遺伝性高脂血症家兎 (WHHL-rabbit) の培養線維芽細胞 における脂質の蓄積と、それに対する低酸素の影響*

築 谷 学**	渡 辺 直 也**	向 谷 準 一**
末 広 厚 夫**	羽 溪 真**	藤 野 基 博**
石 川 雄 一**	高 野 新 二**	岡 本 良 三**
福 崎 恒**	渡 辺 嘉 雄***	

I. 緒 言

われわれは、すでに、家兎胸部大動脈培養平滑筋細胞にて、食餌性高脂血症家兎血清を含む medium で incubation した際、低酸素状態において、cholesterol とくに esterified cholesterol の蓄積が増加することを示し、動脈硬化の進展に組織低酸素が促進的に働いている可能性を指摘した¹⁾。

今回、家兎培養皮膚線維芽細胞を用い、低酸素下における各種の脂質含量を測定し、さらに末梢細胞における脂質の蓄積に対する LDL-receptor の役割りを究明する目的にて、LDL-receptor を欠く^{2~4)} WHHL-rabbit (Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit) の培養皮膚線維芽細胞において、それらを検討した。

II. 対象および方法

細胞は培養家兎線維芽細胞を使用し、10% newborn calf serum 添加 Eagle's minimum essential medium で 37°C, 5% CO₂ incubator にて培養した。

実験は、7~9 代目の細胞を 45 万/60 mm dish で plating し、subconfluent になるまで 3 日間培養した後、家兎 lipoprotein deficient serum 添加 medium (2.5 mg protein/ml) に交換、24 時間 incubation した後、normolipemic rabbit serum

* 1983 年 7 月、第 15 回日本動脈硬化学会総会において発表

** 神戸大学医学部第一内科

*** 同 附属動物実験施設

(NLS) 添加 medium および 1% コレステロール含有食にて飼育した hyperlipemic rabbit serum (HLS) 添加 medium に交換し、20% O₂ の normoxic incubator、および 2% または 5% O₂ の hypoxic incubator にて 48 時間培養した。その時点で、細胞は、Dulbecco's phosphate-buffered saline にて 2 回洗浄後、trypsinize し、さらに生理的食塩水にて 3 回遠沈、洗浄をくり返した。細胞は、超音波破碎した後、Folch の方法⁵⁾ にて、クロロホルム・メタノールにて lipid を抽出、非脂質成分除去操作を加えた後、各脂質量測定に供した。Free fatty acid は Itaya-Ui の変法 (NEFA-Test Wako), Triglyceride は acetyl acetone 法 (Triglyceride-Test Wako), Phospholipid は Wako 法 (Phospholipids-Test Wako), Cholesterol は Heider Boyett による fluorometric enzymatic assay⁶⁾ にて行った。

また、クロロホルム・メタノールにて生じた沈殿物は、乾燥後、0.1 N NaOH に溶解し、蛋白測定に供した⁷⁾。

次に、正常家兎培養皮膚線維芽細胞 (以下 normal fibroblast) と WHHL-rabbit 培養皮膚線維芽細胞 (以下 WHHL fibroblast) を同時に用い、20% O₂ incubator, 2% O₂ incubator にて、同様のプロトコールならびに方法で各脂質含量を測定した。

III. 結 果

Figure 1a は、normal fibroblast を 20% NLS にて、2% O₂ または 5% O₂ の hypoxic incubator

Fig. 1a Lipid content ratio of Hypoxia/Normoxia in 20% normolipemic serum. FFA; free fatty acid, FC; free cholesterol, EC; esterified cholesterol, PL; phospholipid TG; triglyceride

Fig. 1b Lipid content ratio of Hypoxia/Normoxia in 20% hyperlipemic serum.

