

氏名（本籍）	岩崎 有希（群馬県）		
学位の種類	博士（栄養学）		
学位記番号	博甲第 39 号		
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 15 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項 該当 人間栄養学研究科 人間栄養学専攻		
論文題目	エライジン酸による動脈硬化発生機序の解析		
論文審査委員	主査	教授	加納 和孝
	副査	教授	佐々木 弘子
	副査	教授	池本 真二

論文内容の要旨

トランス脂肪酸は、FAO 及び WHO により設置された国際的な政府間機関であるコーデックス委員会で、「少なくとも 1 つ以上のメチレン基で隔てられたトランス型の非共役炭素-炭素二重結合を持つ単価不飽和脂肪酸及び多価不飽和脂肪酸の全ての幾何異性体」とであると定義されている。トランス脂肪酸は、人工的にはニッケルを触媒とした不飽和脂肪酸の工業的水素化で、天然には牛や羊などの反芻動物における生体内での水素化により生じることが知られている。工業的に生産されたトランス脂肪酸の摂取は、疫学研究により動脈硬化症、心血管疾患、糖尿病及びいくつかの癌のリスク増加と関連していることが報告されたが、他方、それを否定する報告がなされた。その様な状況にありながらトランス脂肪酸を含む硬化油が、他の不飽和脂肪酸よりも高い融点を持つため固さの調整ができ、思い通りのテクスチャーを表現しやすいなどの利便性から工業的に盛んに作られるようになり、同時に消費量も増加した。

その後、工業的に生産されたトランス脂肪酸の摂取の増加に伴うリスクとして、心血管疾患、特に冠動脈性心疾患が確定的であると指摘され、現在、欧米では、公的機関が策定するガイドラインにより、トランス脂肪酸摂取は 1 日当たりの総エネルギー摂取量の 1%未満という、上限目標が設定されている。

国内においては、トランス脂肪酸摂取量が総エネルギー摂取量の約 0.3%と低く、そのためあまり問題視されていないが、個人レベルの偏った洋食中心の食事、外食、菓子類の摂取では、摂取エネルギーの 1%を超える場合があり、健康への影響が懸念される。現在までの研究は疫学研究が主流であり、生化学的、細胞学的な解析は多くはなされていない。本研究では、エライジン酸によるアディポネクチン発現抑制作用及びマクロファージの食作用の亢進作用について生化学的見地から検討を行った。

エライジン酸によるアディポネクチン発現抑制作用

アディポネクチンは脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインである。血液中に他のたんぱく質をはるかに凌駕する量が含まれている。抗動脈硬化たんぱく質として知られており、その機能としてマクロファージの血管壁への付着を抑制し、アテローム性動脈硬化を防ぐとされている。しかしながら、これまでにトランス脂肪酸とアディポネクチンの関連性について詳細な研究はなされていなかった。そこで、エライジン酸をヒト乳がん由来 YMB-1-E(YMB)細胞に添加すると、アディポネクチン発現が有意に抑制された。一方、エライジン酸は TNF- α mRNA の発現を増加させた。TNF- α たんぱく質がアディポネクチンの合成を阻害していることが報告されているため、YMB 細胞でも同様のことが起こるか検証する目的で、TNF- α たんぱく質を添加したところアディポネクチン mRNA の発現が強く抑制された。これらの事実は、エライジン酸が TNF- α 発現を誘導しアディポネクチン mRNA 発現を抑えている可能性を示唆している。

さらに、NF- κ B の核への移行を阻害するサリドマイド、TNF- α 分泌阻害剤であるレナリドマイド、細胞の受容体への TNF- α の結合を阻害する可溶性 TNF 受容体エタネルセプトの添加、及び TNF- α siRNA 導入により、エライジン酸によるアディポネクチンの発現抑制は解除された。これらの結果も、アディポネクチン mRNA 発現に対する TNF- α の関与を強く示唆している。

