

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業） 分担研究報告書

単球と血管内皮細胞の接着とその制御に関する研究

分担研究者 田中良哉（産業医科大学医学部第一内科講師）

研究要旨

動脈硬化症は、脂質代謝異常と粥状硬化巣における単球/マクロファージの集積を伴う炎症性変化によってもたらされる。今年度、動脈硬化性炎症部への単球の集積における酸化LDLの役割を、血管内皮細胞との接着と血管外遊出の観点から検討した。その結果、無刺激単球を酸化LDLで刺激すると、血管内皮細胞とのインテグリンLFA-1依存性の接着が著明に誘導された。また、単球を酸化LDLで刺激すると、単球のCD31発現とCD31依存性の経内皮細胞遊走率を誘導した。酸化LDL刺激により誘導されたこれらの単球機能は、 α -tocopherol、及び、PKC阻害剤で阻害された。以上、酸化LDLは、単球に於いてLFA-1の活性化とLFA-1依存性の血管内皮への接着、及び、CD31の発現とCD31依存性の経血管内皮遊出を誘導し、これらの作用は、PKCを介することが示唆された。即ち、単球の機能発現に於ける脂質代謝異常と細胞接着/遊走のクロストークが動脈硬化炎症部の病態形成に関与するものと考えられた。

A. 研究目的

動脈硬化の病態は、脂質代謝の異常に加え、血管障害に対する修復反応に単球/マクロファージを初めとする炎症性細胞による慢性炎症の要因が加わったものであると理解される。これまで、組織学的には、粥状動脈硬化巣では、内膜下から内膜深層にかけて著明な新生血管とその周囲の単球の集積を認めた。これらの事実は、大動脈壁は、血流に伴う極めて強いはずり応力が掛かる部位であり単球の浸潤部位としては不適切である一方、比較的はずり応力の弱い内膜の新生微小血管（後毛細管細静脈）が単球の浸潤部位であることを示唆するものである。循環リンパ球や単球が後毛細管細静脈の血管内皮細胞と接着して組織内へ遊出するという点は、炎症病態形成に一般的に認められるものである。しかしながら、動脈硬化巣への単球の集積機構に関しては、これまで不詳であった。今年度は、動脈硬化病態形成との関連性が報告されている酸化LDLやケモカインMCP-1が、単球の血管内皮細胞との接着、及び、単球の経血管内皮潜り抜けにおいて、如何なる役割を担うかを解明することを目的として以下の研究を行った。

B. 研究方法

- (1) 無刺激単球は健常人末梢血より比重遠心法で単核球を得、その後エルトリエータを用いて分離した。90%以上がCD14陽性の単球であることを確認した。
- (2) 酸化LDLは、従来の方法を用いて健常人血清から分離精製した（東京大学先端科学技術研究セ

ンター和田洋一郎博士担当）。

- (3) α -tocopherolと β -tocopherolは、従来の方法を用いて精製した（東京大学先端科学技術研究センター野口範子氏担当）。
- (4) 細胞接着実験は、ヒト臍帯静脈由来内皮細胞HUVECと皮膚細静脈由来内皮細胞株HMEC-1を血管内皮細胞として用いて48穴プラスチックプレートに固相し、 $5 \text{ } ^{1}\text{Cr}$ でラベルした単球を添加して30分培養後、非接着細胞を完全に除去して接着細胞の接着率を求めた。
- (5) 細胞内骨格線維F-actinは、単球を酸化LDLなどで刺激1分後に、フォルマリンで固定し、rhodamine-phalloidineにて染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
- (6) 単球のLFA-1 α 鎖(α L)、およびLFA-1の活性化エピトープの発現は各々TS1/22抗体とNK1-L16抗体で、血管内皮細胞のCD31はNIH31-2抗体でICAM-1は84H10抗体で染色し、フローサイトメータで検出した。
- (7) 単球の経内皮細胞遊走率は、皮膚細静脈由来内皮細胞株HMEC-1を24穴チャンバー上に培養後、 $5 \text{ } ^{1}\text{Cr}$ でラベルした単球を添加して1時間培養後、内皮下に遊走した細胞率を求めた。

（倫理面への配慮）：該当なし

C. 研究結果

- (1) elutriation法で得た無刺激単球は、血管内皮細胞HUVEC/HMEC-1と接着できないが、酸化LDL及びMCP-1の刺激により単球の接着は、刺激

後30分以内に著明に誘導された。なお、native LDLやアセチル化LDLには細胞接着誘導作用はなかった。また、酸化LDLによる刺激には濃度依存性が認められ、100 μ Mで最大に達した。

