

令和元年9月15日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08254

研究課題名(和文) 心筋細胞膜不安定化におけるG蛋白共役型受容体構造変化と機能解析—心保護薬への影響

研究課題名(英文) Role of changes in the function of G-protein coupled receptors due to cholesterol depletion from the cell membrane in cardiovascular protection

研究代表者

三浦 伸一郎 (Shinichiro, Miura)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：20343709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：心血管細胞膜が不安定な場合(膜コレステロール含量が減少した場合)には、アンジオテンシンII(Ang II)1型(AT1)受容体構造の変化とAng IIが結合可能なAT1受容体発現量の減少が起こり、Ang IIによるイノシトールリン酸産生能が低下し、また、Ang IIによる血圧上昇が抑制され、心血管保護へ働く可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心血管病は、死亡原因の第2位であり、その克服は非常に重要なテーマである。今回の研究は、その新たな治療法を示唆する基礎研究である。細胞膜が不安定な場合(膜コレステロール含量が減少した場合)には、AT1受容体構造の変化とAng IIが結合可能なAT1受容体発現量の減少が起こり、Ang IIによるIP産生能が低下し、血圧上昇と脈拍数増加が抑制され、心血管保護へ働く可能性が示唆されたとういことである。

研究成果の概要(英文)：We determined whether changes in the function of angiotensin II type 1 (AT1) receptor due to cholesterol depletion from cardiovascular cell membranes through statin treatment affects blood pressure. Angiotensin II-induced increase in mean blood pressure was significantly suppressed by pretreatment with rosuvastatin in mice. Angiotensin II-induced inositol phosphate production through AT1 receptor was suppressed by cholesterol depletion from cell membranes using rosuvastatin or methyl-beta-cyclodextrin. Angiotensin II-induced activation of AT1 receptor reduced after cholesterol depletion, and this may contribute to blood pressure reduction.

研究分野：循環器

キーワード：高血圧 脂質

1. 研究開始当初の背景

コレステロールは、生命維持に必須の成分であり、細胞膜の安定化やステロイドホルモン合成に関与している。G 蛋白共役型受容体 (GPCR) は、細胞膜に組み込まれて刺激薬や拮抗薬により活性化や不活性化を受ける。現在、薬剤の約半分は、GPCR をターゲットとしている臨床分野では、GPCR であるアンジオテンシン II (Ang II) 1 型 (AT₁) 受容体やβ₁ アドレナジック (Ad) 受容体をターゲットとした AT₁ 受容体ブロッカー (ARB) や β₁-Ad 受容体拮抗薬が降圧薬や心保護薬として頻用されている。これら薬剤は、すでに多くの臨床研究によってその有効性と安全性が証明されている。

細胞膜が不安定な状態 (膜コレステロール含量低下) では、GPCR の構造も不安定となり、受容体は活性化または不活性化されやすい状態となるといわれている。動脈硬化性心血管疾患の予防には、スタチンによる積極的脂質低下療法が推奨されているが、その治療は、血清低比重リポ蛋白 (LDL) コレステロール値を著明に低下させるのみならず、細胞膜のコレステロール含量を低下させることが報告されている。したがって、膜不安定化が起こると GPCR の構造が変化し、受容体が活性化または非活性化されやすい状態となることが推測される。実際、M1 ムスカリニック受容体やμオピオイド受容体では、細胞膜のコレステロール含量を低下させるとアゴニストによる受容体活性化が増強されると報告されている。しかし、現在まで AT₁ 受容体に関する報告はない。

スタチンは、前述したように LDL コレステロール値を低下させ、心血管疾患の発症や進展を抑制することが報告されている。また、スタチンはわずかではあるが、血圧低下効果もあるといわれているがはっきりしたことはわかっていない。

2. 研究の目的

AT₁ 受容体は、細胞膜に組み込まれた後、Ang II や ARB により活性化や不活性化を受ける。細胞膜コレステロールは、膜安定化に必須の成分であるが、心血管細胞膜のコレステロール含量が減少している場合 (スタチンによる積極的脂質低下療法などで細胞膜が不安定化) AT₁ 受容体構造や機能の変化が心血管保護へ働くのかについて、β₁-Ad 受容体と比較し、ARB とβ₁-Ad 受容体拮抗薬の薬効への影響を検討し、今後の心臓病治療やその他の GPCR 拮抗薬開発の一助とする。

