

活性型ビタミンDの輸送形態と抗動脈硬化作用

帝京大学内科 研究代表者 寺 本 民 生
共同研究者 木 下 誠
南 佳 余

はじめに

粥状動脈硬化は動脈内膜におけるマクロファージ ($M\phi$) の泡沫化すなわちコレステロールエステル (CE) の蓄積を主病巣として形成される。この過程に酸化LDLのスカベンジャー (SR) 受容体による取り込みが重要な役割を演じている。実際、LDL低下療法がイベント発症予防に有効であるという多くのエビデンスが示された。しかし、その効果は抑制率約30%であり、残りの約70%はLDLの低下にもかかわらず動脈硬化の発症を予防できなかったといえる。また、高LDL血症がなくてもイベント発症は見られるのであり、別の角度からの予防法の確立が要請される。

ビタミンDについては、そのカルシウム (Ca) 代謝調節因子として動脈壁におけるCaの沈着促進作用があるとする報告もあるが、Watsonらは血中の活性型ビタミンD濃度と冠動脈Ca濃度が逆相関するという報告をしている。また、Raisanenらは免疫抑制作用を有するビタミンD誘導体が動脈壁におけるTリンパ球の増殖を抑制し、内膜肥厚を抑制していることを示唆する報告をしている。Rossは動脈硬化性病変として炎症性細胞の浸潤をあげているが、その起因するものとして酸化LDLの存在と $M\phi$ の泡沫化を提示している。既に、ビタミンDにより $M\phi$ のSRA1の抑制調節が起こることが報告されているが、他の受容体や細胞内コレステロールエステルのプロセッシングについては検討されていない。報告者らは、活性型ビタミンDである $1,25-(OH)_2$ Vitamin D_3 がLDL、酸化LDLに結合して運搬されることをすでに発表している (Biochem Biophys Res Comm.215 : 199-204, 1995)。これらのリポ蛋白はそれぞれの受容体の存在する細胞に特異的に取り込まれ、結合したビタミンDがこの経路で取り込まれることも確認した。とくに酸化LDLに結合したビタミンDは $M\phi$ をターゲットとして取り込まれる。また、ビタミンDの誘導体のうち分化誘導活性の強い誘導体もLDLや酸化LDLで運搬される。本研究では酸化LDLの $M\phi$ への取り込み機構と細胞内CEのプロセッシングに焦点をあて、その予防法を構築することを目的とした。そこで、本年度は、この $M\phi$ におけるCE蓄積機構であるSRA1、SRB1、CD36、SRECなど種々の酸化LDL受容体に焦点をあて、その制御系について検討を加えたので報告する。

実験方法

実験材料

RPMI1640、Streptomycin、Penicillin、Trizol、及びすべての逆転写反応、PCRに用いた試薬はGIBCOより購入し、Fetal bovine serumはJRH Bioscience、Phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) はSigma、[1 α 、2 α -3H] cholesteryl oleoyl etherはAmashamより購入した。

LDLと酸化LDLの調製

LDLはヒト血清より超遠心法にて $d=1.019-1.063\text{g/ml}$ の分画として分離した。LDLの酸化は以下に示したように銅イオンを用いた方法にて行った。まず最初にLDLをPBS (pH7.4) にて透析し、その後蛋白濃度が 0.2mg/ml になるようPBSにて希釈した。次に最終濃度 $5\ \mu\text{M}$ になるように CuSO_4 を添加し、 37°C 、16時間インキュベートしてLDLの酸化を行った。反応はEDTA (Final, 1mM) の添加により終了させ、その後アミコン (YM10) を使って濃縮したのち、 0.15M NaCl 、 1mM EDTA (pH7.4) にて透析した。また酸化度の確認のためアガロースゲル電気泳動を行った。本実験に使用したOxLDLの移動度はnative LDLと比較して約3倍であった。酸化を受けた場合はLDLより粒子全体の陰性荷電が増加するため泳動度が増すことが知られており、これらのことからLDLは実験に使用可能な程度酸化されていると判定した。酸化を確認したOxLDLはフィルター滅菌した後BSAをスタンダードとした蛋白定量 (Lowry法) を行い、 4°C で保存し、二週間以内に実験に供した。

