

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590240

研究課題名（和文） リゾホスファチジン酸により生じるシェアストレス依存的血管攣縮に関する研究

研究課題名（英文） Shear stress-dependent vasospasm induced by lysophosphatidic acid

研究代表者

大幡久之（Ohata Hisayuki）

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：00119166

研究成果の概要（和文）：申請者はリゾホスファチジン酸（LPA）が血管内皮細胞におけるシェアストレス応答の感受性を著明に増大する内因性物質であることを報告してきた。そこで本研究では、生理的な環境下で LPA がシェアストレス存在下、血管収縮弛緩反応にどのような影響を与えるかについて明らかにするために、管腔構造を保った摘出細血管のシェアストレス存在下での収縮弛緩応答に対する LPA の作用を検討した。ラット摘出腸間膜動脈の両端をガラスキャピラリーに接続し、栄養液をシンリンジポンプにて定流量還流することにより生体での血流による流れ刺激を再現した。このときの血管にかかる圧力をモニターし、約 80 mmHg とした。この微小灌流系を画像解析装置を装備した蛍光顕微鏡のステージ上にセットし、収縮弛緩の様子をデジタル画像として記録した。シェアストレス存在下、0.3 μ M LPA の適用では血管は応答しなかったが、10 μ M phenylephrine (PE) による収縮反応を有意に増大させた。さらに、PE 誘発収縮後の 10 μ M acetylcholine (ACh) による弛緩反応をほぼ完全に抑制した。この LPA の作用は 0.03-0.3 μ M の LPA 濃度領域およびシェアストレス強度 (10-70 dyne/cm²) に依存して増大した。血管内皮細胞を除去した標本では、この LPA の作用は認められなかった。また、LPA 受容体拮抗薬の Ki16425 によりほぼ完全に抑制された。LPA の作用にアラキドン酸代謝物による収縮応答がかかわる可能性について、インドメタシンの前処置により検討を行ったところ、20 μ M インドメタシン前処置によりほぼ完全に LPA の作用が抑制された。さらに、LPA の作用がトロンボキサン A₂ 受容体拮抗薬 SQ29548 (1 μ M) 前処置により抑制されたこと、トロンボキサン A₂ アナログの U46619 が用量依存的 (0.01-1.0 μ M) に ACh の弛緩反応を抑制したことから、シェアストレス依存的な LPA による ACh 誘発弛緩反応に対する抑制作用にトロンボキサン A₂ を介する情報伝達系が関与することが明らかとなった。これらの作用は LPA の正常血漿濃度域に相当する 30-300 nM で生じることから、高いシェアストレスが負荷される血管部位では容易に起こりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We have previously shown that lysophosphatidic acid (LPA), a bioactive plasma lysophospholipid, markedly accelerates shear stress-induced Ca²⁺ responses in cultured vascular endothelial cells (ECs). This study aimed to demonstrate the impact of LPA and luminal shear stress on vasomotor regulation in the isolated rat mesenteric artery (MA) using a videomicroscopic technique.

Although the addition of LPA to the perfusate in a concentration range of 0.03–0.3 μM had no significant effect on the basal MA tone, LPA in a similar concentration range led to increased phenylephrine-induced MA contraction and reduced acetylcholine-induced MA relaxation under physiological shear conditions. These vasomodulatory actions of LPA, which vanished upon removal of ECs, were positively dependent on luminal shear stress levels and were markedly inhibited by the LPA receptor antagonist Ki16425, the cyclooxygenase inhibitor indomethacin, and the thromboxane A_2 receptor antagonist SQ29548. These data thus suggest that LPA can modify the agonist-induced vasomotor responses in MAs in a shear stress-dependent manner. This effect of LPA was mediated through ECs, the LPA receptor, and cyclooxygenase/ thromboxane A_2 signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：血管、内皮細胞、平滑筋細胞、リゾリン脂質、収縮弛緩反応

