

講座

虚血心筋とリゾリン脂質

橋爪裕子*, A. N. Ehsanul Hoque*, 安孫子保*

1. リゾリン脂質の構造と特徴

リゾリン脂質は、膜を構成するリン脂質から、ホスホリパーゼ A₁ (PLA₁)、あるいはホスホリパーゼ A₂ (PLA₂)によって、脂肪酸が一つはずれてできる(図1)。ホスファチジルコリン(PC)は膜を構成するリン脂質の中で、最も多く存在するものの一つである¹⁾。従って多く存在するリゾリン脂質として、リゾホスファチジルコリン(LPC)が考えられる。生理的状态であれば、生成されたLPCは再び脂肪酸が結合されてPCにもどる(再アシル化)か、またはLysophospholipaseによってさらに脂肪酸がはずれて(脱アシル化)、グリセロホスホリコリンに変わる(図2)。従って、生理的状态ではLPCの代謝は速い。しかし心筋組織が虚血に陥ると、LPCの再アシル化に必要なATPが減少してしまうためにacyl CoAの生成が低下する²⁾。また同時に、LPC acyltransferaseが抑制されてしまう²⁾。さらに虚血の時にはLysophospholipaseも抑制されるので²⁾、LPCの蓄積はさらに増強される。事実、LPCは虚血心筋組織中に蓄積する^{3),4),5)}。報告によると^{4),5)}、虚血心筋におけるリゾリン脂質の濃度は200 μM ~ 1 mMに達するといわれている。またSedlis等⁶⁾はヒト心臓ベisingで誘発された虚血心臓において、冠状静脈洞から採取された血液中のLPC含量は、正常状態の70 μMから虚血4分後には102 μMになり、ピーク時には180 μMへと上昇したと報告している。もしも虚血障害が不可逆性の障害であれば、再灌流されると障害はさらに増悪され(再灌流障害)、細胞内カルシウムイオン濃度([Ca²⁺]_i)が上昇する^{7),8)}。[Ca²⁺]_i

が上昇するとPLA₁ならびにPLA₂が活性化され²⁾、このためLPCの生成が亢進する。従って、再灌流によって虚血時以上に心筋組織中に蓄積すると考えられる。PCからはLPCとともに遊離脂肪酸(FFA)が生成される。虚血心筋ではFFA含量は増加しており、特に不飽和脂肪酸の増加が著しい^{9),10),11)}。再灌流すると、不可逆性虚血障害に陥

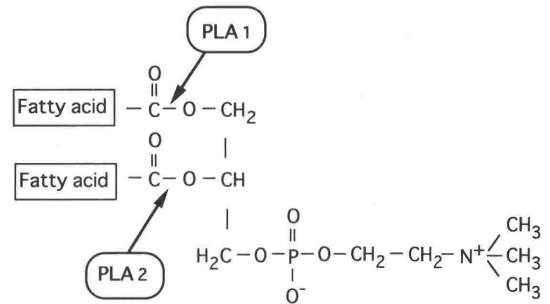


図1 LPCの生成
ホスファチジルコリン(PC)にホスホリパーゼA₁(PLA₁)あるいはホスホリパーゼA₂(PLA₂)が作用して脂肪酸が一つはずれたものがリゾホスファチジルコリン(LPC)である。

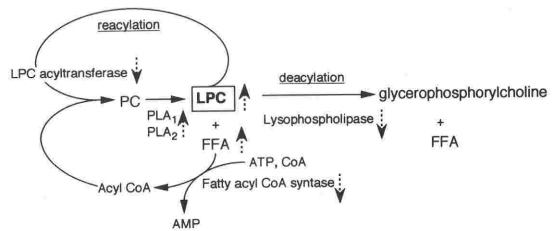


図2 LPCの代謝。
虚血になると、点線で示す矢印のように変化する。

*旭川医科大学薬理学講座

っている場合には、さらに FFA の増加が起り、やはり不飽和脂肪酸の増加が多い^{9),10),11)}. この事実から虚血障害ならびに再灌流障害時には、PLA₂の関与の方が PLA₁より大きいことがうかがえる. 何故ならば、リン脂質の第1位の脂肪酸は飽和脂肪酸の場合が多く、第2位の脂肪酸は不飽和脂肪酸の場合が多いからである. いずれにしても虚血障害や再灌流障害時には、FFA の増加とともに LPC のようなリゾリン脂質の蓄積が起っているのは間違いのない事実である.

