

論 文 要 旨

Association of Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor-1 With Angiotensin II Type 1 Receptor Impacts Mitochondrial Quality Control, Offering Promise for the Treatment of Vascular Senescence

Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor-1 (LOX-1)と
Angiotensin II type 1 Receptor (AT1R)の受容体連関に伴う
ミトコンドリアダイナミクス及びマイトファジーは血管老化に重要な役割を果たす

内門 義博

【序論及び目的】

脂質異常症は過酸化脂質 (ox-LDL) による血管老化や動脈硬化を来し、スタチンなどの薬物により適切に脂質降下をしても動脈硬化性心血管疾患予防が不十分な残余リスクの問題を有する。細胞におけるエネルギー産生を司るミトコンドリアは、副産物として酸化ストレスを発生することから、血管老化や動脈硬化と密接な関連がある。ミトコンドリアは環境の変化に伴い、分離して小さくなる fission 化と、隣り合うミトコンドリア同士で融合する fusion 化により、絶えず形態変化をしており、これをミトコンドリアダイナミクスという。fission 化には Drp1 の活性化が重要な役割を果たしている。また細胞内における古くなったタンパク質やオルガネラを排除するオートファジーの一種として、異常ミトコンドリアを選択的にオートファジーにより排除するマイトファジーという分子機構が存在する。アンジオテンシン II は血管老化や動脈硬化に関わり、また ox-LDL のスカベンジャーレセプターである LOX-1 は Angiotensin II type 1 Receptor (AT1R) を介してシグナルを伝えることが知られている。

以上より、①ox-LDL 投与下で LOX-1 と AT1R は関連しているのか、②ミトコンドリアダイナミクスおよびマイトファジーに AT1R が関与しているか、③AT1R 阻害は、LOX-と AT1R に伴うシグナルやミトコンドリアダイナミクスおよびマイトファジーに関与することで ox-LDL に伴う血管老化を改善するかについて検討した。

【材料及び方法】

培養細胞実験としてヒトの血管平滑筋細胞 (VSMC) を用いて ox-LDL 投与を行った。阻害実験としてはカンデサルタン (アンジオテンシン受容体タイプ 1 拮抗薬; ARB)、mdivi-1 (Drp1 阻害薬)、Dabrafenib (RAF 阻害薬)、PD184352 (MEK 阻害薬)、SCH772984 (ERK 阻害薬)を用いた。ノックダウン実験のために、siRNA (Rab9, Atg7, ERK1, ERK2)をそれぞれ導入した。

動物実験として C57BL/6、Apolipoprotein E (ApoE) KO マウスを用いた。また ApoE KO マウスに対 mdivi-1 の腹腔内投与を 4 週間行い対照群との比較実験を行った。さらに ApoE KO マウスにカンデサルタンの腹腔内投与を 8 週間行い、それぞれの対照群との比較実験を行った。

ミトコンドリアの形態の評価は透過電子顕微鏡での観察および Mitotracker 染色を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。western blot では fission や fusion に関わる因子 Mfn1/2、Opa1、Drp1、p-Drp1 (Ser616)、p-Drp1(Ser637)および老化マーカーである p53、p21 を評価した。ミトコンドリア由来の ROS の評価には MitoSOX Red、ミトコンドリア機能評価には JC-1 染色、ATP 産生能および Amplex Red による H₂O₂

産生能を評価した。血管線維化は Masson trichrome 染色を行い評価した。細胞・血管老化に対しては SA- β gal 染色を行った。マイトファジーの評価としては TOMM20/LAMP2 および LAMP2/Rab9 の二重免疫染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

【結果】

VSMC への ox-LDL 投与では、ミトコンドリアは過度な fission 化を呈し、ミトコンドリア機能低下および細胞老化を生じた。Ox-LDL 刺激によるミトコンドリアの fission 化やミトコンドリア機能障害には、AT1R 下流の Raf/MEK/ERK を介した Drp1 活性化が関与していた。ox-LDL によるミトコンドリア機能低下および細胞老化は、Drp1 阻害薬である mdivi-1 投与や Angiotensin II Type1 受容体 (AT1R) 阻害を各々単独で行っても回復した。

Ox-LDL 投与下での AT1R の阻害実験では、電子顕微鏡及び LAMP2/TOMM20 の免疫染色によりマイトファジーを誘発していることが確認された。このマイトファジーは *Atg7* のノックダウンでは影響を受けなかったが、Rab9 のノックダウンにより低下し血管老化抑制効果が減弱した。さらに AT1R 阻害では LAMP2/LC3 の一致したシグナルの増加はないものの、LAMP2/Rab9 の一致したシグナルの増加を認めたことから、AT1R 阻害によるマイトファジーは Rab9 依存性オートファジー由来であることが判明した。

C57BL/6 と比較し ApoE KO マウスでは、Drp1 活性化を介した過度な fission 化を呈し血管老化・線維化の亢進、ATP 産生の低下や酸化ストレスの上昇を認めた。ApoE KO マウスへの mdivi-1 では過度な fission 化が抑制され、血管老化が改善した。ApoE KO マウスへの ARB 投与は Drp1 の非活性化により fission を抑制し、さらにマイトファジーを誘導することで、ミトコンドリア機能および血管老化が改善した。このマイトファジーは LAMP2/TOMM20 および LAMP2/Rab9 の一致したシグナルの増加を認めたことから、Rab9 依存性オートファジー由来であることが判明した。

【結論及び考察】

我々は①ox-LDL が AT1 受容体の下流にある CRAF/MEK/ERK を介してミトコンドリアを fission 化させ、ARB 投与はこの経路を非活性化させることで過度な fission 化を抑制すること、②ARB が Rab9 依存性オートファジー由来としたマイトファジーを誘導することでミトコンドリア質管理に重要な役割を果たすこと、③ARB による過度な fission 化の抑制および ARB によるマイトファジーの誘導により、ミトコンドリア機能を維持することが脂質異常に伴う血管老化を改善することを証明した。臨床現場における適切な脂質コントロール下での心血管病の残余リスクについて、ARB 投与によるミトコンドリア質管理の改善がこの問題の一助となることを期待する。

(Frontiers in Cardiovascular Medicine [IN PRESS])