1. 研究開始当初の背景

細胞は、神経伝達物質、ホルモン、細胞増殖因子、イオンや薬物などの液性・化学因子に加えて、機械的、物理的因子を刺激として受容し、様々な細胞応答を起こすことが明らかとなっている。例えば、循環器系は、神経性支配とホルモン性の制御により、全身性に、さらには臓器レベルで制御されているが、これらだけでは身体の隅々まで血流をきめ細かく制御することは難しい。この局所における血液循環の恒常性維持において、血液の流れに伴うずれ応力や伸展刺激などを内皮細胞が感知して一酸化窒素などの血管トーン制御因子を産生・放出する機構が重要な役割を果たしている。また、このような短期的な循環制御に加えて、内皮細胞の流れ刺激受容機構は血流変化に適応した血管径の変化（リモデリング）のような長期的な変化や内膜肥厚や粥状動脈硬化症などの病態発現にも関与することが知られている。このように内皮細胞の機械受容機構は、循環制御において生理学的・病態生理学的に極めて重要な役割を果たしている。しかしながら、その初期過程である流れ刺激受容機構については、いくつかの仮説が提唱されているものの、統一した見解は得られておらず、機械受容分子の

実体も未だ明らかではないのが現状である。我々は、細胞間情報伝達物質として注目されるリゾホスファチジン酸（LPA）が消化管平滑筋細胞、肺上皮細胞及び水晶体上皮細胞の機械刺激によるカルシウム応答を顕著に促進することを報告してきた。さらに、最近、培養内皮細胞においてもLPA存在下で流れ刺激強度に依存し、時空的にも特徴的な性質を有するカルシウム応答（ Ca^{2+} spot）を生じることを見いだした。LPAは正常血漿中に存在し、血小板の活性化によって遊離されることや多発性骨髄腫などの疾患時に血漿中に増加することから、LPAが機械受容応答の感受性を増強する内因性物質（メカノセンシタイザー）であるという仮説を提唱している。

2. 研究の目的

生理的な環境下でLPAがシエアストレス存在下、血管収縮弛緩反応にどのような影響を与えるかについて明らかにするために、管腔構造を保ったラット摘出腸間膜動脈のシエアストレス存在下での収縮弛緩応答に対するLPAの作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Wistar 系雄性ラットより摘出した腸間膜動脈の両端をガラスキャピラリーに接続し、栄養液をシンリンジポンプにて定流量還流することにより生体での血流による流れ刺激を再現する。このときの血管にかかる圧力をモニターし、約 80 mmHg とする。この微小灌流系を画像解析装置を装備した蛍光顕微鏡あるいは共焦点レーザー走査顕微鏡のステージ上にセットし、収縮弛緩の様子をデジタル画像として記録する。収縮弛緩応答は取得した画像から得られた平均直径の変化として示す。

1) 一定の圧力 (80 mmHg) と一定のシエアストレス下 (50 μ L/min) で高K溶液あるいはフェニレフリン (PE)、アセチルコリン (ACh) など数種の血管作動性アゴニストを適用し、生じる血管の収縮弛緩反応の評価法を確立する。