で培養したものと、20% O₂ の normoxic incubator で培養したものとの、細胞蛋白あたりの各種脂質含量の比を示す。free fatty acid は2% O₂ で軽度増加し、triglyceride は hypoxia 群で著明に増加し、O₂ 濃度に逆相関した。free cholesterol, esterified cholesterol, phospholipid は、hypoxia 群と normoxia 群の間に差は認めなかった。Fig. 1b は、同様に20% HLS にて培養した際の各種脂質含量の比を示す。free fatty acid と free cholesterol は軽度増加し、triglyceride と esterified cholesterol は著明に増加し、それらは O₂ 濃度に逆相関した。また、phospholipid は差がなかった。以上より、

NLS 添加 medium で incubation した際、hypoxic condition にて、free fatty acid と triglyceride が増加するが、HLS 添加 medium で incubation した際には、それに加えて free cholesterol の軽度の増加および esterified cholesterol の著明な増加を伴うことが判明した。

次に、normal fibroblast および WHHL fibroblast を 20% NLS または、20% HLS で、2% O₂ 下にて48時間培養した際の成績を示す。culture dish あたりの細胞蛋白量は、両細胞ともに、20% O₂ では前値に比し約50%の増加をみたのに対し、2% O₂ では増加は認めなかった (Fig. 2a), free

Fig. 2a Cellular protein in three dishes (60 mm).
LPDS; lipoprotein deficient serum, NLS; normolipemic serum, HLS; hyperlipemic serum

Fig. 2b Free fatty acid content of cells.

Fig. 2c Triglyceride content of cells.

Fig. 2d Phospholipid content of cells.

Fig. 2e Free cholesterol content of cells.

Fig. 2f Esterified cholesterol content of cells.

fatty acid は、低酸素群において、それぞれ軽度の増加を (Fig. 2b), また, triglyceride は両細胞とも, NLS, HLS ともに, 低酸素群で著明な増加を認めた (Fig. 2c). Phospholipid 含量は, 両細胞とも HLS にて軽度の増加傾向を認めたが, O_2 濃度による差はなかった (Fig. 2d). free cholesterol 含量は, normal fibroblast においては, 20% NLS では差がなかったが, 20% HLS では低酸素群で46%の増加を認めた. WHHL fibroblast では, 20% NLS で低酸素群で軽度減少を, 20% HLS で29%の増加を認めた (Fig. 2e). Fig. 2f は esterified cholesterol 含量を示す. 両細胞とも, 20% NLS では O_2 濃度にかかわらず esterified cholesterol の蓄積は認めなかったが, 20% HLS では esterified cholesterol の蓄積を認め, 低酸素群において normal fibroblast では2, 3倍, WHHL fibroblast では1.9倍と蓄積が増加した. また, WHHL fibroblast は normal fibroblast に比し, cholesterol の蓄積がやや少ない傾向があった.

IV. 考 察

動脈硬化の促進因子として, 高脂血症をはじめ種々の因子があげられているが, 動脈壁の組織低酸素状態もその1つと考えられている⁸⁾. Kjeldsen ら⁹⁾ は, 食餌性高脂血症家兎を用い, また, われわれ¹⁰⁾ は, 遺伝性高脂血症家兎 (WHHL-rabbit) を用い, systemic hypoxia が動脈硬化性病変を促進させる事を報告した. しかしながら, in vivo において低酸素吸入により systemic hypoxia とした場合, 様々な二次的な影響は否定しきれず, その意味で培養細胞を用い, 動脈硬化の主たる病像である細胞内脂質の蓄積に対する, 低酸素の直接的な影響をみる事は有意義であると思われる. 培養細胞を低酸素状態にした際の脂質含量を測定した報告は少ないが, Gordon ら¹¹⁾ は, mouse fibroblast を10% horse serum を培地とし, suspension culture で培養した際, 低酸素下にて, free fatty acid および triglyceride の蓄積を生じるが, cholesterol と phospholipid には差がなかったことを報告している. 一方, St. Clair¹²⁾, Chen¹³⁾ らは, 培養平滑筋細胞を, 食餌性高脂血症血清添加培地で incubation した際, 細胞内コレステロール(とくに

エステル型)の蓄積が著明に増加することを示している.

今回, われわれは, 家兎培養線維芽細胞を, normolipemic rabbit serum (NLS) 添加培地, および diet induced hyperlipemic rabbit serum (HLS) 添加培地で培養した際の, 低酸素下での細胞内脂質の蓄積を検討したところ, NLS 添加培地で培養した際には, 低酸素群にて従来の報告のごとく free fatty acid と triglyceride が増加する結果を得たが, HLS 添加培地で培養した際には, 低酸素群にて, free fatty acid と triglyceride の増加に加え, さらに cholesterol とくに esterified cholesterol が著増する結果を得た. 低酸素状態におかれた細胞では, 脂肪酸合成が高まっていることが報告されているが¹⁴⁾, NLS 添加培地を使用した際には細胞内コレステロールは過剰にならないため, 低酸素により増量した脂肪酸は主として triglyceride として蓄積するが, HLS 添加培地を使用した際には, 低酸素状態にすることにより細胞内コレステロールが何らかの機序にて, さらに過剰になり, 増量した脂肪酸は triglyceride のみならず cholesterol ester としても蓄積していくものと思われる.

