

肝臓脂質蓄積に対する魚油の作用に関する研究

平子 哲史

目次

緒論.....	2
第1章 高コレステロール食による肝臓脂質蓄積を抑制する魚油の作用.....	5
第1節 体重、体組成、血漿および肝臓脂質レベル.....	7
第2節 肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現.....	10
第3節 小括および考察.....	12
第2章 高コレステロール食による肝臓脂質蓄積を抑制する低用量魚油の作用.....	15
第1節 体重、体組成、血漿および肝臓脂質レベル.....	17
第2節 肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現.....	20
第3節 小腸における脂質代謝関連遺伝子発現および糞中へのコレステロール排泄.....	21
第4節 小括および考察.....	23
第3章 肝臓脂質代謝および生体内での酸化ストレスにおける魚油摂取の影響.....	25
第1節 体重、体組成、血漿および肝臓脂質レベル.....	27
第2節 肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現.....	29
第3節 体内酸化ストレス度.....	30
第4節 小括および考察.....	31
総括.....	34

謝 辞.....	36
実験の部	37
引用文献	42

本論文で使用した略語一覧

ABC; ATP-binding cassette
ACC; acetyl-CoA carboxylase
AOX; acyl CoA oxidase
CAT; catalase
CH; cholesterol
CPT; carnitine palmitoyltransferase
CYP7A1; cholesterol 7 α -hydroxylase
CYP8B1; cholesterol 12 α -hydroxylase
DHA; docosahexaenoic acid
d-ROM; determinable-reactive oxygen metabolites
EPA; eicosapentaenoic acid
FAS; fatty acid synthase
FO; fish oil
H&E; hematoxylin and eosin
HDL; high-density lipoprotein
HMG-CoA; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
Insig; insulin-induced gene
LDL; low-density lipoprotein
LXR; liver X receptor
LXRE; LXR response element
NAFLD; non-alcoholic fatty liver disease
NASH; non-alcoholic steatohepatitis
NPC1L1; Niemann-Pick C1-like 1
PPAR; peroxisome proliferator activated receptor
RXR; retinoid X receptor
SCAP; SREBP cleavage-activating protein
SCD; stearoyl-CoA desaturase
SO; safflower oil
SOD; superoxide dismutase
SRE; sterol regulatory element
SREBP; sterol-regulatory element binding protein
S1P; site-1 protease
S2P; site-2 protease

TBARS; thiobarbituric acid reactive substances

UCP; uncoupling protein

緒 論

コレステロールは、細胞膜構成成分のひとつであり、胆汁酸、ステロイドホルモンを合成する材料となるなど、生体内において重要な役割を担っている。しかし、コレステロールを過剰に摂取するとその有害作用（食毒性）が現れ、血中の低密度リポタンパク質（LDL）コレステロール濃度を上昇させる。高 LDL コレステロール血症は虚血性心疾患や脳血管疾患などの粥状動脈硬化疾患の発症に密接に関わっていることが良く知られており^{1,2)}、日本人においてもそれら疾患の危険因子となることが明らかにされている³⁾。そして、心疾患と脳血管疾患を併せると日本人の死亡原因の約3分の1を占めている（厚生労働省 平成21年人口動態統計）。一方、高密度リポタンパク質（HDL）コレステロール値は、虚血性心疾患と逆相関することが知られている^{4,5)}。つまり、虚血性心疾患の予防には、血中 LDL コレステロールの減少および HDL コレステロールの増加が重要である。

体内で合成されるコレステロールの多くは、肝臓においてアセチル-CoA から合成され⁶⁻⁹⁾、最終的には胆汁中のコレステロールあるいは、胆汁酸塩として体外へ排出される¹⁰⁾。食事から摂取したコレステロールと植物ステロール、ならびに胆汁中に排泄されたコレステロールは、小腸上皮細胞の刷子縁に存在する Niemann-Pick C1 like-1 (NPC1L1) タンパク質によって上皮細胞内へ取り込まれる¹¹⁻¹⁵⁾。取り込まれたコレステロールは、カイロミクロンとしてリンパ管へ放出される一方で、その一部は、植物ステロールと同様に ATP-binding cassette (ABC) transporter のヘテロダイマー-G5/8 により小腸上皮細胞から小腸内腔へ汲み出され、糞便中へ排泄されると考えられている^{16,17)}。

コレステロールの22位または24位に水酸基が導入されたオキシステロールは、核内受容体である liver X receptor (LXR) α のリガンドとして作用していることが知られている¹⁸⁻²⁰⁾。LXR α は、retinoid X receptor (RXR) とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子のプロモーターに存在する LXR response elements (LXRE) に結合して転写を制御する。LXR の標的遺伝子には、cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1)、ABCA1、ABCG1、sterol regulatory element-binding protein (SREBP) -1c などが知られており、コレステロール代謝に深く関わっている²¹⁻²⁸⁾。

一方、n-3 系多価不飽和脂肪酸である eicosapentaenoic acid (EPA) や docosahexaenoic acid (DHA) を多く含んでいる魚油の摂取が心血管疾患の発症を抑制することが明らかになったのは、1970年代に Dyerberg らが行ったグリーンランドエスキモーを対象とした調査に始まる²⁹⁾。魚を多く摂取するグリーンランドエスキモーはデンマーク人に比べて冠動脈疾患の罹患率がきわめて低く、その原因として n-3 系多価不飽和脂肪酸の関与が考えられた^{30,31)}。その後も多くの疫学データによって、魚油が心血管疾患の発症予防に有効であることが明らかにされてきた³²⁻³⁵⁾。魚油は、血中トリグリセリド濃度を減少させることにより、心血管疾患の発症予防に効果的であることが報告されている³⁶⁾。さらに、このような魚油の作用は、おもに肝臓における脂肪酸合成の抑制と脂肪酸酸化の亢進が組み合わさって生じること

が示されている³⁶⁻⁴⁴。自身の発現が細胞内コレステロールで制御されている転写因子である SREBPs は、細胞内コレステロール量を制御し、さらに脂肪酸合成系に関わる遺伝子の発現制御に関与している⁴⁵⁻⁴⁹。具体的には、SREBPs は SREBP cleavage-activating protein (SCAP)と複合体を形成し、小胞体膜上でヘアピン構造をとり局在する。細胞内コレステロール量が低下すると、SCAP と膜結合型の前駆体 SREBP の複合体が、ゴルジ体へ移行し site-1 protease(S1P)と site-2 protease (S2P)による二段階の切断を受け、活性型 SREBP となる。この活性型は、核内へ移行し、遺伝子のプロモーターにある sterol regulatory elements (SREs)に結合して、転写を促進する⁵⁰⁻⁵²。SREBPs には、-1a、-1c、-2 の 3 つのアイソフォームがあり、SREBP-1a、-1c はおもに fatty acid synthase (FAS)、acetyl-CoA carboxylase (ACC)、stearoyl-CoA desaturase (SCD)など脂肪酸合成系遺伝子の転写を活性化し、SREBP-2 はおもに HMG-CoA 還元酵素、HMG-CoA 合成酵素、LDL 受容体などのコレステロール合成系遺伝子の転写を活性化することが報告されている^{49,51,52}。

これまでの多くの研究から、魚油摂取が肝臓での SREBPs、FAS、ACC、SCD などの遺伝子発現を減少させることにより脂肪酸合成を抑制すること、また、peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) α 活性化を介し、carnitine palmitoyltransferase (CPT) -1、acyl CoA oxidase (AOX)、acetyl CoA synthetase (ACS)、uncoupling protein (UCP) -2 などの遺伝子発現を増加させ、脂肪酸酸化の誘導を引き起こすことが報告されている⁵³⁻⁵⁸。さらに、それら生理活性は魚油中の EPA および DHA によるものであることが解明されている^{59,60}。

コレステロールを過剰に摂取させると肝臓にトリグリセリドとコレステロールが蓄積することが示唆されているが^{22,61}、これまでの高コレステロール食を用いた実験の多くが、高コレステロール血症と動脈硬化病変の誘発を目的とした研究で、肝臓への脂質蓄積は注目されなかった^{62,63}。しかし、我々は高コレステロール食によるこのような肝臓への脂質蓄積をその食毒性として着目した。肝臓に多量の脂肪が蓄積した状態は、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の症候のひとつであり、心血管疾患や糖尿病の発症と密接に関わっている⁶⁵⁻⁶⁷。NAFLD は進行することの少ない単純脂肪肝の状態であるが、そこに酸化ストレスや炎症性サイトカインの刺激が加わると、肝細胞は変性、壊死に陥り非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) が生じる。NASH は進行性であり、治療が行われなければ肝細胞の変性や炎症性細胞の浸潤が持続し、繊維化が生じて、肝硬変にまで進展する。NAFLD のおもな病因はインスリン抵抗性で、肥満や糖尿病を基盤に発症するが、肥満を伴わない NAFLD も多く存在する^{68,69}。このような、非肥満脂肪肝の症例では、肥満が存在する脂肪肝の症例よりも、さらに過剰のコレステロールを摂取していることが報告されている⁶⁸。我が国では肥満人口の急増を受けて、NAFLD の頻度は、成人 10~30%となった⁷⁰。また、NASH は NAFLD の約 10%でみられる。つまり、脂肪肝を予防することは、糖尿病や他のメタボリックシンドロームの改善にとって有効である。一方、魚油には前述のように、肝臓での脂質代謝を改善する作用があり、これまでの研究でも、魚油摂取により肝臓への脂質蓄積が抑制されること

が報告されている⁷⁰⁻⁷⁴⁾。すなわち魚油を摂取することで脂肪肝の予防や改善効果が期待できる。そこで、本研究では単純脂肪肝である NAFLD の初期病態モデルとして、高コレステロール食を与えたマウスを位置づけ、魚油の予防効果について検討を試みることにした。

以上のような背景から、魚油とコレステロールを同時に摂取することは、脂質代謝に相反する影響を与えると考え、第 1 章では、魚油のエネルギー比率を 20%あるいは 50%とし、高コレステロール食による肝臓脂質蓄積に対する魚油の作用について、肝臓における脂質代謝を中心に脂質代謝関連遺伝子の発現を含め検討した。

現在日本人が食事から摂取している魚油の割合は、脂肪エネルギー比率のおよそ 10% (総エネルギーの約 2.5%) である。我々の研究を含め、これまで魚油の生理作用について検討した研究の多くは、食餌中の魚油の割合が高く、脂肪エネルギー比率で 20~50%に設定されている^{73,74)}。しかし、魚油の有効性をヒトの健康づくりに応用するためには、実験動物モデルを用いた検討においても食餌中の魚油をヒトの摂取量に近づけることは非常に重要である。また、食餌中のコレステロールは小腸上皮細胞に存在する NPC1L1 によって吸収され、上皮細胞内へ取り込まれるが、最近、魚油摂取によりこのタンパク質発現の減少に伴いコレステロール吸収が減少することが報告された⁷⁵⁾。これは、魚油摂取によって肝臓でのみならず小腸での脂質代謝を改善していることを示す結果である。しかし、この研究でも魚油の割合は高く、脂肪エネルギー比率でおよそ 30%であった。そこで第 2 章では、食餌中の魚油のエネルギー比率を 2%あるいは 5%と設定し、コレステロール負荷による肝臓脂質蓄積に対する低用量の魚油が肝臓および小腸における脂質代謝に与える影響について検討した。

魚油の脂質代謝を改善する作用については数多く報告されているが、魚油に含有される EPA や DHA などの多価不飽和脂肪酸は化学構造上非常に酸化しやすく、過酸化脂質やフリーラジカルを生成しやすいために健康への悪影響が危惧されている⁷⁶⁾。その一方で、魚油の摂取レベルによっては、これらの生成が増加しないという報告もある⁷⁷⁻⁷⁹⁾。第 3 章では、食餌中の魚油のエネルギー比率を 1%、2%、20%と設定し、高コレステロール食による肝臓脂質蓄積に対する魚油の脂質代謝に与える影響とともに、食毒性の視点から酸化ストレスに及ぼす影響について検討した。

第1章 高コレステロール食による肝臓脂質蓄積を抑制する魚油の作用

我々はまず、8週齢 C57BL/6J 雌マウスを用い、魚油(FO)とコレステロール(CH)を同時に摂取させ脂質代謝に及ぼす影響を検討した。2% (w/w)コレステロールを添加した脂肪エネルギー比率 50%の魚油飼料で、2週間飼育した。また、対照として、脂肪エネルギー比率 20%のサフラワー油(SO)を脂質源とした群を設けた。その結果、サフラワー油にコレステロールを負荷した場合には、肝臓中の総コレステロール値およびトリグリセリド値は非常に高い値を示した。しかし、魚油とともにコレステロールを負荷した場合には、肝臓中の総コレステロール値およびトリグリセリド値の大きな増加は見られなかった。肝臓 SREBP-1c 発現もサフラワー群と比較し、魚油群で減少傾向があり、FAS、SCD-1、HMG-CoA 還元酵素 mRNA 発現も同様にコレステロールの有無に関わらず、魚油摂取により減少する傾向を示した。

そこで本章では、さらに詳細に高コレステロール摂取時における魚油の脂質代謝へ及ぼす影響を明らかにすることを目的に、8週齢 C57BL/6J 雌マウスを実験モデル動物として、2% (w/w)コレステロールを添加した高コレステロール食に含まれる魚油を脂肪エネルギー比率 20%と 50%に設定し、肝臓脂質蓄積に対する作用について検討した。実験食は、脂肪源をサフラワー油とした脂肪エネルギー比率 20%の SO 食、SO 群の餌に 2% (w/w)コレステロールを添加した SO/CH 食、脂肪源を魚油とし脂肪エネルギー比率がそれぞれ 20%、50%の 20FO 食と 50FO 食、20FO 食および 50FO 食にコレステロールを 2% (w/w)添加した 20FO/CH 食、50FO/CH 食とした (Table 1)。実験群の呼称は、各実験食名と同一とした。マウスを実験飼料で8週間飼育した後、脂肪酸やコレステロール代謝に関連する項目について調べた。

Table 1. Composition of the experimental diets

Diet	SO	SO/CH	20FO	20FO/CH	50FO	50FO/CH
Ingredients, g						
Safflower oil	8	8	-	-	-	-
Fish oil	-	-	8	8	25	25
Casein	20	20	20	20	25	25
Sucrose	10.37	10.37	10.37	10.37	12.96	12.96
β -starch	51.83	51.83	51.83	51.83	24.77	24.77
Vitamin mix *	1	1	1	1	1.25	1.25
Mineral mix	3.5	3.5	3.5	3.5	4.38	4.38
Cellulose powder	5	5	5	5	6.25	6.25
L-cystin	0.3	0.3	0.3	0.3	0.38	0.38
Tert-butyl hydroquinone	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.005	0.005
Cholesterol	-	2	-	2	-	2
Total	100.00	102.00	100.00	102.00	100.00	102.00
Energy (kcal/100g)	374.02	366.68	374.02	366.68	464.03	454.93
Fat Energy ratio (%)	19.70	19.70	19.70	19.70	49.62	49.62

*Vitamin mix and mineral mix were based on the AIN-93G formation. Vitamin mix substituted 0.25% sucrose for choline bitartrate. SO; safflower oil, CH; cholesterol, FO; fish oil.