Lipoprotein-deficient serum (LPDS) の作製

LPDSはヒト血清から超遠心法にて $d>1.21\text{g/ml}$ の分画として分離後、生理食塩水 (pH7.4, 4°C) にて透析、続いて 20mM CaCl_2 含有生食 (pH7.4, 室温) にて透析、最後に CaCl_2 除去のために生食 (pH7.4, 4°C) にて透析を行った。その後遠心 ($3,000\text{rpm}$ 15min , 4°C) により分離した上清にsilicicacidを添加して 37°C 、4時間インキュベートした。そして再度遠心 ($3,000\text{rpm}$ 15min 4°C) して得られた上清をLPDSとし、生食にて蛋白濃度を 50mg/ml に希釈した後フィルター滅菌してから使用した。

細胞の培養

マクロファージ様細胞株THP-1細胞 (急性単球性白血病由来) は 10% FBS, $100\ \mu\text{g/ml streptomycin}$ $100\text{U/ml penicillin}$ を含むRPMI1640培地中で 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件下にて培養し、細胞密度が常に約 $5 \times 10^5\text{cell/ml}$ あるいはそれ以下になるよう定期的に継代を行った。ただしTHP-1細胞には長期間培養した場合に形質転換する可能性があることがわかっているので、実験には継代が20回に満たない細胞のみを用いた。

Scavenger Receptor mRNAの定量

細胞の処理

THP-1細胞 ($1 \times 10^6/\text{well}$) を 250nM TPA 及び 10mg/ml LPDS を含むRPMI1640培地中で 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件下にて48時間培養した。その後、PBSにて非付着細胞を除去し、 10mg/ml LPDS を含む

RPMI1640培地あるいは50 μ g/ml OxLDLを加えた培地中で (10mg/ml LPDS, RPMI1640) さらに4、5、6、7日間培養した。

半定量的RT-PCR

THP-1細胞よりTRIzol試薬を用いRNAを抽出した。RNA濃度及び純度は260nm、280nmの吸光度より算出した。

○逆転写反応

TubeにRNA (3 μ g) 及びランダムヘキサマープライマー、DEPC処理水を加え、70°Cで10分間インキュベートした。終了後氷上に1分間放置した後、PCR buffer (1 \times)、MgCl₂ (25mM)、dNTPs (0.5mM) Dithiothreitol (10mM) を加え25°C、5分間プレインキュベートした。それから200U SuperScript II 逆転写酵素を添加し、ピペティングでよく混合した後、さらに25°C、10分間反応させた。続いて50°C、50分間の逆転写反応を行ったのち70°C、15分間インキュベートし、反応停止させた (酵素の失活)。得られたcDNA RT-Reacion MixtureはRNaseHにて37°C、20分間インキュベーションし、鋳型RNAを分解除去してから-20°Cにて保存した。

○Polymerase Chain Reaction (PCR)

A)

まず最初に各sample間のPCR mixture中に含まれるGAPDH (ハウスキーピング遺伝子) の1st strand cDNAの量を同じにするために予備的なGAPDH遺伝子のPCRを行った。PCR productは2%アガロースゲルにて分離後 エチジウムブロマイド染色しFluoroimage SI (Molecular Dynamics) にて画像化したのち、ImageQuaNTソフトウェア (Molecular Dynamics) を用いて解析した。得られたデータはstudents t-testにて統計的処理を行い、P<0.05 を有意差ありと判定した。この予備的に行ったPCRから得られた結果よりGAPDH-1st strand cDNAの量が同じになるようにPCR mixture中に加えるcDNA RT-reaction mixture量を決定した (つまり各sample中のGAPDH mRNA量を添加するcDNA RT-reaction mixture量を調節することによりほぼ同じに揃えた)。

B)

次に各スカベンジャーレセプターについてPCRを行った。PCR条件はannealing温度及びcycle数 (Table1) cDNART-reactionmixture量、アガロースゲル濃度以外は上記 (A) と同じ条件で行った。プライマーはGene Bankに登録されている各スカベンジャーレセプターのsequenceよりデザインし、合成した。

