

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

血管 (1991.11) 14巻4号:269～275.

Lysophosphatidylcholine (LPC)による内皮依存性弛緩反応に関する研究

平山智也、小川裕二、飛世克之、小野寺壮吉

原著 5

Lysophosphatidylcholine (LPC) による 内皮依存性弛緩反応に関する研究

平山智也, 小川裕二, 飛世克之, 小野寺壮吉
旭川医科大学 第一内科学教室

I. 緒言

Lysophosphatidylcholine (LPC) は、生体の主要なリン脂質で、生体膜の重要な構成成分である¹⁾。LPCは生体膜では phospholipase A₂ の作用で産生され²⁾、物理化学的性質が血小板活性化因子 (platelet activating factor : PAF) に類似している³⁾ ことが知られている。

しかし、LPCが循環調節にどのような役割をはたしているかは不明な点が多い。近年、LPCがNa⁺-K⁺-ATPase 阻害作用を持つ内因性ジギタリス様物質のひとつである⁴⁾ と報告され、さらに、容量負荷を加えたラットでは血中の LPC が増加し、同時に著明な利尿作用を認めた⁵⁾ とする報告や、one-kidney one-wrap rat の血中に LPCが増加している⁶⁾ という報告もあり、その生理的意義が注目されている。血管系においてはLPCが内皮依存性血管弛緩反応 (endothelium-dependent relaxation : 以下EDRと略す) を起こすことが知られている⁷⁾ が、その作用機序、動物の種差、臓器差、あるいは投与量による違いなど不明な点が多い。本研究では、LPC によるEDRに関し、ラットを用いて、1) 大動脈、肺動脈、上腸間膜動脈による反応の違い、2) 反応の発現機序、3) PAFレセプターの関与について検討した。PAFレセプターの関与に関しては、LPCの構造アナログであり、PAF拮抗薬であるCV-6209 (Takeda) を用いて、LPCによるEDR がレセプターを介するものかどうかについて検討した。

II. 対象と方法

生後5~8週齢 (体重190~250g) の雄Sprague-Dawley rat (日本 Charles River 社) を対象とした。

*旭川医科大学 第一内科学教室 (〒078 旭川市西神楽4線5号3番11)
First department of Internal Medicine, Asahikawa Medical College,
ishikagura, Asahikawa 078.

pentobarbital sodium (20mg/kg) にて腹腔内麻酔し、胸部大動脈、主肺動脈および上腸間膜動脈をすばやく摘出し、それぞれ長さ5mm, 3mm, 3mmの輪状標本作製した。内皮温存標本および血管内腔にテフロン製のカニューレを挿入し内皮を擦過した標本を用いた。

この血管標本を、Krebs-Henseleit液 (K-H液) 50mlで満たしたマグヌス管に、ステンレス製のL字型フックを用いて懸垂した。K-H液の組成は、NaCl 118.1mM, KCl 4.7mM, CaCl₂ 2.5mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 25.0mM, glucose 11.0mMである。K-H液には95%O₂+5%CO₂ 混合ガスを通気し、37℃, pH (7.30-7.40) に維持した。初期張力は肺動脈と上腸間膜動脈では1g, 大動脈では2gとし、2時間放置し安定した状態がえられた後、各薬液による等尺性張力の変化を force displacement transducer (日本光電, TB 611T, TB612T) を介してXY recorder (理研電子, D 72BP, SPH 3C) に描記した。

内皮の有無は、phenylephrine (Phe) 5×10^{-7} Mにより収縮させた状態で、acetylcholine (ACh) 10^{-5} Mを投与し、その弛緩反応の有無で確認した。次いで、胸部大動脈、肺動脈および上腸間膜動脈のそれぞれについて、以下の項目について観察した。なお、LPC, AChはPhe 5×10^{-7} Mで収縮させプラトーに達してから各薬液を加えた。

- 1) 内膜温存標本および内膜擦過標本でのLPCおよびAChによる反応性の比較。
- 2) L-N^G-monomethylarginine (LNMMA) 5×10^{-5} M存在下でのEDRへの影響。
- 3) indomethacin 10^{-5} M, methylene blue 10^{-6} M存在下でのEDRへの影響。
- 4) CV-6209¹⁵⁾ 5×10^{-6} M存在下でのEDRへの影響。