LPC はその構造上の特徴として、水にも油にも溶ける両親媒性であり、細胞膜に容易に取り込まれる. 図3に Weltzien¹²⁾が示した模式図の一部を改変して示した. LPC はある一定の濃度 (Critical micelle concentration : CMC) 以上になるとミセルを形成する. LPC の CMC は用いたバッファーなどによって変化するが、4 μM ~ 50 μM の間にある^{13),14)}. LPC の細胞膜におよぼす

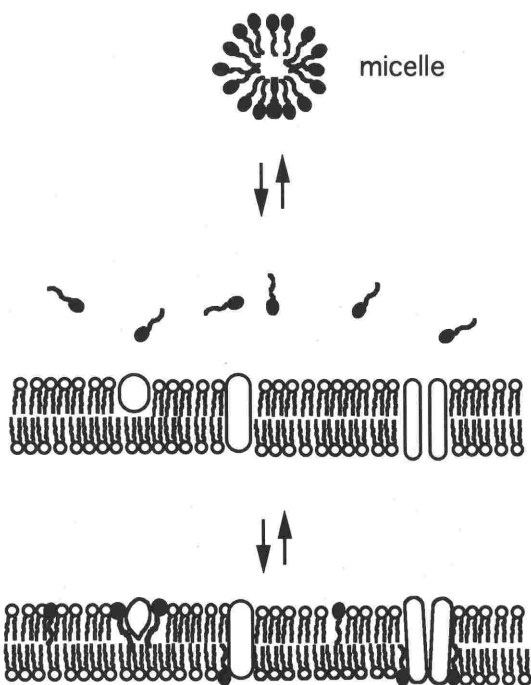


図3 LPCの細胞膜との相互関係.

LPCは細胞膜に取り込まれて、細胞膜の脂質やタンパク質を変化させる。(Weltzienの図の一部を改変)

作用にミセルの状態が不可欠なものかどうかについては、まだはっきりとはわかっていない. 赤血球を用いた実験では、CMC以下の濃度のLPCが赤血球の変形をもたらすので¹⁴⁾, LPCはミセルを形成しなくても細胞膜に作用している可能性がある. LPCが細胞膜に取り込まれると、細胞膜の流動性は増加するので¹⁵⁾, LPCは細胞膜の物理的性質を変化させる. またLPCはタンパク質と結合しやすい特徴があるので、LPCは膜タンパク質に結合してその機能を変化させると考えられている. 例えば、LPCはNa⁺-K⁺ATPaseを抑制する¹⁶⁾. またLPCはNa⁺チャンネルに作用して、その不活性化過程を抑制することによりNa⁺ influxを増大させたり、異常開口 (long-lasting burst)をおこすことが、電気生理学的に証明されている^{17),18)}.

以前からLPCは、虚血や再灌流障害時の不整脈発生の原因の一つと考えられてきた^{19),20)}. LPCの細胞膜におよぼす電気生理学的作用については、他の総説を参照してほしい²¹⁾. LPCが細胞膜に取り込まれ、膜そのものや膜結合タンパク質に影響をおよぼすとすれば、虚血・再灌流時の不整脈の原因になるばかりではなく、虚血障害を増悪する因子の一つとなっている可能性が高い. この総説では、われわれの教室で得られた実験結果を中心に、LPCの作用を虚血・再灌流障害時の変化と比較しながらまとめてみたい.

