

グラム陰性菌 LPS および抗菌ペプチド LL-37 による 老化血管内皮細胞の炎症性応答の増強

鈴木 香, 長岡 功

順天堂大学大学院医学研究科生化学・生体防御学

Gram-negative bacterial lipopolysaccharide and antimicrobial LL-37 enhance ICAM-1 expression and NF- κ B activation in senescent endothelial cells

Kaori Suzuki, Isao Nagaoka

Department of Host Defense and Biochemical Research, Juntendo University Graduate School of Medicine

Abstract

Cellular senescence is associated with the induction of a proinflammatory phenotype. Previous studies revealed that senescent endothelial cells are localized at the sites of atherosclerotic lesions, suggesting the involvement of endothelial cell senescence in atherogenesis. Importantly, bacterial infection has been speculated to contribute to the pathogenesis of atherosclerosis; however the effect of bacterial components or host-derived antimicrobial substances on senescent endothelial cells has not fully understood. Here, we investigated the effects of Gram-negative bacterial lipopolysaccharide (LPS) and antimicrobial peptide LL-37, which is deposited at the atherosclerotic loci, on senescent endothelial cells using serially passaged human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). The results indicated that senescent endothelial cells basally exhibited proinflammatory phenotype, as evidenced by increased expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and activation of NF- κ B (phosphorylation of p65), compared with non-senescent cells. Of note, senescent endothelial cells more potently responded to the stimulation of LPS or LL-37, as evidenced by further enhanced ICAM-1 expression and NF- κ B activation, compared with non-senescent cells. Moreover, expression levels of the receptors for LPS (TLR4) and LL-37 (purinergic receptor P2X7) were upregulated in senescent endothelial cells, suggesting that both LPS and LL-37 enhance the ICAM-1 expression and NF- κ B activation in senescent endothelial cells possibly via the upregulated TLR4 and P2X7. Together these observations indicate that senescent endothelial cells may contribute to the pathogenesis of atherosclerosis via the basal proinflammatory phenotype and the enhanced inflammatory responses against atherogenic factors including bacterial LPS and host-derived antimicrobial LL-37.

Endotoxin and Innate Immunity 23 : 47~53, 2020

Key words : LL-37, cellular senescence, senescence-associated secretory phenotype (SASP), NF- κ B

はじめに

細胞老化 (cellular senescence) は, *in vitro* 培養系において細胞が分裂を停止し, 増殖しない状態が不可逆的に引き起こされた現象として見出された¹⁾。老化細胞は加齢関連疾患の病変部位などで認められ, 生体内での老化を一部反映すると考えられている。近年, 老化細胞は炎症性の形質 (senescence-associated secretory phenotype : SASP) をもつことが明らかになり, 動脈硬化などの慢性炎症の病態形成にもかかわると考えられてい

る²⁾。一方, 動脈硬化を増悪する要因として細菌感染の影響が示唆されているが, そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。また, LL-37 は感染刺激によって宿主細胞から放出される抗菌ペプチドであるが, 動脈硬化の増悪因子としても注目される。われわれは, 動脈硬化における細胞老化, 細菌感染および宿主由来の抗菌ペプチドという3つのリスクファクターに着目し, 老化血管内皮細胞を用いて細菌の菌体成分であるリポポリサッカライド (lipopolysaccharide : LPS) と宿主細胞から放出される抗菌ペプチド LL-37 の影響を検討した。その結