各阻害薬、拮抗薬はPhe前収縮の20分前より投与した。以上の実験に用いた試薬は以下のとおりである。L- α -

Lysophosphatidylcholine (LPC) による内皮依存性弛緩反応に関する研究

lysophosphatidylcholine (from egg yolk, Sigma), acetyl-choline chloride (Sigma), indomethacin (Sigma), methylene blue (Sigma), 1-phenylephrine (Sigma), L-N^o-monomethylarginine (Calbiochem), L-arginine (Sigma), CV-6209 (Takeda).

弛緩活性の統計学的検討は, non paired t-test を用いた。

III. 結 果

1) LPCおよびAChによるEDR: 胸部大動脈, 肺動脈および上腸間膜動脈の各輪状標本を前収縮させた後, LPC

を 10^{-7} Mから 10^{-5} Mまで累積的に投与した (Fig. 1). 内膜温存標本では LPC による弛緩は濃度依存的に認められた。大動脈, 肺動脈では弛緩は緩徐であり, 低濃度LPC (10^{-7} M, 10^{-6} M) での弛緩はわずかであった。上腸間膜動脈では低濃度LPCでも弛緩は迅速で著明であった。内膜擦過標本では有意な弛緩は認められなかった。

内膜温存標本での弛緩活性をまとめると (Fig. 2), 低濃度LPC (10^{-7} M, 10^{-6} M) により上腸間膜動脈では各々 ($17.3 \pm 6.6\%$, $23.5\% \pm 9.1\%$; MEAN \pm SEM, $n=8$) の弛緩活性を示し, 大動脈での弛緩活性 ($5.9 \pm 4.4\%$, $12.4 \pm 5.3\%$; $n=8$) および肺動脈での弛緩活性 (3.8%

