

初代培養ラット肝細胞系における肝性リパーゼ 放出機構の解析に関する研究

田頭尚士、蠟川内理恵、本屋敷敏雄、森田哲生

The Stimulatory Release of Hepatic Lipase from Rat Cultured Hepatocytes

Hisashi Tagashira, Rie Kerakawati, Toshio Motoyashiki and
Tetsuo Morita

ABSTRACT

Heparin is known to stimulate the release of hepatic lipase (HTGL) activity from hepatocytes, but the action mechanisms have not been fully confirmed. Here, we investigated the involvement of the arachidonate pathway in the heparin-stimulated release of HGTL activity from rat hepatocytes. Heparin increased phospholipase (PL) A₂ activity in the hepatocytes in a time- and dose- dependent manner. The stimulatory effect of heparin on PLA₂ activity was markedly decreased by incubation with protein tyrosine kinase (TK) inhibitors. It was also observed that heparin rapidly increased leukotriene (LT) B₄ content in the hepatocytes. In addition, the stimulatory release of HTGL activity by heparin was suppressed by cytosolic PLA₂, and 5-lipoxygenase, but not by cyclooxygenase and thromboxane (TX) synthetase inhibitors or a TXA₂ receptor antagonist.

These findings suggest that the heparin-stimulated release of HTGL activity from hepatocytes is partly due to an action involving increases in cytosolic PLA₂ activity and LTB₄ production with associated of TK activity.

はじめに

脂質は血中を移動する際、個々の分子の形では存在せず、タンパク質と結合した複合体であるリポタンパク質として存在している¹⁾。この内、食餌由来のキロミクロン及び肝臓で合成された超低比重リポタンパク質(VLDL)に多く含まれるトリアシルグリセロール(TG)は、血管内で内皮細胞に係留されている肝外組織で合成されたりポタンパク質リパーゼ(LPL; Lipoprotein Lipase, EC 3.1.1.34)によって加水分解を受ける²⁾。この際生じた加水分解産物であるより高比重のリポタンパク質、レムナント中のTGは、ついで肝性リパーゼ(HTGL; Hepatic Triacylglyceride Lipase, EC 3.1.1.3)によって加水分解を受け、より一層高比重のリポタンパク質と遊離脂肪酸を生じる^{2,3)}。またHTGLは、高比重リポタンパク質(HDL)の末梢からのコレステロール除去作用にも大きな関わりをもっているとされる⁴⁾。すなわち、HTGLは生体におけるTGやコレステロール及び遊離脂肪酸のレベルを調節することで脂質代謝上、極めて重要な一役を担っているといえる。事実、HTGLの活性低下や欠乏・欠損は、高脂血症や動脈硬化症の発症原因にもなっている⁵⁾。

当初、HTGLは、ヘパリンの静脈注射によって血中に遊離してくる、脂質清澄因子として発見され、LPLと同一酵素であると考えられていた²⁾。しかし、その後の多くの報告により、活性発現にApo C-IIなどの補助因子を必要としないこと、1M NaClやプロタミンによって活性が阻害されないことなどから、LPLとは異なる酵素の存在が示唆され、やがて肝臓由来のHTGLであることが明らかになった⁶⁾。このHTGLは、肝実質細胞において合成され、糖鎖の付加を受けた後、細胞外へと分泌され、細胞表面や血管内皮細胞表面へと移行し、ヘパリン様糖鎖を介して係留されていると考えられるが、細胞外移行のメカニズムや活性調節機構などは不明な点が多い⁷⁻⁹⁾。