2. ラット灌流心臓でのLPCの作用

LPCを心臓に投与すると、どのような変化が生じるのであろうか? ラット心臓を Working Heart法を用いて、LPC 10 μMを含むバッファー (Krebs-Henseleit bicarbonate buffer : KHB)で灌流した場合の心機能ならびに代謝変化²²⁾を、虚血・再灌流障害²³⁾と比較した結果を図4, 5, 6にまとめた. 10 μM LPCで心臓を灌流すると、灌流開始5分で心機能は最低となり、その後LPCを除いても心機能は回復しない (図4, 下段). LPCによる変化は、心臓を虚血にした後再灌流した場合の変化 (図4, 上段)とよく似ている. また虚血になると心筋組織のATPやクレアチンリン酸 (CrP)の含量は低下し、乳酸含量は増加する (図5 a). 一方、LPCを含むKHBで心臓を灌流した場合も、灌流時間が長くなると、ATP

ならびに CrP 含量が低下して、乳酸含量が増加してくる (図 5 b). 虚血・再灌流時の場合は、再灌流によって ATP, CrP と乳酸はもとのレベルに戻る傾向を示すが, LPC 灌流の場合は LPC を除いても, ATP と CrP の低下と乳酸の増加が引き続いて起こる. このことから LPC は細胞外から与えた場合には, 細胞膜に取り込まれて

washout されず, その作用が持続していることが考えられる. 虚血によって, パルミトオレイン酸やアラキドン酸のような不飽和脂肪酸が, ステアリン酸のような飽和脂肪酸とともに心筋内に蓄積し, これらの FFA は再灌流するとさらに増加する (図 6 a). 特に不飽和脂肪酸の増加率が著しい事が, 図 6 a からわかるであろう. この虚血・再灌流時の FFA 含量の増加は, 図 2 に示したように, 細胞膜の構成リン脂質から脂肪酸がはずれて, 蓄積した結果であると考えられる. 従って LPC を含むリゾリン脂質も虚血・再灌流によって生成され, 蓄積していることを示唆する. 一方 LPC の灌流によって, 灌流時間が長くなると, FFA 含量は虚血・再灌流時と同様に増加し, LPC を除いてもさらに増加する (図 6 b). また LPC の灌流による FFA 含量増加の場合も, 不飽和の脂肪酸の増加率が著しい.

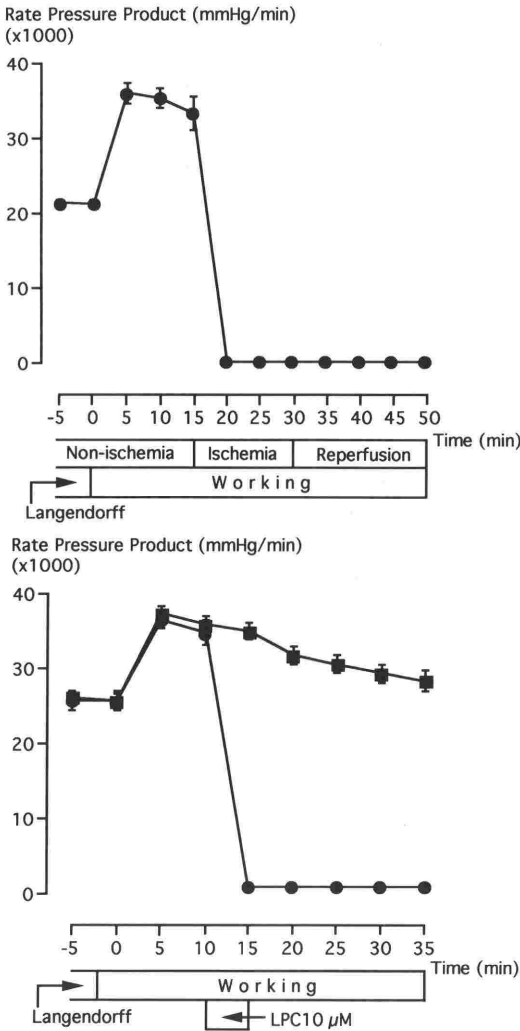


図 4 ラット灌流心臓における LPC の心機能におよぼす作用. 虚血・再灌流による変化との比較. 下段の■は LPC を投与しない場合 (Control 群), また●は LPC を含む KHB で灌流した場合の心機能の変化を示す.

