



# Effects of hypoxia on sterol synthesis, acyl CoA:cholesterol acyltransferase activity and efflux of cholesterol in cultured rabbit skin fibroblasts

向谷, 準一

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1989-12-20

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1360

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001360>

※ 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。



氏名・（本籍）	むこう だに じゅん いち 一 （兵庫県）
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医博ろ第1119号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	平成元年12月20日
学 位 論 文 題 目	Effects of Hypoxia on Sterol Synthesis, Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase Activity, and Efflux of Cholesterol in Cultured Rabbit Skin Fibroblasts (培養家兎線維芽細胞におけるステロール合成, acyl CoA: cholesterol acyltransferase 活性およびコレステロール流出に対する低酸素の影響)
審 査 委 員	主査 教授 福 崎 恒 教授 伊 東 宏 教授 中 村 和 夫

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔 緒 言 〕

動脈壁内側は栄養血管に乏しくその酸素供給は主として内腔からの直接の拡散に依存している。このため内腔からの酸素供給が障害されれば動脈壁内膜側は容易に低酸素状態に陥ると考えられる。

全身低酸素状態では動脈壁も低酸素に陥ると考えられるが Astrup は低酸素条件で飼育した家兎で動脈硬化の進展が促進されたことを報告した。我々も遺伝性高脂血症家兎（WHHL 家兎）を用いて低酸素が動脈硬化を促進することを報告した。また、動脈平滑筋の組織培養や細胞培養を用いた実験でも低酸素が脂質代謝に影響を及ぼすことが報告されている。組織低酸素は動脈硬化の発症，進展に関与する重要な因子のひとつと考えられる。

我々は過去に培養家兎動脈平滑筋細胞において低酸素が細胞へのコレステロールの蓄積を促進することを報告した。今回はさらに低酸素条件における細胞内へのコレステロール蓄積の機序を解明するために培養家兎皮膚線維芽細胞を用いて①細胞内コレステロール合成 ② acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) 活性 ③細胞からのコレステロールの流出，に対する低酸素の影響を検討した。

### 〔 方 法 〕

#### 血 清

正常家兎血清（NRS）は普通食で飼育した日本白色家兎の血液より分離した。高脂家兎血清（HR

S) は 1 % コレステロール添加食にて 1 カ月以上飼育した家兎血液より分離した。血清コレステロール値は酵素法にて測定した。リポ蛋白除去血清 (LPDS,  $d > 1.21$ ) は NRS より Havel らの方法により超遠心にて分離した。

## 細胞

皮膚線維芽細胞は日本白色家兎の皮膚切片より培養した。培養液は Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium に penicillin ( $100 \text{ IU}/\text{ml}$ ) と streptomycin ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加え,  $\text{NaHCO}_3$  にて pH 7.4 にしたものを basal medium として用いた。basal medium に胎児牛血清を 10% 加えて継代培養に用いた。

実験には 7 ~ 9 代めの細胞を用いた。25  $\text{cm}^2$  フラスコに  $4.5 \times 10^6$  個の細胞を蒔いて 10% 胎児牛血清を加えた basal medium にて 72 時間培養する。培養液を吸引除去しさらに PBS で細胞を三回洗浄した後 LPDS ( $2.5 \text{ mg}/\text{ml}$ ) を加えた basal medium で 48 時間の preincubation を行った。

## 低酸素

各実験において対照群は 37 度 95% air + 5%  $\text{CO}_2$  に調整された培養器中で培養した。低酸素群はフラスコ内に 95%  $\text{N}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  混合ガスを充填し密栓したうえで対照群と同一の培養器中で培養した。本法による培養液酸素分圧の確認のため細胞を含まない培養液を 3  $\text{ml}$  ずつフラスコに注入し低酸素群と対照群に分け, 上記の方法で 1 時間及び 4 時間後の各群の培養液中酸素分圧を測定した。

## コレステロール合成

コレステロール合成は [ $^{14}\text{C}$ ] acetate のコレステロールへの取り込みにて測定した。preincubation の後のフラスコ内の培養液を吸引し新たに [ $^{14}\text{C}$ ] acetate ( $2 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) 及び NRS 又は HRS (10% V/V) を含む培養液と交換した。フラスコを低酸素群と対照群に分け前述の条件で 48 時間培養した。細胞をフラスコより剥離し Folch の方法にて脂質を抽出した。薄層クロマトグラフィーを用いてコレステロールエステルとフリーコレステロールを分離した。コレステロールエステルは KOI を用いてケン化しコレステロールと脂肪酸に分離した。各コレステロール分画の放射活性を測定し  $\text{cpm}/\text{mg cell protein}$  単位で記録した。蛋白量の測定は牛血清蛋白を標準として Lowry 法にて行った。