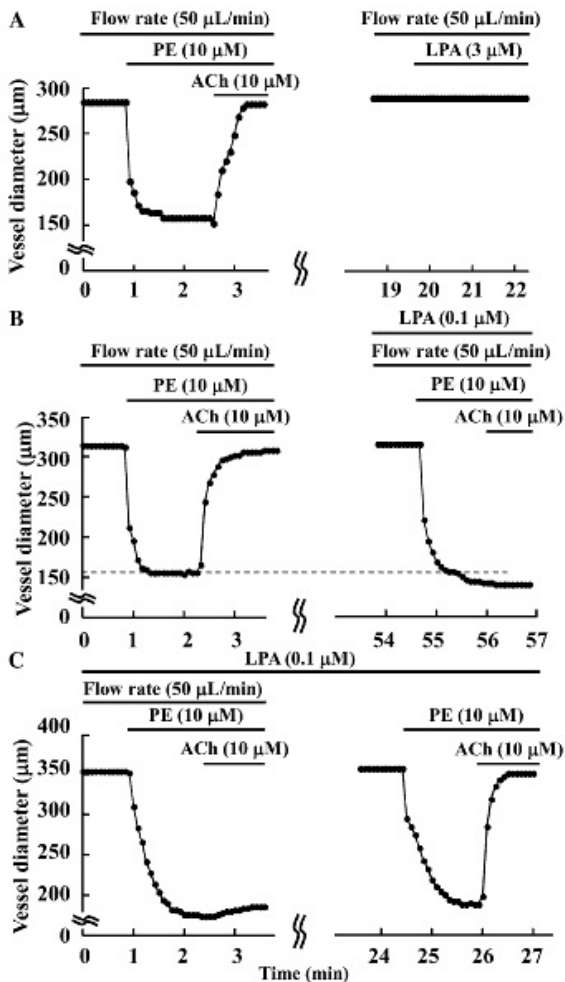


FIGURE 1. Effects of LPA on PE-induced contraction and ACh-induced relaxation of the MA. A, Effects of PE (10 μ M) followed by ACh (10 μ M) on MA diameter and the effect of LPA (3 μ M) alone under flow conditions of 50 μ L/min. B, LPA (0.1 μ M) enhanced the PE-induced contraction and abolished the ACh-induced relaxation. C, LPA had no effect on the PE-induced contraction and the ACh-induced relaxation under conditions of no shear stress.

- 2) 一定濃度のLPA存在下での収縮弛緩反応に対する圧力 (30-200 mmHg) およびシエアストレス (3-50 dyne/cm²) 依存性を検討する。
- 3) アゴニスト適用 (PE、ACh) による収縮弛緩反応に対するLPAの影響を検討する。
- 4) 上記LPAの作用機序を検討する。

4. 研究成果

1) PE 誘発収縮反応及び ACh 誘発弛緩反応に対する LPA の作用 (Figs. 1, 2)

シエアストレス下 (50 μ L/min) LPA (3 μ M) 単独適用は、ラット腸間膜動脈の張力に影響を及ぼさなかった。しかし、LPA (0.1 μ M) を含む栄養液を用いた PE (10 μ M) 誘発収縮反応をわずかに増強し、ACh (10 μ M) 誘発弛緩反応を完全に抑制した。この LPA の作用は、シエアストレス非存在下では認められなかった。また、0.03 μ M LPA でも認められ、0.1 μ M LPA で最大反応を示した。

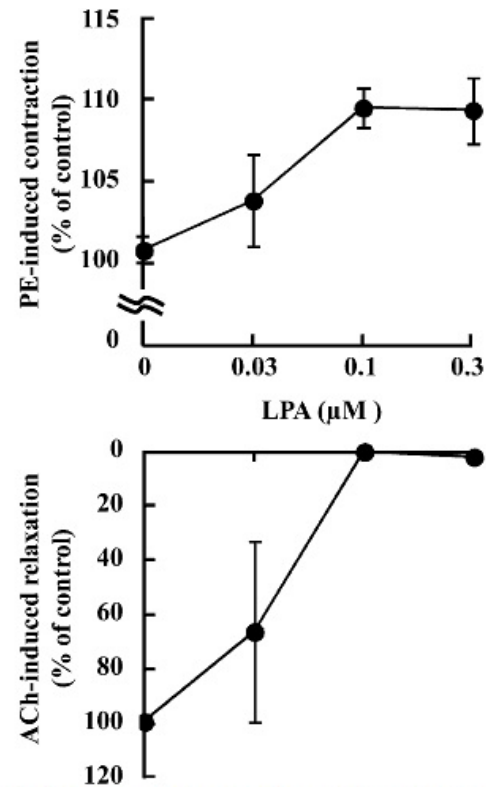


FIGURE 2. Concentration dependence of LPA (0.03, 0.1, 0.3 μ M) on the enhancement of PE-induced contraction and the inhibition of ACh-induced relaxation under flow conditions of 50 μ L/min. Data represent the mean \pm SEM of 3 experiments.

2) シエアストレス依存性 (Fig. 3)

灌流する栄養液の粘度を通常の溶液の 3.6 倍としたときの作用を皮角検討することにより、LPA の PE 誘発収縮反応の増強作用及び ACh 誘発弛緩反応の抑制作用は、流速 (2.78-50 mL/min) でなく、シエアストレス (7.4-72.4 dyn/cm²) に依存することが明らかとなった。