[³H]Cholesteryl Oleoyl Ether labeled Oxidized LDLの細胞内取り込み

・OxLDLの標識

OxLDLをnon-exchangeable、non-hydrolyzableなCholesteryl ester analogである [³H]Cholesteryl Oleoyl Ether (COE) にてラベルし、 [³H]COE labeled Ox LDLを作製した。操作はRobertsらの方法 (Biochem. J. 226. 319-322, 1985) を参考にして行った。ラベル体の比活性は8.8dpm/ng (protein) であった。

・細胞の処理

THP-1細胞 (1×10^6 /well) を250nM TPAと10mg/ml LPDSを含むRPMI1640培地中で37°C、5% CO₂の条件下にて48時間インキュベートした。その後、PBSにて非付着細胞を除去したのち、50 μ g/ml [³H]COE 標識 Ox LDLと10mg/ml LPDSを含むRPMI1640培地中で6時間及び1、4、5、6、7日間インキュベートした。細胞は0.2%BSAを含むPBSにて2回、PBSにて1回洗ったのち、0.2N NaOHに溶解し、Radioactivityの測定（液体シンチレーター）、蛋白定量（Lowry法）を行った。

実験結果

1. 判定量的 RT-PCR条件の決定

まず最初にmRNA量の定量方法（RT-PCR）について条件の確立、validationを行った。検討項目は以下の通りである。

- ・各primerの設計
- ・アニーリング温度（Tm）
- ・各反応試薬濃度（MgCl₂、dNTP、Primer、Tag）
- ・サイクル数

Table1 Sequence of PCR primers

Gene	Primer sequence (5'-3')	Tm (°C)	Product size (bp)
SR-A	F: GCAGTTCTCATCCCTCTCATTGGA R: ATTCCCATGTCCCTGGACTGAG	55	335
CD36	F: GAGACCTGCTTATCCAGAAGAC R: GACCAACTGTGGTAGTAACAGG	55	510
CLA-1	F: TGATGATGGAGAATAAGCCCAT R: TGACCGGGTGGATGTCCAGGAAC	55	696
CD68	F: GCCACTCACAGTCCTGCCACC R: GGACACATTGTA CTCCACCGCC	62	426
LOX-1	F: TTA CTCTCCATGGTGGTGCC R: CTTCTGCTTGTTGCCGGGCTG	55	188
GAPDH	F: CACCACCATGGAGAAGGCTGG R: TTGTCATGGATGACCTTGCCAGG	55	195

・PCR反応液中のcDNA量

また増幅産物の解析には1～2%アガロースゲル電気泳動法およびEthidium bromide染色法を用いた。蛍光の定量はFluoroimage Analyzerにて行った。

Table1に各scavenger receptorのprimer sequence及びT_mを示した。各反応試薬濃度は実験方法に記載した通りである。またサイクル数は解析可能な量のproductが得られ、かつ飽和状態に達してない指数関数的増加が認められるサイクル数を選択した。さらに本試験のPCR前にはPCR反応液中の1st strand cDNA (RT product) 量を各sample間で等しくするため、予備的検討として一部の1st strand cDNAを用い、ハウスキーピング遺伝子GAPDHのPCRを行った。

2. THP-1 細胞におけるPhorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) によるScavenger Receptors mRNA発現の制御

THP-1細胞はTPAによりマクロファージ化することが知られている急性単球性白血病由来の細胞株である。本研究では第一にこの細胞を用いて5種類 (SR-A CD36, CLA-1, CD68, LOX-1) のSRs発現に対するTPAの影響を検討した。まずTHP-1細胞を250nM TPA存在下で37℃, 48時間培養した。この条件においては細胞の増殖停止、plateへの付着といった形態学的な変化が認められた。次に細胞をPBSにて洗いTPAを除去した後、培地のみで4、5、6、7日間培養した。細胞は直ちに回収し、Total RNAを抽出後、本研究にて確立したRT-PCR条件にて各SRs mRNAの定量を行った。

Figure1A, 1B, 1Eに示したようにTPA未処理のTHP-1細胞ではSR-A CD36, LOX-1の発現は殆ど認められない。だが、TPAによりその発現は強く誘導された。

一方、Figure1C, 1Dに示したようにCLA-1, CD68においてはTPA未処理のTHP-1細胞においてもその発現が認められる。そしてまた、その発現も同じ様にTPAにより誘導されていた。

