



Title	Lysophosphatidylcholine causes Ca ²⁺ influx, enhanced DNA synthesis and cytotoxicity in cultured vascular smooth muscle cells
Author(s)	陳, 躍華
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39028
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	陳 躍 華
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 7 9 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 7 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Lysophosphatidylcholine causes Ca^{2+} influx, enhanced DNA synthesis and cytotoxicity in cultured vascular smooth muscle cells (リゾホスファチジルコリンの培養血管平滑筋細胞における細胞内カルシウム濃度上昇、DNA 合成促進、および細胞障害の作用機構解明に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 荻原 俊男 (副査) 教 授 松沢 佑次 教 授 祖父江憲治

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

低比重リポ蛋白 (LDL) の酸化の過程で生じると考えられる lysophosphatidylcholine (LPC) は動脈硬化発症・進展の促進因子として知られ、血管平滑筋細胞 (VSMC) 細胞内カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇作用を有し、さらに VSMC 増殖促進作用を有することが知られているが、その機序については不明である。今回我々は LPC による VSMC の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇作用、増殖促進作用、さらには細胞障害作用の機序について検討した。

【方法】

1) 細胞培養: VSMC は Wistar rat の胸部大動脈より explant 法により単離し、10% ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM) にて 37°C 、5% CO_2 気相下で培養し、5-8 継代の細胞を使用した。

2) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定: 細胞が confluent に達した後、24 時間血清不含 DMEM にて培養後、 $2 \mu\text{M}$ の fura-2 AM を 50 分間添加し、測定溶液 (116 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 0.8 mM MgSO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 5.5 mM glucose, 26 mM NaHCO_3 , 10 mM HEPES, pH 7.3) で洗浄の後、細胞浮遊液 (1×10^6 個/ml) に対する 340 および 380 nm の励起光による 495 nm の蛍光を測定した。 Ca^{2+} 不含溶液は上記溶液から CaCl_2 を除き 2 mM EGTA を添加し作成した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の値は得られた吸光度から Grynkiewicz らの方法により算出した。

3) DNA 合成の測定: VSMC を 4×10^4 個/ml ずつ 24 穴のプレートにて培養し、3 日後細胞が subconfluent に達した後、培養液を血清不含 DMEM に交換しさらに 48 時間培養し、 ^3H thymidine ($2 \mu\text{Ci/ml}$) にて 4 時間ラベルした。次に、細胞を氷冷リン酸緩衝生理食塩水にて 3 回洗浄の後、氷冷 5% トリクロル酢酸にて処理し、酸不溶性分画の ^3H 放射線活性を測定した。

4) 細胞障害性の評価: 細胞障害性の評価は lactate dehydrogenase (LDH) 測定による Wroblewski and La Due の方法にて行った。LDH は反応試薬を含む培養液にて 24 時間インキュベート後、培養上清中活性を測定した。細胞障害度は 1 ml の 1% Triton X-100 を含む培養液にて 23°C 30 分インキュベート後の LDH 活性を total LDH 活性とし、各 LDH 活性を除した percent LDH 活性で表した。

【成績】

1) LPC 10^{-7} から 10^{-4} M は細胞外 Ca^{2+} 存在下で濃度依存性に VSMC の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を持続性に上昇させたが、

Ca²⁺ 不含溶液中ではこの作用は認められなかった。

2) LPC による [Ca²⁺]_i 上昇は angiotensin II や ionomycin による [Ca²⁺]_i 上昇とは異なる pattern を呈し、界面活性剤である digitonin のそれと類似した。

3) LPC による [Ca²⁺]_i 上昇作用は、LPC 10⁻⁶M の連続投与によっても脱感作されず、百日咳毒素 (IAP) 500 ng/ml にて24時間前処理し G 蛋白を抑制した状態でも抑制されず、また L-type Ca²⁺ channel blocker である nifedipine, diltiazem, verapamil (各々 10⁻⁷~10⁻⁴M) や inorganic Ca²⁺ channel blocker である Ni (2 × 10⁻⁵M) や Cd (4 × 10⁻⁵M) 前処理でも抑制されなかった。

4) LPC 10⁻⁵M と 5 × 10⁻⁵M は VSMC の DNA 合成を有意 (p < 0.01) に上昇させ、LPC 10⁻⁵M は DNA 合成を有意 (p < 0.01) に阻害した。

