



Title	Eicosapentaenoic Acid Protects Endothelial Cells Against Anoikis Through Restoration of cFLIP
Author(s)	鈴木, 隆志
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45350">https://hdl.handle.net/11094/45350</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名 鈴木 隆志  
 博士の専攻分野の名称 博士(医学)  
 学位記番号 第18186号  
 学位授与年月日 平成15年10月28日  
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
 医学系研究科生体制御医学専攻  
 学位論文名 Eicosapentaenoic Acid Protects Endothelial Cells Against Anoikis Through Restoration of cFLIP  
 (内皮細胞におけるエイコサペンタエン酸のcFLIPを介した抗アポトーシス作用)  
 論文審査委員 (主査)  
 教授 萩原 俊男  
 (副査)  
 教授 辻本 賀英 教授 長田 重一

## 論文内容の要旨

## [目的]

$\omega 3$ 系多価不飽和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、心血管保護作用を持つことが既に知られている。しかし、その正確な機序はまだ明らかにされてはいない。酸化ストレスや炎症性サイトカインなどの動脈硬化促進因子は、血管内皮細胞にアポトーシス誘導すること、その結果発生する血管内皮細胞の脱落が、動脈硬化を進行させていることが知られている。本実験は、EPAが血管内皮細胞をアポトーシスから保護しうるかどうかについて、また、生存シグナルとして知られているAktを介するシグナル伝達経路がその機構に関与しているかどうかについて検討した。

## [方法]

1. 細胞培養：実験にはヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた。接着の消失による細胞死(anoikis)はプラスチックチューブを用いた浮遊培養下で検討した。2. 蛋白発現量の確認：ウエスタン・プロット法を用いて、FLICE-inhibitory protein(cFLIP)やリン酸化Aktのタンパクの発現を確認した。また、デンシトメーターを用いての発現量の定量を行った。3. アポトーシスの測定：Annexin Vとpropidium iodideでラベルした細胞を用い、フローサイトメーター法によりアポトーシスを定量的に測定した。4. 遺伝子導入：アデノウイルスを用いてAkt、cFLIPを導入した強制発現系による実験を行った。

## [成績]

EPAは、無血清刺激により低下した抗アポトーシス蛋白cFLIPの発現を回復させた。このEPAによるcFLIPの発現増加作用は、PI3キナーゼの阻害薬であるwortmanninによって一部抑制された。また、EPAは実際にPI3キナーゼの下流シグナルであるAktの活性化を誘導した。さらに、アデノウイルスを用いてAkt遺伝子を導入するとcFLIPの発現が誘導された。このことから、EPAによるcFLIPの発現誘導にはAktの活性化が一部関与すると考えられた。EPAは、無血清刺激によって誘導される血管内皮細胞のアポトーシスを抑制したが、接着の消失によって誘

導される細胞死 *anoikis* も抑制した。これに対して、Akt を活性化する IGF-1 では *anoikis* 抑制作作用が認められなかった。IGF-1 は細胞接着下では Akt の活性化を誘導し、cFLIP の発現を促進したが、浮遊培養下においてはこれらの作用が消失した。これに対して、EPA は Akt の活性化を誘導しなかったが、cFLIP の発現を促進した。さらに、アデノウイルスを用いて cFLIP を強制発現させた血管内皮細胞においては、*anoikis* の抑制が確認された。次に、EPA によるアポトーシス抑制作用を、ラットより採取した下大動脈を用いた *ex vivo* の系で検討した。無血清刺激により誘導された血管内皮細胞のアポトーシス、及び血管内皮細胞の脱落が、EPA によって抑制されることが確認された。

#### 〔総括〕

EPA は、cFLIP の発現を Akt 依存性及び非依存性に促進することで血管内皮細胞のアポトーシスを抑制し、抗動脈硬化作用を発揮する可能性があると考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

血管内皮細胞の生存を保つことは、動脈硬化を抑制する上で非常に重要である。血管内皮細胞のアポトーシスを介した内皮機能の低下は、動脈硬化を促進し、心血管イベントの発生を引き起こす原因になる可能性がある。エイコサペンタエン酸 (EPA) は抗動脈硬化作用および心血管イベント抑制作用を有することが知られているが、その作用機序は不明である。本研究は、EPA が、アポトーシスを抑制する内因性の Caspase inhibitor として作用する FLIP (FLICE-inhibitory protein) の発現を回復することで、内皮細胞の生存を促進することを初めて明らかにした。すなわち、EPA は、ヒト臍帯静脈内皮細胞において、無血清培養下で低下する FLIP の発現レベルを回復すること、接着の喪失によって誘導されるアポトーシス (*Anoikis*) を EPA の前処置は抑制すること、また、EPA がアポトーシスを抑制する生存シグナルである Akt の活性化を誘導することを明らかにした。また、Akt の上流である PI3 キナーゼを活性化する Insulin like growth factor-1 (IGF-1) の刺激においても、同様の FLIP 発現レベルの回復作用と *Anoikis* の抑制作用が確認されたが、興味深いことに、既に非接着状態にある内皮細胞においては、EPA は Akt の活性化を介さずに FLIP の発現レベルを亢進し、*Anoikis* を抑制した。この効果は IGF-1 では見られなかった。以上の結果は、EPA が Akt 依存性および非依存性に FLIP の発現を亢進することで、血管内皮細胞の生存を促進することを初めて示すものであり、EPA の持つ抗動脈効果作用機序の理解において新たな知見を提示しており、学位に値するものと認める。