さらに刺激後 (TPA除去後) の経時的変化にもそれぞれ違いが認められた。CD36, CLA-1, CD68の発現においては刺激後4日目以降にも増加傾向が見られ、特にCD36CD68についてはそれぞれ刺激後6日目、7日目まで経時的増加を示していた。一方、SR-Aの発現は4日目以降有意に低下しており、刺激後7日目までその低下が持続していた。LOX-1の発現については刺激後以降7日目まで何ら経時的な変化は認められなかった。

3. THP-1 細胞におけるTPA誘導後のSRsmRNA発現におけるOxLDLの影響

第二にTPAによりマクロファージ様に分化誘導されたTHP-1細胞でのSRs発現に対し、OxLDLがどのように影響するのかについて検討した。まずTHP-1細胞を250nM TPA存在下で37℃, 48hrインキュベートし、マクロファージ様に分化誘導後TPAを除去した。その後培地に50 μg/ml OxLDLを添加し37℃で0、4、5、6、7日間培養した。各SRs mRNAの解析にはsemi-quantitative RT-PCR法を用いた (詳細は前述)。Figure2B, 2C, 2D. に示したようにCD36, CLA-1, CD68においてはOxLDLの添加によりそれらCD36, CLA-1, CD68の発現の誘導がより早くより強くなっていた (Figure1B, 1C, 1D. との比較)。一方SR-AにおいてはOxLDLによりその発現は何ら影響を受けておらず (Figure2A)、逆にLOX-1においては経時的な抑制効果が認められた (Figure2E)。