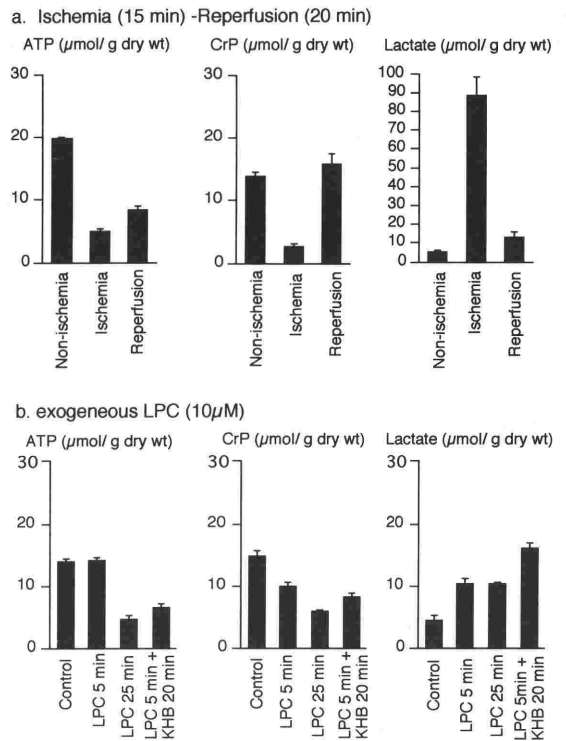


図 5 ラット灌流心臓における LPC の ATP, CrP ならびに乳酸含量におよぼす作用. 虚血・再灌流による変化との比較.

b 図における Control は, 図 4 下図の Control 群 (■) 35分での結果である.

このように LPC を灌流心臓に投与した場合の変化は、虚血・再灌流障害時の変化と非常に似たものであることがわかった。しかし LPC により何故 ATP や CrP が減少し乳酸の増加がおこるのかについては、まだよくわかっていない。考えられることは、LPC が細胞膜に取り込まれてさらに細胞内に入り、直接ミトコンドリアに作用してその呼吸機能を抑制している可能性があることである。あるいは後に述べるように、LPC は $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる作用があるので^{7),8)}、このため細胞障害が起り、間接的にミトコンドリア呼吸機能が抑制されるのかも知れない。Ver Donck⁸⁾によると、LPC によって $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起こっているとき、ミトコンドリア内にも Ca^{2+} の蓄積が起こっており、ミトコンドリアの内膜の形態変化が電子顕微鏡で観察されている。いずれにしても LPC の直接作用あるいは間接作用によって、ミトコンドリアの呼吸機能は抑制されると考えられる。

LPC による FFA の蓄積については、LPC によって $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し、そのために PLA₁ ならびに PLA₂ が活性化されて、新たに膜リン脂質から脂肪酸がはずれてリゾリン脂質ができ、これが蓄積してくるのかも知れない。そうなると LPC 投与によってリゾリン脂質と FFA が同時に新たに生成されることになり、リゾリン脂質がリゾリン脂質の生成を促進するという悪循環に陥っていることになる。

3. ラット心筋細胞におよぼす LPC の作用

心筋細胞に LPC を投与すると、図 7 に示すように細胞の形態が桿状から球状に変化する。その時、 $[Ca^{2+}]_i$ は LPC によって著しく上昇する (図

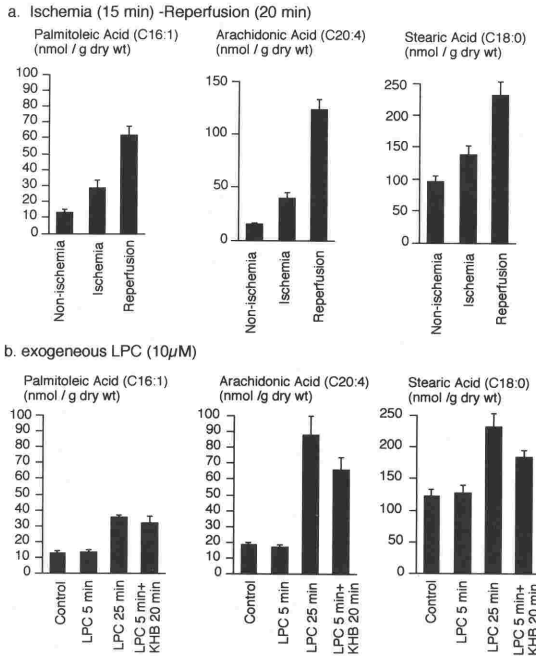


図 6 ラット灌流心臓における LPC の遊離脂肪酸含量におよぼす作用。虚血・再灌流による変化との比較。b 図における Control は、図 4 下図の Control 群 (■) 35分での結果である。

