

7-ケトコレステロールの白血球-血管内皮相互作用の検討

谷 真理子

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科血管代謝探索講座 特任准教授

緒 言

動脈硬化の形成には、血管壁におけるコレステロールエステルの蓄積と、骨髄由来細胞群による炎症過程という二つの現象が関与している。この動脈硬化症における炎症過程とは、まず好中球、単球、リンパ球等の白血球が血管内皮細胞に接着・内皮下に遊走し、単球から分化したマクロファージが、酸化LDLを取り込み、泡沫細胞となって集簇する過程であると考えられてきた。よって、血管炎症の初期病変として、白血球-血管内皮細胞の相互作用は重要と考えられる。血管内皮細胞に発現する細胞接着分子には主に、ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1)、VCAM-1 (vascular-cell adhesion molecule-1)、E-selectinがあり、これらが白血球のインテグリンや糖鎖と結合することにより、単球やマクロファージの内皮下への浸潤につながっていく¹⁾。

動脈硬化症の危険因子として、加齢や生活習慣等の因子が考えられている。生活習慣の中でも食生活、特に脂質に注目すると、コレステロールの摂取が血中の酸化コレステロールの上昇につながるという報告がある²⁾。

7-ketocholesterol (7K) は、コレステロールが酸化変性して生じる酸化コレステロールの一つである。食事に含まれているコレステロールが熱や光によって変性したものが外因性に摂取されるほか、体内ではコレステロールやコレステロール脂肪酸エステルが活性酸素によって酸化されて生じる³⁾。7-ketocholesterolはアテローム性動脈硬化プラークに存在し⁴⁾、また血中の7-ketocholesterolの濃度が高い人は冠動脈疾患を発症しやすいという報告もある⁵⁾。7-ketocholesterolは*in vitro*、*in vivo*で高い炎症誘発性や細胞毒性をもつことが報告されているが^{6,7)}、血管内皮細胞にどのような影響を及ぼすかについて詳しくは解明されていない。

本研究では、酸化コレステロールの一つである7-ketocholesterolの血管炎症惹起作用について、白血球の血管内皮細胞接着に及ぼす影響と、その分子メカニズムを検討した。

実験方法

1. 層流下での血管内皮細胞に対する単球接着実験

ゼラチンコートしたカバースリップにヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell; HUVEC) を播種し、50 μ M 7-ketocholesterolあるいはcholesterolを24時間前刺激した後、0.1 ng/mL TNF α を4時間刺激し、37°Cに保温された位相差顕微鏡上のflow chamberにセットした。ヒト骨髄単球性白血病細胞株 (THP-1) 細胞溶液を、flow chamberにシリンジポンプを用いて流速43.2 mL/h (1.0 dyne/cm²) で流し、HUVECとTHP-1細胞の接着の様子をビデオカメラで撮影した⁸⁾。1視野あたり10秒、各コンディション14視野を録画し、1、2、13、14番目を除いた10視野を計測に用いた。撮影した動画はPCに取り込んで画像化し、THP-1細胞のrollingとadhesionの数を計測した。

2. 接着分子および炎症シグナルのタンパク発現の変化

Cholesterolもしくは7-ketocholesterol 24時間刺激・TNF α 4時間刺激 (接着分子)、あるいはchol/7-ketocholesterol 1時間刺激・TNF α 15分刺激 (シグナル伝達分子) をしたHUVECからlysateを回収した。Reducing buffer (E-selectinは、Non-reducing buffer) を用いて変性させた後、SDS-PAGEで分離し、E-selectin、ICAM-1、VCAM-1のタンパク質発現量、p-JNK (c-jun N-terminal kinase)、p-p65の活性化、NF κ Bの不活性化タンパクであるI κ B α のタンパク質発現量を調べた。ローディングコントロールには、 β -actinを用いた。

3. 接着分子および炎症シグナルのmRNA発現の変化

Cholesterolもしくは7-ketocholesterol 24時間刺激、TNF α 2時間刺激をしたHUVECからRNAを抽出し、Prime script RTを用いてcDNAを作製した。さらに、KAPA SYBR qPCR kitを用いて反応させ、mRNA量を測定した。ターゲット遺伝子は、E-selectin、Interleukin-8 (IL-8)、Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)、

