

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591102

研究課題名(和文)酸化脂質によるアンジオテンシン2受容体活性化の機序の解明と病態生理学的意義の検討

研究課題名(英文)Is angiotensin II receptor activation involved in the mechanism and pathophysiological role of oxidized LDL?

研究代表者

山本 浩一 (Yamamoto, Koichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00528424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では血管細胞において酸化LDLが惹起する細胞内シグナル活性化にアンジオテンシンII受容体(AT1)が関与するという仮説の基、そのメカニズムの詳細と病態生理学的意義の検討を行った。その結果、酸化LDLによる細胞内シグナルは酸化LDL受容体(LOX-1)とAT1の共存在下でのみ活性化されることが示された。LOX-1とAT1は細胞膜上で複合体を形成しており変異AT1を用いた検討では酸化LDLによる細胞内シグナル活性化はAT1の活性化能に依存することが示された。さらにマウス大動脈リングを用いた検討で酸化LDLによる血管内皮弛緩減弱効果はAT1欠損やAT1拮抗薬で消失していた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated our hypothesis that the angiotensin II type 1 receptor (AT1) is involved in the oxidized LDL (oxLDL)-induced vascular responses involved in the pathogenesis of cardiovascular disease. We found that both the lectin like oxLDL receptor (LOX-1) and AT1 are required for the ability of oxLDL to activate cell signaling and that LOX-1 and AT1 form receptor complexes on cell surface membranes. Mutations in AT1 greatly reduced the capacity of oxLDL to activate G protein and MAP kinase. In addition, oxLDL induced acute blood pressure elevations in mice and these hypertensive effects were totally abolished by deletion of AT1a or LOX-1. In addition, oxLDL-induced impairment of endothelial-dependent vascular relaxation was abolished by ARB or genetic deletion of AT1 in mice. These findings indicate that oxLDL-induced activation of AT1 constitutes a heretofore unrecognized mechanism that could further contribute to the effects of oxLDL on risk for atherosclerosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：酸化LDL受容体 アンジオテンシンII受容体 細胞内シグナル 動脈硬化

### 1. 研究開始当初の背景

低重量リポ蛋白質(LDL)の酸化は動脈硬化の進展における重要な過程である。酸化 LDL はマクロファージに取り込まれ局所炎症を惹起するだけでなく、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞に存在するレクチン様酸化 LDL 受容体(LOX-1)に結合し動脈硬化誘導性の細胞反応を惹起することが知られている。酸化 LDL と LOX-1 の結合は多くの細胞内シグナル伝達経路を活性化することが知られているが酸化 LDL と LOX-1 の結合が細胞内シグナルを活性化する伝達経路についてはこれまでのところ明らかでない。一方、G 蛋白共役型受容体であるアンジオテンシン II 1 型受容体(AT1)はアンジオテンシン II を唯一の既知のリガンドとしその活性化は動脈硬化の進展に大きな役割を担っている。アンジオテンシン II による AT1 の活性化は LOX-1 の発現を上昇させ酸化 LDL による LOX-1 の活性化は AT1 の発現を上昇させるなど両受容体の間には発現調節レベルで密接な相互作用があることが知られている。

### 2. 研究の目的

酸化 LDL の LOX-1 への結合により惹起される細胞内シグナル伝達経路に、直接的な AT1 の関与があることを推測しその検証と病態生理学的意義を検討した。

### 3. 研究の方法

細胞培養: ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)とヒト血管平滑筋細胞(HAVSMC)はそれぞれ EGM-2 (Clonotech)とHuMedia-SG2 (Kurabo)で培養した。遺伝子改変したCHO細胞はGlutamax<sup>TM</sup>-1 を含むF12メディウム(Invitrogen)に10%FBSで培養した。Cos細胞はDMEM+10%FBSで培養した。

酸化 LDL の調整: ヒト血漿 LDL を 20uM の CuSO<sub>4</sub>と24時間37度で反応させた。LDLの

酸化はアガロースゲル電気泳動で確認した。

siRNA: 50%コンフレントの細胞に対しRNAiMax(Invitrogen)を用いてsiRNA(Silencer select siRNA, Ambion)を導入した。

Ca<sup>2+</sup>濃度変化測定: Fura2-AMを用いて行ないCa<sup>2+</sup>の指標となるF340/F380の変化をAqua Cosmoを用いて測定した。