第1節 体重、体組成、血漿および肝臓脂質レベル

体重および組織重量の結果を Table 2 に示した。最終体重は全ての群で増加したが、SO 群と比較し 20FO/CH、50FO 群で有意に低値を示した。肝臓重量は SO 群と比較し脂肪エネルギー比 20%魚油の 20FO、20FO/CH 両群で有意に小さかった。子宮周囲白色脂肪組織各群間で大きな差は見られなかった。

Table 2. Body and tissue weight of 16week-old female mice

Parameter	SO	SO/CH	20FO	20FO/CH	50FO	50FO/CH
Initial body weight (g)	17.04 ± 1.01	17.10 ± 1.02	17.06 ± 0.98	17.00 ± 1.10	17.06 ± 0.86	17.02 ± 0.84
Final body weight (g)	22.12 ± 1.88 ^a	21.49 ± 1.18 ^{ab}	21.54 ± 0.98 ^{ab}	20.97 ± 2.56 ^b	20.49 ± 0.79 ^b	20.80 ± 1.98 ^{ab}
Liver weight (g)	0.98 ± 0.19 ^a	0.85 ± 0.51 ^a	0.84 ± 0.10 ^b	0.83 ± 0.04 ^b	1.06 ± 0.06 ^a	1.13 ± 0.09 ^a
Liver weight/body weight (%)	4.62 ± 0.83 ^{bc}	4.56 ± 0.62 ^{bc}	3.93 ± 0.53 ^c	4.24 ± 0.19 ^c	5.17 ± 0.31 ^{ab}	5.56 ± 0.98 ^a
White adipose tissue weight (g)	0.31 ± 0.16	0.36 ± 0.08	0.29 ± 0.10	0.24 ± 0.12	0.23 ± 0.16	0.27 ± 0.08

Values represent means ± S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the p<0.05 level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

X線CT装置により腹部の脂肪組織を測定した結果、内臓脂肪面積(ピンク色の部分)が、SO群と比較し、20FO、50FO群では減少し、魚油とコレステロールの併用群である20FO/CH、50FO/CH群においても内臓脂肪の増加は見られなかった。皮下脂肪(黄色の部分)も同様の傾向であった(Fig. 1)。

血糖値、血漿中の脂質値を Fig. 2 に示した。血糖値は群間で大きな差はなかった。血漿トリグリセリド値はSO群と比較し、20FO群で有意に高値を示した。血漿総コレステロール値はSO群とSO/CH群間に変化がなかったが、SO群と比べ、20FO群で有意に低く、20FO/CH、50FO/CH群ではそれぞれ20FO、50FO群と比較し有意に増加した。HDLコレステロール値も総コレステロール値と同様の傾向となった。

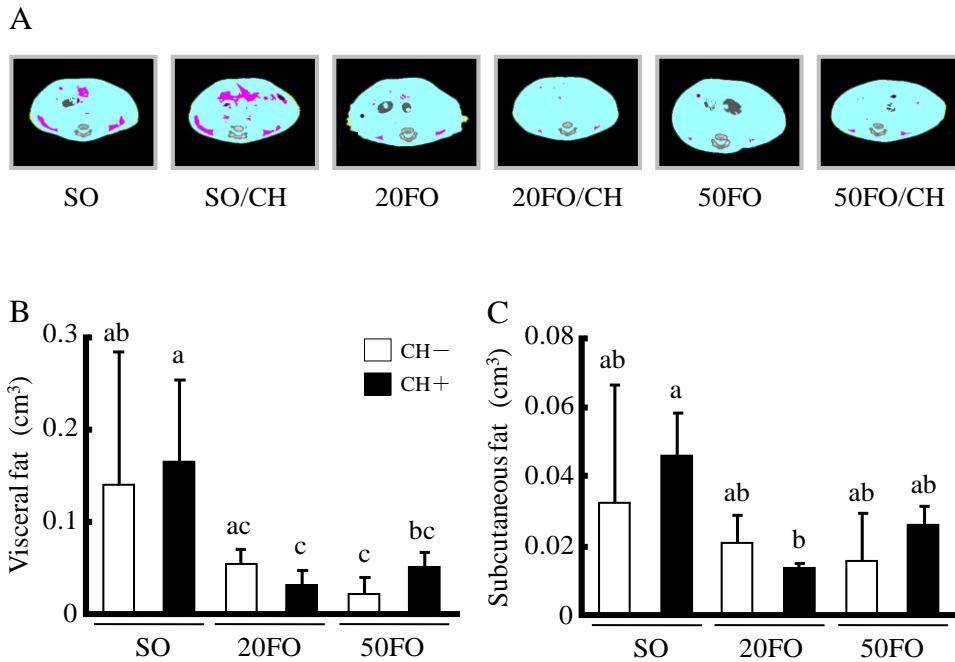


Fig. 1. CT-based fat tissues composition analysis of 16-week-old female mice. Representative X-ray CT images of mice fed SO, SO/CH, 20FO, 20FO/CH, 50FO, and 50FO/CH for 8 weeks, at the third lumbar (L3) level (A). The areas indicated with pink, yellow, and light-blue are visceral fat, subcutaneous fat, and muscle, respectively. CT-estimated amounts of visceral fat (B), and subcutaneous fat (C) in the abdominal area of L2-L4. Values represent means \pm S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the $p < 0.05$ level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

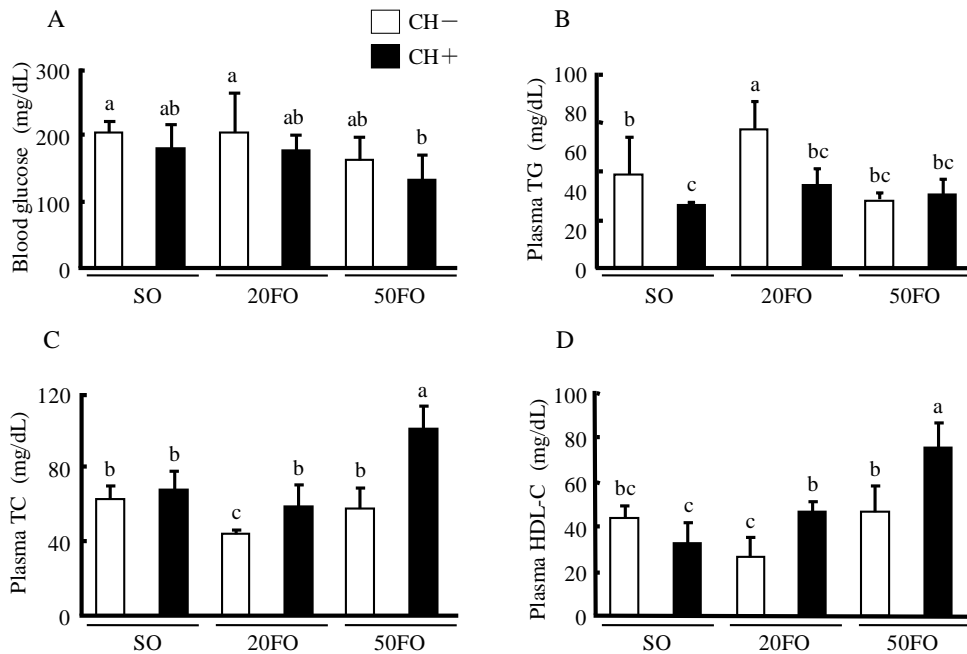


Fig. 2. Blood glucose and plasma lipid levels in 16-week-old female mice. Blood glucose (A), plasma triglyceride (TG) (B), plasma total cholesterol (TC) (C), and plasma high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) (D) in mice fed SO, SO/CH, 20FO, 20FO/CH, 50FO, and 50FO/CH for 8 weeks. Mice were fasted for 3 hours prior to blood sampling. Values represent means \pm S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the $p < 0.05$ level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

魚油とコレステロールが肝臓の脂質蓄積に及ぼす影響を調べるため、肝臓の外見および組織標本の比較を行った (Fig. 3A, B)。肝臓をパラフィン包埋した後に、組織切片を作製し H&E 染色を施して観察した。パラフィン包埋切片では、作成過程で脂肪が除去され脂肪滴は空胞として観察されるため、この空胞を脂肪滴として評価した。SO/CH 群は SO 群と肝臓重量が同じ程度であったにも関わらず、その大きさは明らかに肥大し、全体的に表面が白く変色していた。組織標本の観察では、SO/CH 群では肝細胞全体で多くの脂肪滴の沈着が確認できた。一方、魚油摂取群ではコレステロールの有無に関わらずこのような脂肪滴の沈着は認められなかった。

肝臓中の脂質値を Fig. 3C, D に示した。SO/CH 群のトリグリセリド値が SO 群の約 2 倍、総コレステロール値が SO 群の約 7 倍にまで増加した。一方、魚油にコレステロールを加えた 20FO/CH、50FO/CH 群ではトリグリセリド、総コレステロールの大きな増加はなかった。

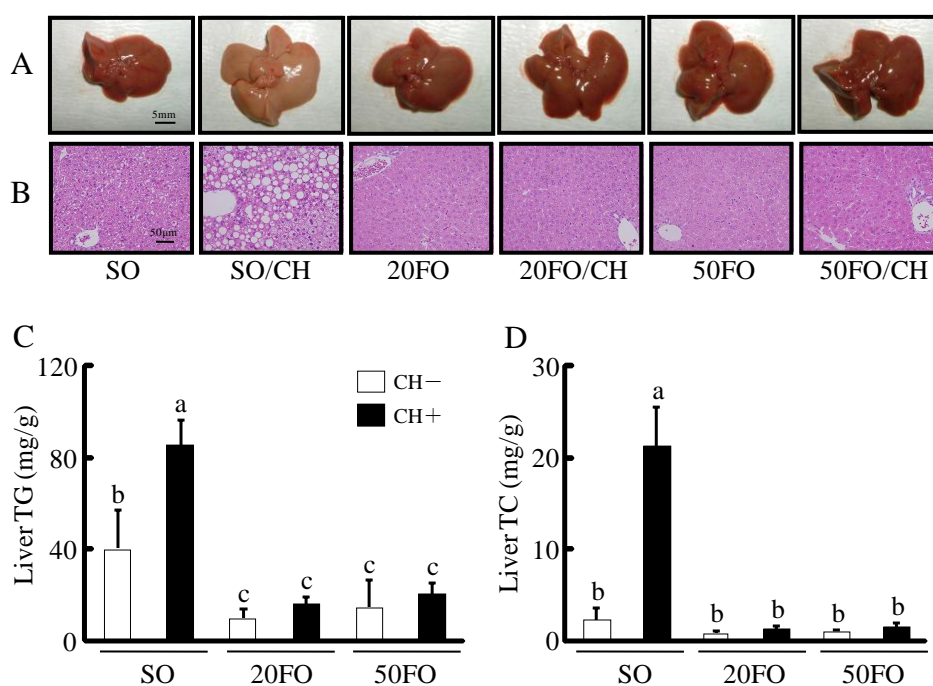


Fig. 3. Liver morphology, tissue histology and hepatic lipids levels in 16-week-old female mice. Liver morphology (A), H&E-stained liver sections (B), liver triglycerides (TG) (C), and liver total cholesterol (TC) (D) in mice fed SO, SO/CH, 20FO, 20FO/CH, 50FO, and 50FO/CH for 8 weeks. Values represent means \pm S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the $p < 0.05$ level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

第2節 肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現

肝臓中の脂質代謝関連遺伝子発現について定量 RT-PCR 法で mRNA レベルを調べ、その結果を Table 3 に示した。SREBP-1c mRNA レベルは、コレステロールを添加した 20FO/CH、50FO/CH 群で、それぞれ無添加群よりも増加した。SREBP-1c の活性型タンパク質発現量に依存している Insig-1 の mRNA レベルは、SO 群と比較し、20FO、50FO 群で減少し、コレステロール負荷の 20FO/CH、50FO/CH 群ではより減少する傾向であった。一方、SREBP-2 mRNA レベルは、コレステロール負荷によって減少した。この減少は、魚油群の 20FO/CH、50FO/CH だけでなく SO/CH 群でも見られた。

SREBP-1c 標的遺伝子である FAS および SCD-1 の mRNA レベルは、20FO、50FO 群で濃度依存的に減少した。しかし、コレステロールの負荷による影響は両遺伝子間で異なり、FAS は各油脂の単独群と比較しコレステロール添加群で減少したが、SCD-1 は、20FO/CH、50FO/CH 群でのさらなる減少は見られなかった。また、SCD-1 タンパク質発現は SCD-1 mRNA 発現と同様の結果となった(Fig. 4A)。

HMG-CoA 還元酵素の mRNA レベルは、SO 群と比較し 20FO、50FO 群で減少し、コレステロール負荷によってさらに減少した。ABCG5 および ABCG8 mRNA レベルは、SO 群と比較し、50FO 群で増加し、どの食餌でもコレステロールの負荷によって増加した。

脂肪酸酸化関連遺伝子の転写因子として働く PPAR α mRNA レベルは、コレステロールの有無に関わらず魚油群で増加した。PPAR α 標的遺伝子である CPT-1、AOX および UCP-2 の mRNA レベルは、SO 群と比較し、20FO、50FO 群で増加し、コレステロール負荷時は、CPT-1、AOX mRNA レベルは変化しなかったが、UCP-2 mRNA レベルは減少した。また、CPT-1 タンパク質発現は、SO 群と比較し、50FO 群で増加した(Fig. 4B)。

CYP7A1 および CYP8B1 の mRNA レベルは、ともに、SO 群と比較し、50FO 群で増加した。コレステロール負荷による影響は、2つの遺伝子において異なり、CYP7A1 はそれぞれの油脂単独群よりコレステロール添加群で増加したが、CYP8B1 mRNA レベルはコレステロールによる増加は見られなかった。さらに、50FO 群ではコレステロール負荷により CYP8B1 mRNA レベルが減少した。

Table 3. Expression of lipid metabolism-related genes in the liver.

	SO	SO/CH	20FO	20FO/CH	50FO	50FO/CH
SREBPs						
SREBP-1c	1.00 ± 0.14 ^c	2.57 ± 0.50 ^a	0.93 ± 0.12 ^c	1.29 ± 0.40 ^{bc}	0.83 ± 0.45 ^c	1.49 ± 0.08 ^b
SREBP-2	1.00 ± 0.08 ^{ab}	0.54 ± 0.11 ^c	1.11 ± 0.17 ^a	0.64 ± 0.14 ^c	0.86 ± 0.26 ^b	0.56 ± 0.43 ^c
Insig-1	1.00 ± 0.23 ^a	0.42 ± 0.34 ^b	0.50 ± 0.21 ^b	0.16 ± 0.20 ^c	0.19 ± 0.23 ^c	0.12 ± 0.16 ^c
Fatty acid biosynthesis						
FAS	1.00 ± 0.51 ^a	0.40 ± 0.21 ^b	0.33 ± 0.12 ^b	0.12 ± 0.02 ^b	0.08 ± 0.04 ^b	0.06 ± 0.02 ^b
SCD-1	1.00 ± 0.22 ^a	0.97 ± 0.21 ^a	0.20 ± 0.18 ^{bc}	0.27 ± 0.14 ^b	0.00 ± 0.0 ^c	0.06 ± 0.03 ^{bc}
Cholesterol homeostasis						
HMG-CoA reductase	1.00 ± 0.65 ^a	0.29 ± 0.36 ^b	0.39 ± 0.24 ^a	0.24 ± 0.14 ^b	0.24 ± 0.22 ^b	0.22 ± 0.14 ^b
LDL-receptor	1.00 ± 0.23 ^a	0.94 ± 0.19 ^a	1.04 ± 0.25 ^b	0.70 ± 0.37 ^b	0.70 ± 0.09 ^b	0.59 ± 0.14 ^b
ABCG5	1.00 ± 0.19 ^a	2.51 ± 0.16 ^b	1.89 ± 0.09 ^c	3.10 ± 0.28 ^{ab}	2.51 ± 0.16 ^b	3.47 ± 0.09 ^a
ABCG8	1.00 ± 0.45 ^c	1.66 ± 0.12 ^{bc}	2.60 ± 0.22 ^b	4.50 ± 0.20 ^a	3.83 ± 0.04 ^b	4.46 ± 0.34 ^a
Fatty acid β-oxidation						
PPARα	1.00 ± 0.12 ^c	1.42 ± 0.21 ^b	1.75 ± 0.06 ^a	1.87 ± 0.07 ^a	1.75 ± 0.08 ^a	1.77 ± 0.12 ^a
CPT-1	1.00 ± 0.17 ^d	1.14 ± 0.24 ^d	1.29 ± 0.24 ^c	1.57 ± 0.19 ^{bc}	1.99 ± 0.36 ^a	1.81 ± 0.18 ^a
AOX	1.00 ± 0.12 ^d	1.26 ± 0.10 ^d	2.61 ± 0.22 ^c	2.95 ± 0.12 ^{bc}	3.19 ± 0.12 ^{ab}	3.72 ± 0.12 ^a
UCP-2	1.00 ± 0.23 ^e	0.79 ± 0.07 ^e	2.75 ± 0.08 ^c	1.68 ± 0.10 ^d	5.02 ± 0.11 ^a	3.88 ± 0.06 ^b
Bile acid biosynthesis						
CYP7A1	1.00 ± 0.55 ^{cd}	2.13 ± 0.37 ^{bc}	0.71 ± 0.60 ^d	2.78 ± 0.42 ^b	2.19 ± 0.24 ^{bc}	4.20 ± 0.21 ^a
CYP8B1	1.00 ± 0.10 ^d	0.88 ± 0.19 ^d	2.04 ± 0.11 ^c	2.32 ± 0.34 ^{bc}	3.57 ± 0.26 ^a	2.93 ± 0.14 ^a

The mRNA expression levels in liver of mice fed SO, SO/CH, 20FO, 20FO/CH, 50FO, and 50FO/CH for 8 weeks. Values represent means ± S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the p<0.05 level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

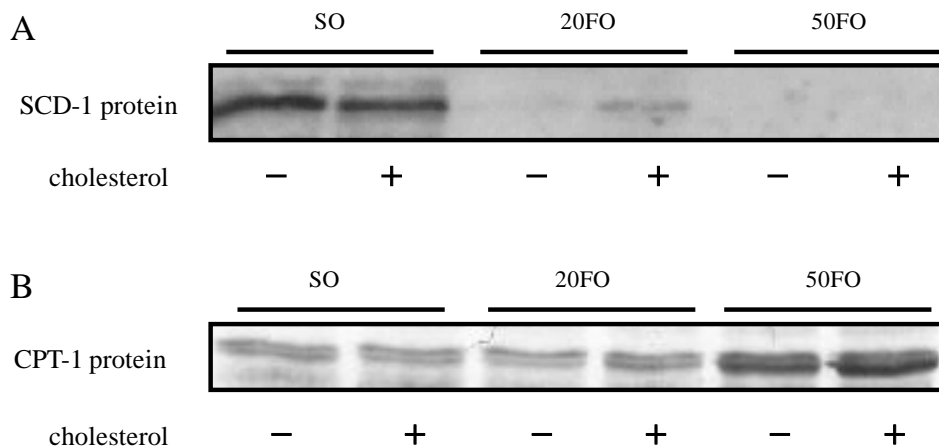


Fig. 4. Western blot analysis of SCD-1 and CPT-1 in membrane from livers of 16-week-old female mice. Liver SCD-1 protein expression (A) and CPT-1 protein expression (B) in mice fed SO, SO/CH, 20FO, 20FO/CH, 50FO, and 50FO/CH for 8 weeks.