Toll-like receptor 2 (TLR2)、Toll-like receptor 4 (TLR4) とし、コントロールは18S rRNAとした。

4. Immunofluorescence による NFκB の核移行

HUVEC に cholesterol もしくは 7-ketocholesterol 24 時間刺激、TNFα 20 分刺激を行った後、1% パラホルムアルデヒドで固定し、一次抗体として rabbit anti-p65、二次抗体として goat anti-rabbit-FITC を用いて免疫蛍光染色を行った。さらに DAPI を用いて核を染色し、細胞内での p65 の局在を調べた。

結 果

Flow assay により、7-ketocholesterol 添加で白血球-血管内皮細胞の相互作用にどのような影響が及ぼされるかを検討したところ、TNFα 単独刺激・cholesterol 添加と比較して THP-1 細胞のローリング数が有意に増加していた。接着現象については、7-ketocholesterol 添加で、TNFα 単独刺激と比べて有意に増加していたが、cholesterol 添加と比べると増加傾向は見られるものの有意差は見られなかった。また、ローリング数と接着数の合計数の比較においても、7-ketocholesterol 添加により cholesterol 添加に比べて有意に増加していた (Fig. 1A, B)。

次に、白血球-血管内皮細胞の相互作用に細胞接着分子の発現が関与しているか、ウェスタンブロット法で細胞接着分子のタンパク発現量を検討した。その結果、7-ketocholesterol 添加で、TNFα 単独刺激や cholesterol 添加に比べて E-selectin の発現量が特に増加していることが確認された (Fig. 2A)。E-selectin は mRNA レベルでも増加しており、ウェスタンブロット法で得られた結果と一致していた (Fig. 2B)。

さらに、血管内皮細胞傷害により生じる現象として、細胞接着分子の発現亢進の他に、炎症性サイトカインやケモカインの産生増加が挙げられる⁹⁾。そこで、RT-PCR 法によりケモカインの mRNA 量を測定したところ、インターロイキン-8 (IL-8) の mRNA 量が 7-ketocholesterol 添加で有意に増加していた。また、7-ketocholesterol が細胞内に取り込まれる受容体を同定するために、TLR2、TLR4 の mRNA 量も測定したが、TLR2 の発現量は変化せず、TLR4 は、7-ketocholesterol 添加で TNFα 単独刺激や cholesterol 添加に比べて増加するものの、TNFα 刺激なしに比して変化は認められなかった (Fig. 2B)。

接着分子やケモカインの発現上昇に至る細胞内シグナル伝達経路について検討したところ、7-ketocholesterol 添加により、p-p65 の発現上昇と IκBα の分解が見られ (Fig. 3A)、さらに免疫蛍光染色では p65 が核に移行し