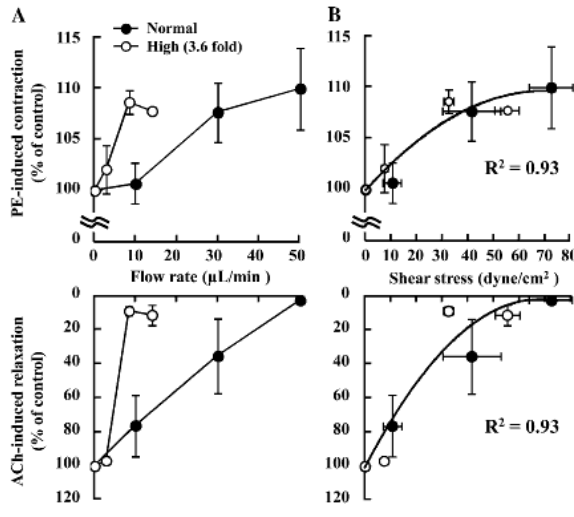


FIGURE 3. Shear stress dependence of the effects of LPA. A, The effects of LPA (0.1 μM) at normal and high (3.6-fold) viscosities were dependent on flow rate (2.78–50 μL/min). B, The effects of LPA were dependent on shear stress (7.4–72.4 dyn/cm²). Data represent the mean ± SEM of 3 experiments.

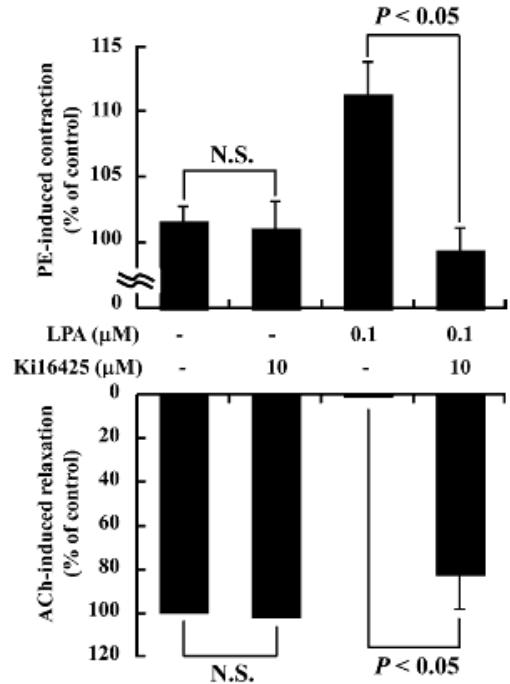


FIGURE 5. Ki16425 (10 μM) abolished the effects of LPA (0.1 μM) on the PE-induced contraction and the ACh-induced relaxation. Data represent the mean ± SEM of 3 experiments.

3) 内非依存性 (Fig. 4)

内皮細胞を除去した血管標本ではLPAの作用は認められなかった。したがって、本作用は内皮細胞を介する作用であることが明らかとなった。

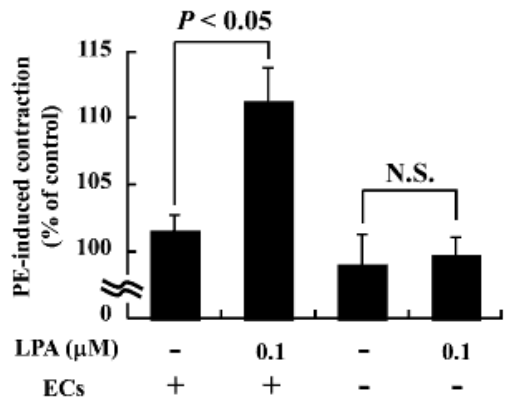


FIGURE 4. Vascular EC removal abolished the effects of LPA on the PE-induced contraction and the ACh-induced relaxation. Data represent the mean ± SEM of 3 experiments.

4) LPA 受容体拮抗薬 Ki16425 の影響 (Fig. 5)

LPA の作用は、LPA 受容体拮抗薬 Ki16425 (10 μM) の前処置によりほぼ完全に抑制された。したがって本作用は、LPA 受容体 LPA1 あるいは LPA3 を介するものであることが示唆された。