第3節 小括および考察

本研究では、高コレステロール食による肝臓脂質蓄積に対する魚油の作用を調べるため、魚油の脂肪エネルギー比 20% または 50% として 2% (w/w) コレステロールを添加した飼料でマウスを 2 ヶ月間飼育し検討した。全ての群で最終体重が増加したが、魚油を脂肪源とする群では体重増加が低く抑えられ、特に、20FO/CH と 50FO 群では有意な低下が認められた。

肝臓の重量および体重に対する比率は、20FO 群では有意に低値を示したが、50FO 群は SO 群と同程度であった。肝臓トリグリセリド値も 20FO 群で、有意に減少したことから、20FO 群における肝臓重量の低下は、肝臓脂質の減少が要因のひとつだと考えられる。魚油により肝臓ペルオキシソームが増加し、それに伴って肝臓重量が増加すると報告されている⁸⁰⁾。本研究ではそのような増加はみられなかったが、20FO 群では SO 群に比べ有意に低下した肝臓重量が 50FO 群で SO 群と同等であったことは、20FO と 50FO 両群の肝臓脂質レベルに有意な差がなかったことから、魚油によるペルオキシソームの増加が一因と考えられる。一方、コレステロール負荷により SO 群の肝臓が最も影響を受け、肝臓のサイズが大きくなり、肝臓表面の色からも肝臓全体に多量の脂肪が蓄積されていることが示唆された。そして、肝臓の組織切片の観察からも、肝細胞全体に多くの脂肪滴の沈着が生じているのを確認した。しかし、脂肪源が魚油のときは、コレステロール負荷による過剰な脂肪滴の沈着は認められず、摂取する油の違いが肝臓の脂質代謝に大きく影響を与えることが示唆された。肝臓トリグリセリドと総コレステロール値は、SO/CH 群で著しく高値を示したのに対し、20FO/CH、50FO/CH 群ではコレステロール負荷においても増加することなく、組織標本の結果を反映するものであった。

コレステロールのおもな異化経路は、肝臓における胆汁酸の合成系で、その経路は律速酵素である CYP7A1 によって調節を受けており、さらに、CYP7A1 は LXR α により誘導される^{23,24)}。また、肝臓に発現する ABCG5/8 ヘテロダイマーは胆汁中へのコレステロールの排泄に関わっており、CYP7A1 と同様に LXR α により誘導されることが知られている^{16,17)}。CYP7A1 mRNA レベルは、SO 群と比較し、50FO 群で増加し、コレステロール負荷により全ての群で増加した。このように食事性コレステロールが過剰な状態では、コレステロールの異化を亢進させることにより、体内の恒常性を維持していると考えられる。本実験では、SO/CH 群で、肝臓の CYP7A1 発現の上昇によってコレステロール異化が亢進し、血中コレステロール値が高値となることを防いだが、肝臓中には多量の脂質が蓄積し、脂肪肝を招いた。一方、20FO/CH、50FO/CH 群では、肝細胞への脂肪蓄積はほとんど見られず、腹部脂肪も減少した。また、肝臓のコレステロール量が 20FO/CH と 50FO/CH 群で同程度あることから、魚油によるコレステロール蓄積抑制効果はエネルギー比 50% と同様、20% の場合においても十分であることが示された。コレステロールの吸収に重要な因子であるコール酸の産

生には CYP8B1 が関与している^{81,82)}。50FO に、コレステロールを添加した 50FO/CH 群では、50FO 群と比べ、CYP8B1 mRNA レベルが減少した。この CYP8B1 発現の低下から、コレステロールの吸収を抑制することで、体内の恒常性を維持している可能性が考えられる。また、肝臓へのコレステロール蓄積の抑制には、魚油によるコレステロールの合成や異化に対する作用に加え、コレステロール吸収抑制や排泄亢進も考えられる。本実験では、魚油摂取により、肝臓 ABCG5/8 mRNA レベルが増加していたことから、胆汁へのコレステロール排泄が亢進している可能性が示唆された。また、魚油により小腸の NPC1L1 量が減少するという報告があり⁷⁵⁾、本実験でも魚油摂取により NPC1L1 量が減少している可能性が考えられ、コレステロールの吸収や排泄に関して、さらに検討する必要がある。

X 線 CT による内臓脂肪および皮下脂肪量解析では、コレステロールの有無に関わらず、全ての魚油群で内臓脂肪および皮下脂肪量が減少する傾向がみられた。

SREBP-1c の標的遺伝子で、脂肪酸合成に関与する FAS mRNA レベルおよび SCD-1 発現は、コレステロールの有無に関係なく魚油摂取により減少した。魚油の脂肪酸合成抑制作用はコレステロールの負荷時でも有効であり、さらに、脂肪エネルギー比が 20%においても 50%と同様であることが示された。魚油による脂肪蓄積の抑制は、おもに、SREBP-1c の遺伝子発現の減少を介し、その標的遺伝子の発現抑制によることが知られており、本研究においても同様の結果が得られた。また、魚油とともにコレステロールを負荷したときは、体内における脂肪酸およびコレステロール代謝に魚油単独とは異なる影響を与えることが推測される。本研究で、魚油単独摂取群はエネルギー比 20%と 50%、いずれにおいても、PPAR α mRNA レベルは、コレステロールの有無に関わらず魚油群で増加し、PPAR α 標的遺伝子の CPT-1、AOX および UCP-2 mRNA レベルも魚油群で増加し、脂肪酸酸化の亢進が示唆された。しかし、コレステロールを負荷することにより、CPT-1、AOX と UCP-2 の遺伝子の mRNA 発現に異なる変化が現れた。脂肪酸のミトコンドリア内への取り込みに関与する CPT-1 と脂肪酸 β 酸化系の初発酵素である AOX はコレステロール負荷により変化しないのに対し、熱産生に関与するミトコンドリア脱共役タンパク質の UCP-2 mRNA レベルはコレステロールにより減少した。UCP-2 遺伝子のプロモーター領域には SREBP-2 に親和性の高い SRE が存在することが報告されており^{83,84)}、コレステロール負荷により SREBP-2 mRNA 発現が低下したため、それに同調して UCP-2 mRNA レベルも減少したと考えられる。

コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素、HMG-CoA 合成酵素や LDL 受容体の mRNA レベルもコレステロール負荷により SREBP-2 と同様に減少した。食事性コレステロールが多いときは、体内のコレステロールの恒常性を維持するためにこれらの遺伝子発現が低下したという報告と一致する結果である²¹⁾。一方、HMG-CoA 還元酵素、合成酵素は SO 群と比べ、20FO、50FO 群で減少し、コレステロール負荷により、全ての群でさらに減少した。魚油摂取が SREBP-2 の減少を介し、コレステロール合成系タンパク質をコードする遺伝子の mRNA 量を減少させるという報告がある⁸⁵⁾。本研究でも、魚油 20%では、

コレステロール負荷により、互いに作用が強められ、**SREBP-2** 制御下にある遺伝子発現が魚油単独群に比べ、約半分のレベルまで抑制された。しかし、魚油 50%では、魚油による影響が強く現れたためか、コレステロール負荷による減少は小幅にとどまった。このことから、魚油のエネルギー比率が高いときはその影響が強く、コレステロールによる作用が生じにくいことが考えられた。

コレステロールを負荷し、細胞内コレステロール濃度が上昇すると、**SREBPs** が負のフィードバック制御を受け、その標的遺伝子の発現とともに減少し、脂質合成が減少すると考えられた。しかし、食餌の脂肪源をサフラワー油としてコレステロール負荷した場合には、**SREBPs** 標的遺伝子の発現は減少したものの、脂質合成減少効果はほとんどみられず、肝細胞への顕著な脂肪蓄積や白色脂肪組織の増加が見られた。一方、脂肪源を魚油としてコレステロールを負荷した場合は、**SREBPs** やその標的遺伝子が減少し、肝細胞への脂肪蓄積を抑制し、腹部内臓脂肪や皮下脂肪組織も増加しなかった。以上の結果から、体内への脂肪蓄積の差異は、脂肪源と脂肪エネルギー比率の違いがコレステロールによる転写因子の制御に異なる影響を与える結果として生じることが示唆された。

第2章 高コレステロール食による肝臓脂質蓄積を抑制する低用量魚油の作用

前章では、魚油の脂肪エネルギー比率を 20%あるいは 50%と設定し、2% (w/w)コレステロール食を摂取したときの脂質代謝への影響について検討した。その結果、サフラワー油を脂肪源としたコントロール食に、コレステロールを添加したときにみられる肝臓の脂質蓄積が、魚油摂取により顕著に抑制され、このような作用は、魚油の脂肪エネルギー比率 20%または 50%いずれでも有効であることを示した⁸⁵⁾。

一方、平成 20 年の国民健康・栄養調査の結果では、日本人が魚類から摂取する脂質の量は、総脂肪エネルギーの約 10% (総エネルギーの約 2.5%) であることが示されている。そこで、第 2 章では、日常の食事でも摂取可能な魚油の脂肪エネルギー比率を念頭におき、2% (w/w)コレステロールを負荷したときの肝臓脂質蓄積に及ぼす低摂取量の魚油の影響を解析するため、魚油の脂肪エネルギー比率を 2%と 5%に設定し検討した。実験食は、脂肪エネルギー比率を 20%とし、脂肪源全てがサフラワー油の SO 食、脂肪エネルギー比率の 2%を魚油に置き換えた 2FO 食、脂肪エネルギー比率の 5%を魚油に置き換えた 5FO 食、これらの食餌に 2% (w/w)コレステロールを負荷した SO/CH 食、2FO/CH 食、5FO/CH 食を設けた (Table 4)。前章と同様のマウスを実験食で 8 週間飼育した後、脂肪酸やコレステロール代謝に関連する項目について調べた。

Table 4. Composition of the experimental diets

Diet	SO	SO/CH	2FO	2FO/CH	5FO	5FO/CH
Ingredients, g						
Safflower oil	8	8	7.2	7.2	6	6
Fish oil	-	-	0.8	0.8	2	2
Casein	20	20	20	20	20	20
Sucrose	10.37	10.37	10.37	10.37	10.37	10.37
β -starch	51.83	51.83	51.83	51.83	51.83	51.83
Vitamin mix *	1	1	1	1	1	1
Mineral mix	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Cellulose powder	5	5	5	5	5	5
L-cystin	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Tert-butyl hydroquinone	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016
Cholesterol	-	2	-	2	-	2
Total	100.00	102.00	100.00	102.00	100.00	102.00
Energy (kcal/100g)	374.02	366.68	374.02	366.68	374.02	366.68
Fat Energy ratio (%)	19.70	19.70	19.70	19.70	19.70	19.70

*Vitamin mix and mineral mix were based on the AIN-93G formation. Vitamin mix substituted 0.25% sucrose for choline bitartrate. SO; safflower oil, CH; cholesterol, FO; fish oil.

第1節 体重、体組成、血漿および肝臓脂質レベル

最終体重および組織重量を Table 5 に示した。実験食で 8 週間飼育後の最終体重および白色脂肪組織重量は、群間に大きな差はなく、脂肪源の違いおよびコレステロールの有無による影響はみられなかった。血糖値においても SO 群と比較し、2FO 群で減少傾向がみられたが、有意な変化ではなかった。

Table 5. Body and tissue weight of 16week-old female mice

Parameter	SO	SO/CH	2FO	2FO/CH	5FO	5FO/CH
Initial body weight (g)	17.63 ± 0.89	17.64 ± 0.82	17.65 ± 0.58	17.67 ± 0.55	17.67 ± 0.53	17.65 ± 0.48
Final body weight (g)	21.78 ± 1.54	21.30 ± 1.45	21.67 ± 1.23	21.98 ± 1.35	22.70 ± 1.65	21.32 ± 0.84
Liver weight (g)	0.94 ± 0.09	0.93 ± 0.09	0.92 ± 0.08	1.02 ± 0.12	0.94 ± 0.08	0.94 ± 0.05
Liver weight/body weight (%)	4.23 ± 0.26 ^b	4.39 ± 0.16 ^{ab}	4.28 ± 0.15 ^{ab}	4.63 ± 0.32 ^a	4.12 ± 0.09 ^{ab}	4.39 ± 0.2 ^{ab}
White adipose tissue weight (g)	0.42 ± 0.12	0.32 ± 0.11	0.28 ± 0.10	0.36 ± 0.10	0.42 ± 0.12	0.33 ± 0.10

Values represent means ± S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the p<0.05 level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

マウスの腹部 X 線 CT 画像から推定した内臓脂肪量では、魚油摂取およびコレステロール負荷による変化はみられなかった(Fig. 5B)。皮下脂肪量においては、SO 群と比較し 2FO 群で有意に低値を示したが、5FO 群では低下がみられないことから、皮下脂肪の減少は魚油による影響ではないものと考えられた(Fig. 5C)。

血漿トリグリセリド値は SO/CH 群と比較して、2FO/CH 群、5FO/CH 群で有意に減少した(Fig. 6B)。一方、血漿の総コレステロール、HDL コレステロール値は、魚油摂取およびコレステロール負荷による大きな差は認められなかった(Fig. 6C、6D)。

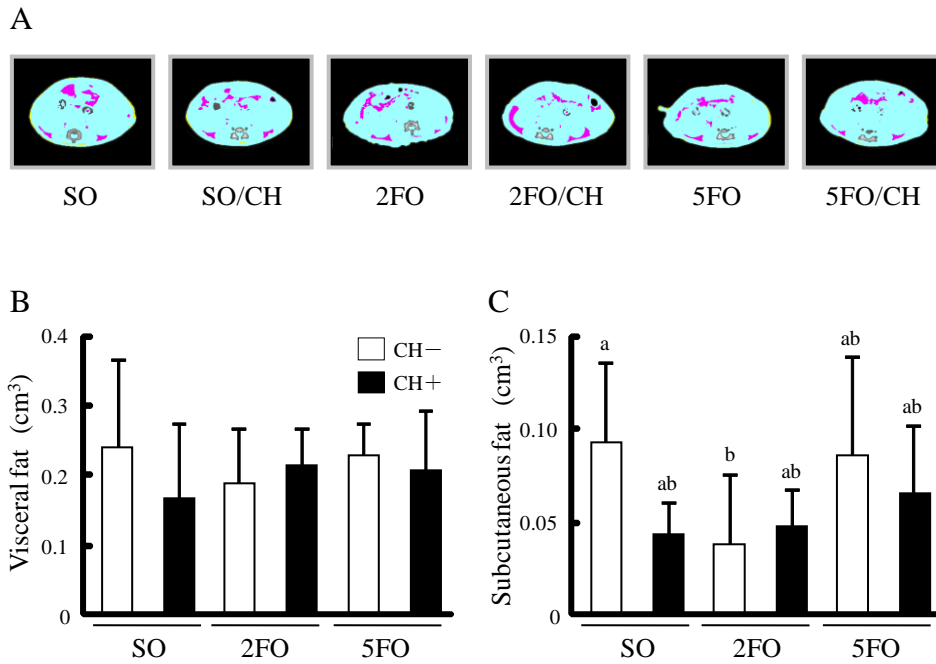


Fig. 5. CT-based fat tissues composition analysis of 16-week-old female mice. Representative X-ray CT images of mice fed SO, SO/CH, 2FO, 2FO/CH, 5FO, and 5FO/CH for 8 weeks, at the third lumbar (L3) level (A). The areas indicated with pink, yellow, and light-blue are visceral fat, subcutaneous fat, and muscle, respectively. CT-estimated amounts of visceral fat (B), and subcutaneous fat (C) in the abdominal area of L2-L4. Values represent means \pm S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the $p < 0.05$ level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