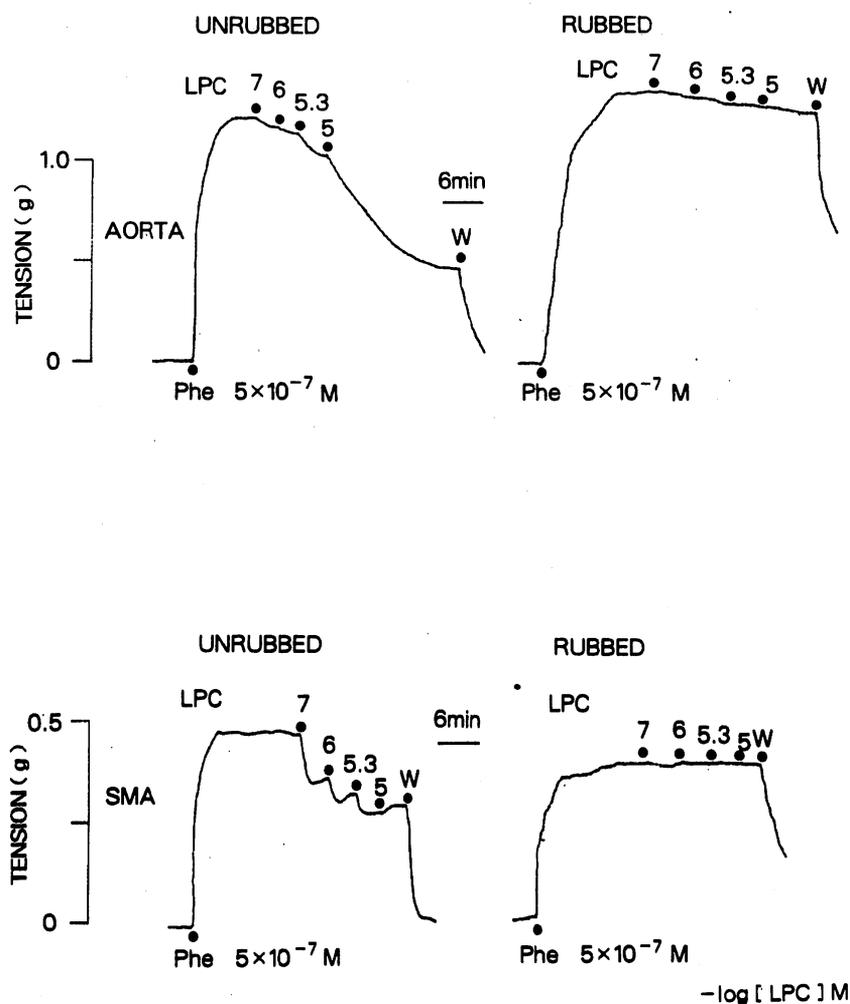


Fig. 1 Representative original recordings of lysophosphatidylcholine (LPC)-induced vasoactive responses in the phenylephrine (Phe)-contracted rat aortic and superior mesenteric arterial rings. LPC 10^{-7} M to 10^{-5} M were added to the plateau of a Phe-contracted preparation. UNRUBBED, with intact endothelium. RUBBED, without endothelium. W, washout, change of bath medium. SMA, superior mesenteric artery.

Lysophosphatidylcholine (LPC) による内皮依存性弛緩反応に関する研究

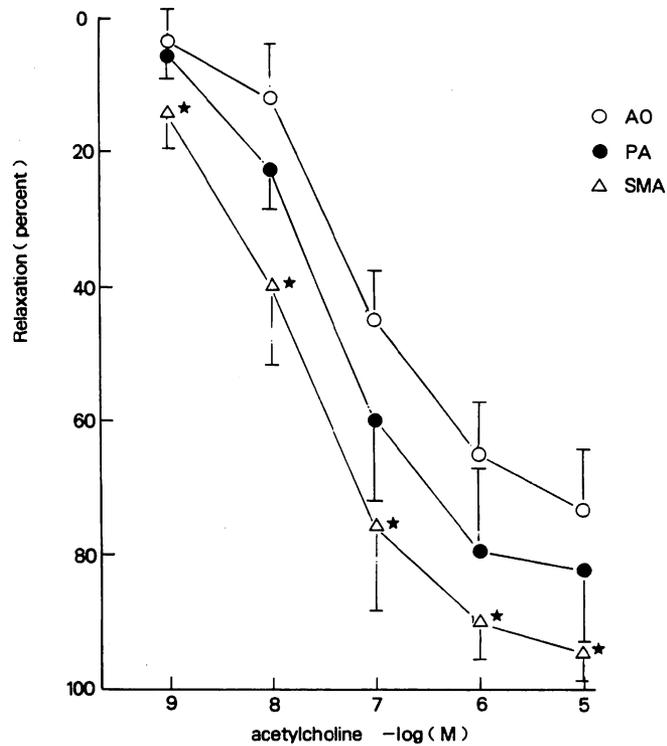


Fig. 3 The effects of acetylcholine on endothelium-dependent relaxations. Values represent mean \pm S.E.M. \circ aorta (AO) : n = 8, \bullet pulmonary artery (PA) : n = 5, \triangle superior mesenteric artery (SMA) : n = 8. \star p < 0.01 compared to AO.

