

# 東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Fatty acid desaturase 2 is up regulated by the treatment with statin through geranylgeranyl pyrophosphate dependent Rho kinase pathway in HepG2 cells
別タイトル	HepG2 細胞において、statin はgeranylgeranyl pyrophosphate 依存性 Rho kinase 経路を通してFatty acid desaturase 2 の発現を上昇させる
作成者（著者）	田中, 翔
公開者	東邦大学
発行日	2020.03.15
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨. 17.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：武城英明 / タイトル：Fatty acid desaturase 2 is up regulated by the treatment with statin through geranylgeranyl pyrophosphate dependent Rho kinase pathway in HepG2 cells / 著者：Shou Tanaka, Noriko Ishihara, Sawako Suzuki, Yasuhiro Watanabe, Daiji Nagayama, Takashi Yamaguchi, Masahiro Ohira, Atsuhito Saiki, Tomoaki Tanaka, Ichiro Tatsuno / 掲載誌：Scientific Reports / 巻号・発行年等：9(1):10009, 2019
著者版フラグ	none
報告番号	32661 甲第956号
学位記番号	甲第661号
学位授与年月日	2020.03.15
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	<a href="https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD38479636">https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD38479636</a>

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

田中 翔より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 661 号

学位申請者 : 田 中 翔

学位論文 : Fatty acid desaturase 2 is upregulated by the treatment with statin through geranylgeranyl pyrophosphate-dependent Rho kinase pathway in HepG2 cells

(HepG2 細胞において、statin は geranylgeranyl pyrophosphate 依存性 Rho kinase 経路を通して Fatty acid desaturase 2 の発現を上昇させる)

著 者 : Shou Tanaka, Noriko Ishihara, Sawako Suzuki, Yasuhiro Watanabe, Daiji Nagayama, Takashi Yamaguchi, Masahiro Ohira, Atsuhito Saiki, Tomoaki Tanaka, Ichiro Tatsuno

公表誌 : Scientific reports 9 (1) : 10009, 2019

論文内容の要旨 :

(背景) 昨今、 $\omega$ -3 系多価不飽和脂肪酸の抗動脈硬化作用が注目されているが、スタチンの投与により血液中の  $\omega$ -6 系多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸が増加し、EPA・DHA といった  $\omega$ -3 系多価不飽和脂肪酸が相対的に低下することも報告されており、スタチン投与下の心血管残余リスクに関与している可能性が示唆されている。スタチンは HMG-CoA 還元酵素を阻害することにより、HMG-CoA から先のメバロン酸(MVA)から始まるコレステロール合成経路(メバロン酸カスケード)を停止させ、コレステロールの欠乏状態になった細胞の表面でコレステロール受容体が増加することで血液中のコレステロール低下作用を示す。また、メバロン酸カスケードの中間産物である geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) は Rho kinase 経路を介して、スタチンのプラーク安定化作用などの多面的効果に関与していると言われている。今回我々は、この GGPP が脂肪酸代謝経路に影響を与えていると仮説を立て実験を行った。

(方法) 脂肪酸代謝酵素の発現が確認されている肝細胞 HepG2 細胞を用いて、アトロバスタチン(ATR)が細胞数に与える影響、ならびに脂肪酸代謝酵素である fatty acid desaturase (FADS)1、FADS2 と elongation of very long-chain fatty acid

proteins(ELOVL)5 の mRNA や蛋白発現に及ぼす影響を Quantitative real-time PCR 及び western blotting で調べた。具体的方法としては、HepG2 細胞を day1 に passage し、day0 で各種薬剤(ATR、MVA、GGPP、EPA、DHA、アラキドン酸)を添加、day2 で細胞数や caspase3/7 の測定、realtimePCR、westernblotting を行い、添加した薬剤の影響を調べた。また、GGPP による反応が Rho kinase を介して行われることを証明する目的で用いた Rho kinase 阻害剤 Y-27632 は day1 で添加した。