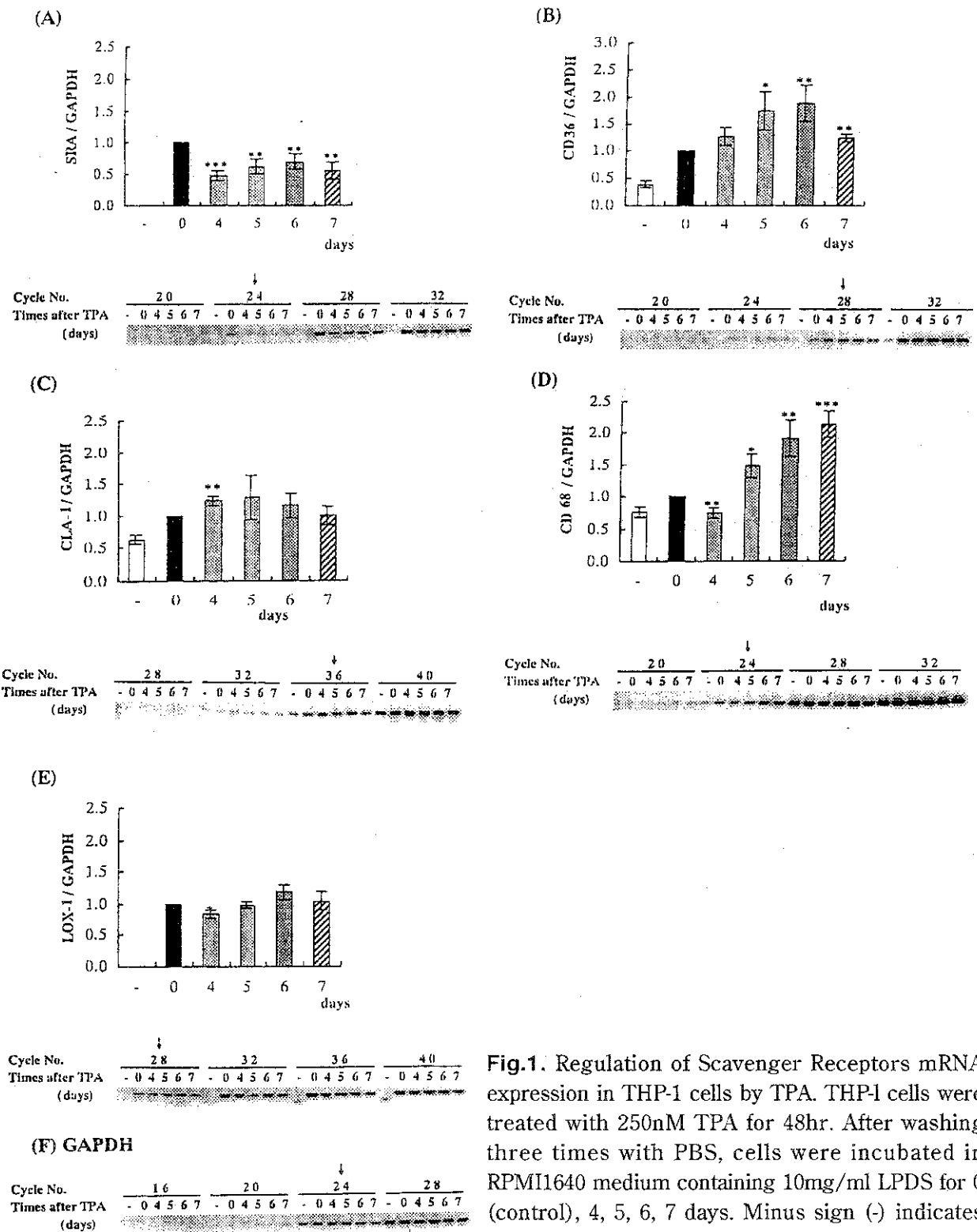


Fig.1. Regulation of Scavenger Receptors mRNA expression in THP-1 cells by TPA. THP-1 cells were treated with 250nM TPA for 48hr. After washing three times with PBS, cells were incubated in RPMI1640 medium containing 10mg/ml LPDS for 0 (control), 4, 5, 6, 7 days. Minus sign (-) indicates TPA untreated cells. RNA was reverse transcribed and amplified by RT-PCR previously described. Arrows indicate the cycle number chosen for relative quantitative RT-PCR. Each relative mRNA level under treatment was normalized to the GAPDH signal, and expressed versus control which is arbitrarily set to 1.0. The data are representative of three experiments (mean±S.D.). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 by t-test. (A) SR-A, (B) CD36, (C) CLA-1, (D) CD68, (E) LOX-1, (F) GAPDH.