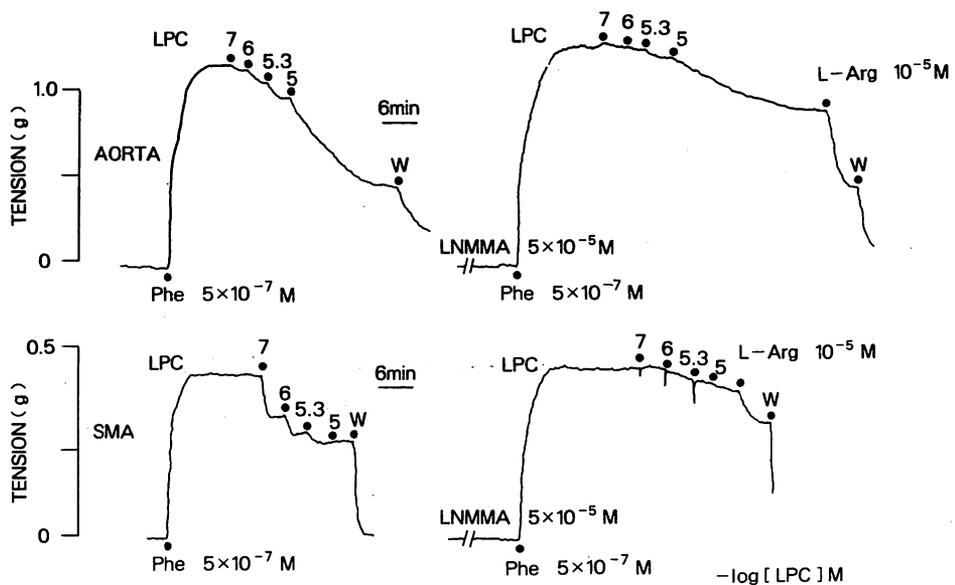


Fig. 4 Effect of pretreatment with L-N^G-monomethylarginine (LNMMA) on the relaxation induced by lysophosphatidylcholine (LPC). Right-hand traces were recorded 60 min after the control (left). LNMMA was added 20 min before phenylephrine-contraction. All preparations were kept intact endothelium. SMA, superior mesenteric artery. Phe, phenylephrine.

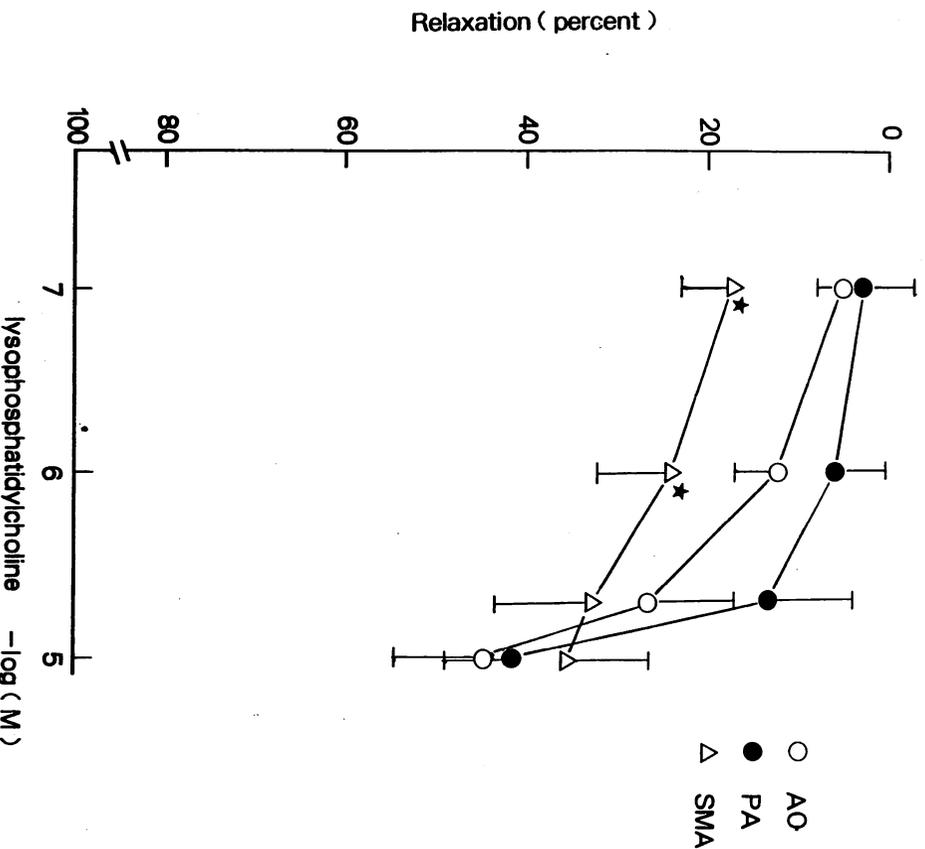


Fig. 2 The effects of lysophosphatidylcholine on endothelium-dependent relaxations. Values represent mean \pm S.E.M. \circ aorta (AO) : n = 8 \bullet pulmonary artery (PA) : n = 5 Δ superior mesenteric artery (SMA) : n = 8 \star p < 0.01 compared to AO and PA.