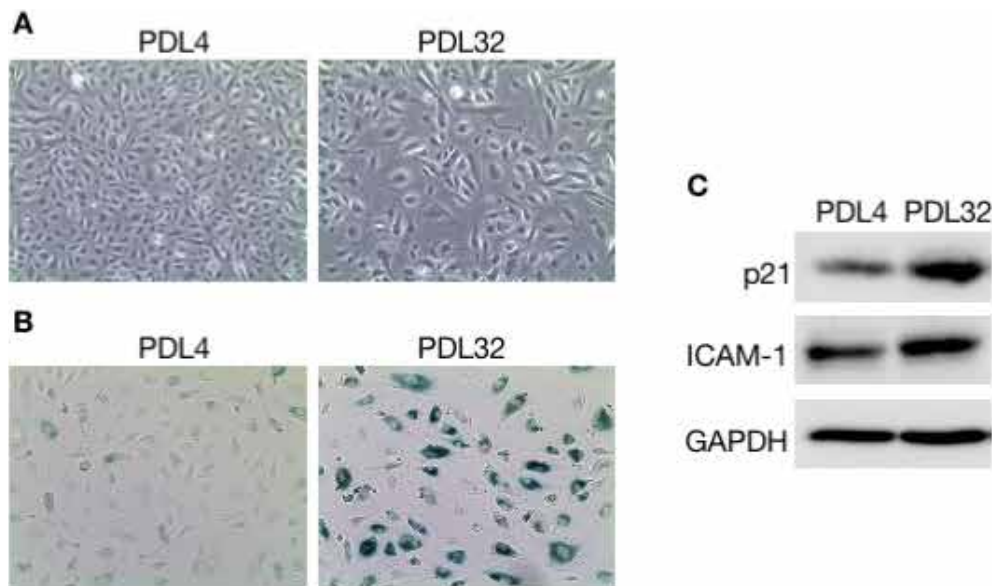


図 1 HUVEC の長期継代培養によって調整された老化細胞の特徴

HUVEC を血管内皮細胞用培地 EGM-2 で培養し、3~4 日毎に継代した。Population doubling level (PDL) 4 (継代回数 4 に相当) と PDL32 (継代回数 12 に相当) の細胞を比較した。A) 位相差顕微鏡像：PDL32 の細胞は扁平化・大型化し、不均一な形態をとった。B) PDL32 の細胞は SA- β -Gal 染色に陽性であった。C) PDL32 の細胞において、PDL4 に比べて p21 と ICAM-1 の発現が増強した。本研究では PDL32 以上を老化細胞 (senescent cells)、PDL4 以下を非老化細胞 (non-senescent cells) として実験に用いた。

果、LPS と LL-37 は老化血管内皮細胞に対して炎症性応答の増強を誘導することを見出した。本稿では、SASP の誘導に中心的な役割をもつシグナル伝達分子 NF- κ B と、LPS および LL-37 の作用とそれぞれの受容体発現に着目して、老化血管内皮細胞における炎症性応答の増強について概説したい。

1. 細胞老化について

細胞老化はヒト初代培養細胞において、増殖期を経たのちに細胞増殖が不可逆的に停止する現象として 1961 年に Hayflick らによって報告された¹⁾。現在では、長期培養のほか酸化ストレス、DNA 損傷、炎症性因子などによっても細胞老化が誘導されることがわかっている。老化した細胞の特徴として、増殖能の低下に加えて形態の扁平化・大型化、細胞周期停止にかかわるタンパク質の発現上昇、酸性 β -ガラクトシダーゼ活性の増加などがある。従来、細胞老化はがん化を抑制する防御機構であると考えられていたが、近年では老化細胞が炎症性の形質 (SASP) をもつことが明らかになり、これが加齢にともなう慢性炎症の病態に関与するとして注目される²⁾。

動脈硬化は血管の慢性炎症が原因となって起こる加齢関連疾患である。動脈硬化巣では老化した血管内皮細胞や血管平滑筋細胞が観察されており、これらの細胞が動脈硬化の病態形成や増悪にかかわると考えられている。