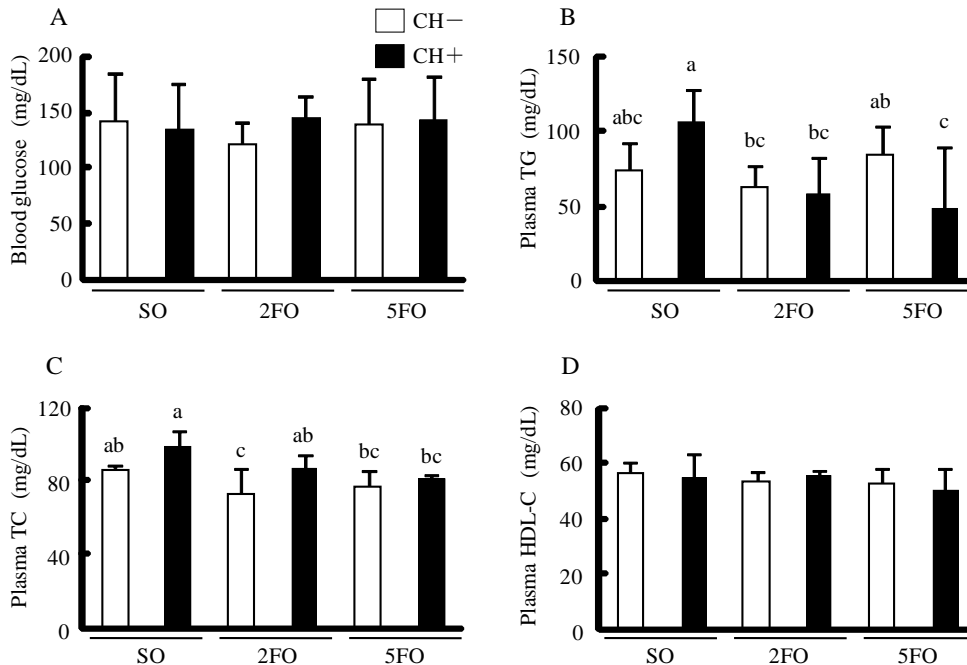


Fig. 6. Blood glucose and plasma lipid levels in 16-week-old female mice. Blood glucose (A), plasma triglyceride (TG) (B), plasma total cholesterol (TC) (C), and plasma high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) (D) in mice fed SO, SO/CH, 2FO, 2FO/CH, 5FO, and 5FO/CH for 8 weeks. Mice were fasted for 3 hours prior to blood sampling. Values represent means \pm S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the $p < 0.05$ level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

肝臓の重量や大きさに群間で違いはみられなかったが、外見上では、SO 群と比較し、SO/CH 群では肝臓の表面の色が全体的にやや白っぽく変色していた。また、HE 染色した SO/CH 群の肝臓組織の中には脂肪の蓄積が多くみられたが、2FO/CH 群では、肝臓の表面が白っぽく変色したものの、SO/CH 群でみられた脂肪の蓄積は顕著に減少した。また、5FO/CH 群においては、2FO/CH 群に比べ、脂肪の蓄積がさらに減少した(Fig. 7A、B)。

肝臓中の脂質値を、Fig. 7C、D に示した。肝臓のトリグリセリド値は、SO 群と比較し、SO/CH 群において、有意に増加した。魚油とコレステロール群の 2FO/CH 群においても、2FO 群と比較し有意に増加した。一方、魚油のエネルギー比率が高くなる 5FO/CH 群では 5FO 群との間に有意な差は認められなかった。そして、2FO/CH、5FO/CH 群ともに、SO/CH 群と比較すると有意に減少し、5FO/CH 群では約 50%にまで減少した。肝臓の総コレステロール値においても、同様の傾向がみられ、5FO/CH 群では SO/CH 群と比較し約 30%まで減少した。

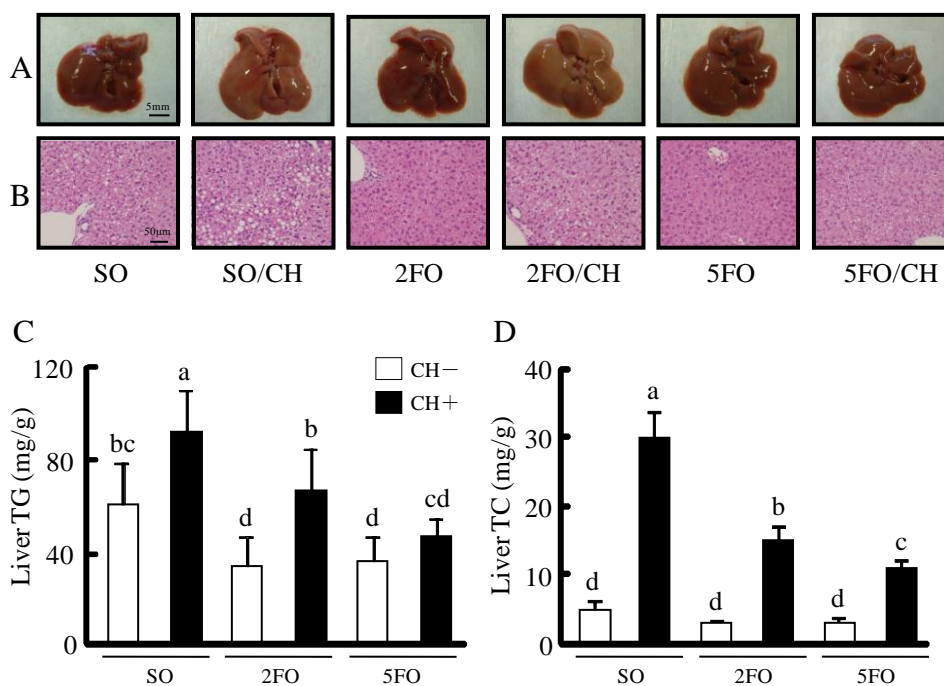


Fig. 7. Liver morphology, tissue histology and hepatic lipids levels in 16-week-old female mice. Liver morphology (A), H&E-stained liver sections (B), liver triglycerides (TG) (C), and liver total cholesterol (TC) (D) in mice fed SO, SO/CH, 2FO, 2FO/CH, 5FO, and 5FO/CH for 8 weeks. Values represent means \pm S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the $p < 0.05$ level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

第2節 肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現

肝臓中の脂質代謝関連遺伝子の mRNA レベルを Table 6 に示した。脂肪酸合成に関与する遺伝子の転写因子である SREBP-1c の mRNA レベルは、全ての群でコレステロール負荷により増加したが、Insig-1 の mRNA レベルは、コレステロール負荷群で減少した。

脂肪酸合成に関与する FAS の mRNA レベルは、魚油摂取群で減少傾向を示したが、魚油の用量による違いはみられなかった。また、SCD-1 の mRNA レベルにおいては、魚油摂取、およびコレステロール負荷による影響はみられなかった。

脂肪酸の異化に関与する AOX および UCP-2 の mRNA レベルは、ともに、SO 群と比較し、2FO 群で有意に増加し、5FO 群でさらに有意に増加した。しかし、コレステロール負荷によるさらなる増加はみられず、UCP-2 の mRNA レベルにおいては、5FO 群と比較し 5FO/CH 群で有意に減少した。

SREBP-2 の標的遺伝子である HMG-CoA 還元酵素の mRNA レベルは、魚油摂取群の 2FO、5FO で減少傾向を示し、コレステロール群でさらに減少した。一方、LDL 受容体 mRNA レベルは、SREBP-2 と同様に、魚油摂取による大きな変化はみられなかったが、コレステロール負荷により減少した。

CYP7A1 mRNA レベルは、コレステロール負荷により、全ての群で増加したが、2FO/CH、5FO/CH 群では、有意に減少し、SO/CH 群に比べ、約 25~50%であった。CYP8B1 mRNA レベルでは、魚油摂取およびコレステロール負荷による大きな影響はみられなかった。

Table 6. Expression of lipid metabolism-related genes in the liver.

	SO	SO/CH	2FO	2FO/CH	5FO	5FO/CH
SREBPs						
SREBP-1c	1.00 ± 0.82 ^b	1.59 ± 1.39 ^b	1.61 ± 0.20 ^b	3.39 ± 0.48 ^a	1.72 ± 0.29 ^b	3.93 ± 1.65 ^a
SREBP-2	1.00 ± 0.09 ^{bc}	0.74 ± 0.16 ^c	1.39 ± 0.22 ^a	1.01 ± 0.05 ^b	1.60 ± 0.32 ^a	0.86 ± 0.17 ^{bc}
Insig-1	1.00 ± 0.72 ^{ab}	0.58 ± 0.28 ^c	1.61 ± 0.22 ^a	1.12 ± 0.70 ^c	1.72 ± 0.13 ^a	0.91 ± 0.26 ^{bc}
Fatty acid biosynthesis						
FAS	1.00 ± 0.21 ^a	0.54 ± 0.31 ^b	0.57 ± 0.13 ^b	0.48 ± 0.13 ^b	0.66 ± 0.12 ^{ab}	0.57 ± 0.41 ^b
SCD-1	1.00 ± 0.12	0.69 ± 0.22	0.68 ± 0.11	0.75 ± 0.35	0.70 ± 0.30	0.70 ± 0.31
Cholesterol homeostasis						
HMG-CoA Reductase	1.00 ± 0.44 ^a	0.40 ± 0.20 ^b	0.71 ± 0.33 ^{ab}	0.41 ± 0.07 ^b	0.51 ± 0.36 ^b	0.44 ± 0.12 ^b
LDL-Receptor	1.00 ± 0.25 ^{ab}	0.63 ± 0.15 ^b	1.29 ± 0.11 ^a	0.93 ± 0.15 ^{ab}	1.16 ± 0.33 ^a	1.01 ± 0.14 ^{ab}
ABCG5	1.00 ± 0.22 ^b	2.07 ± 0.26 ^a	1.25 ± 0.18 ^b	2.54 ± 0.51 ^a	1.35 ± 0.18 ^b	2.39 ± 0.65 ^a
ABCG8	1.00 ± 0.05 ^d	1.51 ± 0.42 ^{bc}	1.12 ± 0.13 ^{cd}	2.02 ± 0.33 ^a	1.21 ± 0.14 ^{cd}	1.64 ± 0.27 ^b
Fatty acid β-oxidation						
PPARα	1.00 ± 0.16 ^d	1.39 ± 0.15 ^c	1.56 ± 0.21 ^{bc}	1.98 ± 0.18 ^{ab}	1.95 ± 0.67 ^{ab}	2.01 ± 0.31 ^a
AOX	1.00 ± 0.06 ^d	1.40 ± 0.30 ^d	2.19 ± 0.33 ^c	2.40 ± 0.35 ^{bc}	3.38 ± 0.83 ^a	2.96 ± 0.43 ^{ab}
UCP-2	1.00 ± 0.29 ^c	1.48 ± 0.24 ^{bc}	1.99 ± 0.56 ^{ab}	1.72 ± 0.41 ^b	2.60 ± 0.71 ^a	1.70 ± 0.36 ^b
Bile acid biosynthesis						
CYP7A1	1.00 ± 0.51 ^c	8.06 ± 3.13 ^a	1.42 ± 1.29 ^c	2.37 ± 1.35 ^{bc}	0.71 ± 0.64 ^c	4.11 ± 2.47 ^b
CYP8B1	1.00 ± 0.33 ^{ab}	0.81 ± 0.26 ^b	1.25 ± 0.43 ^{ab}	1.40 ± 0.40 ^{ab}	1.48 ± 0.39 ^a	1.41 ± 0.61 ^a

The mRNA expression levels in liver of mice fed SO, SO/CH, 2FO, 2FO/CH, 5FO, and 5FO/CH for 8 weeks. Values represent means ± S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the p<0.05 level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

第3節 小腸における脂質代謝関連遺伝子発現および糞中へのコレステロール排泄

小腸中のコレステロール代謝関連遺伝子を Table 7 に示した。小腸上皮細胞から小腸内腔へのコレステロールを排泄するトランスポーターである ABCG5、ABCG8 mRNA レベルは、SO 群と比較し 2FO 群で有意に増加した。HDL 産生に寄与している ABCA1 mRNA レベルは、SO 群と比較し 5FO 群で有意に増加し、コレステロール負荷によってさらに増加した。コレステロール吸収のトランスポーターである NPC1L1 mRNA レベルは、魚油やコレステロール摂取による有意な差はみられなかった。

Fig. 8 に示したように、糞中コレステロール排泄は、全ての群でコレステロール負荷によって有意に増加した。また、SO/CH 群と比較し、2FO/CH、5FO/CH 群で増加した。

Table 7. Expression of lipid metabolism-related genes in the jejunum.

	SO	SO/CH	2FO	2FO/CH	5FO	5FO/CH
ABCG5	1.00 ± 0.22 ^{bc}	1.47 ± 0.49 ^{ab}	1.72 ± 0.34 ^a	2.02 ± 0.86 ^a	0.90 ± 0.34 ^c	1.54 ± 0.37 ^{ab}
ABCG8	1.00 ± 0.24 ^b	1.49 ± 0.23 ^{ab}	1.47 ± 0.38 ^a	1.76 ± 0.61 ^a	1.03 ± 0.38 ^b	1.23 ± 0.25 ^{ab}
ABCA1	1.00 ± 0.19 ^c	2.86 ± 0.68 ^a	1.53 ± 0.73 ^{bc}	2.86 ± 0.94 ^a	1.64 ± 0.19 ^b	2.63 ± 0.66 ^a
NPC1L1	1.00 ± 0.72 ^{ab}	1.20 ± 0.37 ^a	1.33 ± 0.50 ^a	1.00 ± 0.35 ^{ab}	0.77 ± 0.23 ^{ab}	0.46 ± 0.33 ^b

The mRNA expression levels in liver of mice fed SO, SO/CH, 2FO, 2FO/CH, 5FO, and 5FO/CH for 8 weeks. Values represent means ± S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the p<0.05 level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

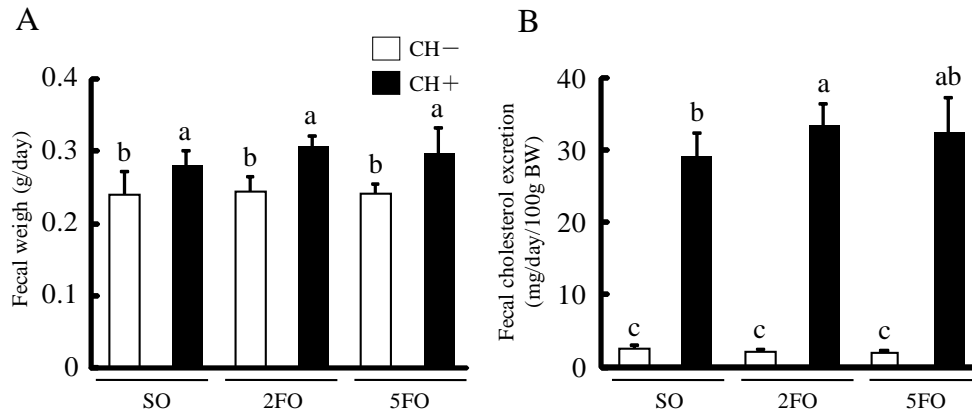


Fig. 8. Fecal weight and fecal cholesterol excretion of 16-week-old female mice. Fecal excretion (A), and fecal cholesterol excretion (B) in mice fed SO, SO/CH, 2FO, 2FO/CH, 5FO, and 5FO/CH for 8 weeks. Values represent means ± S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the p<0.05 level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