$\pm 6.3\%$, $6.8 \pm 6.6\%$; n = 5) に比べ有意に大であった。AChによるEDRも上腸間膜動脈で、胸部大動脈、肺動脈に比して弛緩活性は大であった (Fig. 3)。

2) LNMMA による影響：LNMMA の前処置によりLPCによるEDRは有意に抑制された。上腸間膜動脈ではLPC 10^{-5} Mでの弛緩活性は $37.6 \pm 10.6\%$ (n = 8) より $15.4 \pm 3.8\%$ (n = 4) へと抑制された。さらにLNMMAによるEDRの抑制は、L-Arginine 10^{-5} M投与により解除された (Fig. 4)。

3) indomethacin, methylene blue による影響：indomethacin前処置ではLPC 10^{-5} MによるEDRの変化は認められなかった。methylene blue 前処置ではLPC 10^{-5} MによるEDRはほぼ消失した。

4) CV-6209による影響：CV-6209前処置で、上腸間膜動

脈でのLPC 10^{-5} MによるEDRは有意に減弱した (Fig. 5)。しかし、ACh 10^{-5} MによるEDRはCV-6209前処置で変化はなかった。上腸間膜動脈でのLPCの弛緩活性に及ぼす各阻害薬の影響をFig. 6にまとめた。

IV. 考 案

LPCによりEDRが起こることはSaitoら⁹⁾により報告されているが、その作用機序は不明である。彼らは、ウサギ大動脈標本を用い、LPCによるEDRの速度がAChと比較すると緩徐であり、作用機序が両者で異なることを推察した。著者らは大動脈では彼らの報告と同様にLPCによる緩徐なEDRを観察したが、上腸間膜動脈においては彼らの報告より低濃度のLPC 10^{-7} Mで、反応後約4分ではほぼ最大弛緩活性を示す迅速な反応を観察した。このこと