## ACAT 活性

ACAT 活性は [ $^{14}\text{C}$ ] oleate の細胞内コレステロールエステルへの取り込みとして測定した。preincubation の後培養液を 10% HRS 添加培養液と交換した。フラスコを低酸素群と対照群に分けそれぞれ前述の条件で一定時間培養した後 [ $^{14}\text{C}$ ] oleate ( $0.8 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) を添加してさらに 2 時間培養し細胞内のコレステロールエステル分画に取り込まれた [ $^{14}\text{C}$ ] oleate の放射活性を測定した。

## コレステロール流出

preincubation の後 10% HRS 添加培養液にて細胞を 48 時間培養した (Load Phase)。Load Phase の後細胞の一部を収穫し Heider らの方法で細胞内コレステロールを測定した。残りの細胞を低酸素群と対照群に分け NRS (10% V/V) 又は LPDS ( $2.5 \text{ mg}/\text{ml}$ ) を含む培養液で 24 時間培養し (Efflux Phase)。Efflux Phase の後細胞を収穫しコレステロール含量を測定した。

## 〔結 果〕

低酸素群の培養液中酸素分圧は $44.8 \pm 5.6$  mmHg と対照群 $167. \pm 4.3$  mmHg の約 4 分の 1 であった。  
コレステロール合成

NRS で培養すると [ $^{14}\text{C}$ ] acetate のコレステロールへの取り込みは低酸素群において $29.4 \times 10^3$  cpm/mg cell protein と対照群 $85.2$  cpm/mg cell protein の約 3 分の 1 であった。HRS で培養すると両群ともコレステロール合成は NRS の場合に比して著明に抑制されていたが、低酸素群では $4.9 \times 10^3$  cpm/mg cell protein と対照群 $6.9 \times 10^3$  cpm/mg cell protein の約 3 分の 2 であった。脂肪酸合成は NRS, HRS いずれの場合も低酸素群が対照群の約 4 分の 3 であった。以上の結果より低酸素状態ではコレステロール合成は抑制されると考えられた。

### ACAT 活性

[ $^{14}\text{C}$ ] oleate の細胞内コレステロールエステルへの取り込みは低酸素群 $12.1 \pm 2.0 \times 10^3$  cpm/mg cell protein と対照群 $6.1 \pm 0.3 \times 10^3$  cpm/mg cell protein に比して有意に増加していた ( $p < 0.01$ )。一方 [ $^{14}\text{C}$ ] oleate の中性脂肪への取り込みは両群間に差がなかった。以上より低酸素条件では ACAT 活性は増加すると考えられた。

### コレステロール流出

NRS による Efflux Phase 前後の細胞内コレステロール量を比較すると遊離コレステロールは両群とも Efflux Phase の前後ではほぼ不変であった。一方コレステロールエステルは低酸素群では変化しなかったが対照群では有意に減少した ( $p < 0.01$ )。この結果 Efflux Phase 後の細胞内コレステロールエステルは低酸素群が $38.2 \pm 3.7$  nmol/mg cell protein と対照群 $22.4 \pm 5.7$  nmol/mg cell protein に比し有意に多かった ( $p < 0.01$ )。又 LPDS による Efflux Phase においても同様に低酸素群 $53.1 \pm 3.0$  nmol/mg cell protein と対照群 $36.6 \pm 6.3$  nmol/mg cell protein に比し有意にコレステロールエステル含量が多かった ( $p < 0.01$ )。

以上の結果より低酸素条件では細胞からのコレステロール流出は低下していると考えられた。

## 〔考 察〕

細胞内への脂質の蓄積は動脈硬化の主たる病態のひとつであり動脈硬化発症機序を研究するうえで脂質蓄積の機構を解明することは重要である。我々は家兎動脈平滑筋細胞を HRS 添加培養液中で培養した場合の細胞内コレステロールエステルの蓄積が低酸素条件 (5 %  $\text{O}_2$ ) において対照群 (20 %  $\text{O}_2$ ) に比し有意に増加することを報告した。細胞内へのコレステロールの蓄積はコレステロールの取り込み、細胞内コレステロール合成、細胞からのコレステロール流出の 3 者のバランスにより規定される。低酸素はこのバランスを障害し細胞内へのコレステロールの蓄積を促進すると考えられる。

Albers の報告によれば  $^{125}\text{I}$ -LDL の培養平滑筋への取り込みは低酸素で変化しなかった。我々は LDL 受容体を持たない WHHL 家兎から培養した皮膚線維芽細胞におけるコレステロール蓄積が低酸素により促進されることをすでに報告した。これからは LDL 受容体を介するリポ蛋白の取り込みは低酸素の細胞内コレステロール蓄積促進にさほど関与していないことを示唆するものと考えられる。