TNF- α 発現を誘導する情報伝達系として、Toll 様受容体 (TLR) 4/NF- κ B 情報伝達経路が知られている。近年、TLR-4 はリポポリサッカライド (LPS) ばかりでなく、ミリスチン酸やパルミチン酸のような飽和脂肪酸によっても活性化されることが報告されている。このことは、インスリン抵抗性をきたす飽和脂肪酸が、TLR-4 シグナルを活性化し慢性炎症を引き起こす可能性を示すと考えられる。そこで、エライジン酸による TNF- α 発現誘導に TLR-4 が関与するか検証する目的で、TLR-4 情報伝達系特異的阻害剤 TAK-242 及び VIPER を用いて実験を行った。TAK-242 及び VIPER の添加でエライジン酸により亢進された TNF- α mRNA 発現は抑制され、アディポネクチン mRNA 発現の回復が認められた。この結果はエライジン酸による TNF- α mRNA 発現の亢進とそれに続くアディポネクチンの発現抑制が TLR-4 を介して行われていることを示すと考えられる。

本研究は、ヒト乳がん由来 YMB 細胞を用いて、エライジン酸が抗動脈硬化たんぱく質アディポネクチンの発現抑制作用を持つこと、さらに、エライジン酸による TNF- α mRNA 発現誘導、及びそれに続くアディポネクチンの発現抑制に TLR-4 情報伝達系が関与していることを初めて示したものである。

エライジン酸によるマクロファージの食作用の亢進作用

2010 年の報告によると、我が国ではトランス脂肪酸摂取が 1 日当たりの総エネルギー摂取量の 1%を超えていた人が、女性の 24.4%、男性の 5.7%でみられ、特に都市部に在住の 30~49 歳の女性に多かった。その要因としては菓子類・洋食などの摂取が多いことが考えられる。国内において若年層の心血管疾患の発症率は増加傾向にあり、トランス脂肪酸多量摂取がその原因

の一つである可能性が示唆されている。

トランス脂肪酸摂取による心血管疾患の発症機序に関しては、未だ不明な点が多い。動脈硬化は、単球由来のマクロファージが血管内皮下へ遊走し、酸化 LDL を取り込んだ泡沫細胞が血管内皮に蓄積することで肥厚化して動脈の弾性が失われ、血管内腔の狭窄が起こる。さらに、たんぱく質分解酵素が放出され、薄くなった繊維性被膜が破綻し、動脈内腔から出血、さらには血小板凝集が起こって血栓・閉塞を引き起こされる。ヒト単球由来 U937 細胞はフォルボールエステル (PMA) 刺激でマクロファージに分化することが知られている。PMA 処理後にエライジン酸、オレイン酸を添加すると細胞は塊状になりディッシュの器底に接着した。エライジン酸添加後、接着細胞数は増加した。同時にマクロファージの指標たんぱく質である CD68、及び分化マーカーでありマトリックスメタロプロテアーゼを誘導する CD147 もエライジン酸添加で増加した。さらに、炎症性サイトカインの TNF- α 発現も増加することを見出した。TNF- α はマクロファージにおいて食作用を亢進するたんぱく質としても知られている。そこで PMA 処理 U937 細胞での脂質蓄積、及び食作用を調べたところいずれもエライジン酸によって亢進していることが示された。オレイン酸ではこのような作用は認められなかった。

本論文における研究は、ヒト乳癌由来 YMB-1-E 細胞及びヒト単球白血病 U937 細胞を用いてエライジン酸が動脈硬化の防御に働くアディポネクチンの発現を抑制し、さらに動脈硬化の発症に重要な役割を果たすとされるマクロファージが活性化されることで、食作用が亢進することを初めて示したものである。エライジン酸は TLR-4/NF- κ B 情報伝達系を活性化することにより、上記 2 つの側面から動脈硬化発症のリスクを高めていると考えられる。

通常、身体の中でエライジン酸 100 μ M の濃度で存在する可能性は殆どないと思われているが、脂肪組織や生体膜への局所的な蓄積による健康障害についての詳細な研究は行われていない。トランス脂肪酸の情報伝達系、濃度、暴露期間についてさらなる研究が必要であると思われる。