(2) 酸化LDLによって誘導された単球と内皮細胞との細胞接着は、インテグリンLFA-1 α 鎖(α L)抗体とLFA-1 β 鎖(β 2)抗体で阻害されたが、CD31抗体には阻害作用がなく、この接着はインテグリンLFA-1に依存性であった。

(3) インテグリンの活性化には、細胞内骨格繊維の重合化によってもたらされるインテグリンの集束や立体構造の変化を必要とする。単球を酸化LDLやMCP-1で刺激すると、細胞内骨格繊維F-actinの重合化を1分以内に誘導した。

(4) インテグリンに活性化に伴い表出するNK1-L16抗体で認識されるLFA-1活性化エピトープは、単球を酸化LDLで刺激すると発現したが、LFA-1 α 鎖の発現量には変化がなく、インテグリンの量的変化ではなく質的变化によって単球の接着性が誘導されることが示唆された。

(5) 酸化LDLによって誘導された単球と内皮細胞との細胞接着、単球のF-actinの重合化、単球のLFA-1活性化エピトープの発現は、単球を α -tocopherolで前処理すると阻害されたが、 β -tocopherolは阻害効果を有さなかった。 α -tocopherolは、抗酸化作用以外にPKC阻害作用を有すると報告されるが、PKC阻害薬H7で単球を前処理しても同様の阻害効果を認めた。なお、MCP-1によって誘導される単球の接着性やF-actinの重合化は、 α -tocopherolでもH7でも阻害されなかった。

(6) 血管内皮細胞を酸化LDLで刺激すると、2時間以内に内皮細胞上のICAM-1の発現とCD31の発現が著明に増強した。

(7) 酸化LDL刺激により単球の経内皮細胞遊走率も増強した。増強された遊走率はCD31抗体で阻害されたが、LFA-1抗体には阻害作用がなく、酸化LDLはCD31依存性の単球の経内皮遊走を誘導するものと考えられた。

(8) 血管内皮細胞を α -tocopherolやH7で前処理すると、酸化LDLによって誘導された経内皮細胞遊走率が抑制されたが、 β -tocopherolは阻害効果を有さなかった。

D. 考察

以上の結果より、酸化LDLは、ケモカインMCP-1と同様、単球に対して、細胞内骨格依存性

のインテグリンLFA-1の活性化とLFA-1依存性の血管内皮細胞との接着を誘導する事、さらに酸化LDL刺激による単球の接着性に誘導は、PKC阻害薬及び抗酸化作用以外にPKC阻害作用を有すると報告される α -tocopherolによって抑制されたことから、PKCを介するものと考えられた。MCP-1による単球の接着性の誘導は、H7や α -tocopherolの影響を受けず、酸化LDLによるそれと異なるパスイエイを介するものと思われた。即ち、酸化LDL刺激によって誘導されるPKCを介する細胞内シグナルが、単球のインテグリン依存性細胞接着を誘導し、循環血中の単球と血管内皮との接着をもたらすものと考えられた。また、酸化LDLは、血管内皮細胞のICAM-1の発現を増強し、そのレセプターであるLFA-1を発現する単球との接着の機会が増加することが示唆された。

一方、単球はCD31を高発現し、血管内皮細胞上のCD31とホモフィリックに接着して単球の経血管内皮細胞間の潜り込みと浸潤を担うとされる。酸化LDLは、血管内皮細胞上のCD31の発現と、単球のCD31依存性の経血管内皮細胞間の潜り込みを誘導する事が明らかとなり、さらに、CD31の発現とCD31依存性の経血管内皮遊出も、PKCを介することが示唆された。

動脈硬化病態は、脂質異常と共に、単球の組織内への集積による慢性炎症がその病態形成に中心的に関与する。以上より、ケモカインなどの炎症性サイトカインのみならず酸化LDLの刺激により伝達される"inside-out"のシグナル（ここでは主にPKC）を介して、単球においてはインテグリンの接着性と血管内皮との接着を誘導する事、血管内皮細胞ではCD31の発現量と単球の潜り込みを誘導する事が明らかとなった。即ち、単球や血管内皮細胞の機能発現に於ける脂質代謝異常と細胞接着/遊走のクロストークが、単球の組織内集積を特徴とする粥状動脈硬化炎症部の病態形成に関与するものと考えられた。

E. 結論

酸化LDLは、単球に於いてLFA-1の活性化とLFA-1依存性の血管内皮への接着、及び、血管内皮細胞に於いてCD31の発現とCD31依存性の単球の経血管内皮遊出を誘導し、これらの作用は、PKCを介することが示唆された。即ち、単球の機能発現に於ける脂質代謝異常と細胞接着/遊走のクロストークが、単球の組織内集積を特徴とする動脈硬化炎症部の病態形成に関与するものと考え