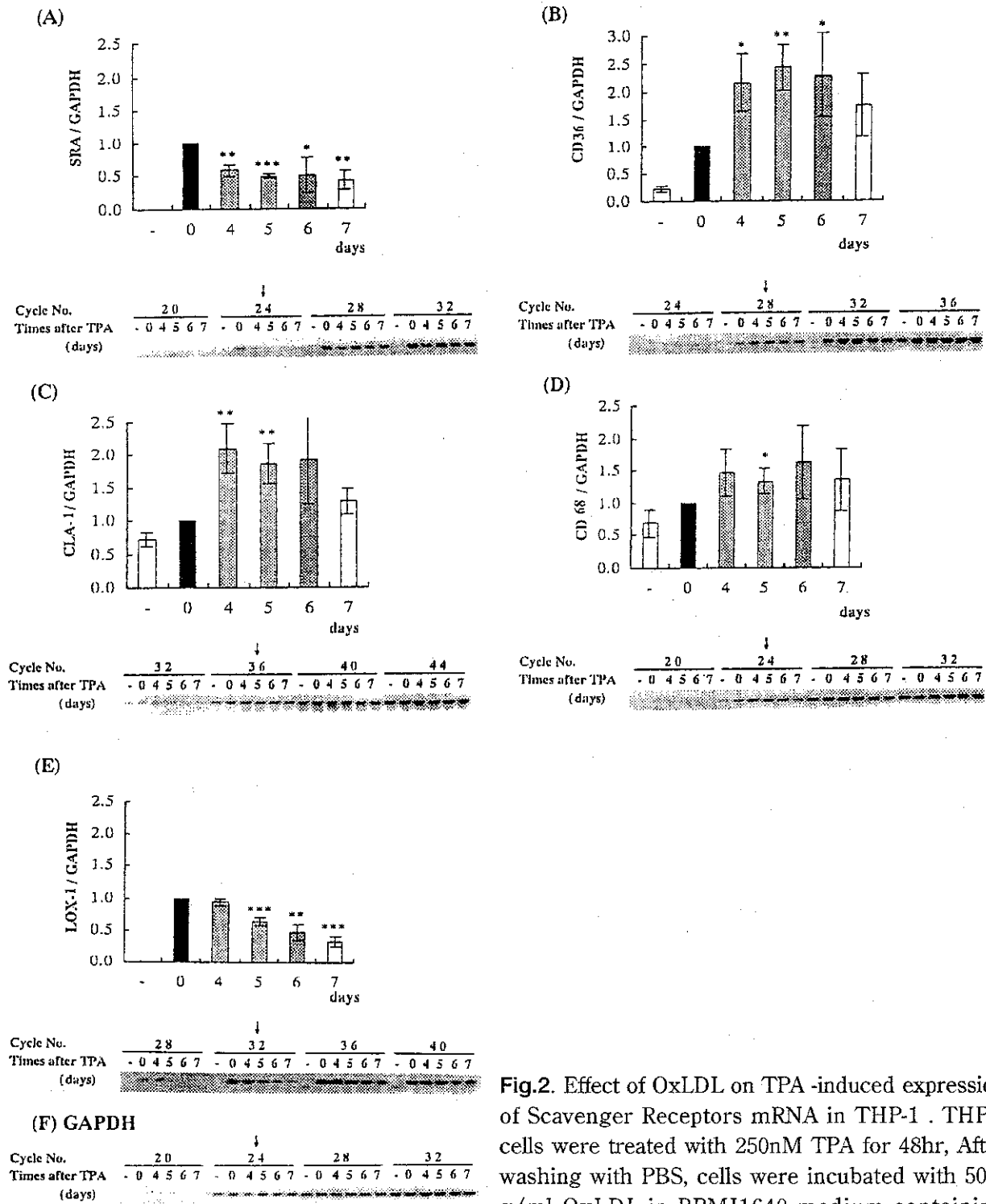


Fig.2. Effect of OxLDL on TPA-induced expression of Scavenger Receptors mRNA in THP-1. THP-1 cells were treated with 250nM TPA for 48hr. After washing with PBS, cells were incubated with 50 μ g/ml OxLDL in RPMI1640 medium containing 10mg/ml LPDS for 0 (control), 4, 5, 6, 7 days. Minus sign (-) indicates TPA untreated cells. RNA was reverse transcribed and amplified by RT-PCR previously described. Arrows indicate the cycle number chosen for relative quantitative RT-PCR. Each relative mRNA level under treatment was normalized to the GAPDH signal, and expressed versus control which is arbitrarily, set to 1.0. The data are representative of three experiments (mean \pm S.D.). (A) SRA, (B) CD36, (C) CLA-1, (D) CD68, (E) LOX-1, (F) GAPDH.