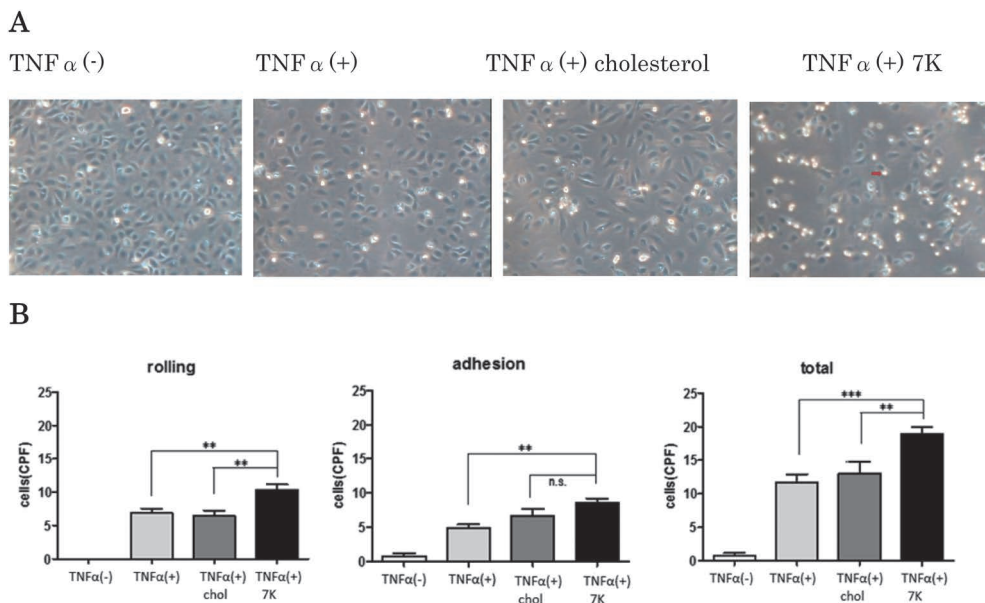


Fig. 1 7-ketocholesterol の白血球-血管内皮細胞相互作用への影響。Cholesterol/7-ketocholesterol 24 時間刺激、TNFα 4 時間刺激をした HUVEC を用いて、flow assay を行った。3 回実験を行い、同じ傾向の結果が得られたので、代表的な 1 回の結果を示す。(A) 撮影した動画の一部を切り取った静止画。(B) 各コンディションにおける、撮影した 10 視野でのローリングと接着の合計数を表している。***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, n.s.: not statistically significant

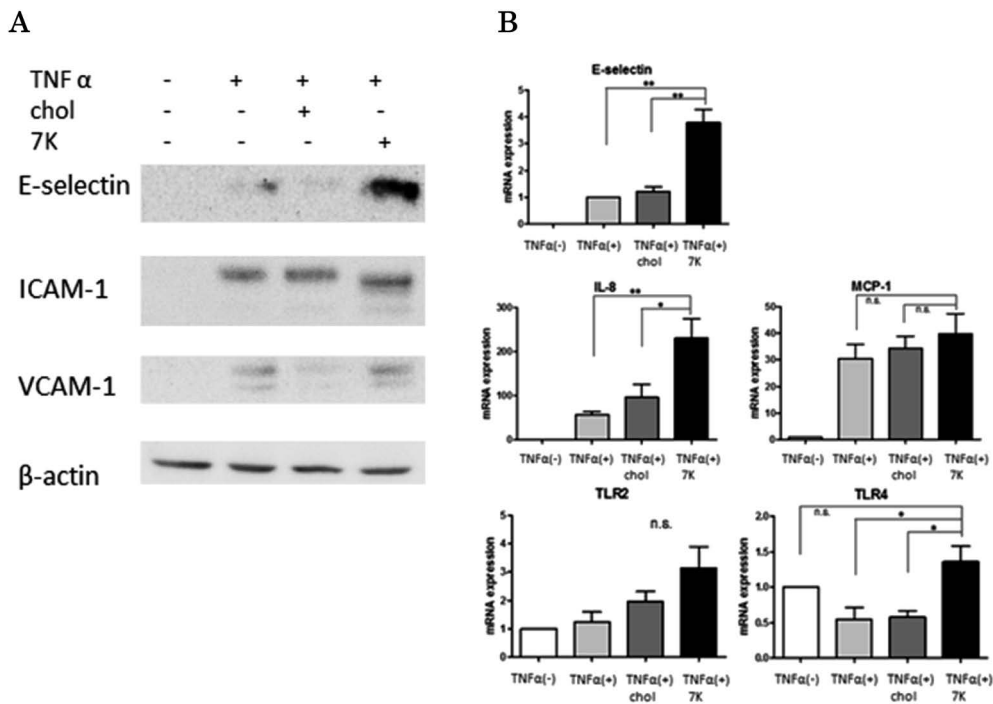


Fig. 2 (A) Cholesterol/7-ketocholesterol 24時間刺激、TNFα4時間刺激をした後E-selectin, ICAM-1, VCAM-1の発現量の変化を示す。β-actinは同一メンブレン上でリプローブした結果である。3回実験を行い、代表的な1回の結果を示している。(B) Cholesterol/7-ketocholesterol 24時間刺激、TNFα2時間刺激をした後のmRNA量の変化を示す。E-selectinはTNFα (+)を1としたときの相対値、IL-8, MCP-1, TLR2, TLR4については、TNFα (-)を1としたときの相対値を示している (n=3)。**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, n.s.: not statistically significant

