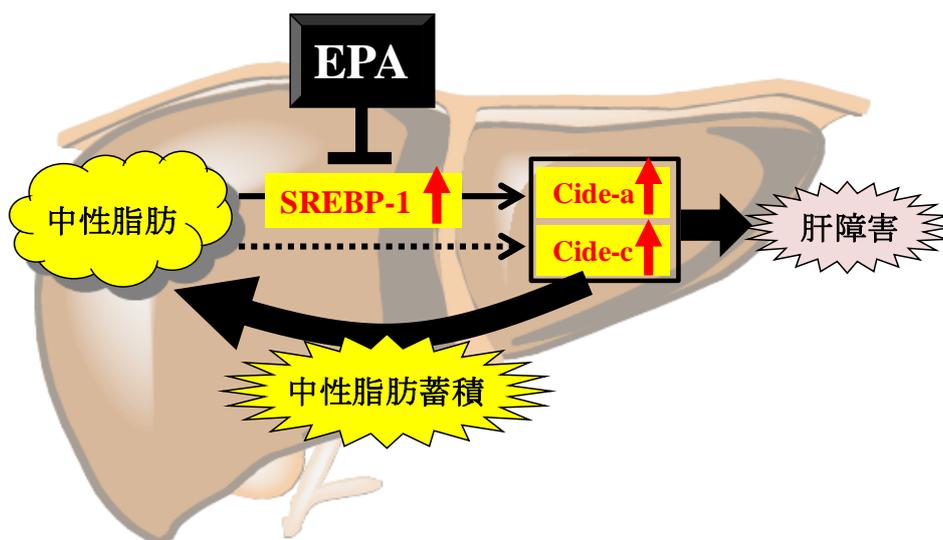


図 35. EPA による脂肪肝形成の抑制作用

血中の過剰な VLDL と脂肪肝は心血管イベントの危険因子である。本研究で著者は、LDL-C 非依存的な EPA の抗動脈硬化作用として、VLDL の炎症惹起性と脂肪肝形成に対する EPA の抑制作用をこれらの機序とともに提示した (図 34-36)。血中 VLDL 増加をきたした高 TG 血症や、NAFLD を併発した動脈硬化症患者に、EPA は有効である可能性が示唆された。これらの知見は新たな動脈硬化予防戦略の創出に寄与すると考える。