第4節 小括および考察

本章では、魚油の脂肪エネルギー比率を2%と5%と低く設定し、コレステロールを負荷した時の脂質代謝へ及ぼす影響について調べた。前章での研究で、魚油の脂肪エネルギー比率が20%または50%の条件では、体重増加量が減少傾向または有意な減少がみられたが、本実験においては、最終体重に、群間の有意な差はみられなかった。したがって、魚油の脂肪エネルギー比率が2~5%の低い条件下では、体重増加量に有意な影響を与えないと考えられる。

体重と同様に肝臓重量や大きさにも群間における変化がみられなかったが、外見には顕著な変化がみられ、コレステロール負荷により、前章と同様にSO/CH群の肝臓の色が白く変色し、肝臓全体に脂肪が多く蓄積していることが示された。さらに、肝臓の組織切片の観察からも、肝細胞全体に脂肪滴の過剰な蓄積が生じているのを確認した。しかし、脂肪源が魚油の時は、コレステロール負荷による過剰な脂肪滴の蓄積は減少し、特に5FO/CH群でより顕著にみられ、摂取する油の違いと量が肝臓の脂質代謝に大きく影響を与えることが示唆された。肝臓トリグリセリドと総コレステロール値においてもSO/CH群で著しく高値を示したのに対し、2FO/CH、5FO/CH群ではコレステロール負荷により大きく増加することなく、組織標本の結果を反映するものであった。

魚油による脂質低下作用は、おもに、SREBP-1cの遺伝子発現の減少を介し、その標的遺伝子の発現抑制によることが報告されているが³⁷⁻³⁹⁾、本研究では、これらの報告とは異なる結果が得られた。SREBP-1cの標的遺伝子で、脂肪酸合成に関与するFASのmRNAレベルは魚油摂取群で減少傾向を示したが、用量による違いはみられず、さらに、脂肪酸の不飽和化に関与するSCD-1のmRNAレベルにおいても魚油摂取による大きな影響はみられなかった。一方、魚油摂取によりPPAR α の活性化とともに脂肪酸酸化の遺伝子発現が増加するという報告があり⁴²⁻⁴⁴⁾、今回もPPAR α の標的遺伝子であるAOXとUCP-2のmRNAレベルは、コレステロールの有無に関わらず魚油群で増加し、脂肪酸異化の亢進が示唆された。第1章の結果から、魚油の脂肪エネルギー比が20%から50%の場合は、肝臓における脂肪酸合成の抑制と脂肪酸異化亢進の両方からの制御により脂質蓄積を抑制するが⁸⁵⁾、魚油の脂肪エネルギー比が2%と5%では、おもに脂肪酸の異化を亢進することによって肝臓への脂質蓄積抑制効果が示されることが考えられた。そして、今回の条件では白色脂肪組織重量やX線CT画像における内臓脂肪などの脂肪量の減少には至らなかった。

胆汁酸合成の律速酵素であるCYP7A1のmRNAは、SO群と比べ、魚油単独群の2FO、5FOにおいて有意な変化はみられなかったが、全ての群でコレステロール負荷により増加した。しかし、SO群と比較し、SO/CH群での約8倍もの著しい増加は、魚油とコレステロール同時摂取群ではみられず、SO/CH群と比べ、2FO/CH、5FO/CH群では有意に減少した。

これは、魚油摂取により肝臓でのコレステロール蓄積が抑制されたため、SO/CH 群と比べ、CYP7A1 によるコレステロール異化の促進が減少したものと考えられる。一方、ハムスターを用いた実験で、魚油により小腸の NPC1L1 量の減少に伴ってコレステロール吸収が減少するという報告がある⁷⁵⁾。しかし、本実験では、2 または 5 % エネルギーの魚油摂取で減少しなかった。それは今回の魚油摂取量がエネルギー比率で 2% および 5% と低いためだと考えられる。多くの研究で、高コレステロール摂取によって糞中コレステロール排泄が増加することが報告されている⁸⁶⁾。この研究で、コレステロールを負荷した全ての群で、糞中コレステロール排泄が増加し、その増加は、脂肪源を魚油としたときさらに増加した。

本実験では、ヒトが摂取可能な量である脂肪エネルギー比率 2% あるいは 5% の魚油摂取で、高コレステロール食の摂取による食毒性のひとつである肝臓への脂質蓄積を抑制できることを見出した。このように低用量の魚油摂取は、肝臓での脂質代謝関連遺伝子発現に対する影響に加え、糞中のコレステロール排泄を増加させることで脂質代謝を改善することを示した。本実験で用いた魚油を、ヒトが脂肪エネルギー比率 2% の割合で摂取した場合、EPA および DHA の摂取量はおよそ 1.3g/日程度となり、日本人の食事摂取基準 2010 で示している「EPA 及び DHA の目標量である 1g/日以上」とほぼ一致している。また、脂肪エネルギー比率 2% の魚油においても、肝臓の脂質代謝を改善する効果がみられたため、今後、さらに低用量の魚油が脂質代謝に与える影響を検討する必要がある。

第3章 肝臓脂質代謝および生体内での酸化ストレスにおける魚油摂取の影響

前章で、脂肪エネルギー比率 2%または 5%の魚油を含む食餌にコレステロールを加えたときの脂質代謝に与える影響を検討し、コレステロールと同時に摂取した魚油が高コレステロール食による肝臓への脂質蓄積を抑制することを示した⁸⁷⁾。このように、日本人が日常的に摂取している量と同等の魚油摂取でも脂質代謝改善作用がみられたが、全員が一様にその量を食べているわけではなく、平成 20 年の国民健康・栄養調査の結果から、特に若年層では魚介類の摂取量が中高年層と比較すると少ないことがわかっている。

また、魚油に含まれる多価不飽和脂肪酸の EPA・DHA は、化学構造上きわめて酸化されやすく、魚油を多量に摂取した場合には、肝臓中の過酸化脂質濃度が増加することが報告されており、生体内での脂質の過酸化が問題視されることがある⁷⁶⁾。魚油摂取の影響を検討する上において有効性と毒性を同時に評価することは非常に重要である。そこで、本実験では前章の研究よりもさらに少ない量の魚油による脂質代謝改善作用、加えて食毒性の視点から生体内の酸化ストレスへの影響を調べるため、実験食は脂肪エネルギー比を 20%とし、脂肪源がすべてサフラワー油の SO 食、脂肪エネルギー比率 1%または 2%を魚油に置き換えた 1FO 食、2FO 食、さらに脂肪源がすべて魚油の 20FO 食を設け、これらの食餌に 2%(w/w) コレステロールを添加した SO/CH 食、1FO/CH 食、2FO/CH 食、20FO/CH 食とした (Table 8)。8 週間飼育した後、脂肪酸やコレステロール代謝に関連する項目に加え酸化ストレス度について調べた。

Table 8. Composition of the experimental diets

Diet	SO	SO/CH	1FO	1FO/CH	2FO	2FO/CH	20FO	20FO/CH
Ingredients, g								
Safflower oil	8	8	7.6	7.6	7.2	7.2	-	-
Fish oil	-	-	0.4	0.4	0.8	0.8	8	8
Casein	20	20	20	20	20	20	20	20
Sucrose	10.37	10.37	10.37	10.37	10.37	10.37	10.37	10.37
β-starch	51.83	51.83	51.83	51.83	51.83	51.83	51.83	51.83
Vitamin mix *	1	1	1	1	1	1	1	1
Mineral mix	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Cellulose powder	5	5	5	5	5	5	5	5
L-cystin	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Tert-butyl hydroquinone	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016	0.0016
Cholesterol	-	2	-	2	-	2	-	2
Total	100.00	102.00	100.00	102.00	100.00	102.00	100.00	102.00
Energy (kcal/100g)	374.02	366.68	374.02	366.68	374.02	366.68	374.02	366.68
Fat Energy ratio (%)	19.70	19.70	19.70	19.70	19.70	19.70	19.70	19.70

*Vitamin mix and mineral mix were based on the AIN-93G formation. Vitamin mix substituted 0.25% sucrose for choline bitartrate. SO; safflower oil, CH; cholesterol, FO; fish oil.

第1節 体重、体組成、血漿および肝臓脂質レベル

8週間飼育により、全ての群で最終体重が増加したが、群間における大きな差はなかった。また、肝臓重量も脂肪源やコレステロール負荷による大きな影響はみられなかった。白色脂肪組織は、SO群と比較し20FO群で減少する傾向がみられた(Table 9)。

Table 9. Body and tissue weight of 16week-old female mice

Parameter	SO	SO/CH	1FO	1FO/CH	2FO	2FO/CH	20FO	20FO/CH
Initial body weight (g)	16.70 ± 1.11	16.68 ± 0.93	16.66 ± 0.82	16.66 ± 0.78	16.68 ± 0.70	16.66 ± 0.70	16.68 ± 0.65	16.76 ± 0.66
Final body weight (g)	21.05 ± 1.65 ^{ab}	22.14 ± 2.22 ^{ab}	22.06 ± 2.05 ^{ab}	22.52 ± 1.19 ^{ab}	22.60 ± 2.06 ^a	22.35 ± 1.30 ^{ab}	20.51 ± 1.12 ^b	22.20 ± 0.52 ^{ab}
Liver weight (g)	0.92 ± 0.12 ^{ab}	1.28 ± 0.13 ^a	1.11 ± 0.48 ^{ab}	1.09 ± 0.09 ^{ab}	0.90 ± 0.13 ^{ab}	0.96 ± 0.10 ^{ab}	0.85 ± 0.06 ^b	1.00 ± 0.06 ^{ab}
Liver weight/body weight (%)	4.38 ± 0.42 ^{bc}	5.64 ± 0.32 ^a	4.96 ± 1.91 ^{ab}	4.83 ± 0.19 ^{ac}	3.98 ± 0.28 ^c	4.29 ± 0.19 ^{bc}	4.13 ± 0.31 ^{bc}	4.51 ± 0.20 ^{bc}
White adipose tissue weight (g)	0.32 ± 0.17 ^{ab}	0.46 ± 0.22 ^a	0.52 ± 0.29 ^a	0.51 ± 0.11 ^a	0.49 ± 0.09 ^a	0.45 ± 0.13 ^a	0.20 ± 0.10 ^b	0.41 ± 0.16 ^{ab}

Values represent means ± S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the p<0.05 level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

血漿トリグリセリド値は、群間で大きな差は見られなかった(Fig. 9B)。血漿総コレステロール値は、どの群でもコレステロール負荷によって増加したが、低用量魚油群である1FO、2FO群では脂肪源の違いによる有意な変化はみられなかった。20FO群ではSO群と比較し、有意に減少した(Fig. 9C)。HDLコレステロール値は、SO群と比較し、2FOおよび20FO群で有意に減少し、コレステロール負荷によって増加した(Fig. 9D)。

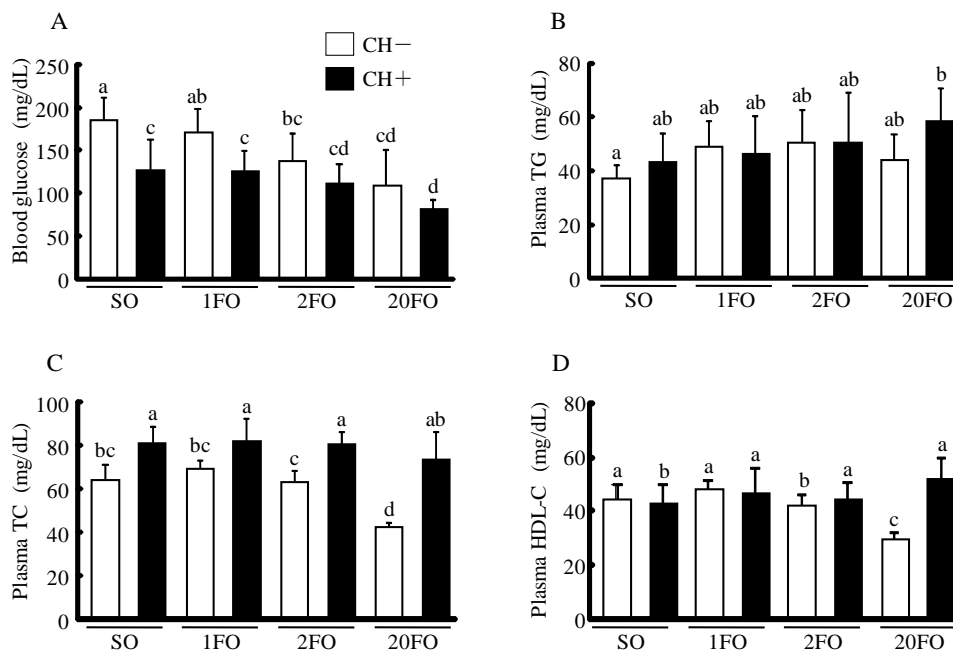


Fig. 9. Blood glucose and plasma lipid levels in 16-week-old female mice.

Blood glucose (A), plasma triglyceride (TG) (B), plasma total cholesterol (TC) (C), and plasma high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) (D) in mice fed SO, SO/CH, 1FO, 1FO/CH, 2FO, 2FO/CH, 20FO and 20FO/CH for 8 weeks. Mice were fasted for 3 hours prior to blood sampling. Values represent means ± S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the p<0.05 level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

肝臓の外見は、SO 群と比較し SO/CH 群では表面の色が白く変色しており、組織標本においても多くの脂肪滴が観察された。また、SO/CH 群と比較して、1FO/CH 群ではわずかに肝臓全体の変色が抑えられ、2FO/CH 群ではさらに抑えられており、脂肪滴も明らかに減少していた (Fig. 10 A、B)。肝臓脂質値を Fig. 11 に示した。肝臓トリグリセリド値は、低用量魚油群で顕著に増加したが、SO/CH 群と比較して 1FO/CH 群は変化が見られなかったが、2FO/CH 群では有意に減少した。肝臓総コレステロール値は、低用量魚油群である 1FO、2FO 群では、コレステロール負荷によって著しく増加した。しかし、SO/CH 群と比較して、魚油とコレステロール同時摂取群である 1FO/CH、2FO/CH 群ではともに有意に減少した。高用量魚油群である 20FO 群と 20FO/CH 群においては、第 1 章と同様に SO 群と変わらず正常な赤褐色であり、脂肪滴も観察されなかった。また、肝臓総コレステロール値、トリグリセリド値ともにコレステロール負荷による有意な増加はみられなかった。

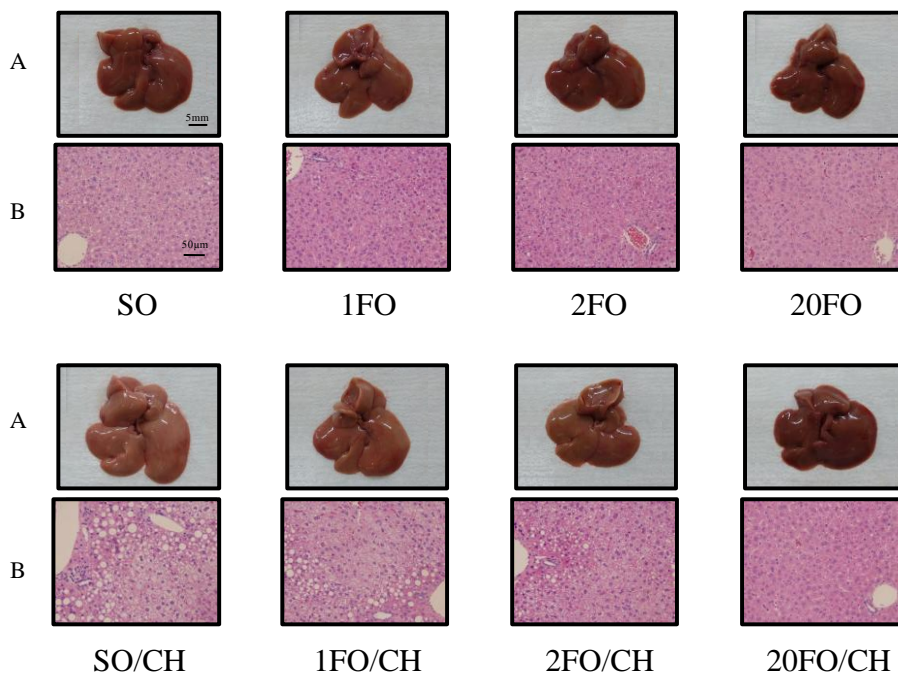


Fig. 10. Liver appearance, tissue histology and lipid levels of 16-week-old female mice. Liver appearance (A), H&E-stained liver sections (B) in mice fed SO, SO/CH, 1FO, 1FO/CH, 2FO, 2FO/CH, 20FO and 20FO/CH for 8 weeks.