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）
分担研究報告書

られる。

F. 研究発表

1. 論文発表：該当なし
2. 学会発表

(1) 太幡敬洋、田中良哉、峯信一郎、藤崎丈詞、
飯田武、江藤澄哉：酸化LDLによる単球のインテ
グリン依存性接着の誘導機構： α -tocopherolによ
る抑制効果について。第29回日本免疫学会総会。
1999年12月（京都）

G. 知的所有権の取得状況：該当なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）
分担研究報告書

LDL酸化変性の追跡と抗酸化剤作用の測定

分担研究者 二木鋭雄（東京大学先端研教授）

研究要旨

動脈硬化の引き金となっている酸化LDLの生成を抑制するための、新規抗酸化剤を合成し、この効果と作用機序を検討した。また、従来不明な点が多い、血管壁での脂質酸化メカニズムを明らかにするため、LDL酸化を経時的に観察することを可能とする蛍光試薬を合成し、これを大動脈細胞混合培養系に加えるシステムの構築を行った。

A. 研究目的

動脈硬化初期病変形成においてLDLの酸化変性が重要であるということは、*in vivo*で動脈硬化巣に酸化LDLが存在すること、動脈硬化症患者の血中に酸化LDLの自己抗体が発見されたこと、動脈硬化の予防・改善に抗酸化剤が効果を発揮することなどから示唆されている。一方*in vitro*においてLDLが白血球由来のフリーラジカルや酵素により酸化されることが確かめられている。しかしLDLの酸化には種々の血管細胞・血漿成分が複雑に関連しており、詳細な機序は未だ不明のままである。そこで酸化を解析する新たな手段として過酸化物質と反応することにより蛍光を発するジフェニルピレニルフォスフィン（DPPP）を培養細胞系に導入することを目的とした。

B. 研究方法

DPPPは無蛍光だが、過酸化物質と反応しDPPP=Oとなり、蛍光を発する。このDPPPを用い1.多核白血球（PMN）および2.低比重リポタンパク（LDL）の酸化の追跡を行った。

1. PMNはマウスの腹腔からチオグリコレート処理5時間後に採取した。細胞懸濁液にDPPPをDMSO溶液として添加し、細胞に取り込ませた。この細胞に過酸化物質を添加あるいはフォルボールエステルで刺激し、蛍光の変化を蛍光分光光度計または蛍光顕微鏡で測定した。

2. LDLはヒト凍結血漿から超遠心分離し、界面活性剤（Pluronic F-127）に溶解させたDPPPを添加することによりLDL内にDPPPを取り込ませた。このLDLをラジカル開始剤により酸化させ、DPPP=Oの蛍光を蛍光分光光度計で測定し、脂質過酸化物質および抗酸化物質の濃度を経時的に高速液体クロマトグラフィーにより分析した。

なお、実験に際して用いたマウスは実験動物

取り扱いに関するガイドラインに従って愛護上十分の配慮を行った。

C. 研究結果

1. DPPPはDMSO溶液として添加するとPMNに良好に取り込まれた。細胞に取り込まれたDPPPは水溶性の過酸化水素とは反応しなかったが、脂溶性の過酸化物質であるリノール酸メチルヒドロペルオキシドとはすみやかに反応した。また、PMNのフリーラジカル産生を引き起こすことが知られているフォルボールエステルを細胞に添加したところ、DPPP=Oの蛍光増加が蛍光分光光度計および蛍光顕微鏡で測定できた。

2. DPPPはこの方法によりLDL一粒子あたり10個以上取り込まれた。LDLをラジカル開始剤により酸化させると、ラジカル開始剤の濃度依存的・時間依存的に蛍光が増加することが確認できた。また、DPPPとの反応により生成したと思われる脂質水酸化物質が高速液体クロマトグラフィーにより検出された。

D. 考察

DPPPは細胞に取り込ませると疎水性の過酸化物質と選択的に反応する。これは、DPPPが脂溶性のため細胞中の膜内に局在するためである。細胞の酸化蛍光プローブとしてはDCFH-DAなどいくつか知られているが、脂質過酸化物質を特異的に検出するものは今まで例がない。この点以外にもDPPPを用いることにより、蛍光分光光度計や蛍光顕微鏡で経時的に測定できること、生成したDPPP=Oの量により脂質過酸化の程度を定量的に議論できること等の利点がある。

また、DPPPはLDL中の脂質過酸化反応を追跡することにも適していると考えられる。

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）
分担研究報告書

E 結論

DPPPは細胞内・LDL内の脂質過酸化の蛍光マーカーとして、蛍光分光光度計や蛍光顕微鏡で測定できることが明らかとなった。培養細胞系での脂質酸化をリアルタイムで追跡できるプローブとして応用が期待される。