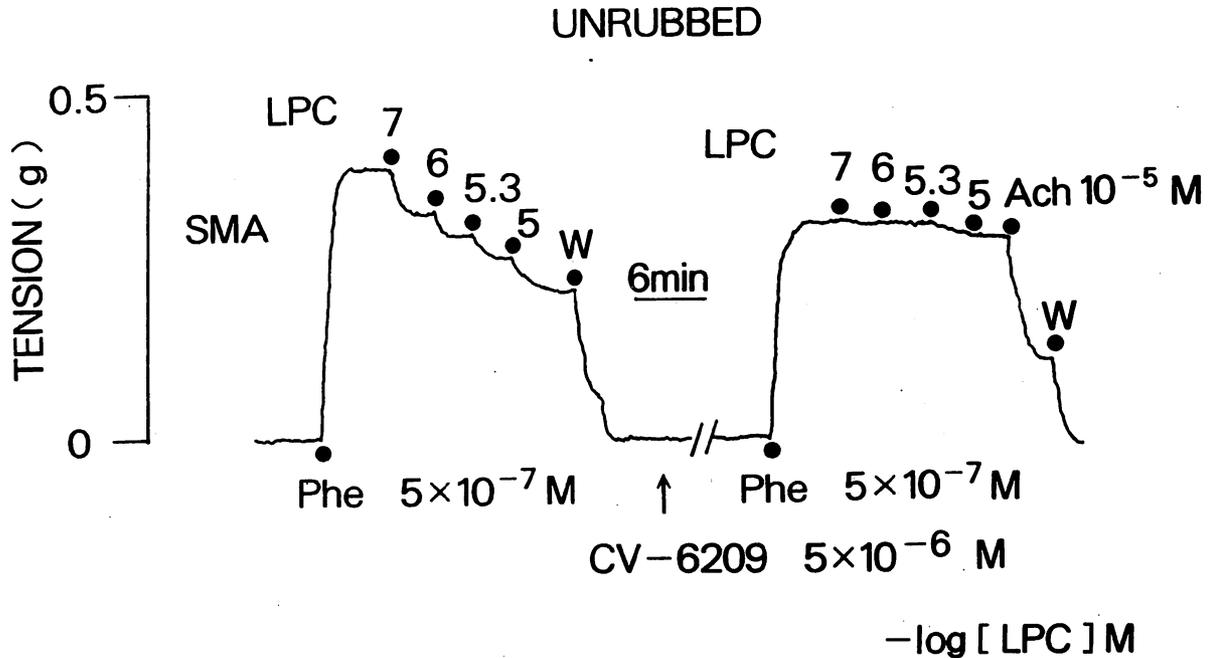


Fig. 5 Effect of pretreatment with CV-6209 on the relaxation induced by lysophosphatidylcholine (LPC). Right-hand traces were recorded 60min after the control (left). CV-6209 was added 20min before phenylephrine-contraction. UNRUBBED, with intact endothelium. ACh, acetylcholine chloride. Phe, phenylephrine. SMA, superior mesenteric artery.

は、LPCによるEDRは血管部位により反応性が異なることを示している。LPCと同様に、AChによるEDRの感受性も上腸間膜動脈で高く、LPCによるEDRの作用機序を検討するうえでは、上腸間膜動脈が評価しやすいと考えられた。

LPCによるEDRの作用機序に関し、NO生成阻害薬であるLNMAを用いてNO生成の関与を検討した報告は、著者らが検索した範囲では認められない。著者らは、LNMAを用いてLPCによる弛緩反応が抑制され、L-Arginine添加により抑制が解除されることを認め、LPCによるEDRにNOが関与していることを明らかにした。また、indomethacinで反応が抑制されず、methylene blueで反応が消失した点はSaitoらの報告と一致しており⁹⁾、LPCによるEDRはcyclooxygenase系産物は関与せず、NOが生成され、反応にはcyclic GMPが関与していると考えられた。

LPCに物理化学的性質の類似しているPAFが、EDRをおこすことはよく知られている。^{9,10)} Shigenobuら⁹⁾は、ラット大動脈摘出標本において、PAFが用量依存的なEDRを示すことを示した。さらに、彼らはPAFがphosphatidyl-

cholineやLPCと同等な弛緩を生じ、生理的な低濃度では反応をおこさないことから、PAFによるEDRはPAF受容体を介したものでなく、膜の流動性が変化したためと考えた。Saitoら⁹⁾も、LPCのEDRが、グリセロール骨格第一位脂肪酸の炭素数に依存し、C₁₆、C₁₈で最も活性が大であり、膜流動性の変化によるCa mobilizationがその初期過程をなしていると推察した。一方、Chibaら¹⁰⁾はラット腸間膜動脈を用い、PAFによるEDRが10⁻¹²Mという低濃度より認められ10⁻⁹Mで最大弛緩に達し、PAF拮抗薬であるCV-3988で抑制されたことより、その反応機序は膜流動性の変化ではなくPAFレセプターを介したものと報告している。このように、PAFによるEDRが、膜流動性を変化させないような低濃度でおこることが、腸間膜動脈標本を用いることにより明らかになってきている。著者らの結果でも、LPCによるEDRは、上腸間膜動脈では10⁻⁷Mという内皮の膜流動性に影響を与えにくい濃度でも反応が迅速で著明であった。このことから、著者らは、LPCがPAFレセプターないしはPAFレセプター類似のリン脂質レセプターを介してEDRをおこすと推察した。そこで、PAF拮抗薬であるCV-6209を