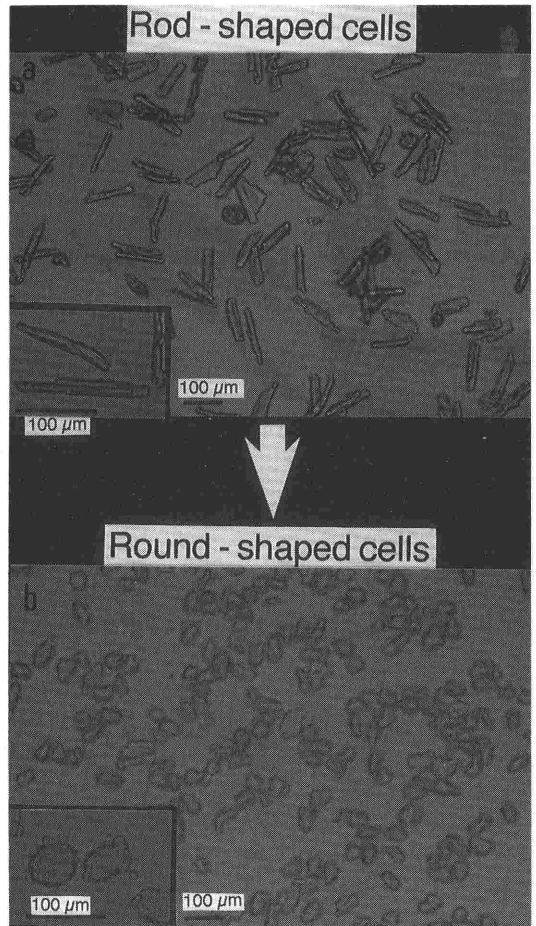


図 7 ラット心筋細胞における桿状から球状への形態変化。

8). 心筋細胞における形態変化と $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、心筋細胞を低酸素の状態にさらした場合とよく似ている²⁴⁾. LPC による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はどのようなメカニズムで起こっているのであろうか. 細胞外液中に EGTA を加えて外液中の Ca^{2+} をフリーにすると, LPC による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は完全に抑制され, 細胞外液に $CaCl_2$ を加えてはじめて, $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がおこった (図9). 従って LPC による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には, 細胞外からの Ca^{2+} の流入が必要であることがわかった. この LPC による細胞外からの Ca^{2+} の流入に, 膜電位依存性の Ca^{2+} チャネルは関与しているかどうか検討した結果が, 図10である. 80mM KCl は膜電位を脱分極させ膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルを開口させるので, $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる. Ca^{2+} チャネル遮断薬であるベラパミル (200 μ M) は, 80mM KCl による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇をほぼ完全に抑制するので, この時膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルは, ベラパミルによりほぼ完全に遮断されているといえる. ここに LPC を投与すると, ベラパミルが存在しない時と同程度に, $[Ca^{2+}]_i$ は上昇した. このこと

