

培養肝細胞に対する 7-ketocholesterol の細胞毒性と ビタミン E による保護機構

大谷 貴美子, 岡本 絵美, 宮原 郁, 湯浅 勲
(大阪市大・生活科学部)

Cytotoxicity of 7-Ketocholesterol on Cultured Rat Hepatocytes and Cytoprotection by Vitamin E

Kimiko Ohtani, Kaoru Miyabara, Emi Okamoto and Isao Matsui-Yuasa
Faculty of Human Life Science, Osaka City University

The effects of 7-ketocholesterol on rat hepatocytes prepared by collagenase perfusion were examined. The addition of 7-ketocholesterol to the culture medium increased the relative ratio of total sterol to phospholipid of hepatocytes significantly in a time-dependent manner without changing the phospholipid content. And vitamin E suppressed the incorporation of 7-ketocholesterol into hepatocytes significantly. Although hepatocytes treated with 7-ketocholesterol produced a larger amount of O_2^- at the early stage of incubation than those treated with cholesterol, lipid peroxidation was not observed. When hepatocytes were treated with 7-ketocholesterol, vitamin E might prevent the hepatocytes from cell death not only by suppressing the incorporation of 7-ketocholesterol into hepatocytes but by scavenging O_2^- .

コレステロールは比較的容易に酸化を受けるため、種々の分子種のコレステロール酸化物が食品の中だけでなく生体の中にも広く分布している¹⁾⁻³⁾。そして、近年、これらコレステロール酸化物が動脈硬化や発癌等、生体に対して重大な影響を与えていることが明らかにされている^{4), 5)}。我々は、先の研究で日本の伝統的水産加工食品である「するめ」の中に含まれている数種類のコレステロール酸化物を同定し、それらの細胞毒性について一部報告を行った⁶⁾。本研究では、さらに 7-ケトコレステロールの細胞毒性について、培養肝細胞を用いて検討すると共に、ビタミンによる細胞保護について検討を行った。

実験方法

1. 肝実質細胞の調製と培養

ラット肝実質細胞は、コラゲナーゼ灌流法により調製した。細胞は、 2.5×10^5 /ml に調製後、10% 牛胎児血清を含む Williams'E 培養液を用い一晩前培養後、実験に供した。実験には血清を含まない培養

液（コントロール群として 100 μ M コレステロール添加，実験群として 100 μ M 7-ケトコレステロール添加）を用いた。

2. 分析方法

細胞生存率は中性色素法⁸⁾で、 O_2^- の生成は NBT 法⁹⁾を用いて測定した。細胞の全ステロール量およびリン脂質量は、粗脂肪を抽出後、それぞれ和光純薬社製、コレステロール E テスト、リン脂質 B テストを用いて定量した。また、細胞へ取り込まれた 7-ケトコレステロールの分析は、ガスクロマトグラフィーによった。

結果と考察

多くのコレステロール酸化物の中でも、本研究で用いた 7-ケトコレステロールは食品中や生体内に広く認められるコレステロール酸化物である。先に我々は、7-ケトコレステロール添加群により、経時的に肝細胞生存率は低下するが、LDH の溶出は認められないことを報告した⁶⁾。

ところで、一般的に哺乳動物の細胞膜においては、コレステロールとリン脂質はモル比、0.4 : 1.0 で存在するとされている⁹⁾。また、コレステロールは細胞膜において、リン脂質中のアシル基の運動を抑制することや細胞膜の透過性を抑制すること、7-ケトコレステロールが細胞膜上でのリン脂質分子の分布密度を変化させること¹⁰⁾などが報告されている。そこで 7-ケトコレステロールを肝細胞に添加した際の全ステロール量とリン脂質量の存在比 (w/w) の時間的経過を検討したところ、Table 1. に示すように、培養 4 時間で、コントロール群の約 2 倍に増加していることが示された。このことは少なからず生体膜がステロールにより、量的にも、質的にも影響を受けていることを示唆するもので、何らかのセカンドメッセンジャーを介して肝細胞死が誘発されたとも考えられた。

ところで、ビタミン E は、リン脂質二重膜層において、space filler として、膜を安定化させることが報告されている¹¹⁾。そこで次に、ビタミン E 存在下および非存在下における 7-ケトコレステロール

Table 1. Total Sterol and Phospholipid of Hepatocytes Cultured with 100 μ M Cholesterol or 7-Ketocholesterol. In the case of the measurement of cholesterol, cells were harvested from three or four culture dishes because of the small amounts of cholesterol content in the cell. Then each cholesterol value shows the mean value of three or four culture dishes.

