



# Administration of high dose eicosapentaenoic acid enhances anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein in Japanese patients with dyslipidemia

Tanaka, Nobuaki

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6545号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006545>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



## 学 位 論 文 の 内 容 要 旨

### Administration of high dose eicosapentaenoic acid enhances anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein in Japanese patients with dyslipidemia

日本人脂質異常症患者において、高用量のエICOSAPENTAENOIC酸の内服投与は高比重  
リポ蛋白 (HDL) の抗炎症効果を増強する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
循環器内科学  
(指導教員：平田健一教授)

田中 伸明

#### 【背景】

多くの疫学研究において、魚油の摂取量は、冠動脈疾患の罹患率および死亡率と反比例することが報告されている。魚油の主要成分は、エイコサペンタエン酸 (EPA)やドコサヘキサエン酸 (DHA)に代表される n-3 系多価不飽和脂肪酸(PUFA)であり、様々な心血管保護作用もつことが報告されている。n-3 PUFA は、低比重リポ蛋白コレステロール (LDL-C)を減らす作用は軽微であるが、peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR  $\alpha$ ) を刺激し、sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1)を阻害することによって中性脂肪(TG)や、非高比重リポ蛋白コレステロール(non-HDL)を減少させる。日本人の脂質異常症患者を対象にした JELIS 試験では、高容量 EPA 製剤を内服することで冠動脈イベントの発症が有意に減少し、特に冠動脈疾患の 2 次予防患者や複数の冠動脈危険因子を持つ患者において EPA の有益性が顕著であった。このような冠動脈イベントの抑制効果は、LDL-C 値の低下とは直接関係なく、その機序については明らかでない。

HDL は、末梢組織から余剰コレステロールを引き抜き、肝臓に転送し異化するというコレステロール逆転送系の主役を担うリポ蛋白である。また、血管内皮細胞における炎症性接着分子の発現抑制や、動脈壁における炎症性サイトカインの産生や炎症細胞の集積の阻害、一酸化窒素合成の活性化による血管内皮保護、酸化物質の加水分解などの多彩な抗炎症・抗酸化作用を介して心血管保護効果を有している。

しかし、最近の知見では、HDL 粒子は炎症や酸化ストレスによって化学的な修飾・構造変化を受けやすく、その抗動脈硬化作用が減弱または消失することが報告されている。このような機能不全に陥った HDL の抗炎症作用を回復させるような方法は解明されていない。本研究の目的は、冠動脈危険因子をもつ患者群において、EPA が HDL 機能に及ぼす効果を評価検討することである。

#### 【方法、結果】

2011～2012 年に、神戸大学医学部附属病院に通院中の脂質異常症の患者(28 人)に対して、EPA (Epadel-S900®カプセル; 持田製薬)を 1800mg/日、4 週間内服継続し、内服開始前と内服 4 週間後に空腹時採血を行った。血清は遠心法によって分離し、血清中の総コレステロール(T-Chol)、TG、HDL-C 値は、従来の検査方法で測定した。LDL-C 値は Friedewald 式で計算した。血清 EPA およびアラキドン酸(AA)濃度はガスクロマトグラフイーによって測定した。

#### 【結果】

脂質異常症患者に対する EPA 投与によって、TG、LDL-C、HDL-C、アポリポ蛋白などの血清脂質プロファイルは、有意な量的変化を認めなかったが、血清中の EPA 濃度や EPA/AA 比は有意に上昇が認められた。HDL 分画中の EPA/AA 比は、血清中 EPA/AA 比と極めて強く相関しており、EPA は HDL 粒子中の主要な構成成分であるリン脂質に取り込

まれていることが示された。

HDL 粒子には様々な機能的蛋白が含まれているが、その中で paraoxonase1 (PON1)は HDL の抗酸化作用の中心を担う蛋白である。EPA 内服によって HDL 関連 PON1 活性は有意に上昇した。また、抗酸化能を有するスタチンを内服している患者群においても、EPA 内服は HDL 関連 PON1 活性を上昇させたことから、スタチンに EPA を追加投与することは、抗酸化能のさらなる改善に寄与できる可能性が示唆された。

HDL は血管内皮細胞の増殖や遊走を促進する作用があるが、冠動脈疾患患者の HDL は血管内皮修復能が低下していることが報告されている。そこで、ヒト臍帯静脈内皮細胞を培養チップで傷をつけた間隙の修復過程における HDL の作用を検討したところ、EPA 投与後の HDL(EPA-rich HDL)は、EPA 治療前の HDL と比べて有意に細胞遊走能を改善した。

