

## 論文の内容の要旨

論文題目            **Angiotensin II and Cholesterol Synergistically  
Induce Endothelial Dysfunction.**

和訳                 アンジオテンシン II とコレステロールは血管内皮  
機能障害において同調的に作用する

指導教員           永井 良三 教授

東京大学医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名                網谷 英介

Angiotensin II(Ang II)は動脈硬化を引き起こす原因として重要であるが、その機序として活性酸素産生や eNOS の bioavailability の低下により内皮機能障害を引き起こすことがあげられる。また、高コレステロール血症も重要な動脈硬化の risk factor であるが、動脈硬化の引き起こす原因の一つとして内皮機能の障害が注目されており、LDL コレステロールと内皮機能障害の報告は数多い。しかし、Ang II とコレステロールにおける相互作用についてはあまり明らかになっていない。Free cholesterol (FC)は細胞膜の重要な構成成分であるが、Lipid raft と呼ばれる FC やスフィンゴ脂質の多く占める膜部分に存在する。Lipid raft はシグナル伝達や endocytosis において極めて重要なはたらきをもつことが知られている。また最近 Lipid raft との関連で、例えば赤血球膜の FC の総量が虚血性心疾患のイベント発生に関わるなど、FC の細胞機能に与える影響の報告が出てきている。我々はこの Lipid raft の観点から Ang II のシグナル伝達とコレステロールの関係について内皮細胞にて検討を行った。

コレステロール負荷の方法としては methyl-beta cyclodextrin (MBCD)をキレート剤として用い、FC と MBCD の化合物を使用した。この化合物を用いた

場合、15分後より細胞内のFC濃度が上昇し、FC量としては約8倍程度まで上昇、コレステロールの総量としては約2.5倍程度まで上昇をみる。コレステロールの上昇の程度は文献におけるLDLの効果とほぼ同等である。

Ang IIを内皮細胞に負荷した場合、eNOSのリン酸化やdimer形成を障害し、eNOSのbioavailability及びNO産生能を低下させる。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した状態でAng II刺激をすると、eNOSのbioavailabilityの障害は強く増強された。

密度勾配法によってlocalizationを見てみると、Ang II負荷によってeNOSがdetergent resistant membrane (DRM)へ移行するのが認められたが、コレステロール負荷によってeNOSはDRMの中でもより軽い層(DRM-L)へ移行するのが認められた。密度勾配で分離した各層ごとのコレステロール濃度を測定すると外部より投与したコレステロールはFCの形でDRM-Lに強く限局することが示され、eNOSの移行は外部より投与したFCと強く関係して起きていることが示唆された。DRM-Lへの移行はAng II type1 receptor及びAng II type2 receptorの拮抗薬を用いて抑制することができた。これら拮抗薬を用いてDRM-Lへの移行を抑制した際に、eNOSリン酸化のAng II及びコレステロール負荷による障害は部分的に改善をみた。またeNOSの活性型であるリン酸化されたeNOS及び二量化されたeNOSは密度勾配法によってDRMには存在せず、より密度の重い層に集積した。以上よりeNOSのDRM-Lへの移行がeNOSの活性調節に深く関与していることが示唆された。

次に細胞免疫染色にて各々の局在を検討したところ、まず外部より投与したFCは細胞膜、細胞質及び核周囲に存在し、細胞質に存在するFCはvesicle様の形態をとっていることが示された。ここにAng IIを負荷すると、核周囲にFCの強い集合を認めた。eNOSの細胞免疫染色においても同様に、コレステロール負荷後のAng II刺激によってeNOSは核周囲に集積し、そしてそれらはvesicle様の構造をとっていることが認められた。

一方コレステロール負荷によって細胞の外観は大幅には変化しないものの、細胞質における顆粒状の構造物の増加を認めたため、脂肪滴染色を試みた。BODIPYではコントロールとコレステロール負荷との差異化をはかる事はできなかったが、oil red O染色を試みたところコレステロール負荷によって著明にlipid-rich vesicleの増加が認められ、またこれは蛍光顕微鏡においてより精密に観察することができた。FCに結合する蛍光プローブのfilipinを用いて共染色すると、oil red Oで染色されたlipid-rich vesicleと共在することが認められ、染色されたvesicleはFCを密に含むことが示唆された。Nile red染色でも同様にvesicleがコレステロール負荷によって著明に増加するのを認めた。次にAng IIのvesicleに対する作用を検討したところ、AngII負荷後ではこのlipid-rich

vesicle が核周囲に集積するのを認めた。以上より内皮細胞において FC 負荷は FC rich な vesicle 形成をひきおこし、AngII はこれらの vesicle の translocation に何らかの影響を与えていることが示唆された。