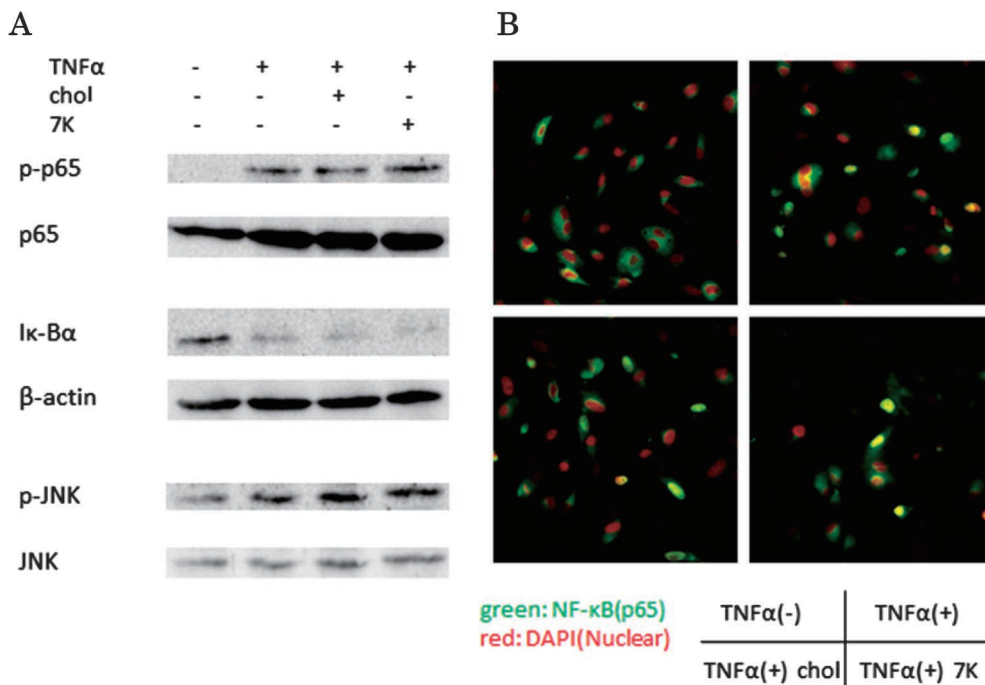


Fig. 3 (A) Cholesterol/7-ketocholesterol 1時間刺激、TNFα15分刺激をした後のp-p65, IκBα, p-JNKの発現量の変化を示す。p65, β-actin, JNKはそれぞれ同一メンブレン上でリプローブした結果である。3回実験を行い、代表的な1回の結果を示している。(B) Cholesterol/7-ketocholesterol 24時間刺激、TNFα20分刺激をしたHUVECにおける、NF-κB p65の局在を示す。緑がp65、赤がDAPIで染色した核の位置を表しており、二つが重なった部分は黄色で表されている。3回実験を行い、代表的な視野の写真を示している。

ていることが確認された (Fig. 3B)。p-JNKのタンパク発現量は、7-ketocholesterol添加で、TNF α 単独刺激やcholesterol添加に比して変化は見られなかった (Fig. 3A)。

考 察

本研究の結果より、7-ketocholesterol添加によって白血球-血管内皮細胞の相互作用が亢進することがわかった (Fig. 1)。酸化コレステロールを多く含む食品を摂取したり、生体内でコレステロールが酸化されたりして、血中で7-ketocholesterolが増加する状況では、TNF α 等の炎症刺激が入ると、白血球の血管内皮細胞への接着が亢進する可能性が考えられる。

HUVECにおいては、E-selectinの発現が7-ketocholesterol添加で増加していた (Fig. 2A)。E-selectinの発現増加は、Flow assayにおいてローリングが有意に増加していたという結果と一致する。さらに、HUVECにおけるケモカインのmRNA発現量は、IL-8で有意に増加していた (Fig. 2B)。IL-8は、好中球に対する走化因子と考えられていたが、それだけでなく、ローリングしている単球が血管内皮との強固な接着に移行するのにも重要な役割を果たすという報告がある¹⁰⁾。MCP-1は、単球の炎症組織へのrecruitmentに関わっているとされている⁹⁾が、今回は7-ketocholesterol添加による有意な産生増加は見られなかった。