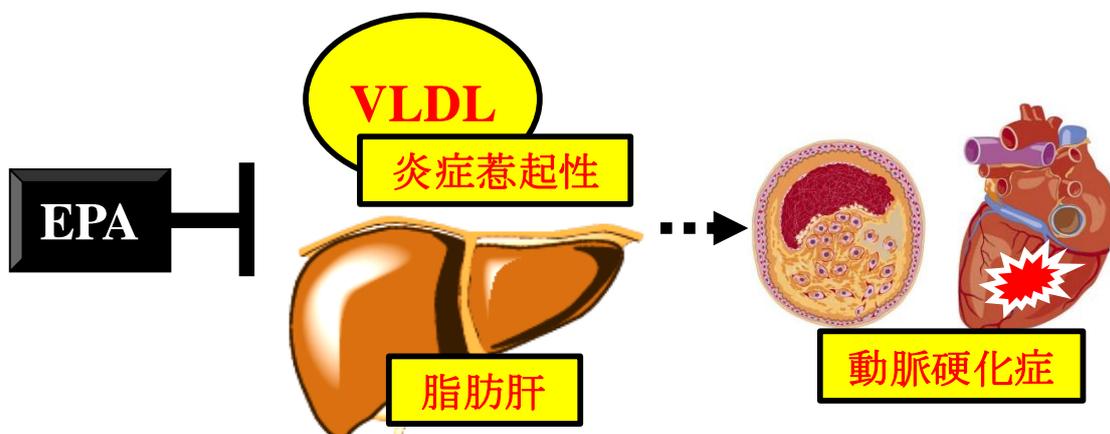


図 36. EPA の LDL-C を介さない抗動脈硬化作用

5 引用文献

1. 厚生労働省. 平成23年人口動態統計月報年計(概数)の概況.
2. 厚生労働省. 平成20年患者調査の概況.
3. 厚生労働省. 平成22年国民医療費の概況.
4. 一般社団法人日本動脈硬化学会. 動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012年版. 2012.
5. Jay W. Heinecke. Lipoprotein oxidation in cardiovascular disease: chief culprit or innocent bystander? *J Exp Med.* 2006; 312(4):813-6.
6. 元山宏華, 稲葉雅章. 動脈硬化と炎症性サイトカイン. *Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology.* 2012; 6(2):94-99.
7. 國分宣明, 西田絢一, 土橋和文. 日本人の虚血性心疾患の疫学. *日本臨牀 増刊号7.* 2011; 69:545-52.
8. 高見澤格, 斯波真理子. LDLとその亜分画. *日本臨牀 増刊号2.* 2001; 59:70.
9. Kromhout D, Bosschieter EB, de Lezenne Coulander C. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med.* 1985; 312(19):1205-9.
10. Siscovick DS, Raghunathan TE, King I, et al. Dietary intake and cell membrane levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *Jama.* 1995; 274(17):1363-7.
11. Davi GL, Stamler J, Orenca AJ, et al. Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1997; 336(15):1046-53.
12. Hu FB, Cho E, Rexrode KM, et al. Fish and long-chain omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease and total mortality in diabetic women. *Circulation.* 2003; 107(14):1852-7.
13. Hu FB, Bronner L, Willett WC, et al. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *Jama.* 2002; 287(14):1815-21.
14. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della

- Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*. 1999; 354(9177):447-55.
15. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet*. 2007; 369(9567):1090-8.
 16. Sato M, Katsuki Y, Fukuhara K, et al. Effects of highly purified ethyl all-cis-5,8,11,14,17-icosapentaenoate (EPA-E) on rabbit platelets. *Biol Pharm Bull*. 1993; 16(4):362-7.
 17. Yano T, Kawano H, Yamashita M, et al. Effects of ethyl-all-cis-5,8,11,14,17-icosapentaenoate (EPA-E), pravastatin and their combination on serum lipids and intimal thickening of cuff-sheathed carotid artery in rabbits. *Life Sci*. 1997; 61(20):2007-15.
 18. Itoh M, Suganami T, Satoh N, et al. Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(9):1918-25.
 19. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*. 2009; 91(6):791-5.
 20. 熊谷朗. EPA の医学—疫学・栄養学から臨床応用まで. 1994: 95-112.
 21. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk*. 1996; 3(2):213-9.
 22. Sacks FM, Alaupovic P, Moye LA, et al. VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation*. 2000; 102(16):1886-92.
 23. Kelley DS, Siegel D, Fedor DM, et al. DHA supplementation decreases serum C-reactive protein and other markers of inflammation in hypertriglyceridemic men. *J Nutr*. 2009; 139(3):495-501.
 24. Rosenson RS, Huskin AL, Wolff DA, et al. Fenofibrate reduces fasting and postprandial inflammatory responses among hypertriglyceridemia patients with the metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2008; 198(2):381-8.

25. Rapp JH, Lespine A, Hamilton RL, et al. Triglyceride-rich lipoproteins isolated by selected-affinity anti-apolipoprotein B immunosorption from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14(11):1767-74.
26. Saraswathi V, Hasty AH. The role of lipolysis in mediating the proinflammatory effects of very low density lipoproteins in mouse peritoneal macrophages. *J Lipid Res.* 2006; 47(7):1406-15.
27. Stollenwerk MM, Lindholm MW, Porn-Ares MI, et al. Very low-density lipoprotein induces interleukin-1beta expression in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 335(2):603-8.
28. Stollenwerk MM, Schioppa A, Fredrikson GN, et al. Very low density lipoprotein potentiates tumor necrosis factor-alpha expression in macrophages. *Atherosclerosis.* 2005; 179(2):247-54.
29. Mizuguchi K, Yano T, Ishibashi M, et al. Ethyl all-cis-5,8,11,14,17-icosapentaenoate modifies the biochemical properties of rat very low-density lipoprotein. *Eur J Pharmacol.* 1993; 235(2-3):221-7.
30. Chan DC, Watts GF, Gan S, et al. Nonalcoholic fatty liver disease as the transducer of hepatic oversecretion of very-low-density lipoprotein-apolipoprotein B-100 in obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(5):1043-50.
31. 松森理枝, 代田浩之. 診断と治療. 2011; 99(9):1477-83.
32. 松坂賢, 島野仁. 肝胆臓. 2010; 60(6):923-28.
33. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2010; 363(14):1341-50.
34. 岡上武. 新領域別シリーズ 肝・胆道系症候群(第2版) I 肝臓編. 2010; 13.
35. Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, et al. A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 1999; 274(50):35840-4.
36. Shimano H. SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family. *FEBS J.* 2009; 276(3):616-21.
37. Harris WS, Miller M, Tighe AP, et al. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical

