◆トピックス◆

リゾフォスファチジルコリンによる血管内皮細胞の遺伝子発現の変化

佐 藤 直 明*

Changes of Endothelial Gene Expression by Lysophosphatidylcholine

Naoaki SATO*

Key words : Atherosclerosis, adhesion molecules, cytokines, growth regulation, thrombosis

はじめに

リゾフォスファチジルコリン(LPC)は、酸化LDL中に含まれる主要な脂質成分であり、動脈硬化巣や炎症組織において増加していることが示されている。これまでLPCの生理作用として、内皮依存性の血管弛緩反応の抑制、protein kinase C活性化を介したTリンパ球の活性化、単球やTリンパ球の内皮下への遊走促進などが報告されており、動脈硬化症の発生、進展や炎症反応に重要な役割を果たすと考えられている。

LPCは、生体膜や血漿リポ蛋白質の主要脂質成分であるフォスファチジルコリンがフォスホオリパーゼA2などで水解されることにより生成する(図1)。動脈硬化巣などでは、血管内皮直下の局所で生成されたLPCが血管内皮を刺激しているものと推定されるが、内皮細胞へどのようにして取り込まれるのかについては十分解明されていない。受容体の存在については疑問視されており、細胞膜へ直接作用して生理活性を発現するものと推定されている。

近年、LPCによって起こる血管内皮細胞機能

図1 LPCの生成

の変化のいくつかは、遺伝子の発現の変化に基づいて起こっていることが明らかになってきた。本稿では、血管内皮細胞の遺伝子発現に及ぼすLPCの影響に関する最近の知見を、筆者らのデータをまじえ概説する。

* 新潟大学医学部第一内科 [〒951-8510 新潟市旭町通一番町757]

The First Department of Internal Medicine, Niigata University School of Medicine (1-757 Asahimach, Niigata 951-8510 Japan.)

接着分子の発現に対する影響

接着分子を介した血管内皮細胞と白血球の接着は、炎症、動脈硬化の初期段階の重要なステップであるが、LPC がこうした病態において、単球やリンパ球の内皮下への侵入を促進する刺激の一つである可能性が示唆されている¹⁾。LPC 刺激で、培養ヒト腸骨動脈細胞では ICAM-1 および VCAM-1 の mRNA 量と細胞表面抗原量の増加が、培養ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) においては ICAM-1 の発現増加が示されている。IL-1 や TNF 刺激では ICAM-1, VCAM-1 の他に E-セレクトインの発現の増加がみられるが、LPC は E-セレクトインの遺伝子発現には影響せず、これらの炎症性サイトカインの作用とは様相を異にしている。また培養ウサギ大動脈細胞を LPC で刺激すると、ICAM-1, VCAM-1 の発現が誘導され、THP-1 や U937 といった単球系白血病細胞株の接着が増加することが示されており、LPC に暴露された血管内皮表面では白血球の接着が促進される可能性が推定される。最近の報告では、LPC は ICAM-1 プロモーターの転写活性を高めることが CAT アッセイで示されており、LPC 刺激による HUVEC での ICAM-1 mRNA の増加には NF- κ B の活性化が関与することを示唆している²⁾。

サイトカインの発現に対する影響

動脈硬化の進展には血管平滑筋細胞の内膜への遊走と増殖の過程が大きく関わっているが、LPC は HUVEC においてヘパリン結合性上皮成長因子様因子 (HB-EGF) や血小板由来成長因子 (PDGF) A 鎖および B 鎖といった強力な平滑筋増殖因子の発現を、転写レベルで増強することが nuclear runoff アッセイを用いた実験で示されている³⁾。HB-EGF の mRNA 量は 50 μ M の LPC 存在下に 1 時間の培養で刺激前の 2.4 倍に、100 μ M の LPC 存在下では 7.5 倍