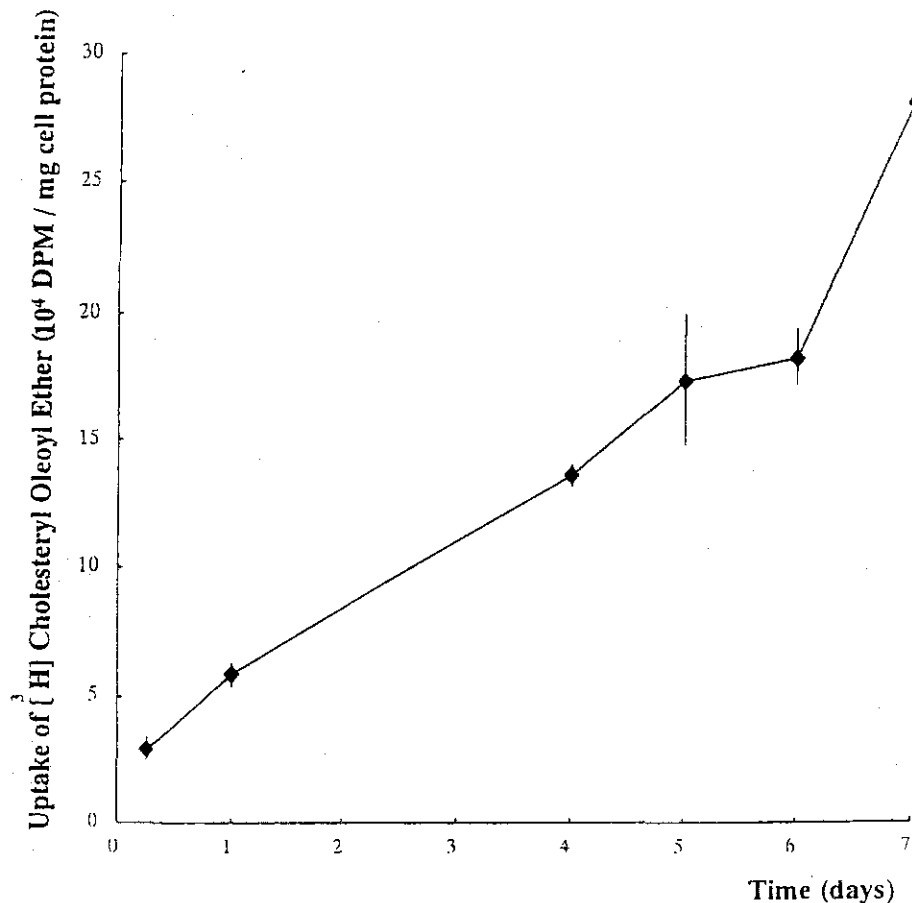


Fig.3. Time course of OxLDL-CE uptake in THP-1 cells treated with TPA.

THP-1 cells were treated with 250nM TPA for 48hr. After washing, cells were incubated with [³H] cholesteryl oleoyl ether-labeled OxLDL (50ug/ml) for 6hr-7days, and extracted with 0.2N NaOH to determine cellular accumulation of [³H] cholesteryl oleoyl ether. The data are representative of three experiments (mean ± S.D.).

4. TPA分化誘導THP-1細胞における[³H]Cholesteryl oleoyl ether 標識Oxidized LDLの取り込み量の経時的変化

THP-1細胞は継代を繰り返すうちに形質転換を起こす可能性がある細胞株であるため本試験で用いたTHP-1が同一条件下においてOxLDLの取り込み能を維持しているかどうかを確認する必要がある。そこで、THP-1細胞を250nMTPA存在下で37℃、48hrインキュベートした後、PBSにてTPAを洗い除いたのち、培地に50 μg/ml [³H] Cholesteryl oleoyl ether 標識 OxLDLを添加し、37℃にて6hr、1、4、5、6、7日間培養した。細胞は0.2N NaOHにて回収し、液体シンチレーターによるカウント測定とLowry Methodによるタンパク定量を行った。Figure3に示したように 細胞内に取り込まれた[³H]cholesteryl oleoyl ether量は刺激後7日目まで経時的に増加していた。したがって本試験に用いたTHP-1細胞はTPAの誘導後にはOxLDL取り込み能を有していることが確認された。

考 察

動脈硬化の初期病変として、マクロファージの泡沫化について検討した。泡沫化には、酸化LDLの取り込みと、取り込まれたコレステロールの細胞内処理機構、ならびに細胞内コレステロールの除去機構のバランスが関与している。本研究では、とくに酸化LDLの取り込み機構である、酸化LDLに対する受容体の制御機構について検討した。これらの受容体は数種類存在することが分かっているが、それぞれ、特異な作用を持っていることも知られており、泡沫化に最も関与している受容体がどれかはっきり示された事実がない。マクロファージにコレステロールエステルが蓄積するためには、酸化LDLの取り込み後もdown regulationのかからない受容体が存在する必然性がある。そこで、本研究ではマクロファージ類似細胞として、THP-1細胞を用い、マクロファージへの形質変換後の受容体の挙動について検討した。少なくとも検討を加えたすべての受容体は発現誘導がもたらされた。次に、酸化LDL受容体が発現誘導された状態で酸化LDLを添加したところ、LOX-1ではdown regulationが起こり、SRAではup-regulationが起こらないことが確認され、これらの受容体はマクロファージの泡沫化には強く関与していないものと推定された。一方、CD36やCLA-1はup-regulationを受けているものと考えられ、これらの受容体がマクロファージの泡沫化に強く関与している可能性が示唆された。現在、これらの受容体に対するビタミンDの作用について検討を加えているところである。