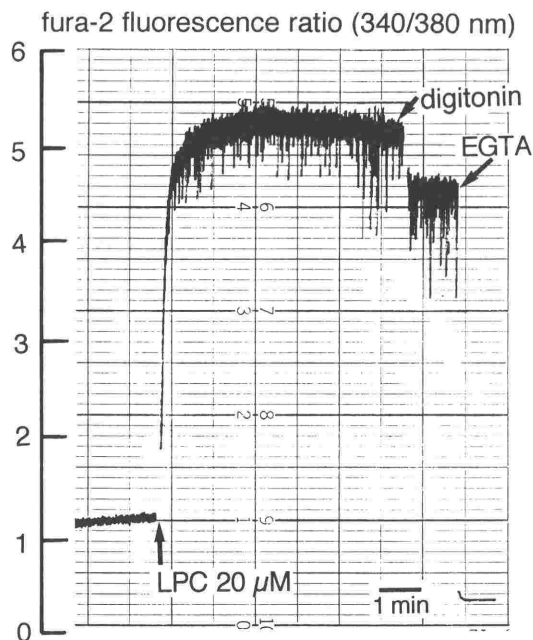


図8 ラット心筋細胞における LPC による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇. LPC (20 μ M) は fura-2 によって測定された $[Ca^{2+}]_i$ を、ほぼマキシマムのレベルにまで上昇させた.

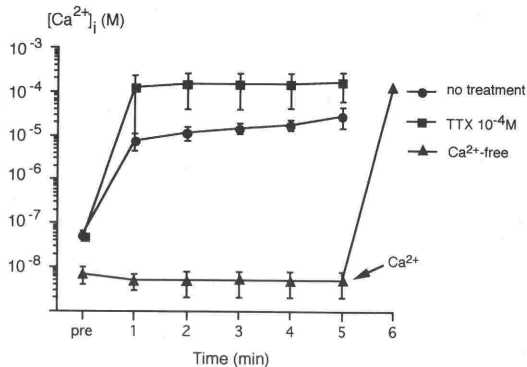


図9 Ca^{2+} フリーとテトロドトキシン (TTX) 存在下での LPC の $[Ca^{2+}]_i$ におよぼす作用. Ca^{2+} フリーでは LPC による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は抑制されたが, TTX はこれを抑制しなかった.

は LPC が膜電位依存性 Ca^{2+} チャネル以外のルートを介して, 細胞外から細胞内へ Ca^{2+} を流入させ, $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させることを意味している.

それでは LPC による Ca^{2+} の細胞外から内への流入は, どのようにして起こるのであるだろうか. LPC は Na^+ チャネルに作用して, その不活性化過程を抑制して Na^+ チャネルの異常開口をおこす^{18), 19)}ので, LPC によって修飾された Na^+ チャネルを介して $[Na^+]_i$ が上昇し, 次に Na^+ - Ca^{2+} 交換によって $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する可能性が考えられる. しかし図9からわかるように選択的 Na^+ チャネル遮断薬テトロドトキシン (TTX) は, LPC による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制しなかった. TTX は, ベラトリジン (Na^+ チャネルに選択的に作用してその不活性化過程を抑制し, Na^+ チャネルの持続的な開口をおこす物質) による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は抑制する²⁵⁾. 従って, LPC による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は, Na^+ チャネルを介した $[Ca^{2+}]_i$ の上昇ではないらしい. しかし LPC は Na^+ - K^+ ATPase を抑制するので¹⁶⁾, そのために $[Na^+]_i$ が上昇し, 次に Na^+ - Ca^{2+} 交換によって $[Ca^{2+}]_i$ が上昇している可能性は考えられる. LPC による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇のメカニズムに関しては, 今後の詳しい検討が必要である.