Lipid raft のマーカーの一つとして糖鎖の GM1 が有名であるが、これに特異的に結合する Cholera Toxin Subunit B (CTxB)を用いて、GM1 の局在を見ることができる。コレステロール負荷状態において Ang II の刺激を加えたところ、蛍光ラベルした CTxB は核周囲への集積をみ、FC と同様の挙動を示した。

次に vesicle と eNOS の関係について共染色を試みたところ、Ang II 投与後に核周囲に集積した vesicle の周囲に eNOS がとりまき、それが vesicle 状に見えることが判明した。文献的には FC に関連する蛋白は密度勾配法によってもっとも上層に来ることが知られているが、eNOS も同様の動きを認めており、コレステロール負荷後の Ang II 刺激によって eNOS は lipid-rich vesicle 周辺へ集積することが示された。電顕にて FC 負荷後の細胞内の変化を検討したところ、multivesicular body が増加しているのを認めた。Multivesicular body は一般的に early endosome と late endosome の中間に位置する vesicle であり、次に late endosome の marker である lysosomal associated membrane protein (LAMP) -1 と eNOS、filipin、CTxB の共染色を行ったところ、FC rich な状況下に Ang II を負荷することでこれらは核周囲へ集積し、LAMP-1 にて label される endosome 内に eNOS、filipin、CTxB がきれいに集積するのを認めた。

Caveolin-2 (Cav-2)は DRM に存在する蛋白の一つであるが、HepG2 細胞においてある条件下に脂肪滴へ限局することが報告されている。次に Cav-2 が内皮細胞においても同様な動向をたどるか検討した。まず細胞免疫染色による検討では、Ang II 刺激において細胞膜および細胞質に存在した Cav-2 が核周囲に集積をみた。コレステロール負荷条件における Ang II 刺激ではこの核周囲の集積が強く増強をみた。また密度勾配法ではコレステロール負荷によって Cav-2 はより密度が軽い方向へ移動したが、Ang II を加えることでさらにその移動は増強し、DRM-Lに限局するのをみた。

Rac は small GTPase の一つであるが、これは細胞膜の Lipid raft と結合し、Lipid raft の internalization に深く関与しているとされている。またその際にはリン酸化された Caveolin-1 (Cav-1)も強く関係すると報告されている。これらの分子においても密度勾配法及び細胞免疫染色にて局在の検討を行った。Rac は通常は detergent soluble fraction 中心に存在するが、Ang II の刺激によって DRM-H へ移行する。コレステロール負荷の状態では Ang II 刺激を行うと Rac は DRM-L へ移行する。また細胞免疫染色でも同条件の際に核周囲に集合するのが認められる。リン酸化された Cav-1 においてもコレステロール負荷状態における Ang II の刺激にて同様の所見を得た。

以上より GM1、Cav-2、Rac、リン酸化 Cav-1、リン酸化 Src と同様の所見をえたことより、これらの分子の核周囲への集積においては DRM の internalization が深く関与していることが示唆された。

以上をまとめると、コレステロール負荷状態において Ang II の刺激をくわえると、核周囲に eNOS、FC、Lipid raft、lipid-rich vesicle の集積が認められた。この集積は細胞膜の Lipid raft の膜成分の internalization に由来することが示唆された。またこのとき eNOS は vesicle と強く関係していることが認められた。一方コレステロール負荷状態では AngII 刺激によって eNOS のリン酸化および dimer 形成が強く障害されることを認めたが、この障害は eNOS の vesicle への translocation と関係することが示唆された。高コレステロール血症の早期の段階において、血管内皮下に修飾し変性したリポ蛋白が認められ、これは Modified Reassembled Lipoproteins (MLPs) と呼ばれるが、今回内皮細胞において描出化した lipid-rich endosome は MLPs と類似した構造を持っている。今回高コレステロール血症の際に Ang II の内皮機能障害が大幅に増強される一つのメカニズムを提示したが、そのメカニズムは動脈硬化病巣における早期の病的変化に関連した現象を見ている可能性がある。