Time (h)	0*	0.5	2.0	4.0	6.0
with cholesterol					
total sterol (μ g/ μ g protein)	0.3	0.31	0.36	0.40	0.33
phospholipid (μ g/ μ g protein)	2.4 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.1	N.D.**	2.2 $\pm$ 0.1	N.D.
total sterol/phospholipid	0.12	0.13	—	0.18	—
with 7-ketocholesterol					
total sterol (μ g/ μ g protein)		0.42	0.50	0.71	0.63
phospholipid (μ g/ μ g protein)		2.2 $\pm$ 0.1	N.D.	2.1 $\pm$ 0.1	N.D.
total sterol/phospholipid		0.19	—	0.33	—

* 0 time means time before changing the culture medium to the experimental medium.

** N.D.: not determined.

の取り込みについて検討を行った。肝細胞を、 $100\mu\text{M}$ のビタミンEを含む培養液で1時間前培養後、7-ケトコレステロールを添加したところ、培養8時間後、ビタミンE非存在下では、コレステロールに対する7-ケトコレステロールの存在比が $1.0:0.4$ であったのに対し、ビタミンE存在下では、7-ケトコレステロールの取り込みは認められず、ビタミンEが7-ケトコレステロールの細胞への取り込みを顕著に抑制していることが示された。また、培養24時間では、いずれの群においてもコレステロールとの存在比は約 $1.0:0.8$ であったが、この時の細胞の生存率は、ビタミンE非存在下では、コントロールの約50%であったのに対して、ビタミンE存在下では約90%と有意に ($p < 0.01$) 高く、ビタミンEが細胞を強く保護していることが示された。

ところで、7-ケトコレステロールの取り込みにより細胞死が引き起こされるメカニズムの1つとして、細胞膜の流動性の変化が細胞内へのカルシウムイオンの流入を招き、細胞死を引き起こしている¹²⁾、のではないかと考えた。そこで培養液中のカルシウム濃度を変化させ検討したところ、結果はTable 2. に示すとおりであるが、培養液中のカルシウム濃度が低下するにつれてむしろ細胞の生存率は低下する傾向が認められ、細胞外からのカルシウムの流入は、7-ケトコレステロール添加による細胞死には関係ないと考えられた。

先に我々は、7-ケトコレステロールによる細胞死に、NOラジカルが一部関与していることを報告した。そこで、別のラジカル、 O_2^- についても検討を行った。Fig. 1には、7-ケトコレステロール添加後、1時間および4時間後の O_2^- 発生量を示した。 O_2^- の発生量はNBTより生成されるFormazan量を測定した。その結果、NOラジカルと同様、培養初期に7-ケトコレステロール添加群ではコントロール群と比較して有意に ($p < 0.01$) 高い O_2^- 発生量が示された。この時、培養液中のMDAを測定したが、過酸化脂質を生成させるには至っていなかった。また、ラジカルスカベンジャーでもあるビタミンEをあらかじめ細胞に添加しておく、 O_2^- の発生が有意に ($p < 0.01$) 抑制されることが示されたため、ラジカルの消去と細胞生存率との関係をさらに詳しく検討した。結果はFig. 2に示す通りである。ビタミン非添加群に比し、ビタミンE添加群では、ビタミンEの濃度に依存して細胞の生存率が有意に高値を示した。水溶性のラジカルスカベンジャーであるビタミンC添加は、殆ど効果を示さなかった。しかしながら、ビタミンEとCが共存した場合は、ビタミンE単独添加群に比べ細胞生存率はさらに高くなり、 $100\mu\text{M}$ ビタミンEおよびC添加群では、コントロール群と同じレベルに細胞生存率が維持

Table 2. Relative Viability of Hepatocytes Cultured in the Medium Containing $100\mu\text{M}$ 7-Ketocholesterol and Various Concentration of Calcium. The cell viability at 0 time was defined as 100.

Time (h)	4	24
Ca free	90%	44%
0.6mM Ca	95%	46%
1.2mM Ca *	100%	49%

* Normal calcium concentration of Williams' E medium.

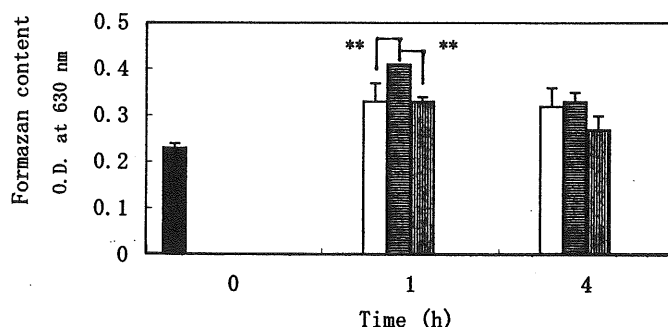


Fig. 1 Production of O_2^- by the Culture with Cholesterol or 7-Ketocholesterol with or without Vitamin E.