博士論文審査の要旨

I. 論文審査の要旨

トランス脂肪酸は、反芻動物における生体内水素化、あるいは不飽和脂肪酸を多く含む植物油の工業的水素添加による硬化油製造の過程で生じる。疫学研究により、硬化油を原料としたマーガリン、ショートニング、ファットスプレッドと、それを用いた菓子類の摂取はトランス脂肪酸の過剰摂取を招き、動脈硬化、心血管疾患、2型糖尿病などのリスクを高めることが報告された。これに基づき FAO/WHO により、トランス脂肪酸摂取は1日当たりの総エネルギー摂取量の1%とするよう勧告がなされている。日本国内におけるトランス脂肪酸の平均摂取量は総エネルギー摂取量の約0.3%と低く、問題視されていない。しかし個人レベルの偏った洋食中心の食事、外食、菓子類の摂取では、摂取エネルギーの1%を超える場合があり、上記の疾患の発症への影響が懸念される。このような状況の中で、トランス脂肪酸と動脈硬化についての研究は現在でも疫学的研究が主流であり生化学的、細胞学的な解析は多くはなされていない。

本論文は、エライジン酸の細胞への障害作用について生化学的な解析を行ったものであり、エライジン酸による抗動脈硬化たんぱく質アディポネクチン発現抑制作用、及びエライジン酸によるマクロファージの食作用の亢進についての研究の2部から構成されている。

エライジン酸によるアディポネクチン発現抑制作用

ヒト乳がん由来 YMB-1-E 細胞において、エライジン酸には、NF- κ B を活性化し、TNF- α mRNA 発現を促進する作用があること、その結果産生された TNF- α が細胞外へ分泌され、近傍あるいは自己の TNF 受容体を介してアディポネクチン発現を抑制することを明らかにした。さらに、TNF- α 産生を誘導する情報伝達系として、TLR-4/NF- κ B 経路が知られていることから、エライジン酸による TNF- α 発現誘導に TLR-4 が関与する可能性を検証した。TLR-4 特異的阻害剤 TAK-242 及び VIPER の添加によりエライジン酸が誘導した TNF- α mRNA 発現は抑制され、アディポネクチン mRNA 発現は回復が認められ、TLR-4 が関与することが明らかとなった。

エライジン酸によるマクロファージの食作用の亢進作用

ヒト単球由来 U937 細胞はフォルボールエステル (PMA) 刺激でマクロファージに分化することが知られている。この際にエライジン酸、あるいはオレイン酸を添加すると細胞は塊状になりディッシュに接着する。PMA 添加では接着している細胞は一層であるが、PMA+エライジン酸またはオレイン酸添加では塊状となり、塊はエライジン酸添加細胞がやや大きく、接着細胞数は増加した。マクロファージの指標たんぱく質である CD68、及びマトリックスメタロプロテアーゼを誘導する CD147、加えて炎症性サイトカイン TNF- α mRNA 発現も、PMA+エライジン酸添加で増加した。さらに、脂質蓄積及び食作用の PMA+エライジン酸による亢進

が認められた。

以上の通り、申請者はエライジン酸が TLR-4/NF- κ B 情報伝達系を介して TNF- α の発現を誘導し、TNF- α 受容体を經由してアディポネクチンの発現を抑制すること、またヒト単球由来 U937 細胞を用いてエライジン酸がマクロファージの活性化に関与することを初めて明らかにした。

本論文はエライジン酸による動脈硬化発症機序の一端を明らかにしたものであり、論文のまとめ方、内容の新規性、実験の進め方と結果の解釈などにおいて博士の水準に十分に達していると判断され、合格と判定された。

II. 諮問の結果の要旨

1月29日の公開試問（研究発表）に続き、申請者に対して、非公開の形で、公開試問の内容についての検証、論文内容に対する理解程度、諮問に対する対応および研究の今後の展望についての最終試問を行った。

公開試問における発表の内容は、イラストを含めてわかりやすく整理されており、いくつかの実験ごとに要約を加えるなどの工夫も見られた。発表はエライジン酸による抗動脈硬化蛋白質アディポネクチン発現抑制作用、及びエライジン酸によるマクロファージの食作用の亢進についての研究の2部から構成され、エライジン酸による動脈硬化の発症に TLR-4 を介して誘導された TNF- α が中心的役割を果たすことが示された。結果については新規性が高く独創的なものであると判断された。

また口頭試問の内容を要約すると以下のとおりである。

1. 今後の研究の方向性、中心とすべき課題についての見解。
2. エライジン酸以外のトランス脂肪酸の障害性についての確認。

これらの試問に対する回答も適切かつ妥当であること、論文の内容をよく理解し、今後の研究方針について明確な指針を有していることも評価された。

以上により試問担当者全員が合格と判断した。