しかしながら、細胞老化がどのような機序で動脈硬化の病態形成にかかわるのか、また病態形成における他の増悪因子との関係については十分に解明されていない。

2. 血管内皮細胞の長期培養で誘導される細胞老化

われわれはまず、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells : HUVECs) を長期間培養して細胞老化の誘導を試みた³⁾。Lonza 社より購入した HUVECs を血管内皮細胞培養培地 EGM-2 を用いてカルチャーディッシュ (直径 100 mm) で培養し、コンフルエントに達する前に (3~4 日毎)、トリプシン/EDTA 溶液で細胞を剥離、回収して継代した。約 80 日間の継代培養後、細胞分裂回数を示す population doubling level (PDL) が 30 を過ぎる頃には細胞増殖が遅くなり、形態は扁平化・大型化して不均一になった (図 1A)。また、細胞老化を評価する方法のひとつとして老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼ (senescence-associated beta-galactosidase : SA- β -gal) アッセイが一般的に用いられ、この試験では老化した細胞が青く染色される。図 1B に示すように、われわれの調製した PDL32 の細胞は継代回数の少ない PDL4 の細胞に比べて強く青色に染色された。さらに、細胞老化関連タンパク質の発現変化を検討した。p21 (Waf1/Cip1) はサイクリン依存性キナーゼの阻害タンパク質であり、細胞周期を抑制して増殖を遅らせ

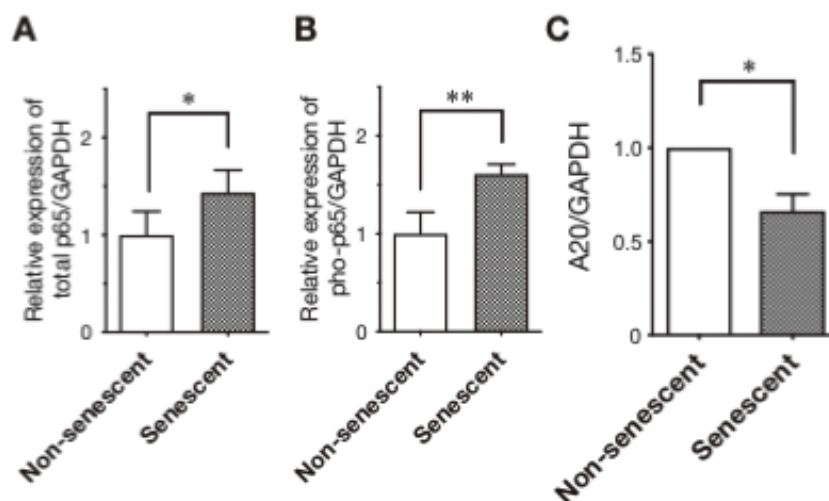


図 2 未刺激時の老化細胞における NF- κ B の活性化

老化細胞および非老化細胞における total p65 (A), リン酸化 p65 (B), A20 (C) の発現をウェスタンブロット法で解析し、非老化細胞に対する相対値で示した。p65 の発現量とリン酸化 p65 (pho-p65/GAPDH) は非老化細胞に比べて老化細胞で多かった。一方、NF- κ B シグナルの抑制因子である A20 の発現は老化細胞で低下していた。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

る働きがある。ウェスタンブロットの結果、PDL32 の細胞では p21 の発現が亢進していた (図 1C)。これらの結果から、PDL32 の細胞は老化細胞の特徴を有することがわかった。したがって、本研究では PDL32 以上を老化細胞 (senescent cells)、対照として PDL 4 以下を非老化細胞 (non-senescent cells) として以下の実験に用いた。

老化細胞では接着因子、サイトカイン、プロテアーゼなどの産生が増加し (炎症性の形質である SASP の誘導)、これが炎症の増強にかかわることが示されている²⁾。Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) は血管内皮細胞が産生する接着因子であり、動脈硬化を含めたさまざまな炎症の場において、単球の血管内皮細胞への接着と浸潤に重要な働きをしている。そこで、老化細胞における ICAM-1 の発現変化を調べた結果、PDL32 の細胞では PDL4 に比べて発現亢進しており、SASP の誘導が確認された (図 1C)。