また, LDL-receptor を欠く WHHL fibroblast においても HLS 添加培地で incubation した際 cholesterol の蓄積を認め, 低酸素にて増強したことより, 末梢細胞での cholesterol 蓄積には, 高脂血症環境下においては, LDL-receptor 以外の lipoprotein の取り込みが主な役割りを果たしている可能性が示唆され, 低酸素で cholesterol 蓄積が増強する機序には, LDL-receptor の有無は無関係と思われる.

なお, WHHL fibroblast を NLS 添加培地で培養した際, 低酸素群で free cholesterol が減少しているが (Fig. 2e), この機序としては, 低酸素により内因性コレステロール合成が抑制されたために¹⁵⁾, LDL-receptor を欠くことによる外因性コレステロールの uptake の不足と相まって, 細胞コレステロールが枯渇した状態を表わしているものと想像される. また, normal fibroblast は WHHL fibroblast に比し, HLS 添加培地で培養した際, normoxia, hypoxia ともに esterified cholesterol の蓄積がやや多いが, この差はおそら

く LDL-receptor の有無による uptake の差であろうと推測される。しかしながら、今回の実験では、LPDS 添加培地で前処置することにより、LDL-receptor の activity を最大にしているが、in vivo においては、とくに高脂血環境下では、末梢細胞の LDL-receptor の activity は、著明に抑制されていると考えられるので、in vivo での末梢細胞への cholesterol 蓄積に対し、LDL-receptor を介した uptake が大きな割合を占めるとは考えにくい。

以上より、高脂血環境下における末梢細胞への cholesterol の蓄積には、LDL-receptor を介さない取り込みが重要と思われ、低酸素により蓄積が増加することより、血管平滑筋での cholesterol 蓄積にも、組織低酸素状態が促進的に働いている可能性が示唆された。

V. 結 語

1) normal fibroblast を 20% normolipemic serum で 48 時間 incubation した際、低酸素群において free fatty acid の軽度の増加傾向および triglyceride の著明な増加を認めた。20% hyperlipemic serum で incubation した際には、free fatty acid, triglyceride の増加に加え、軽度の free cholesterol の増加および esterified cholesterol の著明な増加を認めた。また、それらの増加は O_2 濃度に逆相関していた。

2) LDL-receptor を欠いた WHHL fibroblast においても、normal fibroblast とほぼ同様の結果が得られ、20% hyperlipemic serum で incubation した際 cholesterol の増加がみられ、これは LDL-receptor 以外の経路に由来するものと考えられた。

文 献

- 1) 築谷 学, 末広厚夫, 羽溪 真, 今井直昭, 高野新二, 岡本良三, 福崎 恒: 家兎培養平滑筋における低酸素の細胞コレステロール蓄積に及ぼす影響。日本老年医学会雑誌, 20: 162-163 (1983), (抄録)。
- 2) Tanzawa, K., Shimada, Y., Kuroda, M., Tsujita, Y., Arai, M. and Watanabe, Y.: WHHL-rabbit: A low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. FEBS

Lett., 118: 81-84 (1980).