4. おわりに

これまで述べてきたように, LPC はこれまで考えられていたように単に不整脈を誘発するだけではなく, 虚血・再灌流障害の増悪因子として重

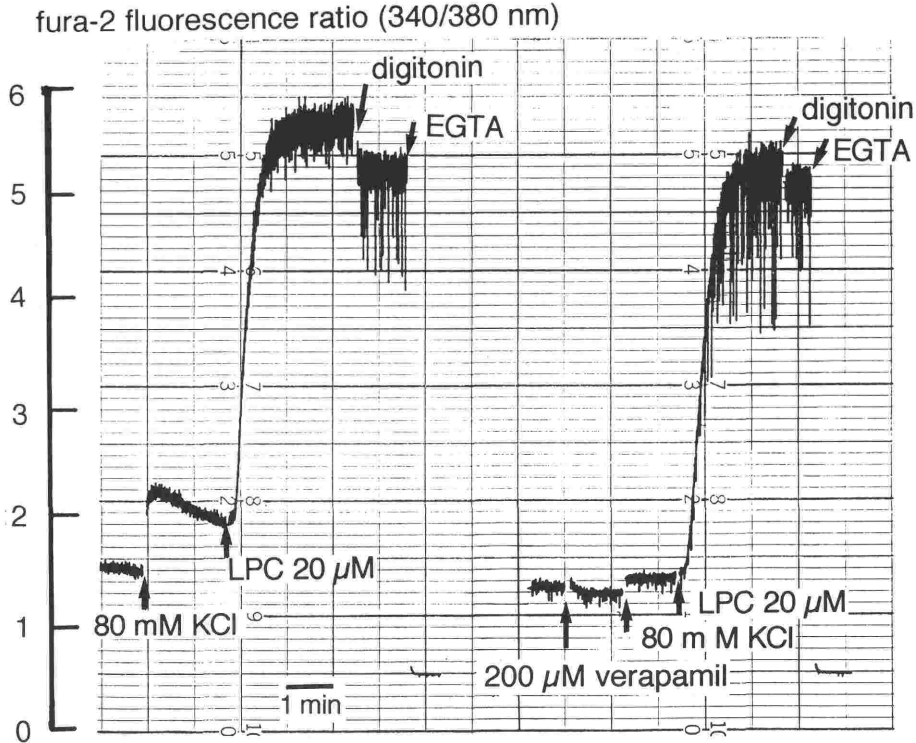


図10 ベラパミル存在下でのLPCの $[Ca^{2+}]_i$ におよぼす作用。
 Ca^{2+} チャネル遮断薬ベラパミル(200 μM)はKCl(80mM)による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はほぼ完全に抑制したが、LPCによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は抑制できなかった。

要な役割を演じていると思われる。また最近、LPCの血管系におよぼす作用が注目されている。すなわちLPCは内皮依存性血管弛緩反応をおこす²⁶⁾が、一方ブラジキニンのような他の血管弛緩作用を有する物質の反応を、受容体とGタンパク質との相互作用を抑制することによって阻害する²⁷⁾。LPCは虚血・再灌流障害において蓄積するので、おそらく血管系に対してもまた重要な役割を演じていると思われる。LPCの作用を検討することにより、LPCの作用を抑制できるような薬物、つまり抗LPC薬の開発につながるであろう。抗LPC薬は今までの薬物とは異なった新しい作用機序に基づく虚血心筋の治療薬として、また臓器移植の際に用いられる薬物として、大いに期待できる。

文 献

- 1) Post JA, Langer GA, Op den Kamp JAF, et al : Phospholipid asymmetry in cardiac sarcolemma. Analysis of intact cells and 'gas-dissected' membranes. *Biochim Biophys Acta* 943 : 256-266, 1988
- 2) Das DK, Engelman RM, Rousou JA, et al : Role of membrane phospholipids in myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 251 (Heart Circ. Physiol.) : H71-H79, 1986
- 3) Corr PB, Snyder DW, Lee BI, et al : Pathophysiological concentrations of lysophosphatides and the slow response. *Am J Physiol* 243 (Heart Circ Physiol.12) : H187-H195, 1982
- 4) Steenbergen C, Jennings RB : Relationship between lysophospholipid accumulation and plasma membrane injury during total *in vitro* ischemia in dog heart. *J Mol Cell Cardiol* 16 : 605-621, 1984
- 5) Wientzek M, Arthur G, Man RYK, et al : A sensitive method for the quantitation of lysophosphatidylcholine in canine heart. *J. Lipid Res* 26 : 1166-1169, 1985
- 6) Sedlis SP, Sequeira JM, Altszuler HM : Coronary sinus lysophosphatidylcholine accumulation during rapid atrial pacing. *Am J Cardiol* 66 : 695-698, 1990
- 7) Sedlis SP, Corr PB, Sobel BE, et al : Lysophosphatidyl-