3. 老化血管内皮細胞における NF- κ B の活性化

次に、老化血管内皮細胞における NF- κ B の活性化状態を調べた。NF- κ B 分子の中で p65 (RelA) は、ICAM-1 の発現を含めた幅広い炎症応答に関与する。さらに、p65 は老化細胞における SASP の恒常的な誘導にかかわることが報告される⁴⁾。そこで、p65 の発現量とその活性化 (リン酸化) を老化細胞と非老化細胞で比較した。その結果、老化細胞において p65 の発現が増加しており (図 2A)、リン酸化 p65 も増加していた (図 2B)。また、NF- κ B の活性は活性化因子と抑制性因子のバランスに

よって調節される。A20 は NF- κ B シグナルの過剰な活性化を抑える抑制性因子である⁵⁾。興味深いことに、老化細胞において A20 の発現低下がみられた (図 2C)。これらの結果から、老化血管内皮細胞の恒常的な SASP の誘導には、p65 の発現亢進とそのリン酸化の亢進、さらに A20 の発現低下による NF- κ B の活性化がかかわると考えられた。

4. LPS に対する老化血管内皮細胞の炎症性応答

細菌感染が動脈硬化の増悪にかかわるとする報告がある。そこで、老化した血管内皮細胞に細菌の病原因子である LPS を作用させ、老化細胞と非老化細胞における応答性を比較した。LPS を作用させて 24 時間後に ICAM-1 の発現をみたところ、老化細胞と非老化細胞のどちらにおいても ICAM-1 の発現誘導が確認された。興味深いことに、LPS による ICAM-1 の発現誘導は老化細胞においてより増強していた (図 3A)。LPS による ICAM-1 の発現は NF- κ B 経路によって誘導される⁶⁾。そこで p65 の活性化を老化細胞と非老化細胞で比較したところ、LPS は老化細胞と非老化細胞において p65 のリン酸化を誘導したが、誘導の程度は老化細胞においてより強かった (図 3B)。これらの結果から、老化血管内皮細胞において LPS による ICAM-1 の発現誘導が増強しているが、それには NF- κ B p65 の活性化がかかわると考えられた。