- 3) 羽溪 真, 築谷 学, 末広厚夫, 今井直昭, 堀 康郎, 高野新二, 岡本良三, 福崎 恒, 渡辺嘉雄, 藤野基博: 動脈硬化症発症初期因子に関する研究——自然発症高脂血症家兎に対する高酸素, 低酸素の影響——。日本老年医学会雑誌, 18: 52 (1981), (抄録)。
- 4) Tsukitani, M., Okamoto, R., Suehiro, A., Hatani, M., Fujino, M., Imai, N., Takano, S., Watanabe, Y. and Fukuzaki, H.: LDL receptor activity of cultured arterial smooth muscle cells from genetically hyperlipidemic rabbits (WHHL-rabbit). Kobe J. Med. Sci., 28: 171-179 (1982).
- 5) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226: 497-509 (1957).
- 6) Heider, J. G. and Boyett, R. L.: The picomole determination of free and total cholesterol in cells in culture. J. Lipid Res., 19: 514-518 (1978).
- 7) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275 (1951).
- 8) Hueper, W. C.: The anoxemia theory. Arch. Pathol., 38: 173-181, 245-285 (1944).
- 9) Kjeldsen, K., Wanstrup, J. and Astrup, P.: Enhancing influence of arterial hypoxia on the development of atheromatosis in cholesterol-fed rabbits. J. Atheroscler. Res., 8: 835-845 (1968).
- 10) Okamoto, R., Hatani, M., Tsukitani, M., Suehiro, A., Fujino, M., Imai, N., Takano, S., Watanabe, Y. and Fukuzaki, H.: The effect of oxygen on the development of atherosclerosis in WHHL rabbits. Atherosclerosis, 47: 47-53 (1983).
- 11) Gordon, G. B., Barcza, M. A. and Bush, M. E.: Lipid accumulation in hypoxic tissue culture cells. Amer. J. Path., 88: 663-678 (1977).
- 12) St. Clair, R. W. and Leight, M. A.: Differential effects of isolated lipoproteins from normal and hypercholesterolemic rhesus monkeys on cholesterol esterification and accumulation in arterial smooth muscle cells in culture. Biochim. Biophys. Acta, 530: 279-291 (1978).
- 13) Chen, R. M. and Dzoga, K.: Effect of hyperlipemic serum lipoproteins on the lipid accumulation and cholesterol flux of rabbit aortic medial cells. Atherosclerosis, 28: 339-353 (1977).
- 14) Filipovic, I. and Buddecke, E.: Increased fatty acid synthesis in arterial tissue hypoxia. Europ. J. Biochem., 20: 587-592 (1971).
- 15) Robertson, Jr. A. L.: Oxygen requirements of the human arterial intima in atherogenesis. In C. H. Miras, A. N. Howard and R. Paoletti (Eds.), Progress in biochemical pharmacology—Recent advances in atherosclerosis, 4: Karger, New York, pp. 305-316 (1968).

Summary

Effect of Hypoxia on Lipids Accumulation in Cultured Fibroblasts from WHHL-rabbit

Manabu TSUKITANI*, Naoya WATANABE*, Junichi MUKODANI*, Atsuo SUEHIRO*,
Makoto HATANI*, Motohiro FUJINO*, Yuichi ISHIKAWA*, Shinji TAKANO*,
Ryozo OKAMOTO*, Yoshio WATANABE** and Hisashi FUKUZAKI*

*First Department of Internal Medicine, **Institute for Experimental Animals,
Kobe University School of Medicine

We previously reported that hypoxic incubation (2% O₂) promoted the cellular cholesterol (especially esterified form) accumulation in cultured rabbit arterial smooth muscle cells in the presence of diet induced hyperlipemic serum.

Present study was designed to examine cholesterol and other lipids accumulation in cultured rabbit fibroblasts under different degree of hypoxic conditions (2% O₂ and 5% O₂), and to investigate the role of LDL-receptor in cellular lipids accumulation using cultured fibroblasts from WHHL-rabbit.

After 48 hours incubation of normal fibroblasts in the medium with 20% normolipemic rabbit serum (NLS), free fatty acid level increased slightly and triglyceride level increased markedly in hypoxic group. While in the medium with 20% hyperlipemic rabbit serum (HLS), in addition to the increased free fatty acid and triglyceride levels,

free cholesterol level increased slightly and esterified cholesterol level increased markedly in hypoxic group. And these increases were correlated with O₂ concentration inversely.

Moreover, in WHHL fibroblasts, which lacked LDL-receptor, cellular lipids accumulation were also observed after 48 hours incubation in the medium with 20% HLS, and hypoxic incubation enhanced the cellular lipids accumulation, as in normal fibroblasts.

These results suggest that under hyperlipemic condition, receptor non-mediated uptake of lipoproteins plays an important role in cellular lipids deposition in peripheral cells, and tissue hypoxia may promote the lipids accumulation in peripheral cells including vascular smooth muscle cells by LDL-receptor independent mechanism.

Key words: Tissue culture, hypoxia, hyperlipemia, LDL-receptor, lipid deposition.