3. 研究の方法

(1) AT₁ 受容体が endogenous に発現している心筋細胞 (rat neonatal myocytes) と平滑筋

細胞 (rat aortic smooth muscle cells、Lonza Walkersville Inc., Walkersville, MD, USA)、さらに、AT₁ 受容体を強発現させた COS1 細胞や HEK293 細胞を用いた。COS1 細胞や HEK293 細胞は、5 % CO₂ の 37°C 下、10% 血清の Dulbecco's modified Eagle's essential medium (DMEM) で培養した。実験に使用する場合は、無血清下で実施した。AT₁ 受容体を過剰発現させる場合は、AT₁ 受容体ベクターを Lipofectamine 2000 liposomal reagent (Roche Applied Science) を使用し細胞内へ導入した。細胞膜の精製には、nitrogen Parr bomb disruption 法または freeze and throw 法を使用した。

(2) スタチンや Methyl-β-cyclodextrin (MβCD) にて細胞膜を処理して、コレステロールを引き抜いた。また、細胞膜のコレステロール量はコレステロールアッセイキット (Amplex® Red cholesterol assay kit、Molecular Probes Inc., Eugene, OR) を用いて測定した。

(3) 細胞膜の AT₁ 受容体発現量を ¹²⁵I-[Sar¹,Ile⁸]Ang II を用いた Binding study や ウエスタンブロット法により測定した。Competition binding study は、K_d 値を平衡状態で ¹²⁵I-[Sar¹,Ile⁸]Ang II 結合能から求めた。

(4) AT₁ 受容体機能は、血管収縮シグナルのイノシトールリン酸 (IP) 産生能を測定し評価した。方法は、細胞を [³H]-myoinositol とともに 5 % CO₂ の 37°C 下、10% 血清の DMEM にて 24 時間培養しラベリングした。その後、細胞を洗浄し、LiCl を加えた後、[Sar¹]Ang II や ARB を加え培養した。培養液を除去し、perchloric acid 法により soluble IP を取り出し測定した。

(5) β₁-Ad 受容体機能は、イソプロテレノールによる Cyclic AMP 増加量にて測定した。Cyclic AMP の測定には、cyclic AMP アッセイキット (DetectX® High Sensitivity Direct Cyclic AMP, Ann Arbor, MI) を使用した。

(6) AT₁ 受容体構造変化の解析は、Substituted-cysteine accessibility method (SCAM) により、細胞膜を 2-Aminoethyl methanethiosulfonate hydrochloride で処理後、¹²⁵I-[Sar¹,Ile⁸]Ang II の結合阻害率を算出した。

(7) 野生型マウスを使用する。高用量と低用量スタチン投与群および非投与群に分け、28 日間経過を観察した。Ang II (1.44 mg/kg/day) は、持続的に osmotic min-pump により投与した。その間、経時的に、tail-cuff-based MK-2000 (Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) により血圧値と脈拍数を測定した (0、7、14、21、28 日後)。

4. 研究成果

スタチンや MβCD は、心筋細胞・平滑筋細

胞や AT₁ 受容体過剰発現 COS1 細胞や HEK 細胞モデルにおいて、用量依存性に細胞膜のコレステロール濃度を低下させ (図 1) Ang II による IP 産生能は、前処理した MβCD (図 2) やスタチンの用量依存性に低下していた。