低酸素は細胞内コレステロール合成を抑制した。低酸素で細胞内に蓄積するコレステロールは細胞内合成由来ではなく細胞外リポ蛋白由来と考えられる。

今回の結果は低酸素において ACAT 活性が増加することを示している。ACAT 活性は ATP 依存性の ACAT のリン酸化と細胞内のコレステロール量の両者により規定されと考えられている。低酸素において ATP 依存性の酵素のリン酸化が促進されるとは考えにくい。低酸素における ACAT 活性の増加は細胞内コレステロール量増加の結果と考えられる。

細胞からのコレステロールの流出は細胞内へのコレステロール蓄積防止機構として重要な役割を持つと考えられるが低酸素ではコレステロール流出は抑制されていた。このため細胞外から取り込んだ過剰なコレステロールが細胞内に停滞し ACAT によりエステル化されて蓄積していくと考えられる。

今回の低酸素群の培養液酸素分圧は約40 mmHg で Niinikoski の報告した正常動脈壁内の酸素分圧とほぼ一致している。すなわち正常動脈壁内の細胞も本実験における低酸素群に近い条件下にあり過剰なコレステロールの取り込みがあれば容易に細胞内にコレステロールエステルの蓄積をきたすと考えられる。

#### 〔結 語〕

培養家兎線維芽細胞を用いて細胞の脂質代謝に対する低酸素の影響を検討した。低酸素条件下では細胞からのコレステロール流出が低下しておりこのため容易に細胞内コレステロール蓄積をきたすと考えられた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Astrup らはかなり古く低酸素条件で飼育した家兎で動脈硬化の進展が促進されることを報告している。一方、近年本申請者は協同研究者と共に WHHL 家兎を用いて低酸素が動脈硬化を促進すること、並びに培養家兎平滑筋細胞において低酸素が細胞へのコレステロール (ch) の蓄積を促進することを報告している。

本研究は、低酸素がどのような機序で細胞内への ch の蓄積を促進するかを明確にするべく行なわれたものである。

(方法) 家兎の皮膚から得た線維芽細胞を Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium を用い継代培養し、本実験には 7～9 代目の細胞を用いた。培養条件として、対照群では 95% air + 5% CO<sub>2</sub>, 低酸素群では 95% N<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> 混合ガスを用いた。細胞内 ch 合成は [<sup>14</sup>C] acetate の sterol への取り込み, acyl CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) は cholesteryl ester への [<sup>14</sup>C] oleate の取り込み, 更に ch の efflux を測定しそれぞれの過程に対する低酸素の影響を検討した。なお、低酸素群の培養液中酸素分圧は 44.8±5.6 mmHg と対照群 167.0±4.3 mmHg の約  $\frac{1}{4}$  であった。

(結果) ①低酸素群では対照群に比し、細胞内 ch 合成は抑制された。②低酸素条件では、ACAT 活

性は増大した。③低酸素条件下では、細胞からの ch の efflux は低下することが示された。

細胞内の ch の蓄積は、ch の取り込み、細胞内の ch の合成、細胞からの ch の efflux の三者のバランスにより規定されるとみなされる。そこで低酸素はこのバランスを障害することにより細胞内 ch 蓄積を来すものと考えられる。今回の実験結果では、低酸素は細胞内の ch 合成を抑制した。また、ACAT 活性を規定する要因より考えると低酸素による ACAT 活性の増大は細胞内 ch 量増加の結果とみなすのが妥当といえる。一方、細胞の ch の efflux は、細胞内 ch 蓄積の防禦機構と考えられるが低酸素はこの機構を阻害することが分かった。

以上を総括すると、低酸素は細胞からの ch efflux を阻害するため、細胞内合成によらず細胞外リポ蛋白由来の過剰な細胞内 ch の停滞を来し、これは ACAT の活性増大によりエステル化され蓄積されていくことが推定された。

なお、本実験における低酸素の程度は約40 mmHg で Niinikoski の報告した正常動脈壁内酸素分圧とほぼ一致している点を考慮すると、生体内でも過剰な ch の取り込みがあれば実験結果と同様の機序で細胞内に ch 蓄積を来すと推測することができる。

本研究は、動脈硬化の成因に与る細胞内 ch 蓄積の機序を低酸素条件下の細胞培養実験の結果より明らかにしたもので価値ある集積とみなされる。依って、本研究者は医学博士の学位を得る資格を有するものと認めた。