にまで増加し、エンドトキシン 1 μ g/ml 刺激での 2.1 倍と比べてもより強力な誘導効果がみられた。PDGF についても 100 μ M の LPC 存在下に 4 時間の培養で mRNA 量は A 鎖で 8.6 倍、B 鎖で 8.7 倍になり、TNF 200 U/ml またはフォルボールエステル 100 nM での刺激より強力であったとしている。これに対し LPC は、好中球の遊走や活性化に関与するサイトカインである IL-8 や、単球の遊走や活性化に関与する MCP-1 の血管内皮細胞での遺伝子発現には影響しないことが示されている。

凝固線溶系関連因子の発現に対する影響

最近筆者らは、HUVEC を 50 μ M の LPC 存在下または非存在下で培養し、それぞれの条件下で発現している mRNA をディファレンシャル・ディスプレイ法により比較することで、LPC で誘導される 12 種類の遺伝子を同定した。うち 3 種類は凝固線溶系関連因子で、トロンボモジュリン (TM), PAI-1, tPA の mRNA 量が LPC 刺激で増加した⁴⁾。これまで酸化 LDL による刺激では、TM の mRNA と抗原量の低下⁵⁾、PAI-1 抗原量の増加と tPA 抗原量の低下⁶⁾が報告され、酸化 LDL が血栓形成に促進的に作用することが示唆されていた。筆者らの解析では TM については LPC 刺激後 4 時間、PAI-1 については 4~6 時間、tPA については 6 時間をピークにおおの mRNA 量が増加した。PAI-1 だけでなく TM や tPA でも mRNA 量の増加がみられたことは、報告されている酸化 LDL の作用とは必ずしも一致しなかったが、これには酸化 LDL 中の LPC 以外の過酸化脂質成分や蛋白質成分が影響しているものと考えられた。したがって LPC 自身の内皮の抗血栓性に対する影響は、単純に血栓形成に促進的とはいえ、複雑に作用しているものと考えられる。また筆者らは、LPC 刺激の tissue factor pathway inhibitor (TFPI) の発現に対する影響も検討した⁷⁾。HUVEC を 50 μ M の LPC 存

図2 LPC刺激のTFPI発現に及ぼす影響

(A) 培養上清中のTFPI抗原量の変化. 35 mm径のdishを用い, 各濃度のLPCを含む培養液800 μ lでHUVECを24時間培養後, total TFPI抗原量をELISAにて測定した. (mean $\pm$ SD, n=9)

(B) LPC刺激後のTFPI mRNA量の経時変化. 50 μ MのLPC存在下にHUVECを一定時間培養後, RNAを抽出してTFPI cDNAをプローブとしてノーザンブロットを行った.

在下で24時間培養すると, 培養上清中のTFPI抗原量は, LPC濃度依存性に低下し, (図2A), cell lysate中のTFPI抗原量も同様の傾向がみられた. TFPI mRNA量についてもLPC存在下に12時間の培養で減少がみられ, 18時間でbasal levelの15%に低下し, LPCによる発現の抑制が見出された(図2B). 一方, tissue factor (TF) については, LPC刺激による発現誘導が全くみられなかった. 動脈硬化の進行に伴い内皮下組織に蓄積増加したLPCが, 内皮に働きかけてTFPI産生に抑制的に作用するものと仮定すると, 内皮下の動脈硬化組織では正常に比べTF活性は格段に高くなっているため, LPCが内皮自身のTF産生に影響を与えなくとも動脈硬化部位での外因系凝固活性化のリスクを高める可能性が考えられる.

血管トーンの調節因子の発現に対する影響

最近, LPC刺激でcyclooxygenase-2 (COX-2), nitric oxide synthase type III (NOS-III)といった血管トーンの調節に関与する2つの酵素が, mRNA量, 蛋白質産生ともに増加すると相次いで報告された. 12時間のLPC刺激後, COX-2の発現増強に伴い, basal levelのプロスタサイクリン産生はコントロールに比し2倍量となり, さらにA23187存在下ではコントロールに比し5倍量となったとしている⁸⁾. またLPC処理によりNOS-IIIの産生が増加したHUVECは, トロンビン惹起性の血小板凝集に対する抑制作用の増強を認めたという⁹⁾. こうしたCOX-2やNOS-IIIの産生増強は, 血管自体にはむしろ保護的に作用しており, 動脈硬化には抑制的に作用すると考えられる. このこと