Lysophosphatidylcholine (LPC) による内皮依存性弛緩反応に関する研究

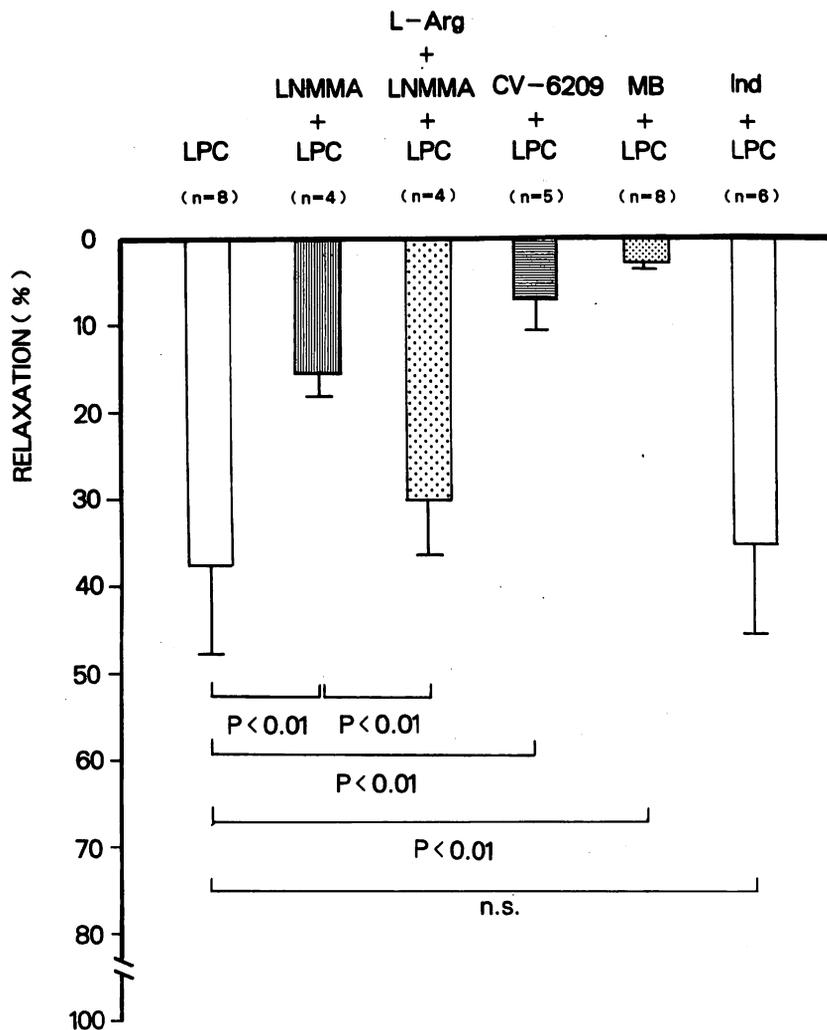


Fig. 6 Effect of inhibitors on lysophosphatidylcholine(LPC)-induced relaxations of the rat superior mesenteric arterial rings with intact endothelium. The response plotted is percentage of relaxation in the phenylephrine ($5 \times 10^{-7}M$) -induced plateau tension after addition of LPC ($10^{-5}M$). Columns represent responses after addition of the respective inhibitors : LNMMA ($5 \times 10^{-5}M$), CV-6209($5 \times 10^{-6}M$), MB ($10^{-6}M$) or Ind ($10^{-5}M$). Values plotted are means with vertical bars representing the S.E.M. LPC-induced relaxations were significantly inhibited ($p < 0.01$)by LNMMA, CV-6209, and MB. n, number of preparations. MB, methylene blue. LNMMA, L-N^G-monomethylarginine. Ind, indomethacin. n.s., not significant.

用いてLPCによるEDRが抑制されるかどうか検討した。

CV-6209は、PAFレセプターに対する脂質性拮抗薬としては最も強い作用を有する¹⁵⁾と考えられている。この化合物は、LPCの誘導体として制がん作用を目的に合成されたCV-3988¹⁶⁾を改良したものであり、構造上はLPCのアナログと考えられている。CV-6209の前処置でLPC

による EDR は有意に抑制されたことから、1) LPC が PAFレセプターを介して反応をおこしている 2) LPC が CV-6209 でブロックされるような PAFレセプター類似のリン脂質レセプターを介して反応をおこしている 3) 投与された LPC が PAF に変換されて反応をおこしたなどの可能性が考えられた。PAF は、pM から nM オーダーの