■, Williams' medium E; □, Cholesterol; ▨, 7-Ketocholesterol; ▩, 7-Ketocholesterol + Vitamin E ** , $p < 0.05$

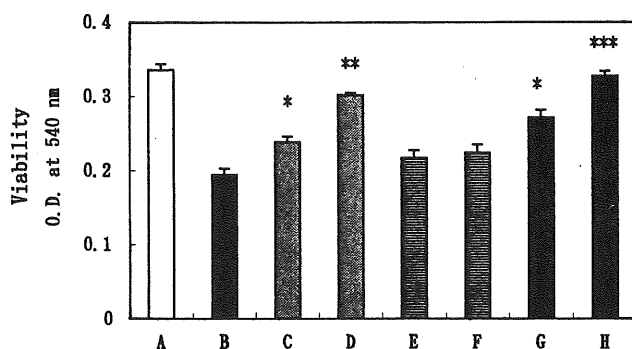


Fig. 2 Effects of Vitamin E and Vitamin C on the Viability of Hepatocytes added $100 \mu M$ 7-Ketocholesterol.

A, Cholesterol; B, 7-Ketocholesterol; C, 7-Keto + V.E. ($50 \mu M$);
D, 7-Keto + V.E. ($100 \mu M$); E, 7-Keto + V.C ($50 \mu M$); F, 7-Keto + V.C. ($100 \mu M$);
G, 7-Keto + V.E. ($50 \mu M$) + V.C. ($50 \mu M$); H, 7-Keto + V.E ($100 \mu M$) + V.C ($100 \mu M$)
Significant difference from B: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

された。

以上の結果を総合的に考えると、肝実質細胞に7-ケトコレステロールを添加すると、おそらく膜の恒常性が乱され、細胞死が誘発されると考えられるが、ビタミンEとCが十分に存在する環境下では、7-ケトコレステロールそのものの取り込みが抑制されると共に、細胞膜内で発生したラジカルはビタミンEで消去され、その結果生じたビタミンEラジカルは、細胞内、外に存在しているビタミンCにより再び抗酸化力をもつビタミンEへと再生され細胞膜を保護し続ける¹³⁾、または、細胞死へと誘導する何らかの細胞内セカンドメッセンジャーの発生を阻止しているのではないかと考えられた。今後、さらにセカンドメッセンジャーについて研究を進めていく予定である。

文 献

- 1) Sanghvi, A., M. G. Kienle and G. Galli (1978) Anal Biochem. 85 : 430
- 2) Gray, M. F., T. D. V. Lawrie and C. J. V. Brooks (1971) Lipids. 6 : 836
- 3) Pie, J. E., K. Spahis and C. Sellan (1990) J. Agric. Food Chem. 38 : 973
- 4) Kumar, N. and O. P. Singhal (1991) J. Sci. Food Agric. 55 : 497
- 5) Kūçük, Ö., M. Churley, M. T. Goodman, A. Franke, L. Custer, L. R. Wilkens and J. St. Pyrek (1994) Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 3 : 571
- 6) Ohtani, K., K. Miyabara, M. Kamei and I. Yuasa (1995) Proc. 12th Symposium in Trace Nutrient Res. 73
- 7) Zhang, S. Z., M. M. Lipsky, B. F. Trump and I-C, Hsu (1994) Cell Biol. Toxicol. 6 : 219
- 8) Mochida, S., N. Masaki, Y. Ohta, A. Matsui, I. Ogawa and K. Fujiwara (1992) J. Pharmacol. 167 : 83
- 9) Peng, S-K. and R. J. Morin (1992) Biological Effects of Cholesterol Oxide, CRC Press, London
- 10) Theunissen, J. J. H., Jackson, R. L. H. J. M. Kemoen and R. A. Demel (1986) Biochim. Biophys. Acta. 860 : 66
- 11) Urano, S., M. Iida, I. Otani and M. Matsuo (1987) Biochim. Biophys. Res. Comm. 146 : 1413
- 12) Starke, P. E., P. E. J. B. Hoek and J. L. Farber (1986) J. Biol. Chem. 261 : 3006
- 13) Beyer, R. E. (1994) J. Bioener. Biomem. 26 : 349