は動脈硬化に促進的と認識されていた LPC の作用として一見矛盾するようであるが、LPC による傷害に対する血管内皮細胞の一種の防御機構として解釈できるかもしれない。

その他の遺伝子の発現に対する影響

筆者らの行ったディファレンシャル・ディスプレイ法では、既述の HB-EGF, TM, PAI-1, tPA 以外に、8 種類の遺伝子の発現量が LPC 刺激で増加することがわかった⁴⁾。特徴的な点としては、CL100, B23/hVH-3, グラビン, ATF-4 など細胞増殖の制御に関与していると推定される蛋白質の mRNA 増加である。

CL100, B23/hVH-3 はいずれも dual specificity phosphatase であり、活性化した mitogen-activated protein kinase (MAPK) を脱リン酸化し不活化する¹⁰⁾。筆者らは HUVEC を用いた実験で、LPC 刺激の直後から一過性に MAPK の活性化がみられることを確認しており、LPC により誘導された CL100, B23/hVH-3 がその不活化に関与している可能性がある。また CL100 は虚血やヒートショック、酸化的ストレス、紫外線照射でも発現が誘導され¹¹⁾、活性化した stress-activated protein kinase も脱リン酸化し不活化することが示されている¹²⁾。CL100 はこのようなストレス環境下における細胞保護的な機能が示唆されており、LPC による CL100 の発現増加は、LPC の存在が血管内皮細胞に対して一種の外的ストレスとなっていることの反映と考えられる。

グラビンはもともと myasthenia gravis 患者の血清と反応性を示す～250 kDa の蛋白質として報告されたが、cDNA については 3'側の部分配列のみが既知であった¹³⁾。筆者らが行ったクローニングの結果から、グラビン cDNA は rat mitogenic regulatory gene と高い相同性を示し、グラビンはこの遺伝子のヒトホモログと考えられた。rat mitogenic regulatory gene を過剰発現させると、*src*, *ras*, あるいは *fos* でトラ

ンスフォームした NIH3T3 細胞の増殖が抑制されると報告されており¹⁴⁾、この遺伝子が、細胞増殖に対して抑制的な作用をもつ可能性が示唆されている。また最近の報告ではグラビンは、protein kinase C および protein kinase A の結合蛋白質であることが示されている¹⁵⁾。

ATF-4 は cAMP レスポンスエレメントに結合する転写因子の 1 つで、cAMP レスポンスエレメントの下流に位置する遺伝子の転写を抑制すると考えられている¹⁶⁾。

その他、魚類でカルシウム濃度をコントロールするホルモンとして知られていたスタニオカルシン、葉酸代謝関連酵素である NAD 依存性メチレン四水素葉酸デヒドロゲナーゼ (NMDMC)、ホモシステイン刺激により HUVEC で発現が増強するとして同定された reducing agents and tunicamycin-responsive protein (RTP)¹⁷⁾、そして機能不明の遺伝子である BENE についても LPC 刺激で発現量が増加した。RTP は正常組織で普遍的に発現している蛋白質で、細胞増殖時における発現量の増加がみられ、それ自身がリン酸化を受けることから、細胞増殖との関連も推定されている (宮田ら未発表データ)。また RTP のみならず ATF-4, NMDMC についてもホモシステイン刺激で発現が増強することが示されており、異なる二種類の動脈硬化惹起物質により共通して発現が増強する遺伝子として興味深い。

おわりに

以上、LPC が血管内皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響について概説した。LPC 刺激後の細胞内のシグナル伝達については、protein kinase C 活性化を介する経路を示唆する報告があるものの依然不明な点が多く、検討の余地が残されている。またこれまで動脈硬化との関連では注目されることのなかった遺伝子や、機能が解明されていない遺伝子のアップレギュレーションが、血管内皮細胞の機能にどう影響するのか、

現段階で十分な解析はできていないが、内皮細胞の増殖への影響については動脈硬化病変部位での傷害を受けた血管内皮細胞の修復過程との関連において重要であり、今後の検討課題であると思われる。