次に、HDL の主要な機能であるコレステロール引き抜き能に関して評価を行った。ヒト単球系 THP-1 細胞をマクロファージへ分化誘導させ、トリチウム標識コレステロールで泡沫化させた後、EPA 投与前後の HDL と培養し、培養液中のトリチウムをカウントすることによりコレステロールの引き抜き量を評価した。その結果、EPA-rich HDL で有意にコレステロール引き抜きが增強するとともに、血清 EPA/AA 比と HDL のコレステロール引き抜き能が正相関する傾向が認められた。

血管内皮への単球の接着と浸潤は血管の炎症の発端となるが、HDL は VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1))などの接着因子の発現抑制を介して単球の血管内皮への結合を阻害する。そこで、ヒト臍帯静脈内皮細胞を EPA 投与前後 HDL の存在下で Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )で刺激し、VCAM-1 の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で評価した。EPA-rich HDL は、EPA 投与前 HDL と比べて有意に VCAM-1 の発現を抑制し、血清 EPA/AA 比と VCAM-1 発現抑制効果は有意な相関を示した。すなわち、HDL 粒子中の EPA の含有量が、HDL が抗炎症効果の重要な制御因子であることが明らかとなった。

#### 【考察】

本研究では、冠動脈危険因子を有する患者群において、EPA の投与が HDL の抗動脈硬化作用を增強できるかを検討した。4 週間の EPA 経口投与によって生成された EPA-rich HDL は、EPA 治療前 HDL に比べて抗酸化酵素 PON1 の活性を高め、血管内皮の修復能やマクロファージからのコレステロール引き抜き能を促進し、血管内皮における VCAM-1 の発現を抑制することが証明された。つまり EPA の内服投与は、量的には血清脂質に影響しないものの、HDL の抗動脈硬化作用を改善することが示された。

既報では、心血管疾患患者において血漿 PON1 活性が有意に減少しており、PON1 活性が低いと心血管疾患の罹患率が高まることが報告されている。したがって、EPA の内服で HDL の抗酸化能が改善されることは治療的に意義深いものと考えられる。

血管内皮遊走能は、障害された血管内皮の修復や血管新生に重要な役割を担っている。

本研究では、EPA-rich HDL が顕著に血管内皮細胞の遊走能を改善させた。心血管危険因子を持つ患者の HDL は血管内皮遊走能が低下していると報告される中、EPA 内服治療により血管内皮遊走能が改善することは、血管内皮障害の予防や血管内皮の機能回復に貢献できることを示唆している。

これまでコレステロール引き抜きにおける n-3 PUFA の効果には議論の余地があった。すなわち、既報において、マクロファージを直接 EPA で刺激すると ATP-Binding Cassette sub-family A, member 1(ABCA1)依存性のコレステロール引き抜きが減少したと報告されている。本研究では、EPA で細胞を刺激するのではなく、HDL のコレステロール引き抜き能を直接評価することによって、EPA-rich HDL ではコレステロール引き抜き作用が增強することを証明した。その機序として、EPA-rich HDL において増加した HDL 関連 PON1 が ABCA1 発現を增強したり、アポ A-1 が Scavenger receptor-class B1 (SR-B1)を活性化することによりコレステロール引き抜きを增強した可能性が推察される。さらに、一般的に PUFA はコレステロール引き抜きと HDL の成熟を促進する Lectin-cholesterol acyltransferase (LCAT)を活性化することが報告されていることから、EPA-rich HDL が LCAT 活性化によってコレステロールの引き抜きを促進させた可能性もある。詳細な分子機序についてはさらなる検討が必要と考える。

メタボリックシンドローム患者に対して EPA を投与することで血漿中の可溶性 VCAM-1 濃度が有意に減少することが報告されている。HDL は sphingosine-1-phosphate (S1P)受容体である S1P1/S1P3 を介して接着分子の発現を抑制する。HDL 中のリン脂質は HDL の抗炎症能を制御し、とくに HDL リン脂質における不飽和脂肪酸の増加が VCAM-1 の抑制に関与するという報告もある。このような知見は、本研究における EPA-rich HDL による VCAM-1 発現の抑制作用と合致するものであり、その機序の一因である可能性がある。

JELIS 試験では、脂質異常症患者において低用量スタチンに高用量 EPA(1800mg/日)を追加することにより、約 20%心血管イベントが減少したが、欧米の低用量 n-3 PUFA 製剤を用いた大規模臨床試験では必ずしもイベント抑制効果が得られていない。MARINE and ANCHOR 研究では EPA の抗炎症効果は用量依存性であると報告されていることを考えると、本研究では、高用量で高純度の EPA を使用したことが有効な結果に結び付いたと考えられる。