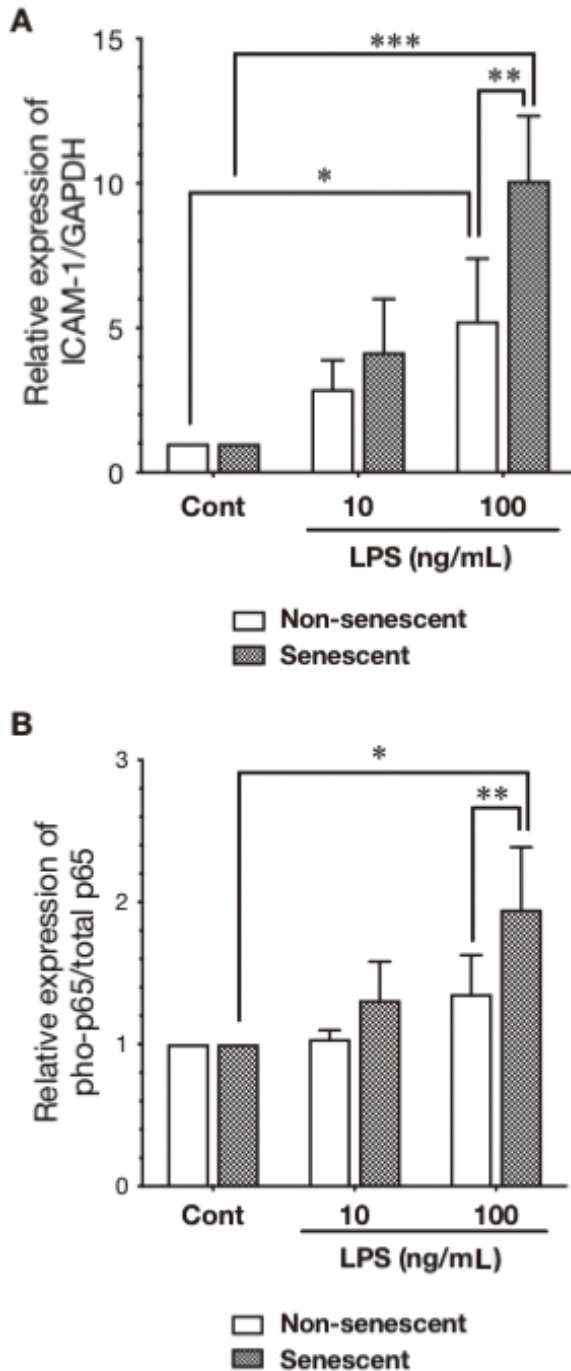


図 3 LPS 刺激時の老化細胞における ICAM-1 の発現誘導および NF- κ B の活性化

老化細胞および非老化細胞を LPS (*E. coli* O111 : B4, 10 or 100 ng/mL) で刺激し, ICAM-1 の発現 (A, 24 時間後) と p65 のリン酸化 (pho-p65/total p65, B, 1 時間後) をウェスタンブロット法で解析した。結果は老化細胞および非老化細胞のそれぞれにおいて, 未刺激時に対する相対値で示した。LPS (100 ng/mL) は老化細胞および非老化細胞に対して ICAM-1 の発現と p65 のリン酸化を誘導したが, その効果は老化細胞においてより強かった。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

5. LL-37 に対する老化血管内皮細胞の炎症性応答

LL-37 はヒト好中球, 単球, 腸管上皮細胞などが産生する抗菌ペプチドであり, 感染刺激によってこれらの細胞から放出される。そして, 興味深いことに, LL-37 が動脈硬化巣に高発現すること⁷⁾, さらに, 動脈硬化モデルマウスでは CRAMP (ヒト LL-37 のマウス相同体) を欠損させることにより病態の改善が認められること⁸⁾から, LL-37 が動脈硬化の増悪因子として注目される。そこで, 老化血管内皮細胞に LL-37 を作用させ, 老化細胞と非老化細胞における応答性を比較した。LL-37 は血管内皮細胞に作用して ICAM-1 の発現を誘導することが知られているが⁹⁾, LL-37 を作用させると, 老化細胞と非老化細胞のどちらにおいても ICAM-1 の発現が誘導されることが確認された。興味深いことに, LL-37 による ICAM-1 の発現誘導は老化細胞において増強していた (図 4A)。次に, LL-37 刺激のシグナル経路を調べるために, LL-37 が NF- κ B 経路を活性化するか, p65 の核移行を指標として免疫細胞染色法で調べた¹⁰⁾。その結果, LL-37 により p65 の核移行が誘導されたことから, LL-37 が NF- κ B を活性化することがわかった (図 4B)。そこで p65 の活性化を老化細胞と非老化細胞で比較した。LL-37 は老化細胞と非老化細胞において p65 のリン酸化を誘導したが, 誘導の程度は老化細胞においてより強かった (図 4C)。これらの結果から, LL-37 は老化血管内皮細胞において NF- κ B p65 をより活性化し, それにともなって ICAM-1 の発現が増強されることが示唆された。

6. 老化血管内皮細胞における LPS および LL-37 受容体の発現変化

LPS および LL-37 による炎症性応答 (ICAM-1 の発現誘導, NF- κ B p65 の活性化) は老化細胞において増強していた (図 3, 4)。このメカニズムを明らかにするため, LPS および LL-37 の受容体の発現をフローサイトメトリ法で調べた。その結果, LPS の受容体である TLR4 は非老化細胞に比べて老化細胞において強く発現することがわかった (図 5A)。一方, LPS の共受容体である CD14 の発現は老化細胞で低下していた (図 5B)。