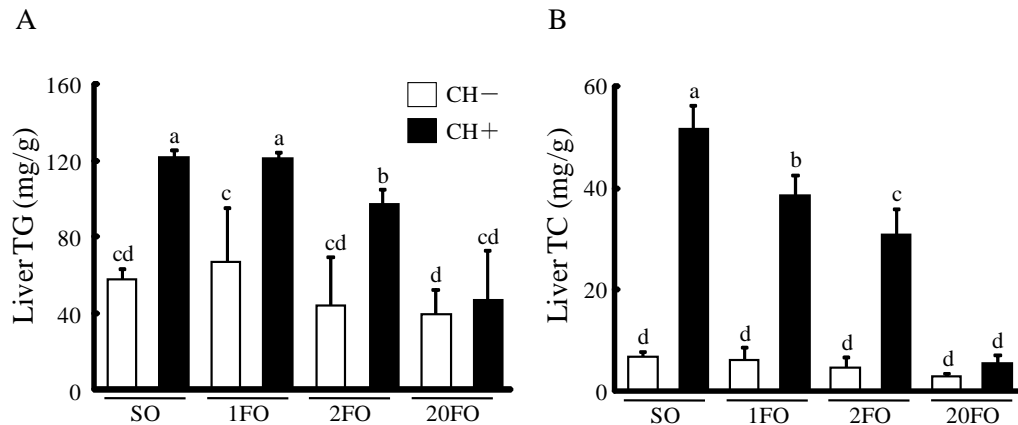


Fig. 11. Hepatic lipid levels of 16-week-old female mice. Total cholesterol (TC) (A), and triglycerides (TG) (B) in mice fed SO, SO/CH, 1FO, 1FO/CH, 2FO, 2FO/CH, 20FO and 20FO/CH for 8 weeks. Values represent means \pm S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the $p < 0.05$ level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

第2節 肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現

魚油およびコレステロールの摂取が、肝臓での脂質代謝に与える影響を検討するため、肝臓中の脂質代謝に関連する遺伝子発現を調べ、Table 10 に示した。

低用量魚油群では、SREBP-1c およびその標的遺伝子である FAS および SCD-1 mRNA レベルは、脂肪源の違いによる変化はなかった。また、FAS mRNA レベルはコレステロール負荷により減少したが、SCD-1 mRNA レベルは、コレステロール負荷群による影響はみられなかった。これらの遺伝子レベルは、第1章と同様に、20FO 群においては、SO 群と比較しコレステロールの有無に関わらず有意に減少した。

PPAR α およびその標的遺伝子である AOX mRNA レベルは、SO 群と比較し 2FO、20FO 群では有意に増加したが、1FO 群では有意な変化はみられなかった。UCP-2 mRNA レベルは、SO 群と比較し 20FO 群で有意に増加し、また、どの群でもコレステロール負荷により減少傾向がみられたが、低用量魚油群では大きな影響はみられなかった。

SREBP-2 mRNA レベルは、SO 群と比較し、2FO および 20FO 群で減少した。また、どの群でもコレステロール負荷による減少がみられた。HMG-CoA 還元酵素 mRNA レベルは、低用量魚油群では、脂肪源の違いによる変化はみられなかったが、コレステロール負荷では減少した。高用量魚油群では、SO 群と比較し有意に減少したが、コレステロール負荷によるさらなる減少はみられなかった。

CYP7A1 mRNA レベルは、コレステロール負荷により増加傾向がみられたが、脂肪源の

違いによる大きな差はみられなかった。一方、CYP8B1 mRNA レベルは低用量魚油群間で有意な差はなかったが、高用量魚油群では SO 群と比較し有意に増加した。ABCG5 および G8 mRNA 発現は、全ての群でコレステロール負荷によって有意に増加した。

Table 10. Expression of lipid metabolism-related genes in the liver.

	SO	SO/CH	1FO	1FO/CH	2FO	2FO/CH	20FO	20FO/CH
SREBPs								
SREBP-1c	1.00 ± 0.26 ^{bc}	1.29 ± 0.38 ^{ab}	0.97 ± 0.29 ^{bc}	1.68 ± 0.45 ^a	0.93 ± 0.04 ^b	1.28 ± 0.66 ^{ab}	0.41 ± 0.45 ^{cd}	0.40 ± 0.13 ^c
SREBP-2	1.00 ± 0.12 ^a	0.48 ± 0.05 ^{ca}	0.96 ± 0.18 ^a	0.48 ± 0.05 ^c	0.80 ± 0.20 ^b	0.44 ± 0.03 ^c	0.79 ± 0.15 ^b	0.40 ± 0.05 ^c
Fatty acid biosynthesis								
FAS	1.00 ± 0.47 ^a	0.46 ± 0.07 ^{bc}	0.61 ± 0.30 ^{ab}	0.41 ± 0.17 ^{bc}	0.90 ± 0.58 ^a	0.35 ± 0.06 ^{bc}	0.14 ± 0.02 ^c	0.17 ± 0.11 ^c
SCD-1	1.00 ± 0.40 ^a	1.21 ± 0.34 ^a	0.97 ± 0.35 ^a	1.20 ± 0.18 ^a	0.97 ± 0.41 ^a	1.14 ± 0.16 ^a	0.11 ± 0.06 ^b	0.35 ± 0.17 ^b
Cholesterol homeostasis								
HMG-CoA Reductase	1.00 ± 0.43 ^a	0.37 ± 0.08 ^b	1.00 ± 0.44 ^a	0.45 ± 0.11 ^b	0.93 ± 0.47 ^a	0.45 ± 0.07 ^b	0.40 ± 0.11 ^b	0.30 ± 0.08 ^b
ABCG5	1.00 ± 0.30 ^b	1.74 ± 0.60 ^a	1.07 ± 0.24 ^b	2.09 ± 0.50 ^a	1.10 ± 0.15 ^b	1.94 ± 0.65 ^a	1.10 ± 0.23 ^b	1.16 ± 0.29 ^b
ABCG8	1.00 ± 0.27 ^c	1.43 ± 0.28 ^{ab}	1.07 ± 0.40 ^{bc}	1.67 ± 0.24 ^a	1.01 ± 0.22 ^c	1.66 ± 0.34 ^a	0.98 ± 0.22 ^c	1.00 ± 0.28 ^c
Fatty acid β-oxidation								
PPARα	1.00 ± 0.19 ^d	1.10 ± 0.33 ^{cd}	1.17 ± 0.19 ^{cd}	1.46 ± 0.31 ^{bc}	1.44 ± 0.41 ^{bc}	1.64 ± 0.06 ^{ab}	1.58 ± 0.45 ^a	1.64 ± 0.13 ^a
AOX	1.00 ± 0.21 ^d	1.20 ± 0.19 ^{bd}	1.07 ± 0.19 ^{cd}	1.40 ± 0.25 ^b	1.34 ± 0.19 ^{bc}	1.49 ± 0.09 ^b	1.86 ± 0.37 ^a	2.07 ± 0.26 ^a
UCP-2	1.00 ± 0.16 ^{bcd}	0.86 ± 0.14 ^{cd}	1.20 ± 0.34 ^{bc}	0.70 ± 0.08 ^e	1.21 ± 0.22 ^b	0.80 ± 0.17 ^{ce}	1.71 ± 0.11 ^a	1.57 ± 0.29 ^a
Bile acid biosynthesis								
CYP7A1	1.00 ± 0.95 ^{bc}	1.71 ± 0.82 ^{ab}	1.28 ± 1.03 ^{bc}	1.29 ± 1.03 ^{bc}	0.80 ± 0.42 ^{bc}	2.30 ± 1.26 ^a	0.35 ± 0.26 ^c	1.07 ± 0.18 ^{bc}
CYP8B1	1.00 ± 0.38 ^d	1.78 ± 0.45 ^b	1.63 ± 0.51 ^{bc}	1.10 ± 0.26 ^{cd}	1.22 ± 0.53 ^{cd}	1.57 ± 0.12 ^{bc}	3.20 ± 0.48 ^a	3.33 ± 0.37 ^a

The mRNA expression levels in liver of mice fed SO, SO/CH, 1FO, 1FO/CH, 2FO, 2FO/CH, 20FO, and 20FO/CH for 8 weeks. Values represent means ± S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the p<0.05 level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

第3節 体内酸化ストレス度

魚油およびコレステロールの摂取が、体内酸化ストレス度に与える影響を検討するため、血漿中の脂質ヒドロキシペルオキシドを評価する d-ROMs テストを行った。

血漿中 d-ROMs 値は、実験食開始 1 週間、4 週間、8 週間後いずれも、魚油やコレステロール負荷による大きな影響はみられなかった。経時的な変化をみると、どの群でも実験食開始 4 週間後に最も高い値を示し、8 週間目ではさらなる増加はみられなかった(Fig. 12A, B)。

血漿中の過酸化脂質含量は、チオバルビタール(TBA)法を用いて測定した。血漿中 TBARS 値は、SO 群と比較し 20FO 群で有意に減少したが、低濃度魚油やコレステロール負荷による大きな変化はなかった(Fig.12C)。

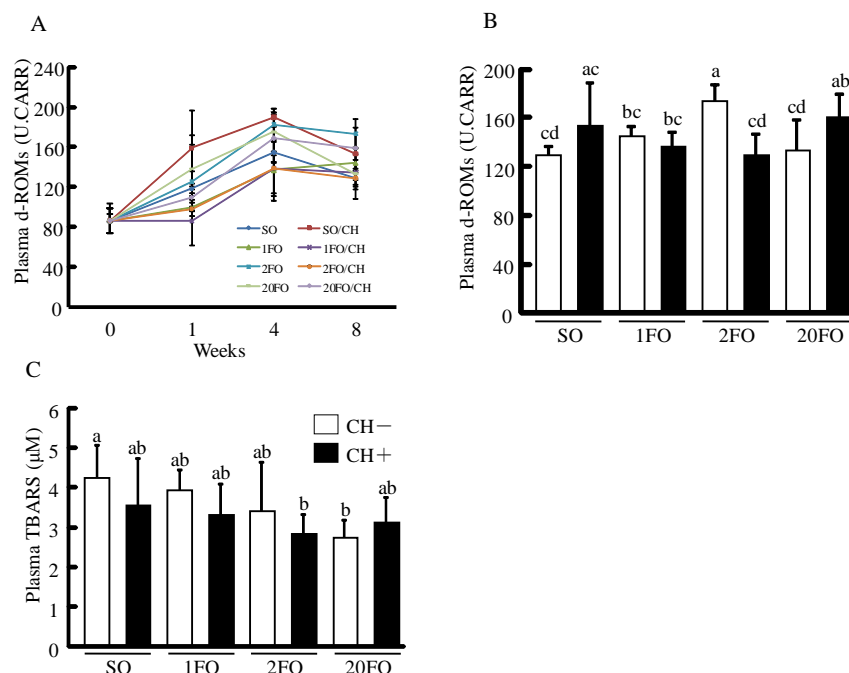


Fig. 12. Plasma d-ROMs and TBARS levels in female mice. Plasma d-ROMs for 0,1,4,8 weeks of experimental diets fed (A), plasma d-ROMs for 8 weeks of experimental diets fed (B) and plasma TBARS for 8 weeks of experimental diets fed. (C). Values represent means \pm S.D. (n=4-5). Means with different letters are different at the $p < 0.05$ level by Fisher's protected least significant difference (PLSD) test.

第4節 小括および考察

本研究では、より低用量の魚油による脂質代謝改善作用と食毒性の視点から生体内の酸化ストレスへの影響について検討するため、C57BL/6 雌マウスに脂肪エネルギー比率1%、2%、20%の魚油と2%(w/w)コレステロールを含む実験食を与え8週間飼育した。体重および脂肪組織重量は1FO、2FO群ではSO群と比較し有意な差はみられなかったが、20FO群では減少した。しかし、肝臓重量は各群大きな差はなかった。

前章までの結果と同様に、魚油またはコレステロール摂取は、肝臓重量に影響を与えなかったが、肝臓外見や組織標本の観察から、SO/CH群には多くの脂質が蓄積した。肝臓脂質値においても、肝臓トリグリセリド値、総コレステロール値は、サフラワー油群ではコレステロール負荷によって著しく有意に増加した。SO/CH群と比較して、魚油とコレステロール同時摂取群である1FO/CH、2FO/CH群では、肝臓総コレステロール値は、いずれも有意に減少したが、肝臓トリグリセリド値は、SO/CH群と比較して1FO/CH群では有意な減少はみられず、2FO/CH群では有意に減少した。また、20FO/CH群においては、第1章での結

果と一致し、肝臓トリグリセリド値、総コレステロール値ともに SO 群と同等なレベルにまで減少した。以上のことから、コレステロール食による肝臓への脂質蓄積を抑制する魚油の作用は、2%エネルギーでは十分な効果が得られるが、1%エネルギーでは用量が低く、十分ではなかったと考えられる。

これまで魚油の摂取が肝臓への脂質代謝を改善することを示してきたが、いずれも魚油を毎日摂取した場合の結果である。しかし、多くの人は、毎日魚を摂取できるとは限らない。また、エネルギーおよび各栄養素の摂取基準を示した食事摂取基準では、習慣的な摂取量の基準が示されており、おおむね 1 ヶ月程度の期間での摂取量の基準と考えられている。以上のことから、今後は、摂取量を一定とし、摂取頻度の違いによる魚油の作用を検討する必要があると考える。

一方、魚油に含まれる多価不飽和脂肪酸である EPA や DHA は非常に酸化されやすく、過酸化脂質やフリーラジカルを産生しやすい性質を持っており、魚油または EPA や DHA を用いた、いくつかの研究で血中や肝臓中で過酸化脂質値が増加することが報告されている^{75,88,89}。また、Tsuduki らは、老化促進マウス(SAMP8)に長期間魚油を摂取させると酸化ストレスが亢進して細胞機能化が低下し組織の機能不全を引き起こすことで、老化が促進され、寿命が短くなると報告した⁹⁰。しかし、本実験において、血漿中の過酸化脂質値の指標である TBARS 値は、魚油摂取による増加はみられず、むしろ 20FO 群では SO 群と比較し減少した。酸化ストレス度の指標である血漿中 d-ROMs 値も実験食での飼育開始後、どの段階でも群間で大きな差はみられなかった。魚油摂取によって、体内の酸化ストレスが亢進するという報告がある一方で、食餌への EPA や DHA の添加は、抗酸化酵素である superoxide dismutase (SOD)や catalase (CAT)の活性化を亢進させることや^{90,92}、フリーラジカルによるダメージから細胞を保護することで過酸化脂質生成を減少させるという報告もある^{78,79,93}。さらに、EPA や DHA の量が多い場合には過酸化脂質量が増加するが、少ない場合には増加しないという報告もある⁷⁷。本実験では、血漿中の TBARS 値や酸化ストレス度が魚油の摂取量に関わらず増加しなかったことから、魚油の摂取量が脂肪エネルギー比率 1~20%においては、血中の過酸化脂質産生や酸化ストレスに影響を与えないと考えられる。その理由として、魚油の摂取量が少ないことや魚油摂取によって抗酸化酵素活性が増加した可能性が示唆されるが、今後、その詳細について検討する必要がある。

コレステロールや低用量の魚油が、肝臓中の脂質代謝に関連する遺伝子発現に与える影響を調べた結果、コレステロール合成に関連する HMG-CoA 還元酵素 mRNA レベルは、転写因子の SREBP-2 とともに、コレステロール負荷により減少する傾向がみられた。これは、コレステロール摂取時に体内のコレステロール値を減少させ、体内コレステロールの恒常性を維持する機構が働いたためだと考えられる。脂肪酸合成に関連する FAS および SCD-1 mRNA レベルは、魚油のエネルギー比率が 1%あるいは 2%の群では、サフラワー油群と大きな差はみられなかった。また、脂肪酸酸化に関連する AOX および UCP-2 mRNA レベル

も低用量の場合は魚油摂取による大きな影響はみられなかった。一方、魚油のエネルギー比率が 20%の群では、第 1 章と同様にコレステロールの有無に関わらず脂肪酸合成系遺伝子発現は減少し、酸化系の遺伝子発現は有意に亢進した。以上の結果から、食餌中の魚油の量がエネルギー比率で 1%または 2%と低い場合は、肝臓の脂質代謝に関連する遺伝子発現には大きな影響を与えないことが示唆された。