#### 【結語】

高用量の EPA を経口内服することで、HDL の抗酸化能、抗炎症能、内皮保護作用、マクロファージからのコレステロール引き抜き能が增強した。以上より、冠動脈危険因子をもつ患者群において、高用量 EPA を内服投与により、機能不全 HDL を機能的な HDL へ改善できることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2572号	氏 名	田中 伸明
論文題目 Title of Dissertation	Administration of high dose eicosapentaenoic acid enhances anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein in Japanese patients with dyslipidemia 日本人脂質異常症患者において、高用量のエICOSAPENTAENOIC 酸の内服投与は高比重リポ蛋白（HDL）の抗炎症効果を増強する		
審査委員 Examiner	主 査 小川 浩 Chief Examiner 副 査 栗 健 Vice-examiner 副 査 平井 みどり Vice-examiner		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

魚油の主要成分であるエイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）は、代表的な n-3 系多価不飽和脂肪酸（PUFA）であり、様々な心血管保護作用もつことが報告されている。日本人の脂質異常症患者を対象にした JELIS 試験では、高容量 EPA 製剤を内服することで冠動脈イベントの発症が有意に減少したが、冠動脈イベントの抑制効果は、LDL コレステロール値の低下とは直接関係なく、その機序については明らかでない。HDL コレステロールは、多彩な抗炎症・抗酸化作用を介して心血管保護効果を発揮すると考えられているが、機能不全に陥った HDL コレステロールの抗炎症作用を回復させるような方法は解明されていない。本研究は、冠動脈危険因子をもつ患者群において、EPA が HDL コレステロール機能に及ぼす効果を評価することを目的として行われた。

研究は 2011～2012 年に、神戸大学医学部附属病院に通院中の脂質異常症の患者（28 人）に対して、EPA を 1800mg/日、4 週間内服継続し、内服開始前と内服 4 週間後に空腹時に採血を行い、各種の脂質パラメーターを測定するとともに、HDL を分画し、その機能を ex vivo で検討したものである。血清は遠心法によって分離し、血清中の総コレステロール、TG、HDL コレステロール値は、従来の検査方法で測定した。血清 EPA およびアラキドン酸（AA）濃度はガスクロマトグラフィー法によって測定された。

EPA 投与を行っても TG、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、アポリポ蛋白などの血清脂質プロファイルは、有意な変化がなかったが、血清中の EPA 濃度や EPA/AA 比は上昇した。また、HDL 分画中の EPA/AA 比は、血清中 EPA/AA 比と強く相関しており、EPA は HDL 粒子中の主要な構成成分であるリン脂質に取り込まれていることが示された。

Paraoxonase1 (PON1) は HDL の抗酸化作用の中心を担う蛋白であるが、EPA 内服によって HDL 関連 PON1 活性は有意に上昇することが明らかとなった。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞を培養チップで傷をつけた間隙の修復過程を検討することにより、HDL の血管内皮修復能を検討したところ、EPA 投与後の HDL (EPA-rich HDL) は、EPA 治療前の HDL と比べて有意に細胞遊走能を改善することが示された。

また、HDL の主要な機能であるコレステロール引き抜き能に関しても評価が行われた。ヒト単球系 THP-1 細胞をマクロファージへ分化誘導させ、トリチウム標識コレステロールで泡沫化させた後、EPA 投与前後の HDL と培養し、培養液中のトリチウムをカウントすることによりコレステロールの引き抜き量を評価した結果、EPA-rich HDL では有意にコレステロール引き抜きが増強するとともに、血清 EPA/AA 比と HDL のコレステロール引き抜き能が正相関する傾向が示された。

血管内皮への単球の接着と浸潤は血管の炎症の発端となるが、HDL は VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) などの接着因子の発現抑制を介して単球の血管内皮への結合を阻害することが知られている。そこで、本研究では脈内皮細胞を EPA 投与前後 HDL の存在下で Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) で刺激し、VCAM-1 の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で評価した。その結果、EPA-rich HDL は、EPA 投与前 HDL と比べて有意に VCAM-1 の発現を抑制し、血清 EPA/AA 比と VCAM-1 発現抑制効果は有意な相関を示すことが明らかとなった。

本研究は従来ほとんど知られていなかった EPA が HDL 機能に及ぼす影響について検討し、HDL 粒子中の EPA の含有量と HDL の有する抗炎症作用・抗動脈硬化作用に関して、重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を取る資格があると認める。