LL-37 の受容体としていくつかの分子が報告されているが, 血管内皮細胞においてはホルミルペプチド受容体である formyl peptide receptor 2 (FPR2) とプリン受容体である P2X7 が LL-37 受容体として報告されている。老化細胞と非老化細胞でこれらの発現を調べたところ, FPR2 の発現は老化細胞と非老化細胞で差が認められなかったが (図 5C), P2X7 は老化細胞に強く発現することがわかった (図 5D)。

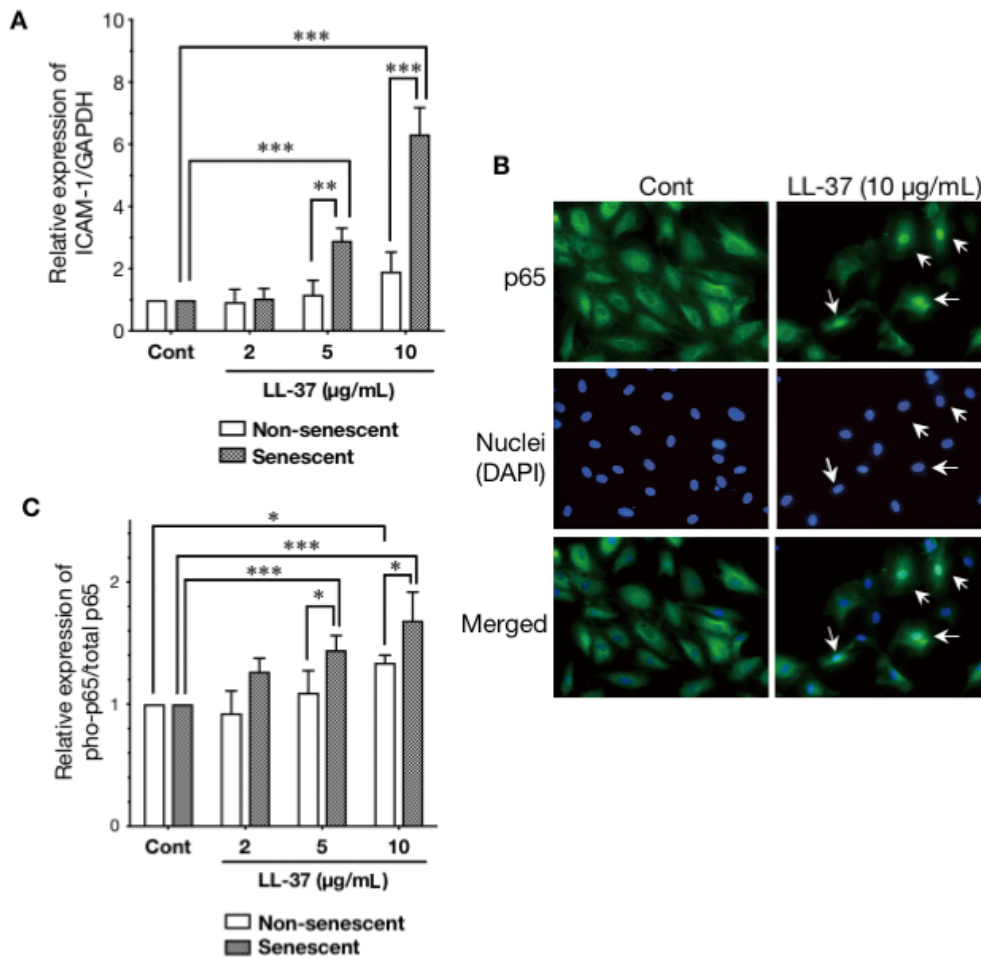


図 4 LL-37 刺激時の老化細胞における ICAM-1 の発現誘導および NF-κB の活性化
 老化細胞および非老化細胞を LL-37 (2, 5 or 10 μg/mL) で刺激し, ICAM-1 の発現 (A, 24 時間後) と p65 のリン酸化 (pho-p65/total p65, C, 4 時間後) をウェスタンブロット法で解析した。結果は老化細胞および非老化細胞のそれぞれにおいて, 未刺激時に対する相対値で示した。LL-37 は老化細胞および非老化細胞に対して ICAM-1 の発現と p65 のリン酸化を誘導したが, その効果は老化細胞においてより強かった (LL-37 5 and 10 μg/mL)。B) 非老化細胞を LL-37 (10 μg/mL, 4 時間) で刺激し, p65 の局在を免疫細胞染色法で観察した。LL-37 は p65 の核移行を誘導した。矢印は p65 が核局在する細胞を示す。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)