本章では、コレステロール食による肝臓への脂質蓄積や酸化ストレスに対する低用量の魚油の作用を検討した。その結果、脂肪エネルギー比率 2%では肝臓の脂質蓄積抑制作用を認めたが、脂肪エネルギー比率 1%では十分ではないことを示唆した。また、酸化ストレス度の検討から、魚油の摂取エネルギー比率が 2~20%の範囲では、生体内の酸化ストレスの上昇による有害作用を受けずに、脂質代謝改善に有効な効果が得られることを示した。

総 括

本研究では、コレステロールの食毒性である高コレステロール食の摂取による肝臓への脂質蓄積に対する魚油の作用について検討した。実験動物は、脂質代謝に対する応答性が高い C57BL/6J マウスを用いた。第 1 章では、高コレステロール食による肝臓脂質蓄積に及ぼす高用量の魚油の影響について、肝臓における脂質代謝を中心に調べた。第 2 章では、高コレステロール食による肝臓への脂質蓄積に対する低用量の魚油の影響を肝臓と小腸において調べた。第 3 章では、さらに低用量の魚油が高コレステロールによる肝臓脂質蓄積に対する影響に加え、魚油の食毒性と考えられる生体内での酸化ストレスに与える影響を調べた。

本研究の結果から、C57BL/6J マウスに高コレステロール食を 8 週間与えると、肝臓に多量に脂質が蓄積するが、脂肪エネルギー比率 20%あるいは 50%の高用量の魚油のみならず、2%エネルギーと低用量の魚油摂取でも、コレステロールの有害作用のひとつである肝臓への脂質蓄積を抑制できることを明らかにした。

脂肪エネルギー比率 20%または 50%の魚油摂取では、肝臓における脂肪酸合成関連遺伝子である FAS および SCD-1 mRNA レベルは減少した。一方、脂肪酸酸化関連遺伝子である AOX および UCP-2 mRNA レベルは高用量魚油摂取で増加した。また、コレステロール合成に関連する HMG-CoA 還元酵素および胆管へのコレステロール排泄に関連する ABCG5 および G8 の mRNA レベルも高用量魚油摂取によって変化がみられ、コレステロール合成関連遺伝子は減少し、排泄関連遺伝子は増加した。これらの結果から、高用量の魚油は脂肪酸およびコレステロールの合成を抑制するとともに、脂肪酸酸化や胆汁中へのコレステロールの排泄を亢進することで肝臓中の脂質を減少させると考えられる。

脂肪源をサフラワー油とした場合は、コレステロール負荷により、SREBPs 標的遺伝子の発現は減少した。脂肪源が魚油の場合はコレステロールを負荷により、SREBPs の標的遺伝子がさらに減少し、肝臓への脂肪蓄積を抑制された。食餌にコレステロールを負荷すると、細胞内コレステロール濃度が上昇し、SREBPs が負のフィードバック制御を受け、その標的遺伝子の発現とともに減少し、脂質合成が減少すると考えられるが、魚油とコレステロールを同時に摂取した場合には、SREBPs の負のフィードバック制御に加え、魚油による脂質代謝調節作用がはたらき、体内の脂質を減少させることが示唆された。

一方、脂肪エネルギー比が 2%と低用量の魚油では、FAS および SCD-1 mRNA レベルは大きな変化はみられず、脂肪酸酸化関連遺伝子である AOX および UCP-2 mRNA レベルは、魚油摂取によって増加した。以上の結果から、魚油の用量が多い場合は、脂肪酸の合成抑制と異化亢進が組み合わさって作用するが、魚油の用量が少ない場合は、おもに脂肪酸の異化を亢進することによって肝臓への脂質蓄積に対する抑制効果が示されると考えられる。本実験では、肝臓中の AOX 遺伝子発現が増加したことから、特に、ペルオキシソームでの β 酸

化が亢進されたことが示唆されたが、魚油摂取によって、ペルオキシソームでの β 酸化に加え、ミトコンドリアでの β 酸化が亢進するという報告があり^{94,95)}、また、第 1 章でも魚油摂取によって、脂肪酸のミトコンドリアへの取り込みを制御している CPT-1 遺伝子発現が増加していたことからミトコンドリアでの β 酸化が亢進した可能性も考えられる。また、ヒトとマウスではペルオキシソームとミトコンドリアでの β 酸化の寄与率が異なることから、魚油の作用をヒトの健康づくりに応用するためには、この点を考慮する必要がある。また、魚油摂取によって、糞中のコレステロール排泄が増加したことから、そのことも高コレステロール食による肝臓への脂質蓄積抑制効果の一因となっていることが考えられた。

魚油摂取による生体内の酸化ストレスは、低用量のみならず脂肪エネルギー比 20% の高用量の場合でも増加しなかったことから、脂肪エネルギー比率が 2~20% の範囲では、生体内の酸化ストレスに影響を与えずに脂質代謝改善に有効な効果が得られることが示された。

本研究の結果から、日常の食事において積極的に魚油を摂取することは、現在世界的に問題となっている脂肪肝の予防に有効であることを示した。特に、コレステロールの過剰摂取によって生じる脂肪肝を予防するために、魚油摂取が効果的であることを明らかにした。また、日常的に摂取可能な量の魚油摂取でも、肝臓脂質蓄積が抑制されることが明らかとなったことから、本研究の成果は通常の食事からの魚の摂取で、十分に脂肪肝の予防が可能であることを示すエビデンスになりうるものと考えられる。

謝 辞

本研究は、著者が城西大学大学院薬学研究科博士後期課程に在学中に同大学薬学部 松本明世教授の御指導、御鞭撻のもとに行われたことを記し、心から深く感謝致します。

学位論文審査において、貴重な御指導と御助言を頂いた城西大学薬学部 荻原政彦教授ならびに城西大学薬学部 加園恵三教授に感謝の意を表します。

また、本研究を進めるにあたり、終始御指導、御助言を賜りました城西大学薬学部 金賢珠講師に深く感謝致します。さらに、当講座において常日頃有益な御指導、御助言、御協力を頂きました城西大学薬学部 千葉大成助教に感謝致します。

当講座の卒業生である荒井健氏、清水紗耶さん、原田美貴さんには、在学中は日頃より有益な御討論御助言および実験遂行の手助けを賜り心からの感謝を申し上げます。

本研究において魚油を提供していただいた日油株式会社様に心から感謝申し上げます。

最後となりましたが、当講座でともに研究し助言等を下さいました皆様に深く感謝の意を表しますと共に、本研究は分子栄養学講座の諸氏による御協力、御助言、御心遣いに支えられたものであることを記し、厚く御礼申し上げます。

実験の部

実験動物および飼育条件

実験動物は 8 週齢 C57BL/6 雌マウス((株)東京実験動物)を用いた。飼育は、12 時間ごとの明暗サイクル(明期 7:00-19:00)、室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ の環境下、城西大学生命科学研究センターで行った。食餌、飲料水は自由摂取とし、毎日 10:00 に飼料交換を行い、残量から摂食量を算出した。実験食開始前の 1 週間は検疫期間を含む予備飼育とし、その後実験食により飼育した。

なお、本研究は科学的観点、動物愛護及び環境保全の観点に並び動物実験等を行う教員・学生等の安全確保の観点から、動物実験等の実施方法を定めた「城西大学動物実験規定」に従い、動物実験委員会による研究計画の審査に基づく学長承認を得て実施した。

解剖

飼育終了後の解剖は 3 時間絶食させた後、ペントバルビタールナトリウム注射液((株)大日本住友製薬)を腹腔内注射することで麻酔を施し、小動物実験用 X 線 CT 装置(La theta LCT100、(株)アロカ)を用い、第二腰椎から第四腰椎までを 2mm 間隔で測定し内臓脂肪および皮下脂肪を測定した。体重測定後、尾先から採血し、血糖測定機器(アセンシア ブリーズ、(株)バイエル メディカル)により、血糖値を測定した。開腹した後、下大静脈より採血し、肝臓を摘出するとともに、子宮周囲白色脂肪組織および肩甲骨周囲褐色脂肪組織、空腸および回腸を摘出して各々の重量を測定した。また、摘出した肝臓は、肝臓の状態を観察するため、デジタルカメラでその形態を撮影した。摘出した肝臓の一部は、10% 中性緩衝ホルマリン液((株)和光純薬工業)で固定し、(株)江東微生物研究所に Hematoxylin eosin 染色を依頼し、病理組織学的検討を行った。摘出した小腸は、上部 3cm を十二指腸とし、残りを 2 等分して、前半を空腸、後半を回腸として分け、本実験では空腸部分を使用した。EDTA-2Na で採取した血液は遠心(4°C 、3000rpm、10 分間)処理により血漿を分離し、解析時まで -80°C で冷凍保存した。摘出した臓器は液体窒素で凍結後、 -80°C で冷凍保存した。

実験飼料

実験試料の原材料であるカゼイン、シュクロース、 β スターチ、AIN-93G ミネラル混合、AIN-93G ビタミン混合(コリン添加)、セルロースパウダーは、(株)オリエンタル酵母工業から購入し、L-シスチン、*t*-ブチルヒドロキノン、コレステロールは(株)和光純薬工業から購入した。サフラワー油は、(株)紅花食品から購入し、魚油は(株)日油から提供されたマグロ由来の魚油を用いた。これらの材料を用いて、各章に示した飼料組成に基づき実験に用いる試料を調製した。また、各実験で使用した油脂の脂肪酸組成は Table 11 に示した。

Table 11. Fatty acid composition (%)

	SO	1FO	2FO	20FO, 50FO
14:0	-	0.15	0.3	3
16:0	4.4	5.09	5.78	18.2
16:1	0.2	0.4	0.6	4.2
18:0	2.1	2.24	2.38	4.9
18:1	77.5	74.57	71.63	18.8
18:2	14.2	13.56	12.91	1.3
18:3	0.4	0.42	0.44	0.8
20:4	0.5	0.58	0.65	2
20:5	-	0.34	0.68	6.8
22:6	-	1.14	2.28	22.8
other	0.7	1.525	2.35	17.2

血中パラメータ測定

血漿トリグリセリド、総コレステロールおよびHDLコレステロール測定はトリグリセリドE-テストワコー、コレステロールE-テストワコー、HDL-コレステロールE-テストワコー((株)和光純薬工業)を用いた。チオバルビツール酸 (TBA) 反応陽性物質 (TBARS) は、TBARS Assay Kit (Cayman Chemical)を用いた。

肝臓中脂質抽出・測定

13mL チューブに、0.1M KCL:メタノール(1:2.5)混液を 1.75mL 分注し、肝臓組織を約 0.1g 入れ、ホモジナイズした。そこにクロロホルムを 1.375mL 加え攪拌し、さらに 0.1M KCL:メタノール(1:2.5)混液を 0.75mL 加え攪拌後、室温で 3 時間静置した。その後、遠心分離(4℃、

3000rpm、15 分間)し、下層をスピッツ管に回収した。残った上層に再び、0.1M KCL:メタノール(1:2.5)混液を 0.875mL、クロロホルム 1.425mL 加え、良く攪拌した後 10 分間室温で静置した。その後、遠心分離(4°C、3000rpm、15 分間)し、下層を先ほどのスピッツ管に回収した。このスピッツ管に超純水を 0.25mL 加え、良く攪拌し、エマルジョン状態にした。10 分間の室温静置後、遠心分離(4°C、3000rpm、15 分間)し、下層を褐色瓶に回収し、これを肝臓脂質抽出液とし、冷暗条件下で保存した。

肝臓トリグリセリドおよび総コレステロール値の測定は、マイクロチューブに肝臓脂質抽出液を 0.05mL 分注し、蒸発乾固させた後、t-ブチルアルコール：トライトン X-100：メタノール混液(3:1:1)を 0.05mL 加え、良く攪拌したものを試料とし、血中脂質と同様に、トリグリセリドE-テストワコーおよびコレステロールE-テストワコー((株)和光純薬工業)を用いた。

肝臓および空腸の mRNA 量の測定

RNA 抽出

13mL チューブに Trizol (Invitrogen Co.)液を 1mL 分注し、肝臓組織約 0.05g あるいは空腸組織 0.1g を加え、ホモジナイズした。そのホモジネイトを室温で 5 分間静置した後、マイクロチューブに全量移し、クロロホルムを 200 μ L 加え、攪拌後に遠心(4°C、15000rpm、15 分間)した。上清を新しいマイクロチューブに移し、イソプロパノールを 650 μ L 加え、攪拌後に遠心(4°C、15000rpm、15 分間)した。上清を除き、RNA ペレットを室温でドライアップし、DEPC(Diethylpyrocarbonate)処理水を 50 μ L 加え-80°Cで保存した。

Quantitative Real-time PCR

Quantitative Real-time PCR 測定は、ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems Co.)を用いて行い、50°C、30 min、1 cycle、95°C、15 min、1 cycle、94°C、15 sec、55°C、30 sec、72°C、1 min、40 cycle の条件で増幅を行った。プライマーは Table 12 に示したセットを用いた。また、ハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を内部標準として使用した。

Table 12. Primer for RT-PCR amplification of indicated genes

Gene	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
SREBP-1c	GGAGCCATGGATTGCACATT	GGCCCGGAAGTCACTGT
SREBP-2	GCGTTCTGGAGACCATGGA	ACAAAGTTGCTCTGAAAACAAATCA
Insig-1	TCACAGTGA CTGAGCTTCAGCA	TCATCTTCATCACACCCAGGAC
FAS	TCACCACTGTGGGCTCTGCAGAGAAGCGAG	TGTCATTGGCCTCCTCAAAAAGGGCGTCCA
SCD-1	CCGGAGACCCCTTAGATCGA	TAGCCTGTAAAAGATTTCTGCAAACC
HMG-CoA Reductase	CTTGTGGAATGCCTTGTGATTG	AGCCGAAGCAGCACATGAT
LDL-Receptor	AGGCTGTGGGCTCCATAGG	TGCGGTCCAGGGTCATCT
ABCG5	TCTCCGCGTCCAGAACAAC	CATTGAGCATGCCGGTGTAT
ABCG8	CCCTCCGATTGCTTCTTTCAG	CTGAGAAATGCCCCAGATAAA
PPAR α	GTGGCTGCTATAATTTGCTGTG	GAAGGTGTCATCTGGATGGTT
AOX	TCAACAGCCCAACTGTGACTTCCATTA	TCAGGTAGCCATTATCCATCTCTTCA
UCP-2	GTTCCTCTGTCTCGTCTTGC	GGCCTTGAACCAACCA
CPT-1	CCAGGCTACAGTGGGACATT	GAAGTGGCCATGTCCTTGT
CYP7A1	CTGTGTTCACTTTCTGAAGCCATG	CCCAGGCATTGCTCTTTGAT
CYP8B1	TTCGACTTCAAGCTGGTCTGA	CAAAGCCCCAGCGCCT
ABCA1	ACCAGCTTCCATCCTCCTTG	GGCCACATCCACAAGTGTCT
NPC1L1	ATCCTCATCCTGGGCTTTGC	GCAAGGTGATCAGGAGGTTGA
GAPDH	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	CCTGCTTACCACCTTCTTGAT

Western Blotting

Shengらの方法に従って⁹⁶⁾、肝臓から膜タンパク質を抽出し、SDS-PAGEを行った。SCD-1タンパク質は、ヤギ抗SCD-1抗体(S-15,SANTA CRUZ)を一次抗体として、HRP標識抗ヤギIgG抗体を二次抗体として用い、CPT-1タンパク質は、ラビット抗CPT-1(H-20,SANTA CRUZ)を一次抗体として、HRP標識抗ラビットIgG抗体を二次抗体として用いWestern Blottingを行った。

血漿中酸化ストレス度の測定

酸化ストレス度は、d-ROMs(Reactive Oxygen Metabolites)キットを用いて、血中のヒドロキシペルオキシド値を指標として測定した。実験食を与える直前、実験食開始1週間後、4週間後、8週間後に、それぞれマウスの尾静脈から血液をヘパリンで採取し、遠心(4°C、3000rpm、10分間)処理により血漿を得た。得られた血漿は、d-ROMsテストキットを用いて、フリーラジカル解析装置(FREE : Free Radical Elective Evaluator)にて測定した。

統計処理

数値は全て平均値±標準偏差にて表した。統計解析には、statview5.0 を用い、一元配置分散分析(ANOVA)を行った。Fisher's protected least significant difference (PLSD)test で比較検定を行い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

引用文献

- 1) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.
- 2) Stokes J 3rd, Kannel WB, Wolf PA, Cupples LA, D'Agostino RB. The relative importance of selected risk factors for various manifestations of cardiovascular disease among men and women from 35 to 64 years old: 30 years of follow-up in the Framingham Study. *Circulation*. 1987;75:65-73.
- 3) Kodama K, Sasaki H, Shimizu Y. Trend of coronary heart disease and its relationship to risk factors in a Japanese population: a 26-year follow-up, Hiroshima/Nagasaki study. *Circ J*. 1990;54:414-421.
- 4) Mabuchi H, Kita T, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Nakaya N, Oikawa S, Saito Y, Sasaki J, Shimamoto K, Itakura H; J-LIT Study Group. Japan Lipid Intervention Trial. Large scale cohort study of the relationship between serum cholesterol concentration and coronary events with low-dose simvastatin therapy in Japanese patients with hypercholesterolemia and coronary heart disease- secondary prevention cohort study of the Japan lipid intervention trial (J-LIT). *Circ J*. 2002;66:1096-1100.
- 5) Okamura T, Kadowaki T, Hayakawa T, Kita Y, Okayama A, Ueshima H; Nippon Data80 Research Group. What cause of mortality can we predict by cholesterol screening in the Japanese general population? *J Intern Med*. 2003;253:169-180.
- 6) Dietschy JM, Siperstein MD. Effect of cholesterol feeding and fasting on sterol synthesis in seventeen tissues of the rat. *J Lipid Res*. 1967;97-104.
- 7) Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell*. 2000;6:517-526.
- 8) Chiang JY. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol*. 2004;40:539-551.
- 9) Chiang JY. Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev*. 2002;23:443-463.
- 10) Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:16237-16242.