- and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis*. 2008; 197(1):12-24.
38. Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, et al. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology*. 2003; 38(6):1529-39.
 39. Tanaka N, Sano K, Horiuchi A, et al. Highly purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2008; 42(4):413-8.
 40. Inohara N, Koseki T, Chen S, et al. CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *Embo J*. 1998; 17(9):2526-33.
 41. Kim JY, Liu K, Zhou S, et al. Assessment of fat-specific protein 27 in the adipocyte lineage suggests a dual role for FSP27 in adipocyte metabolism and cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 294(4):E654-67.
 42. Puri V, Konda S, Ranjit S, et al. Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. *J Biol Chem*. 2007; 282(47):34213-8.
 43. Keller P, Petrie JT, De Rose P, et al. Fat-specific protein 27 regulates storage of triacylglycerol. *J Biol Chem*. 2008; 283(21):14355-65.
 44. Nishino N, Tamori Y, Tateya S, et al. FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J Clin Invest*. 2008; 118(8):2808-21.
 45. Puri V, Ranjit S, Konda S, et al. Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(22):7833-8.
 46. Zhou Z, Yon Toh S, Chen Z, et al. Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet*. 2003; 35(1):49-56.
 47. Matsusue K, Kusakabe T, Noguchi T, et al. Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene Fsp27. *Cell Metab*. 2008; 7(4):302-11.
 48. Palmer AM, Nova E, Anil E, et al. Differential uptake of subfractions of triglyceride-rich lipoproteins by THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*. 2005; 180(2):233-44.
 49. Merkel M, Loeffler B, Kluger M, et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol*

Chem. 2005; 280(22):21553-60.

50. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957; 226(1):497-509.
51. Viswakarma N, Yu S, Naik S, et al. Transcriptional regulation of Cidea, mitochondrial cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A, in mouse liver by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma. *J Biol Chem.* 2007; 282(25):18613-24.
52. Danesch U, Hoeck W, Ringold GM. Cloning and transcriptional regulation of a novel adipocyte-specific gene, FSP27. CAAT-enhancer-binding protein (C/EBP) and C/EBP-like proteins interact with sequences required for differentiation-dependent expression. *J Biol Chem.* 1992; 267(10):7185-93.
53. Hannah VC, Ou J, Luong A, et al. Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem.* 2001; 276(6):4365-72.
54. Mizuguchi K, Yano T, Kojima M, et al. Hypolipidemic effect of ethyl all-cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoate (EPA-E) in rats. *Jpn J Pharmacol.* 1992; 59(3):307-12.
55. Lambert DA, Catapano AL, Smith LC, et al. Effect of the apolipoprotein C-II/C-III1 ratio on the capacity of purified milk lipoprotein lipase to hydrolyse triglycerides in monolayer vesicles. *Atherosclerosis.* 1996; 127(2):205-12.
56. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Jr., et al. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 1984; 25(12):1277-94.
57. Soltys PA, Mazzone T, Wissler RW, et al. Effects of feeding fish oil on the properties of lipoproteins isolated from rhesus monkeys consuming an atherogenic diet. *Atherosclerosis.* 1989; 76(2-3):103-15.
58. Fisher RM, Coppack SW, Humphreys SM, et al. Human triacylglycerol-rich lipoprotein subfractions as substrates for lipoprotein lipase. *Clin Chim Acta.* 1995; 236(1):7-17.
59. Melin T, Qi C, Bengtsson-Olivecrona G, et al. Hydrolysis of chylomicron polyenoic fatty acid esters with lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1075(3):259-66.
60. Shimada M, Ishibashi S, Inaba T, et al. Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density

- lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(14):7242-6.
61. Benlian P, De Gennes JL, Foubert L, et al. Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. *N Engl J Med*. 1996; 335(12):848-54.
 62. Babaev VR, Patel MB, Semenkovich CF, et al. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Biol Chem*. 2000; 275(34):26293-9.
 63. Van Eck M, Zimmermann R, Groot PH, et al. Role of macrophage-derived lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(9):E53-62.
 64. Wilson K, Fry GL, Chappell DA, et al. Macrophage-specific expression of human lipoprotein lipase accelerates atherosclerosis in transgenic apolipoprotein e knockout mice but not in C57BL/6 mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21(11):1809-15.
 65. Michaud SE, Renier G. Direct regulatory effect of fatty acids on macrophage lipoprotein lipase: potential role of PPARs. *Diabetes*. 2001; 50(3):660-6.
 66. Kiens B, Lithell H, Mikines KJ, et al. Effects of insulin and exercise on muscle lipoprotein lipase activity in man and its relation to insulin action. *J. Clin. Invest*. 1989; 84(4):1124-9.
 67. Wang L, Chen WZ, Wu MP. Apolipoprotein A-I inhibits chemotaxis, adhesion, activation of THP-1 cells and improves the plasma HDL inflammatory index. *Cytokine*. 2010; 49(2):194-200.
 68. Recalde D, Ostos MA, Badell E, et al. Human apolipoprotein A-IV reduces secretion of proinflammatory cytokines and atherosclerotic effects of a chronic infection mimicked by lipopolysaccharide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24(4):756-61.
 69. Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, et al. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature*. 1991; 353(6341):265-7.
 70. Plump AS, Scott CJ, Breslow JL. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(20):9607-11.

71. Dansky HM, Charlton SA, Barlow CB, et al. Apo A-I inhibits foam cell formation in Apo E-deficient mice after monocyte adherence to endothelium. *J Clin Invest.* 1999; 104(1):31-9.
72. Duverger N, Tremp G, Caillaud JM, et al. Protection against atherogenesis in mice mediated by human apolipoprotein A-IV. *Science.* 1996; 273(5277):966-8.
73. Cohen RD, Castellani LW, Qiao JH, et al. Reduced aortic lesions and elevated high density lipoprotein levels in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A-IV. *J Clin Invest.* 1997; 99(8):1906-16.
74. Kelder B, Boyce K, Kriete A, et al. CIDE-A is expressed in liver of old mice and in type 2 diabetic mouse liver exhibiting steatosis. *Comp Hepatol.* 2007 ;6:4.
75. Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(9):4312-7.
76. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, et al. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem.* 2000; 43(4):527-50.
77. Marion-Letellier R, Butler M, Dechelotte P, et al. Comparison of cytokine modulation by natural peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands with synthetic ligands in intestinal-like Caco-2 cells and human dendritic cells--potential for dietary modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in intestinal inflammation. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87(4):939-48.
78. Ishii H, Horie Y, Ohshima S, et al. Eicosapentaenoic acid ameliorates steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in hepatocyte-specific Pten-deficient mice. *J Hepatol.* 2009; 50(3):562-71.

謝辞

本論文の作成にあたり、格別なる御指導と御助言を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 榎本秀一教授，杉本幸雄准教授，松野研司准教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の発表の機会を与えて頂き、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 波多野力教授に心より御礼申し上げます。

論文の発表にあたり、有益な御指導を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 綿矢有佑特命教授，金恵淑准教授，佐藤聡助教，元助教の平本晃子博士に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行と発表にあたり、格別なる御指導と御助言を賜りました筑波大学大学院人間総合科学研究科 島野仁教授に深く御礼申し上げます。

本研究実施の機会を与えて頂き、研究の遂行にあたり御指導を賜りました持田製薬株式会社 医薬開発本部長 水口清博士，開発研究所所長 今田和則博士，開発研究所 野津起人博士，太田雅彦氏，佐藤歩美氏に心より感謝申し上げます。また，本研究の遂行と発表にあたり，終始厳しくも温かい御指導と御鞭撻を賜りました開発研究所 河野浩之氏，中久木正則博士に心より感謝申し上げます。本研究の遂行に御協力頂き，学位取得に御理解を賜りました開発研究所の皆様心より感謝申し上げます。

最後に，支え続けてくれた家族に感謝します。