(結果) HepG2 細胞に ATR を濃度別(12.5 $\mu$ M、25 $\mu$ M、50 $\mu$ M、100 $\mu$ M)で添加したところ、細胞数は濃度依存的に低下し、caspase3/7 は濃度依存的に上昇した。この結果より、細胞数の減少は HepG2 細胞のアポトーシスによるものと考えられ、これらの細胞障害性は ATR の濃度依存的に上昇することが判明した。また、このアポトーシスは MVA の添加によって改善した。一方、FADS1、FADS2、ELOVL5 の mRNA は ATR の添加により低濃度(12.5 $\mu$ M、25 $\mu$ M)では濃度依存的に増加する傾向を示したが、高濃度(50 $\mu$ M、100 $\mu$ M)では細胞障害性が強いことが影響してか、増加を認めなかった。ATR 添加濃度を 25 $\mu$ M として、メバロン酸カスケードの中間産物を同時に添加した実験では、アポトーシスや FADS2 の mRNA 上昇は MVA 及び GGPP の添加によって抑制された。また、ATR と MVA の同時添加により低下した FADS2 の mRNA は Y-27632 の添加により再度上昇を認めた。このことより、これらの反応は Rho kinase を介して行われていることが判明した。これらの反応における FADS2 の蛋白発現も western blotting により mRNA の増減と同様であることが確認された。また、ATR により上昇した FADS2 の mRNA は、 $\omega$ -3 系脂肪酸である EPA、DHA そのものを添加することにより優位に抑制されたが、 $\omega$ -6 系脂肪酸であるアラキドン酸を添加した場合は抑制されなかった。

(結論)以上より、HepG2 細胞でスタチンはメバロン酸カスケードを阻害し、GGPP の生成を低下させ、Rho kinase 経路を抑制して、FADS2 を含む脂肪酸代謝酵素を上昇させることで内因性多価不飽和脂肪酸代謝に影響を及ぼすことが分かった。また、スタチンによる FADS2 の上昇は、EPA と DHA 添加により抑制されることが明らかになった。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 661 号	氏 名	田 中 翔
学位審査担当者	主 査	武 城 英 明
	副 査	盛 田 俊 介
	副 査	弘 世 貴 久
	副 査	内 藤 篤 彦
	副 査	杉 山 篤

学位論文の審査結果の要旨 :

多価不飽和脂肪酸 (LCPUFAs) は脳の形成や認知、情動、生殖、炎症や恒常性など多くの生体機能に重要な役割を有している。ω-6 系 LCPUFAs であるアラキドン酸 (AA) は血管機能の脂質モジュレーターとして動脈硬化の進展に関わる。一方、疫学研究から、ω-3 系 LCPUFAs である eicosapentaenoic acid (EPA) と docosahexaenoic acid (DHA) の抗動脈硬化作用が明らかになり、EPA/AA は心血管病リスクマーカーとなっている。冠動脈疾患予防における薬剤スタチンは、動脈硬化のリスクである LDL-コレステロールを低下させる一方で、血中 AA 濃度を上昇、ω-3 系 LCPUFA 濃度を低下させる。本研究は、スタチンが影響を与えるメバロン酸経路を介して LCPUFAs 合成を制御するという仮説を立て、培養肝細胞を用いて LCPUFAs の合成過程の酵素である、fatty acid desaturase (FADS) と elongation of very-long chain fatty acids protein (Elovl) のスタチンによる制御を検討した。HepG2 の細胞数は添加した atorvastatin (ATR) の濃度 (12.5 - 100 μM) に依存し低下した。caspase3/7 活性が上昇していたことから細胞数の減少はアポトーシスによると考えられ、mevalonate (MVA) の添加で改善した。FADS1、FADS2、Elovl mRNA は ATR (12.5 および 25 μM) により増加し、MVA やその中間産物である GGPP を添加するとアポトーシスや FADS2 mRNA 上昇は抑制された。ATR と MVA の同時添加による FADS2 mRNA の低下は Y-27632 を添加すると回復したことから Rho kinase を介していると考えられた。FADS2 の蛋白発現も mRNA の増減と同様だった。ATR による FADS2 mRNA の増加は EPA や DHA で抑制されたが、アラキドン酸では抑制されなかった。以上より、培養肝細胞でスタチンはメバロン酸カスケードを阻害し FADS2 を含む脂肪酸代謝酵素を上昇させることが示された。また、スタチンによる FADS2 の上昇は、EPA と DHA 添加により抑制されることが明らかになった。

2020 年 1 月 28 日の学位審査会では、本研究の背景、実験条件、とりわけ濃度の選定、遺伝子発現変化の解釈、動脈硬化への関わり、臨床への応用など詳細な質疑が行われた。申請者は、一つ一つの質問に対して的確に答え結果の意義を考察した。本研究により明らかになったスタチンによる脂肪酸代謝酵素への作用とその経路の解明は、動脈硬化治療の新たな考え方や創薬に貢献し、たいへん意義のある研究と評価された。以上より、本研究は、糖尿病代謝内分泌学分野において重要で新規な知見をもたらす十分に学位に値するものと判断された。