本稿で紹介した筆者らの研究は、国立循環器病センター研究所の小亀浩市先生、宮田敏行先生、下門顕太郎先生、加藤久雄先生のご協力のもとにおこなわれた。

文 献

- 1) Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA: Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* **90**: 1138-1144, 1992.
- 2) Zhu Y, Lin J, Liao HL, Verna L, Stemerman MB: Activation of ICAM-1 promoter by lysophosphatidylcholine: Possible involvement of protein tyrosine kinase. *Biochim Biophys Acta* **1395**: 86-92, 1997.
- 3) Kume N, Gimbrone MA: Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* **93**: 907-911, 1994.
- 4) Sato N, Kokame K, Shimokado K, Kato H, Miyata T: Changes of Gene expression by lysophosphatidylcholine in vascular endothelial cells: 12 up-regulated distinct genes including 5 cell growth related, 3 thrombosis-related, and 4 others. *J Biochem* **123**: 1119-1126, 1998.
- 5) Ishii H, Kizaki K, Horie S, Kazama M: Oxidized low density lipoprotein reduces thrombomodulin transcription in cultured human endothelial cells through degradation of the lipoprotein in lysosomes. *J Biol Chem* **271**: 8458-8465, 1996.
- 6) Kugiyama K, Sakamoto T, Misumi I, Sugiyama S, Ohgushi M, Ogawa H, Horiguchi M, Yasue H: Transferable lipids in oxidized low-density lipoprotein stimulate plasminogen activator inhibitor-1 and inhibit tissue-type plasminogen activator release from endothelial cells. *Circ Res* **73**: 335-343, 1993.
- 7) Sato N, Kokame K, Miyata T, Kato H: Lysophosphatidylcholine decreases the synthesis of tissue factor pathway inhibitor in human umbilical vein endothelial cells. *Thromb Haemost* **79**: 217-221, 1998.
- 8) Zembowicz A, Jones SL, Wu KK: Induction of cyclooxygenase-2 in human umbilical vein endothelial cells by lysophosphatidylcholine. *J Clin Invest* **96**: 1688-1692, 1995.
- 9) Zembowicz A, Tang J, Wu KK: Transcriptional induction of endothelial nitric oxide synthase type III by lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem* **270**: 17006-17010, 1995.
- 10) Sun H, Tonks NK, Bar-Sagi D: Inhibition of Ras-induced DNA synthesis by expression of the phosphatase MKP-1. *Science* **266**: 285-288, 1994.
- 11) Keyse SM, Emslie EA: Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature* **359**: 644-647, 1992.
- 12) Franklin CC, Srikanth S, Kraft AS: Conditional expression of mitogen-activated protein phosphatase-1, MKP-1, is cytoprotective against UV-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3014-3019, 1998.
- 13) Gordon T, Grove BD, Loftus JC, O'Toole T, Mcmillan R, Lindstrom J, Ginsberg MH: Molecular cloning and preliminary characterization of a novel cytoplasmic antigen recognized by myasthenia gravis sera. *J Clin Invest* **90**: 992-999, 1992.
- 14) Lin X, Nelson PJ, Frankfort B, Tomblar E, Johnson R, Gelman IH: Isolation and characterization of a novel mitogenic regulatory gene, 322, which is transcriptionally suppressed in cells transformed by src and ras. *Mol Cell Biol* **15**: 2754-2762, 1995.
- 15) Nauert JB, Klauck TM, Langeberg LK, Scott JD: Gravin, an autoantigen recognized by serum from myasthenia gravis patients, is a kinase

-
- scaffold protein. *Curr Biol* **7**(1) : 52-62, 1997.
- 16) Karpinski BA, Morle GD, Huggenvik J, Uhler MD, Leiden JM: Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element. *Proc Natl Acad Sci USA* **89** : 4820-4824, 1992.
- 17) Kokame K, Kato H, Miyata T: Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis: GRP78/BiP and novel genes. *J Biol Chem* **271** : 29659-29665, 1996.
-