5) 10⁻⁵M 以上の濃度の LPC は培養液中 LDH 活性を有意 (p < 0.01) に上昇させた。

6) LPC の上記 DNA 合成および LDH への作用は digitonin の作用に類似した。

【総括】

LPC による VSMC の [Ca²⁺]_i の上昇作用機作、DNA 合成・細胞障害作用の詳細を明らかにした。血清 LDL 濃度の上昇は動脈硬化の発症・進展に対する促進因子であることは以前より知られていたが、最近変性 LDL が native LDL より動脈硬化促進作用が強いことが知られるようになった。LPC は LDL の酸化の過程で phosphatidyl choline (PC) より産出されることが報告されている。今回の我々の検討により、LPC 10⁻⁷ から 10⁻⁴M は濃度依存性に VSMC の [Ca²⁺]_i を持続性に上昇させ、この作用は LPC 10⁻⁶M の連続投与によっても脱感作されず、IAP 500ng/ml にて24時間前処理し G 蛋白を阻害した状態でも抑制されなかったことより、LPC による [Ca²⁺]_i 上昇作用は受容体や IAP 感受性 G 蛋白を介さないことが示唆された。また、あらかじめ EGTA 添加により細胞外 Ca²⁺ を除いた状態では LPC による [Ca²⁺]_i 上昇作用は消失したが、L-type Ca²⁺ channel blocker である nifedipine, diltiazem, verapamil (各々 10⁻⁷~10⁻⁴M), inorganic Ca²⁺ channel blocker である Ni (2 × 10⁻⁵M) や Cd (4 × 10⁻⁵M) 前処理では LPC による [Ca²⁺]_i 上昇作用は抑制されなかったことから、LPC による [Ca²⁺]_i 上昇作用は Ca²⁺ channel を介さない細胞外からの Ca²⁺ の流入に依存することが示唆された。さらに、LPC 10⁻⁶ から 10⁻⁵M は VSMC の DNA 合成を濃度依存性に上昇させ、10⁻⁵M より高濃度の LPC は逆に DNA 合成を阻害し培養液中 LDH 濃度を上昇させたことから、LPC は低濃度で VSMC 増殖促進作用を、高濃度で VSMC 障害作用を有していた。さらにこれらの作用は digitonin の作用に類似したことから、LPC はその界面活性作用をも介し、動脈硬化巣における VSMC の過剰な増殖や壊死に関係していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、動脈硬化症への関与が知られる変性低比重リポ蛋白中に存在するリゾホスファチジルコリンの血管平滑筋細胞への作用機序を明らかにする目的で行われている。血中低比重リポ蛋白濃度の上昇が動脈硬化の発症・進展に対する危険因子であることは以前より知られているが、最近活性酸素などにより修飾された変性低比重リポ蛋白は低比重リポ蛋白自体より強い動脈硬化促進作用を示すことが知られるようになった。リゾホスファチジルコリンは低比重リポ蛋白の酸化の過程でホスファチジルコリンより産生される極めて生理活性の高いリン脂質である。本研究において培養血管平滑筋細胞の細胞内カルシウム濃度の検討により、リゾホスファチジルコリン 10⁻⁷ から 10⁻⁴M は濃度依存性に血管平滑筋細胞の細胞内カルシウム濃度を上昇させるものの、あらかじめ EGTA 添加により細胞外カルシウムを除いた条件下ではこの作用は消失したことから、リゾホスファチジルコリンの細胞内カルシウム上昇作用は細胞膜を介する細胞外カルシウムの流入に依存することを示した。さらにリゾホスファチジルコリンの細胞内カルシウム上昇作用は、リゾホスファチジルコリンの連続投与によっても脱感作されず、百日咳毒素にて24時間前処理し G 蛋白を阻害した状態でも抑制されなかったことより、受容体や IAP 感受性 G 蛋白を介さないことが示唆された。さらに、L 型カルシウムチャネル拮抗薬や無機カルシウムチャネル阻害剤の前処理ではリゾホスファチジルコリンによる細胞内カルシウム濃度上昇作用は抑制されなかったことから、リゾホスファチジルコリンによる細胞内カルシウム濃

度上昇作用はカルシウムチャネルを介さないカルシウム流入に依存することを示唆した。さらに、細胞内カルシウム濃度を上昇させるリゾホスファチジルコリン 10^{-6} から 10^{-5} Mは血管平滑筋細胞のDNA合成を上昇させ、 10^{-5} Mより高濃度のリゾホスファチジルコリンは逆にDNA合成を阻害し培養液中LDH濃度を上昇させたことから、リゾホスファチジルコリンは低濃度で血管平滑筋細胞増殖促進作用を、高濃度で血管平滑筋細胞障害作用を有することを示した。以上の如く本研究はリゾホスファチジルコリンの血管平滑筋細胞への作用機構の詳細を明らかにし、このリン脂質の動脈硬化巣における血管平滑筋細胞の過剰な増殖や壊死への関与を示唆し、動脈硬化症の発症機序に新たな視点を提示したものである。したがって本研究は学位授与に値すると認める。