G蛋白細胞質内流入の検出: 細胞を4度で30分間刺激した後細胞質成分を抽出し免疫プロット法により検出した。

共免疫沈降法: CHO細胞の膜タンパクを抽出した後AT1のFlag標識への抗体を用いて免疫沈降を施行した。結合タンパクの検出は免疫プロット法により行なった。

in situ PLA: 受容体同士の近接性をin situ PLA法により検出した。アッセイはDuolink (Onlink Bioscience)のプロトコールに従い施行した。

AT1の変異導入: Primestar mutagenesisキット(Takara)を用いた。Cos細胞へのトランスフェクションにはLipofectamine LTX(invitrogen)を用いた。

実験動物: AT1a欠損マウスと野生型マウスを用いた。実験計画は大阪大学動物実験施設より承認を受け米国NIHの動物実験ガイドラインに従って施行した。

マウス大動脈のNO依存性内皮弛緩反応の観察: 12週齢のマウス胸部大動脈を単離し大動脈リングを作成した。大動脈リングは酸化LDLの存在下、非存在下またオルメサルタン存在下非存在下で24時間培養し実験に用いた。大動脈リングをマグヌス管にセット

し張力を調整後、PGF2 $\alpha$ で収縮しAchを段階的に投与し張力の変化を記録した。

#### 4. 研究成果

AT1 阻害薬(ARB, olmesartan)を HUVEC に 24 時間前投与すると酸化 LDL による ERK の活性化は抑制された(図 1)。

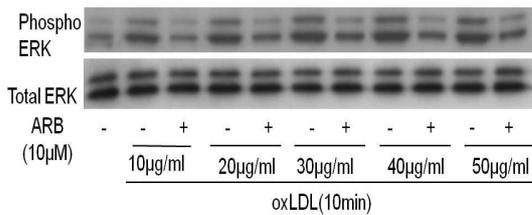


図 1

生体内ではangiotensin IIによるAT1活性化を ARBで阻害することによりLOX-1の発現を抑制されることが報告されているがHUVECでの検討ではARBの投与によるLOX-1の蛋白発現に差を認めなかった。またsiRNAでAT1をノックダウンするとLOX-1をノックダウンした時と同様に酸化LDLによるERKの活性化は抑制された。一方、LOX-1のノックダウンはangiotensin IIによるERKの活性化を抑制しなかった(図2)。

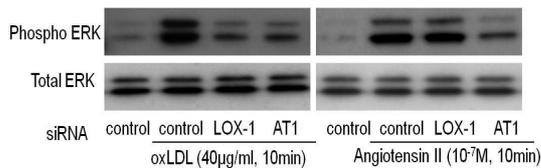


図2

またAT1とLOX-1を発現しないCHO細胞に両遺伝子を安定発現させた細胞を用いた検討ではLOX-1単独発現細胞に比し酸化LDLによるERK活性化は著明に増強した(図3)。

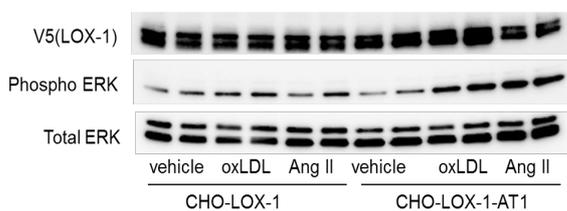


図3

また酸化LDLによるERK活性化はG蛋白阻害剤である百日咳毒素で完全に抑制された。実際酸化LDLは血管内皮細胞のG蛋白を活性化させ、その反応はARBで抑制された(図 4)。

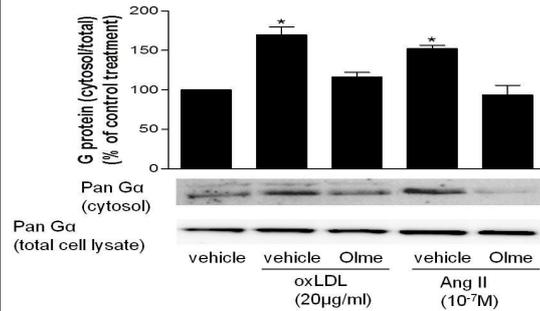


図 4

これらの結果は酸化LDLがLOX-1との結合によりG蛋白共役型受容体であるAT1を活性化させることを示唆するものでありそれを説明する機序としてLOX-1とAT1の細胞膜上での結合があるものと推測し検討した。CHO細胞の膜蛋白を用いた共免疫沈降ではAT1とLOX-1の共沈を認め(図5)、蛋白の近接性を示すPLA法ではAT1とLOX-1が特異的に近接していることが示された(図6)。