低濃度で生理的活性を發揮する^{11,12)}ことから、受容体を介して作用が発現すると考えられている。PAFレセプターは従来の報告^{13,14)}では、Caチャンネルと密接に関連しており、細胞内遊離Ca濃度の変化を介し、種々の生理活性を生じるものと考えられている。LPCによるEDRの作用機序として、このようなCa mobilizationに関与するPAFレセプター類似のレセプターが関係していると推察されるが、今後の検討が必要である。

LPCによるEDRの生理的な役割は不明であるが、近年、LPCが体液量の調節に関与している可能性が推察されている。^{4,5,6)}本実験の結果、LPCによるEDRは、抵抗血管である腸間膜動脈でその感受性が高く、体液量の増大に伴い増加したLPCがEDRにより末梢血管抵抗の調節にかかわっている可能性もあり、その生理的意義に興味もたれる。また、LPCは血中では、lecithin : cholesterol acyltransferase : LCATの作用により生成される¹⁶⁾ことも知られている。Sasakiら¹⁷⁾は、LCATにより生成されたLPCがその界面活性作用によりHDLの表面の状態を変化させてコレステリルエステルを転送しやすい状態にしていると推測している。このように、LPCは体液量の調節や末梢血管抵抗の調節、末梢組織からのコレステロール逆転送などに関与している可能性もあり、生理活性脂質としての生理的意義の検討が今後必要と考えられる。

V. 総 括

- 1) LPCによるEDRはラット大動脈、肺動脈、上腸間膜動脈における検討の結果、抵抗血管である上腸間膜動脈で最も反応は大であり、従来の報告より低濃度でも迅速な反応がおこることが明らかになった。
- 2) LPCによるEDRはLNMMAで有意に抑制され、NOの生成が反応に関与していると考えられた。
- 3) LPCによるEDRはPAF拮抗薬であるCV-6209で抑制され、その発現機序にPAFレセプターあるいはPAFレセプター類似の構造をもつLPCレセプターが関与していることが推察された。

なお、本論文の要旨は、第20回日本脈管作動物質学会(1991年2月8日、東京)において発表した。

文 献

- 1) Nelson, G.J. : *Lipids*, 2, 323-328 (1967)
- 2) Weltzien, H.U. : *Biochem. Biophys. Acta.*, 559, 259-287 (1979)
- 3) 井上圭三 : 現代化学, 別冊17, 21-24 (1989)
- 4) Rauch, A.L., Buckalew, V.M. Jr. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 150, 648-654 (1988)

- 5) Rauch, A.L., Buckalew, V.M. Jr. : *Am. J. Physiol.*, 254, F824-F827 (1988)
- 6) Buckalew, V.M. Jr., Morris, M. et al. : *Klin. Wochenschr.*, (Supple VIII), 133-138 (1987)
- 7) Bing, R.J., Saeed, M. : *Bioscience Reports.*, 7, 783-789 (1987)
- 8) Saito, T., Wolf, A., Bing, R.J. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, 8246-8250 (1988)
- 9) Shigenobu, K., Masuda, Y., Kasuya, Y. et al. : *J. Pharmacobio-Dyn.*, 128-133 (1985)
- 10) Chiba, Y., Mikoda, N., Ito, K. et al. : *Nauryn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 341, 68-73 (1990)
- 11) Bussolino, F., Cammussi, G. et al. : *J. Immunol.*, 139, 2439 (1987)
- 12) Grigorian, G.Y., Ryan, U.S. : *Circ. Res.*, 61, 389 (1987)
- 13) Homma, H. et al. : *J. Biol. Chem.*, 262, 10582 (1987)
- 14) White, J.R., Huang, C.K. et al. : *J. Biol. Chem.*, 259, 81605 (1984)
- 15) Terashita, Z., Imura, Y., Nishikawa, K. et al. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 242, 263 (1987)
- 16) Etienne, J., Polonovski, J. : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 41, 805-812 (1959)
- 17) Sasaki, N., Saito, Y., Yoshida, S. : *Clin. Thr. Cardiovasc.*, 207-210 (1989)