- 11) Davis HR Jr, Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP, Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem.* 2004;279:33586-33592.
- 12) Altmann SW, Davis HR Jr, LJ Zhu, LM Yao X, Hoos, G Tetzloff, SP Iyer, M Maguire, A Golovko, M Zeng, L Wang, N Murgolo, MP Graziano, Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science.* 2004;303:1201-1204.
- 13) Davis HR Jr, Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochim Biophys Acta.* 2009 ;1791:679-683.
- 14) Jia L, Betters JL, Yu L. Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:239-259.
- 15) Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP, Crona JH, Davis HR Jr, Dean DC, Detmers PA, Graziano MP, Hughes M, Macintyre DE, Ogawa A, O'Neill KA, Iyer SP, Shevell DE, Smith MM, Tang YS, Makarewicz AM, Ujjainwalla F, Altmann SW, Chapman KT, Thornberry NA. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:8132-8137.
- 16) Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science.* 2000;290:1771-1775.
- 17) Wang DQ. Regulation of Intestinal Cholesterol Absorption. *Annu Rev Physiol.* 2007;69:221-248.
- 18) Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 2000;14:2831-2838.
- 19) Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature.* 1996;383:728-731.
- 20) Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 1997;272:3137-3140.
- 21) Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptor, LXR α and LXR β . *Genes Dev.* 2000;14:2819-2830.

- 22) Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Cell*. 1998;93:693-704.
- 23) Kliewer SA, Willson TM. Regulation of xenobiotic and bile acid metabolism by the nuclear pregnane X receptor. *J Lipid Res*. 2002;43:359-364.
- 24) Makishima M. Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors. *J Pharmacol Sci*. 2005;97:177-183.
- 25) Millatt LJ, Bocher V, Fruchart JC, Staels B. Liver X receptors and the control of cholesterol homeostasis: potential therapeutic targets for the treatment of atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1631:107-118.
- 26) Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*. 2000;289:1524-1529.
- 27) Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem*. 2002;277:18793-18800.
- 28) DeBose-Boyd RA, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:1477-1482.
- 29) Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane JR. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet*. 1978;15:117-119.
- 30) Dyerberg J, Bang HO, Hjørne N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr*. 1975;28:958-966.
- 31) Bang HO, Dyerberg J, Sinclair HM. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am J Clin Nutr*. 1980;33:2657-2661.
- 32) Iso H, Kobayashi M, Ishihara J, Sasaki S, Okada K, Kita Y, Kokubo Y, Tsugane S; JPHC Study Group. Intake of fish and n3 fatty acids and risk of coronary heart disease among Japanese: the Japan Public Health Center-Based (JPHC) Study Cohort I. *Circulation*. 2006;113:195-202.
- 33) Mozaffarian D, Rimm EB. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA*. 2006;296:1885-1899.
- 34) Yamagishi K, Iso H, Date C, Fukui M, Wakai K, Kikuchi S, Inaba Y, Tanabe N, Tamakoshi A; Fish, omega-3 polyunsaturated fatty acids, and mortality from cardiovascular diseases in a nationwide community-based cohort of Japanese men and women the JACC (Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk) Study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:988-996.

- 35) Harper CR, Jacobson TA. The fats of life: the role of omega-3 fatty acids in the prevention of coronary heart disease. *Arch Intern Med.* 2001;161:2185-2192.
- 36) Nestel PJ. Effects of n-3 fatty acids on lipid metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1990;10:149-167.
- 37) Nakatani T, Kim HJ, Kaburagi Y, Yasuda K, Ezaki O. A low fish oil inhibits SREBP-1 proteolytic cascade, while a high-fish-oil feeding decreases SREBP-1 mRNA in mice liver. *J Lipid Res.* 2003;44:369-379.
- 38) Kim HJ, Takahashi M, Ezaki O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. *J Biol Chem.* 1999;274:25892-25898.
- 39) Xu J, Teran-Garcia M, Park JH, Nakamura MT, Clarke SD. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J Biol Chem.* 2001;276:9800-9807.
- 40) Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, DeBose-Boyd RA, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:6027-6032.
- 41) Ren B, Thelen AP, Peters JM, Gonzalez FJ, Jump DB. Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Biol Chem.* 1997;272:26827-26832.
- 42) Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Kim H, Ezaki O. Up-regulation of liver uncoupling protein-2 mRNA by either fish oil feeding or fibrates administration in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257:879-885.
- 43) Nakatani T, Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Miura S, Ezaki O. Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor- α activator induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. *J Biol Chem.* 2002;277:9562-9569.
- 44) Halminski MA, Marsh JB, Harrison EH. Differential effects of fish oil, safflower oil and palm oil on fatty acid oxidation and glycerolipid synthesis in rat liver. *J Nutr.* 1991;121:1554-1561.
- 45) Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hastay AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem.* 1999;274:35832-35839.
- 46) Shimomura I, Shimano H, Korn BS, Bashmakov Y, Horton JD. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem.* 1998;273:35299-35306.

- 47) Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 1999;274:23577-23583.
- 48) Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002;109:1125-1131.
- 49) Espenshade PJ. SREBPs:sterol-regulated transcription factors. *J Cell Sci.* 2006;119:973-976.
- 50) Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:11041-11048.
- 51) Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest.* 1997;99:846-854.
- 52) Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest.* 1998;101:2331-2339.
- 53) Field FJ, Born E, Murthy S, Mathur SN. Polyunsaturated fatty acids decrease the expression of sterol regulatory element-binding protein-1 in CaCo-2 cells: effect on fatty acid synthesis and triacylglycerol transport. *Biochem J.* 2002;368:855-864.
- 54) Takeuchi Y, Yahagi N, Izumida Y, Nishi M, Kubota M, Teraoka Y, Yamamoto T, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Sekiya M, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Gotoda T, Ishibashi S, Itaka K, Kataoka K, Nagai R, Yamada N, Kadowaki T, Shimano H. Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. *J Biol Chem.* 2010;285:11681-11691.
- 55) Suchankova G, Tekle M, Saha AK, Ruderman NB, Clarke SD, Gettys TW. Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;326:851-858.
- 56) Power GW, Newsholme EA. Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I in rat heart and skeletal muscle. *J Nutr.* 1997;127:2142-2150.
- 57) Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2005;25:317-340.
- 58) Brandt JM, Djouadi F, Kelly DP. Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem.* 1998;273:23786-23792.

- 59) Rustan AC, Nossen JO, Christiansen EN, Drevon CA. Eicosapentaenoic acid reduces hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreasing the activity of acyl-coenzyme A:1,2-diacylglycerol acyltransferase. *J Lipid Res.* 1988;29:1417-1426.
- 60) Worgall TS, Sturley SL, Seo T, Osborne TF, Deckelbaum RJ. Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein. *J Biol Chem.* 1998;273:25537-25540.
- 61) Kim HJ, Miyazaki M, Ntambi JM. Dietary cholesterol opposes PUFA-mediated repression of the stearoyl-CoA desaturase-1 gene by SREBP-1 independent mechanism. *J Lipid Res.* 2002;43:1750-1757.
- 62) Out R, Hoekstra M, Meurs I, de Vos P, Kuiper J, Van Eck M, Van Berkel TJ. Total body ABCG1 expression protects against early atherosclerotic lesion development in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:594-599.
- 63) Wiersma H, Nijstad N, de Boer JF, Out R, Hogewerf W, Van Berkel TJ, Kuipers F, Tietge UJ. Lack of Abcg1 results in decreased plasma HDL cholesterol levels and increased biliary cholesterol secretion in mice fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis.* 2009;206:141-147.
- 64) Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest.* 2004;114:147-152.
- 65) Targher G, Bertolini L, Poli F, Rodella S, Scala L, Tessari R, Zenari L, Falezza G. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2005; 54:3541-3546.
- 66) Goessling W, Massaro JM, Vasani RS, D'Agostino RB Sr, Ellison RC, Fox CS. Aminotransferase levels and 20-year risk of metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease. *Gastroenterology.* 2008;135:1935-1944.
- 67) Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, Wakamatsu T, Hirota Y, Iwamoto Y, Wasada T. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet.* 2005;22:1141-1145.
- 68) Yasutake K, Nakamura M, Shima Y, Ohyama A, Masuda K, Haruta N, Fujino T, Aoyagi Y, Fukuizumi K, Yoshimoto T, Takemoto R, Miyahara T, Harada N, Hayata F, Nakashima M, Enjoji M. Nutritional investigation of non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: the significance of dietary cholesterol. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44:471-477.
- 69) Enjoji M, Nakamura M. Is the control of dietary cholesterol intake sufficiently effective to ameliorate nonalcoholic fatty liver disease? *World J Gastroenterol.* 2010;16:800-803.
- 70) Kojima S, Watanabe N, Numata M, Ogawa T, Matsuzaki S. Increase in the prevalence of fatty liver in Japan over the past 12 years: analysis of clinical background. *J Gastroenterol.* 2003;38:954-961.

- 71) Tanaka N, Zhang X, Sugiyama E, Kono H, Horiuchi A, Nakajima T, Kanbe H, Tanaka E, Gonzalez FJ, Aoyama T. Eicosapentaenoic acid improves hepatic steatosis independent of PPAR α activation through inhibition of SREBP-1 maturation in mice. *Biochem Pharmacol.* 2010;80:1601-1612.
- 72) Capanni M, Calella F, Biagini MR, Genise S, Raimondi L, Bedogni G, Svegliati-Baroni G, Sofi F, Milani S, Abbate R, Surrenti C, Casini A. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23:1143-1151.
- 73) Arai T, Kim HJ, Chiba H, Matsumoto A. Interaction of fenofibrate and fish oil in relation to lipid metabolism in mice. *J Atheroscler Thromb.* 2009;16:283-291.
- 74) Arai T, Kim HJ, Chiba H, Matsumoto A. Anti-obesity effect of fish oil and fish oil-fenofibrate combination in female KK mice. *J Atheroscler Thromb.* 2009;16:674-683.
- 75) Mathur SN, Watt KR, Field FJ. Regulation of intestinal NPC1L1 expression by dietary fish oil and docosahexaenoic acid. *J Lipid Res.* 2007;48:395-404.
- 76) Song JH, Miyazawa T. Enhanced level of n-3 fatty acid in membrane phospholipids induces lipid peroxidation in rats fed dietary docosahexaenoic acid oil. *Atherosclerosis.* 2001;155:9-18.
- 77) Calviello G, Palozza P, Franceschelli P, Bartoli GM. Low-dose eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid administration modifies fatty acid composition and does not affect susceptibility to oxidative stress in rat erythrocytes and tissues. *Lipids.* 1997;32:1075-1083.
- 78) Frenoux JM, Prost ED, Belleville JL, Prost JL. A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr.* 2001;131:39-45.
- 79) Erdogan H, Fadillioglu E, Ozgocmen S, Sogut S, Ozyurt B, Akyol O, Ardicoglu O. Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats. Prostaglandins. *Leukot Essent Fatty Acids.* 2004;71:149-152.
- 80) De Craemer D, Vamecq J, Roels F, Vallée L, Pauwels M, Van den Branden C. Peroxisomes in liver, heart, and kidney of mice fed a commercial fish oil preparation: original data and review on peroxisomal changes induced by high-fat diets. *J Lipid Res.* 1994;35:1241-1250.
- 81) Wang J, Einarsson C, Murphy C, Parini P, Björkhem I, Gåfvæls M, Eggertsen G. Studies on LXR- and FXR-mediated effects on cholesterol homeostasis in normal and cholic acid-depleted mice. *J Lipid Res.* 2006;47:421-430.
- 82) Murphy C, Parini P, Wang J, Björkhem I, Eggertsen G, Gåfvæls M. Cholic acid as key regulator of cholesterol synthesis, intestinal absorption and hepatic storage in mice. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1735:167-175.

- 83) Medvedev AV, Robidoux J, Bai X, Cao W, Floering LM, Daniel KW, Collins S. Regulation of the uncoupling protein-2 gene in INS-1 beta-cells by oleic acid. *J Biol Chem.* 2002;277:42639-42644.
- 84) Medvedev AV, Snedden SK, Raimbault S, Ricquier D, Collins S. Transcriptional regulation of the mouse uncoupling protein-2 gene. Double E-box motif is required for peroxisome proliferator-activated receptor- γ -dependent activation. *J Biol Chem.* 2001;276:10817-10823.
- 85) Hirako S, Kim H, Arai T, Chiba H, Matsumoto A. Effect of concomitantly used fish oil and cholesterol on lipid metabolism. *J Nutr Biochem.* 2010;21:573-579.
- 86) Repa JJ, Buhman KK, Farese RV Jr, Dietschy JM, Turley SD. ACAT2 deficiency limits cholesterol absorption in the cholesterol-fed mouse: Impact on hepatic cholesterol homeostasis. *Hepatology.* 2004;40:1088-1097.
- 87) Hirako S, Kim HJ, Shimizu S, Chiba H, Matsumoto A. Low-dose fish oil consumption prevents hepatic lipid accumulation in high cholesterol diet fed mice. *J Agric Food Chem.* 2011;59:13353-13359.
- 88) Fritsche KL, Johnston PV. Rapid autoxidation of fish oil in diets without added antioxidants. *J Nutr.* 1988 ;118:425-426.
- 89) Gonzalez MJ, Gray JI, Schemmel RA, Dugan L Jr, Welsch CW. Lipid peroxidation products are elevated in fish oil diets even in the presence of added antioxidants. *J Nutr.* 1992;122:2190-2195.
- 90) Tsuduki T, Honma T, Nakagawa K, Ikeda I, Miyazawa T. Long-term intake of fish oil increases oxidative stress and decreases lifespan in senescence-accelerated mice. *Nutrition.* 2011;27:334-337.
- 91) Wang HH, Hung TM, Wei J, Chiang AN. Fish oil increases antioxidant enzyme activities in macrophages and reduces atherosclerotic lesions in apoE-knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2004;61:169-176.
- 92) Jahangiri A, Leifert WR, Kind KL, McMurchie EJ. Dietary fish oil alters cardiomyocyte Ca²⁺ dynamics and antioxidant status. *Free Radic Biol Med.* 2006;40:1592-1602.
- 93) Whitman SC, Fish JR, Rand ML, Rogers KA. n-3 Fatty acid incorporation into LDL particles renders them more susceptible to oxidation in vitro but not necessarily more atherogenic in vivo. *Arterioscler. Thromb.* 1994;14:1170-1176.
- 94) Nakamura MT, Cheon Y, Li Y, Nara TY. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids.* 2004;39:1077-1083.
- 95) Komprda T. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as inflammation-modulating and lipid homeostasis influencing nutraceuticals: A review. *J Funct Foods.* in press.

- 96) Sheng Z, Otani H, Brown MS, Goldstein JL. Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:935-938.