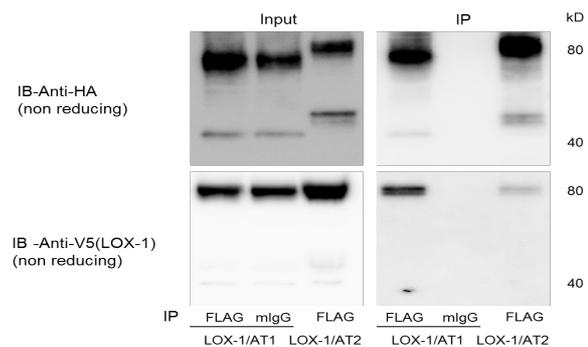


図5

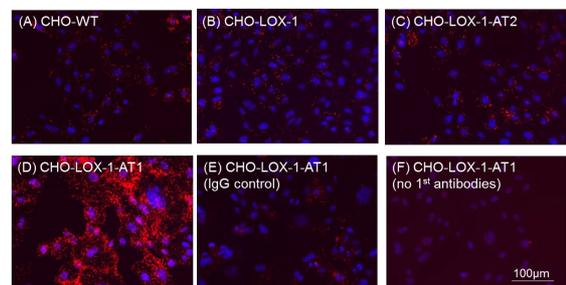


図6

更に酸化 LDL が活性化する G 蛋白共役型受容体が AT1 であることを明確にするために過去の論文から G 蛋白の活性化能が減弱していることが報告されている変異 AT1(AT1Δ221-222)を LOX-1 と Cos 細胞に共発現させたところ両者の近接は認められたが酸化 LDL による AT1 の活性化能は著明に減弱していた(図 7)。

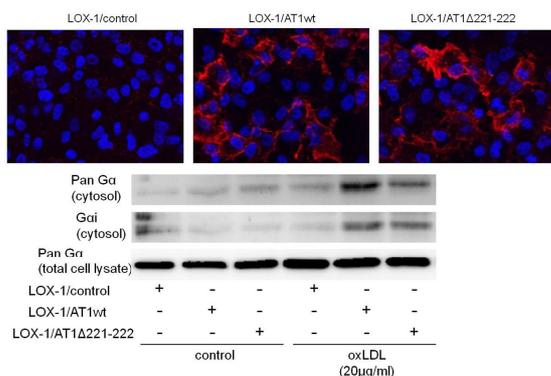


図 7

以上より酸化 LDL と LOX-1 の結合は細胞膜上で LOX-1 と複合体を形成する AT1 を活性化することが示めされた。また酸化 LDL により平滑筋細胞の Ca 濃度上昇が観察され、その反応は ARB 前投与により抑制された(図 8)。

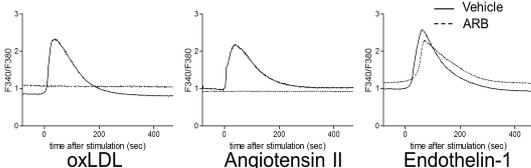


図 8

このような現象が組織単位で認められるか検討するためにマウス大動脈リングを用いて内皮依存性血管弛緩反応を観察した。図 9 に示すように酸化 LDL は野生型マウス大動脈の内皮依存性血管弛緩反応を減弱させ ARB はそれを抑制した。また AT1 欠損マウスでは酸化 LDL の効果が認められなかった。これらより酸化 LDL の効果の AT1 依存性は血管単位でも認めることが示された。

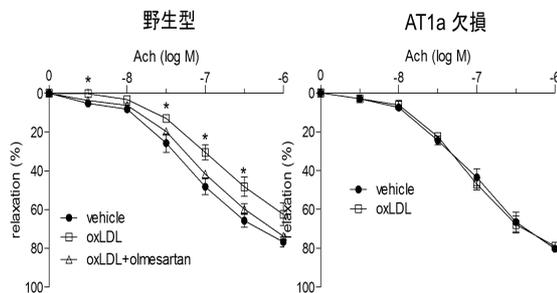


図 9

本研究計画では ApoE 欠損マウスとアンジオテンジエン (AGT) 欠損マウスを掛け合わせ angiotensin II 非存在下での AT1 依存性動脈硬化促進作用を観察する予定であったが、AGT 欠損マウスの繁殖に問題が生じ計画を完了できなかった。引き続き検討を行っていく予定である。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第21回日本血管生物医学学会(平成25年)

シンポジウム

アンジオテンシン 非依存性アンジオテンシン 受容体活性化による新たな高血圧合併症進展機構

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山本 浩一(大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学 講師)

研究者番号: 00528424

### (2)研究分担者

楽木 宏実(大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学 教授)

研究者番号: 20252679

### (3)研究分担者

大石 充(鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 心臓血管・高血圧内科学 教授)

研究者番号: 50335345