おわりに

細菌感染は動脈硬化症の増悪因子とされているが, その詳細はほとんど明らかにされていない。われわれは, グラム陰性細菌の膜成分である LPS と宿主細胞から産生される抗菌性ペプチド LL-37 の老化血管内皮細胞に対する効果を検討したところ, LPS と LL-37 がどちらも老化血管内皮細胞に作用して炎症性応答を増強させることを見出した。そして, その機序として, 老化血管内皮細胞において NF-κB が p65 のリン酸化を介して恒常的に活性化されており, LPS や LL-37 の刺激に対してさらに活性化されることが考えられた。老化細胞における恒常的な (未刺激時の) 炎症性形質の発現と, われわれが

見出した LPS および LL-37 の刺激に対する炎症性応答の増強がどちらも NF-κB シグナル経路の活性化を介しているという知見は, 老化細胞における炎症性応答の増強メカニズムを理解するうえで興味深い。

老化血管内皮細胞において, LPS 受容体である TLR4 と LL-37 受容体である P2X7 の発現が亢進していたことから, LPS と LL-37 に対する炎症性応答の増強に, これら受容体 (TLR4, P2X7) の発現亢進がかかわることが考えられた。動脈硬化症モデルマウスを用いた研究では, TLR4¹¹⁾あるいは P2X7¹²⁾を欠損させることにより動脈硬化の病態改善が報告されていることから, これらの受容体の下流で働くシグナル経路が動脈硬化の病態形成に重要であると考えられる。実際, TLR4¹³⁾や P2X7¹⁴⁾は