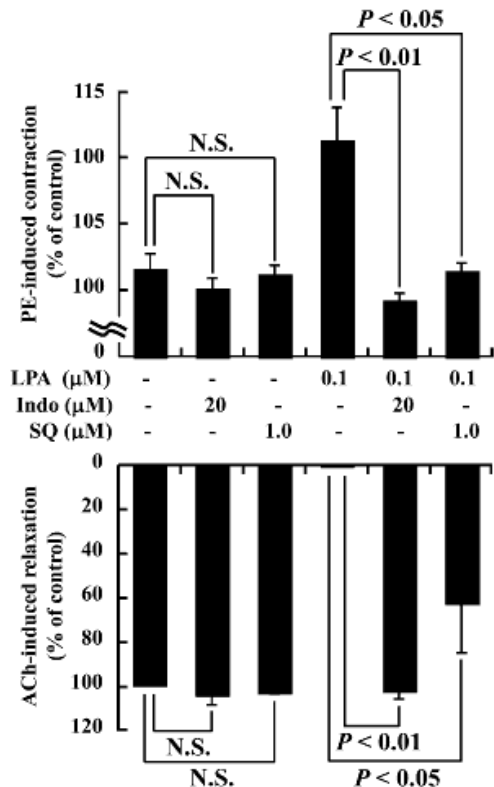


FIGURE 6. Indomethacin (20 μM) and SQ29548 (1 μM) inhibited the effects of LPA on the PE-induced contraction and the ACh-induced relaxation. Data represent the mean ± SEM of 3 experiments.

5) インドメタシン及びSQ29548の影響 (Fig. 6)

LPAの作用は20 μ M インドメタシンによりほぼ完全に、1 μ M SQ29548によるPE収縮増強作用はほぼ完全に、AChによる弛緩反応に対する抑制作用は62.2%となった。したがって本作用には、トロンボキサンA2が関与することが示唆された。

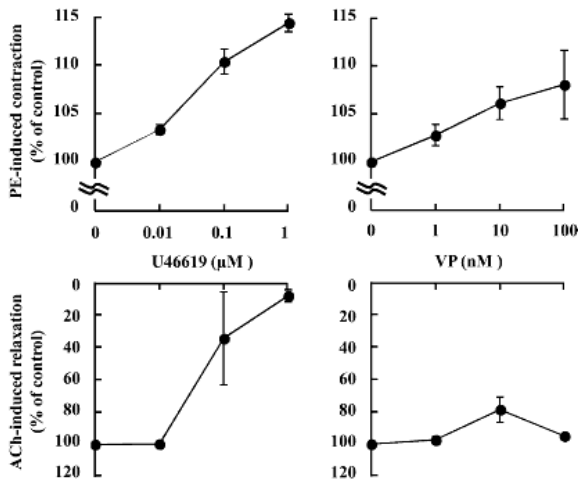


FIGURE 7. Concentration dependence of U46619 (0.01, 0.1, 1 μ M) and VP (1, 10, 100 nM) on the enhancement of the PE-induced contraction. U46619 dose dependently inhibited the ACh-induced relaxation but VP had no effect. Data represent the mean \pm SEM of 3 experiments.

6) PE誘発収縮及びACh誘発弛緩反応に対するU46619およびバソプレシンの影響

LPAの作用にトロンボキサンA2が関与すること可能性について、そのアナログであるU46619と異なる対照薬としてバソプレシンを前処置して検討した。その結果、U46619の濃度(0.01-1.0 μ M)に依存してLPAと同様の作用が認められたが、バソプレシンはPE誘発収縮には促進的に作用したが、AChによる弛緩反応には影響しなかった。

以上の結果より、LPAは正常血漿濃度域(30-300 nM)において血管の狭窄などにより高いシエアストレスが負荷される血管部位では収縮反応性の亢進とAChの弛緩反応が抑制され、異常な収縮を引き起こす可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① H. Ohata, H. Yamada, K. Momose
Lysophosphatidic acid induces shear stress-dependent Ca^{2+} influx in mouse aortic endothelial cells in situ (2011) Experimental Physiol 査読有 96: 468-475
- ② K. Shibata, T. Miyazaki, H. Ohata and K. Honda
Shear Stress-dependent Effects of Lysophosphatidic Acid on Agonist-induced Vasomotor Responses in Rat Mesenteric Artery (2011) J Cardiovascul Pharmacol 査読有 57: 604-610

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大幡久之 (OHATA HISAYUKI)
昭和大学・薬学部・准教授
研究者番号: 00119166

(2) 研究分担者