Huang et al.は、ヒト網膜色素上皮細胞で、7-ketocholesterolによる炎症刺激はTLR4を介することを報告している¹¹⁾。そこで、7-ketocholesterol刺激をしたHUVECにおけるTLR2、TLR4のmRNA量を調べたが、TLR2は変化せず、TLR4は7-ketocholesterol添加でTNF α 単独刺激やcholesterol添加に比べて増加するものの、TNF α 刺激なしとは変わらないという結果になった (Fig. 2B)。

血管内皮細胞において、細胞接着分子の発現上昇に至る細胞内シグナル伝達経路としては、NF- κ Bを介した経路が報告されている¹²⁾。そこで、NF- κ Bの活性化を検討したところ、7-ketocholesterol刺激でI κ B α の分解亢進と、p65の核移行の増加が見られた (Fig. 3)。p65のリン酸化亢進もわずかに認められ、7-ketocholesterolによってNF- κ B経路が活性化していることが考えられた。また、今回NF- κ B同様に細胞接着分子発現に関与することが知られているp-JNKの発現の増加は見られなかった。したがって、7-ketocholesterolは、NF- κ Bをはじめ、炎症シグナル経路の活性化することによってE-selectin

の発現が増加することが示唆された。

要 約

コレステロールが酸化変性した酸化コレステロールは加工食品に多く含まれ、動脈硬化の発症・進展に関与する危険因子として注目されているが、その詳しいメカニズムはわかっていない。本研究では、酸化コレステロールの一つである7-ketocholesterolの血管炎症惹起作用について、白血球の血管内皮細胞接着に及ぼす影響と、その分子メカニズムを検討した。

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に、TNF α と7-ketocholesterolあるいは対照としてのコレステロール (cholesterol) を添加し、24時間培養後、ヒト骨髄単球性白血病細胞株 (THP-1) を用いて、定常流下における生理的細胞接着実験を行った。その結果、HUVECとTHP-1細胞の相互作用は、7-ketocholesterol添加によってローリングが有意に増加し ($p < 0.01$)、ローリングと接着の合計数も、7-ketocholesterol添加によって有意に増加した (18.9 ± 0.35 cells/CPF; $p < 0.01$)。また、同様の条件下におけるHUVECでの細胞接着分子のタンパク発現 (ICAM-1、VCAM-1、E-selectin) は、7-ketocholesterol添加によって増加し、IL-8のmRNA量も増加していた。さらに、7-ketocholesterol添加の細胞接着分子発現誘導の機序を検討したところ、7-ketocholesterol添加においてNF- κ Bの不活性化因子であるI κ B α のタンパク量は低下しており、また免疫蛍光染色法でp65の核移行が確認されたことから、炎症性転写因子であるNF- κ Bが関与していることが示唆された。

以上より、今回の研究によって7-ketocholesterolが、血管炎症を介して動脈硬化の進展リスクを高める可能性を示された。

謝 辞

本研究を実施するにあたり助成を頂きました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) R. Ross: *N. Engl. J. Med.*, **340**, 115-126, 1999.
- 2) H. N. Hodis, et al.: *Atherosclerosis*, **89**, 2-3, 117-126, 1991.
- 3) G. Poli, et al.: *Redox Biol.*, **1**(1), 125-130, 2013.
- 4) M. Ohtsuka, et al.: *J. Atheroscler Thromb.*, **13**(5), 256-262, 2006.
- 5) T. Hitsumoto, et al.: *J. Atheroscler Thromb.*, **16**(4), 363-

7-ケトコレステロールの白血球-血管内皮相互作用の検討

- 370, 2009.
- 6) A. Vejux, et al.: *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **41**(7), 2008.
- 7) J. Amaral, et al.: *PLoS ONE*, **8**(2), e56099, 2013.
- 8) M. Yoshida, et al.: *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **21**(7), 1165-1171, 2001.
- 9) S. S. William, et al.: *Atherosclerosis*, **160**(1), 91-102, 2002.
- 10) S. Apostolakis, et al.: *Cardiovasc. Res.*, **84**(3), 353-360, 2009.
- 11) J. D. Huang, et al.: *PLoS ONE*, **18**, 9(7): e100985, 2014.
- 12) C. Tucker, et al.: *The FASEB Journal*, **9**, 899-908, 1995.