図 1. COS1 細胞における MβCD 処理による細胞膜のコレステロール濃度

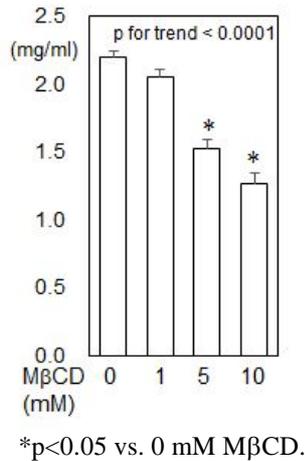


図 2. COS1 細胞における MβCD 処理による IP 産生能

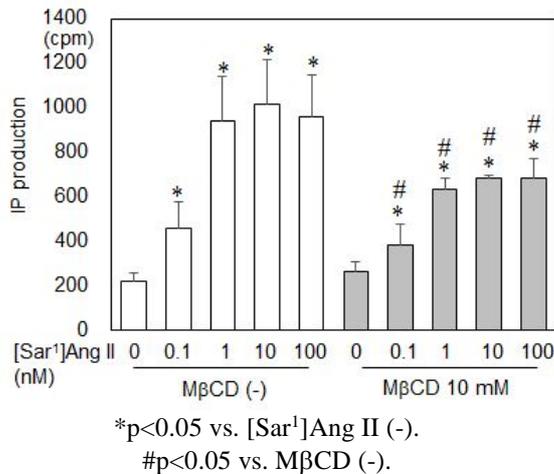
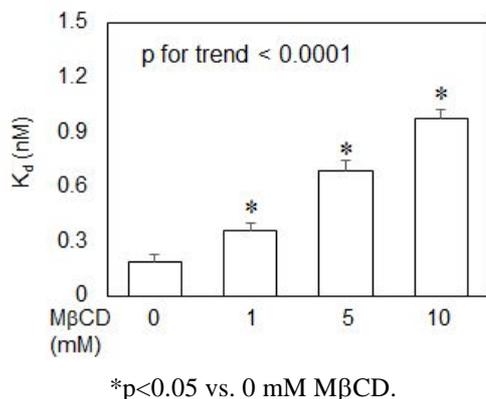


図 3. AT₁ 受容体に対する [Sar¹, Ile⁸] Ang II の結合能



また、MβCD により細胞膜コレステロール濃度を減少させると、Ang II (図 3) や ARB の AT₁ 受容体への結合能が有意に低下し、細胞膜へ発現している AT₁ 受容体量は影響を受けなかったが (図 4) Ang II が結合可能な AT₁ 受容体発現量が MβCD の用量依存性に低下していた (図 5)。

図 4. COS1 細胞膜へ発現している AT₁ 受容体量 (ウエスタンブロット法)

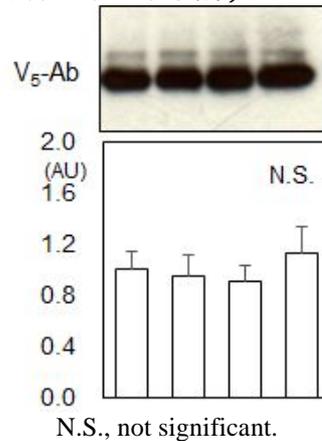
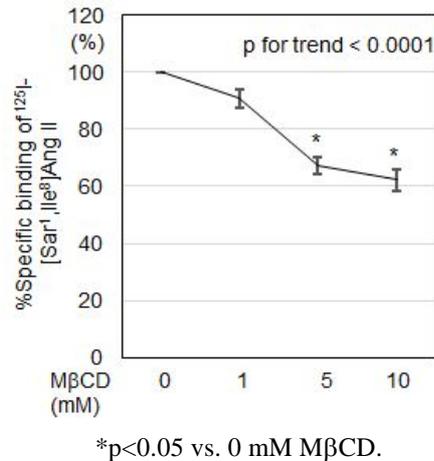


図 5. Ang II が結合可能な AT₁ 受容体発現量



また、MβCD により、AT₁ 受容体の構造変化が起こっていることを SCAM 法にて確認した。

その一方、β₁-Ad 受容体過剰発現 COS1 細胞や HEK 細胞モデルにおいて、用量依存性に細胞膜のコレステロール濃度を低下させ、イソプロテレノール (Iso.) による Cyclic AMP の増加を測定したが、細胞膜のコレステロール濃度の低下の影響を受けていなかった (図 6)。