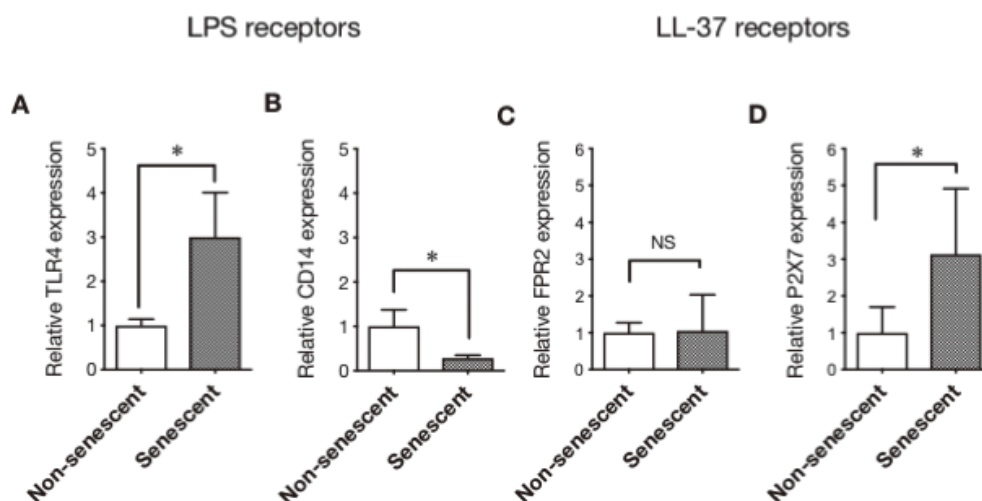


図 5 老化細胞における LPS および LL-37 受容体の発現変化

老化細胞および非老化細胞における TLR4 (A), CD14 (B), FPR2 (C), P2X7 (D) の発現をフローサイトメトリー法で解析した。結果は非老化細胞に対する相対値で示した。LPS 受容体である TLR4 の発現は老化細胞で亢進する一方、CD14 の発現は減弱した。LL-37 受容体である P2X7 の発現は老化細胞で亢進する一方、FPR2 の発現は変化しなかった。(* $p < 0.05$, NS not significant)

動脈硬化患者あるいはモデルマウスのプラーク部位の血管内皮細胞において強く発現していることが報告されている。したがって、動脈硬化の病態形成において、細菌由来の LPS や宿主由来の LL-37 がそれぞれ TLR4 や P2X7 を介して老化血管内皮細胞を刺激し、NF- κ B シグナル経路を介して炎症を増悪させる可能性が考えられる。さらに、このことから、細胞老化が炎症性応答を増強するメカニズムのひとつとして、老化細胞における炎症関連分子に対する受容体の発現誘導が考えられる。動脈硬化の病態形成における細胞老化、細菌感染、さらには宿主由来分子のかかわりについてはいまだ解明の途上であり、今後の研究が期待される。

本稿は、Int J Mol Med 44 : 1187-1196, 2019 (Suzuki, et al.) にて報告された研究に基づく総説論文である¹⁵⁾。

謝 辞

本研究は文部科学省学術研究助成基金助成金（課題番号 JP16K08789）および私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（事業番号 S1411007）の支援を受けて行われた。

文 献

- Hayflick L, Moorhead PS : The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25 : 585-621, 1961
- Childs BG, Durik M, Baker DJ, et al. : Cellular senescence in aging and age-related disease : from mechanisms to therapy. *Nat Med* 21 : 1424-1435, 2015
- Yanaka M, Honma T, Sato K, et al. : Increased mono-
- cytic adhesion by senescence in human umbilical vein endothelial cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 75 : 1098-1103, 2011
- Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K : Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal* 24 : 835-845, 2012
- Shembade N, Harhaj EW : Regulation of NF- κ B signaling by the A20 deubiquitinase. *Cell Mol Immunol* 9 : 123-130, 2012
- Dauphinee SM, Karsan A : Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* 86 : 9-22, 2006
- Edfeldt K, Agerberth B, Rottenberg ME, et al. : Involvement of the antimicrobial peptide LL-37 in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 : 1551-1557, 2006
- Döring Y, Drechsler M, Wantha S, et al. : Lack of neutrophil-derived CRAMP reduces atherosclerosis in mice. *Circ Res* 110 : 1052-1056, 2012
- Ju Y, Hua J, Sakamoto K, et al. : Glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide modulates LL-37-induced endothelial cell activation. *Int J Mol Med* 22 : 657-662, 2008
- Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, et al. : An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest* 111 : 1665-1672, 2003
- Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, et al. : Lack of toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in

- mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 : 10679-10684, 2004
- 12) Stachon P, Heidenreich A, Merz J, et al. : P2X₇ deficiency blocks lesional inflammasome activity and ameliorates atherosclerosis in mice. *Circulation* 135 : 2524-2533, 2017
 - 13) Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, et al. : Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions : a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 105 : 1158-1161, 2002
 - 14) Green JP, Souilhol C, Xanthis I, et al. : Atheroprone flow activates inflammation via endothelial ATP-dependent P2X₇-p38 signalling. *Cardiovasc Res* 114 : 324-335, 2018
 - 15) Suzuki K, Ohkuma M, Nagaoka I : Bacterial lipopolysaccharide and antimicrobial LL-37 enhance ICAM-1 expression and NF- κ B p65 phosphorylation in senescent endothelial cells. *Int J Mol Med* 44 : 1187-1196, 2019