

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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 11794 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($[Ca^{2+}]_i$)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 $[Ca^{2+}]_i$ 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%CO₂気相下で培養し、5-8継代の細胞を使用した。

2) $[Ca^{2+}]_i$ 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 μ 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 CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 5.5 mM glucose, 26 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, pH 7.3)で洗浄の後、細胞浮遊液(1 \times 10⁶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。Ca²⁺不含溶液は上記溶液からCaCl₂を除き2 mM EGTAを添加し作成した。 $[Ca^{2+}]_i$ 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 \times 10⁴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 μ 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活性を除いたpercent LDH活性で表した。

【成績】

1) LPC 10⁻⁷ から10⁻⁴ Mは細胞外Ca²⁺存在下で濃度依存性にVSMCの $[Ca^{2+}]_i$ 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 の上昇作用機序、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ン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。