- choline potentiates Ca^{2+} accumulation in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 244 (Heart Circ. Physiol. 13) : H32-H38, 1983
- 8) Ver Donck L, Verellen G, Geerts H, et al : Lysophosphatidylcholine-induced Ca^{2+} -overload in isolated cardiomyocytes and effect of cytoprotective drugs. *J Mol Cell Cardiol* 24 : 977-988, 1992
 - 9) Miura I, Hashizume H, Akutsu H, et al : Accumulation of nonesterified fatty acids in the dog myocardium during coronary artery occlusion determined by a method using 9-anthrhydridiazomethane. *Heart Vessels* 3 : 190-194, 1987
 - 10) Hara Y, Nakamura K, Nasa Y, et al : Changes in myocardial nonesterified fatty acids during ischemia and reperfusion in isolated, perfused, working rat hearts. *Heart Vessels* 6 : 21-31, 1990
 - 11) Nasa Y : Myocardial free fatty acids during ischemia and reperfusion. *循環制御* 13 : 413-426, 1992
 - 12) Weltzien HU : Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 559 : 259-287, 1979
 - 13) Stafford RE, Fanni T, Dennis E : Interfacial properties and critical micelle concentration of lysophospholipids. *Biochemistry* 28 : 5113-5120, 1989
 - 14) Bergmann SR, Ferguson Jr TB, Sobel BE : Effects of amphiphiles on erythrocytes, coronary arteries, and perfused hearts. *Am J Physiol* 240 (Heart Circ. Physiol. 9) : H229-H237, 1981
 - 15) Fink KL, Gross RW : Modulation of canine myocardial sarcolemmal membrane fluidity by amphiphilic compound. *Circ Res* 55 : 585-594, 1984
 - 16) Pitts BJR, Okhuysen CH : Effects of palmitoyl carnitine and LPC on cardiac sarcolemmal Na^+K^+ -ATPase. *Am J Physiol* 247 (Heart Circ. Physiol. 16) : H840-H846, 1984
 - 17) Burnashev NA, Undrovinas AI, Fleidervish IA, et al : Modulation of cardiac sodium channel gating by lysophosphatidylcholine. *J Mol Cell Cardiol* 23 (Supplement I) : 23-30, 1991
 - 18) Undrovinas AI, Fleidervish IA, Makielski JC : Inward sodium current at resting potentials in single cardiac myocytes induced by the ischemic metabolite lysophosphatidylcholine. *Circ Res* 71 : 1231-1241, 1992
 - 19) Corr PB, Cain ME, Witkowski FX, et al : Potential arrhythmogenic electrophysiological derangements in canine purkinje fibers induced by lysophosphoglycerides. *Circ Res* 44 : 822-832, 1979
 - 20) Da Torre SD, Creer MH, Pogwizd SM, et al : Amphipathic lipid metabolites and their relation to arrhythmogenesis in the ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol* 23 (Supplement I) : 11-22, 1991
 - 21) 有田 真 : Lysophosphoglycerides の不整脈誘発作用 - 電気生理学的, 生化学的, 薬理学的検討 - *Jpn J Electrocardiology* 7 (Supple 1) : S-1-59 - S-1-79, 1987
 - 22) Hoque ANE, Nasa Y, Abiko Y : Cardioprotective effect of d-propranolol in ischemic-reperfused isolated rat hearts. *Eur J Pharmacol* 236 : 269-277, 1993
 - 23) Hoque ANE, Hoque N, Hashizume H, Abiko Y : A study of dilazep : II. Dilazep attenuates lysophosphatidylcholine-induced mechanical and metabolic derangements in the isolated, working rat heart. *Jpn J Pharmacol* (in press)
 - 24) Allshire A, Piper HM, Cuthbertson KSR, et al : Cytosolic free Ca^{2+} in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. *Biochem J* 244 : 381-385, 1987
 - 25) Hashizume H, Akiyama K, Abiko Y : Effects of anti-ischemic drugs on veratridine-induced hypercontracture in rat cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol* (in press)
 - 26) Saito T, Wolf A, Menon NK, et al : Lysolecithins as endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxants that differ from endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 8246-8250, 1988
 - 27) Flavahan N : Lysophosphatidylcholine modifies G protein-dependent signaling in porcine endothelial cells. *Am J Physiol* 264 (Heart Circ. Physiol. 33) : H722-H727, 1993