野生型マウスのスタチン高用量投与群では、コントロール群に比し、Ang II による血圧上昇を有意に抑制していた (図 7)。

図 6. COS1 細胞における MβCD 処理による Cyclic AMP 産生能

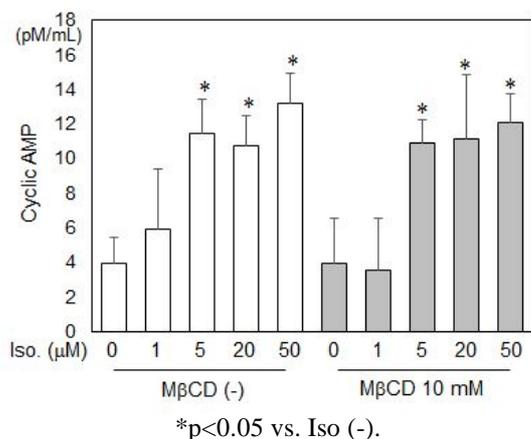
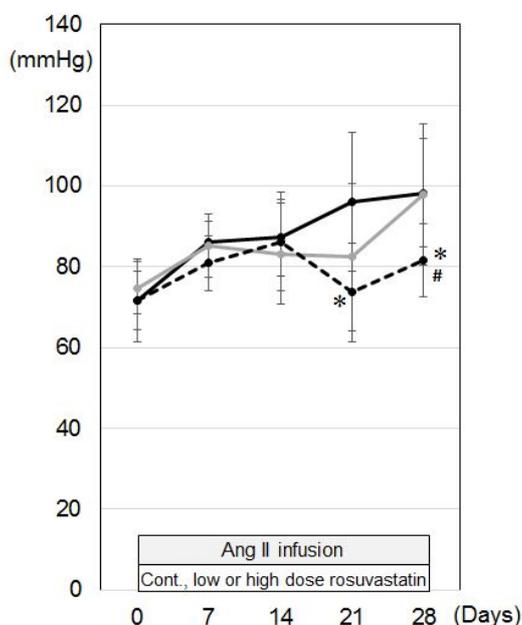


図 7. 野生型マウスにおけるスタチン投与の有無による平均血圧値の推移



非スタチン群(solid lines)

低用量スタチン群(gray lines)

高用量スタチン群(dotted lines)

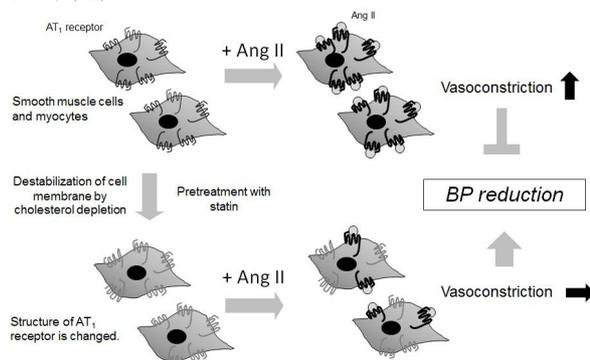
*p<0.05 vs. control group.

#p<0.05 vs. low-dose rosuvastatin.

以上より、図 8 には、Ang II を介した心血管細胞膜が不安定な場合の推測される降圧メカニズムを示した。

例えば、スタチン投与などにより、心血管細胞膜が不安定な場合(膜コレステロール含量が減少した場合)には、AT₁ 受容体構造の変化と Ang II が結合可能な AT₁ 受容体発現量の減少が起こり、Ang II による IP 産生能が低下する。その結果として血圧上昇(血管収縮)が抑制され、心血管保護へ働く可能性が示唆された。

図 8. 心血管細胞膜が不安定な場合の降圧メカニズム



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Matsuo Y, Suematsu Y, Idemoto Y, Kuwano T, Kitajima K, Miura S. Changes in the function of angiotensin II type 1 receptor due to cholesterol depletion from cell membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;514:791-797.

[学会発表](計2件)

井手元良彰、三浦伸一郎、後藤昌希、志賀悠平、今泉聡、桑野孝志、朔啓二郎 Function of G-Protein Coupled Receptors by Cholesterol Depletion from Cell Membrane on Cardiovascular Protection. 第 80 回日本循環器学会学術集会. 2016 年.

Miura S. Role of Changes in the Structure and Function of Angiotensin II Type 1 Receptor Due to Cholesterol Depletion from the Cell Membrane in Cardiovascular Protection. 第 38 回日本高血圧学会総会. 2015 年.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 伸一郎 (MIURA, Shinichiro)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号: 20343709

(2) 研究分担者

朔 啓二郎 (SAKU, Keiji)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号: 40183371