一方、ヘパリンは、1916年にMcLeanらによってイヌの肝から見い出された¹⁰⁾。その後、分離法の改良、分析法、活性測定法の進歩に伴って数多くの組織や臓器への分布が明らかとなっている¹¹⁾。一般にヘパリンは、動物の小腸や肺に多く見い出され、その他、肝、腎及び皮膚組織においても存在しており、肥満細胞の顆粒中に貯蔵されている^{12,13)}。またヘパリンは、グルコサミン、グルクロン酸及びイズロン酸からなる多糖のN-アセチル、N-硫酸及びO-硫酸置換体であり、ムコ多糖のうちでは、硫酸基を最も多く含む¹²⁾。このヘパリンの生理作用には、主として抗血液凝固作用と高脂血清澄作用とが知られている。前者の生理活性は、アンチトロンビンⅢによる血液凝固因子の有するセリンプロテアーゼ活性に対する阻害作用の促進とされる¹⁴⁾。一方、後者は、ヘパリン分子のもつ電荷によって本酵素と細胞表面のヘパリン様糖鎖との静電的結合の解離によって、本酵素が血中へ放出されることによると考えられている^{7,8)}。しかし、ヘパリンによる本酵素の遊離はそれのみでなく、ヘパリンの細胞への刺激の関与も考えられる。また、健常ヒト成人血漿中にはヘパリン約1~2mg/Lが存在しており、ヘパリンは、生体内の脂質レベルの調節に重要な一役を果たしている可能性が考えられる¹⁵⁾。さらにヘパリンが、上述の作用の他にも抗腫瘍作用や抗菌作用及び抗ウイルス作用など、様々な作用をもつことが報告されており、これらの作用発現においても、ヘパリンの静電的な作用だけでなく、ヘパリンの

細胞への刺激の関与が示唆されている^{15,16)}。

ところで、本酵素の肝細胞からの遊離は、従来ヘパリンやインスリンによることが報告されており、さらに最近本研究室において、オルトバナジン酸ナトリウム、上皮成長因子、アルギニン及びルテニウムレッドによって促進されることが見いだされている^{7,8,17-22)}。しかし、国内外の研究をとおしても、依然本酵素の遊離機構を含め、生理的意義や活性調節機構の詳細は、不明な点が多い。そこで本研究では、肝細胞からの本酵素の遊離とその調節を明らかにすることは、脂質代謝への寄与の解析する上で、極めて重要であると考え、初代培養肝細胞を用いて、ヘパリン刺激による肝細胞からの本酵素の遊離について、特に細胞内シグナル伝達の面から解析した。

1. ヘパリンによる初代培養ラット肝細胞からのHepatic Triacylglyceride Lipaseの遊離に対するチロシンキナーゼの関与

HTGLの遊離は、本酵素の活性調節において重要な段階であると考えられる。これまでに、ヘパリンによってHTGLの遊離が促進されることが報告されているが、これはヘパリンの電荷によるHTGLとヘパラン様糖鎖との静電的結合の解離であるとされてきた^{7,8)}。しかし近年、ヘパリンによる多彩な生物的作用が報告されており、これらはヘパリンが静電的な作用ではなく、細胞を刺激して作用を発現している可能性を示唆している^{15,16)}。

細胞表面に存在し、細胞外からの刺激をシグナルとして細胞内に伝える因子として最も良く知られているものにチロシンキナーゼがある²³⁾。チロシンキナーゼは、タンパク質のチロシン残基を特異的にリン酸化する酵素であり、細胞の増殖・分化、免疫応答から神経機能の維持など様々な高次の生理機能に関与している^{23,24)}。またその構造の特徴から、大きく受容体型と非受容体型の2種類の型に分類されており、どちらも細胞膜での刺激変換とそれに続く細胞内シグナル伝達を制御することで知られている²⁵⁾。

これまでにヘパリノイドの一種であるデキストラン硫酸によって癌細胞からのリポタンパク質リパーゼ(LPL; Lipoprotein Lipase, EC 3.1.1.34)の遊離に、膜のチロシンキナーゼが関与することが報告されている²⁶⁾。また、ルテニウムレッドによるHTGLの遊離に対するチロシンキナーゼの関与も明らかにされている²²⁾。そこで本章では、ヘパリンによるHTGLの遊離に対してもチロシンキナーゼの関与の可能性を考え、検討を行った。

HTGLは、通常、肝細胞表面や血管内皮細胞表面に係留されているが、ヘパリンの静脈注射によって血中に遊離されることが知られている²⁾。Assmannらは、肝臓においてHTGLが形質膜、ミクロソーム及び細胞質画分に局在しており、ヘパリンの添加によってHTGLが急速に培養液中に遊離されることを報告している⁷⁾。ラット培養肝細胞を用いた本実験系においても、HTGLの遊離は、Fig.1に示すように、ヘパリンとの温置により、時間の経過及びヘパリンの濃度の増加によって促進されることが確認された。さらに、ヘパリンによる本酵素の遊離は、イソフラボン誘導体系チロシンキナーゼ阻害剤Biochanin A²⁷⁾及びBiochanin Aと異なるタイプで、上皮成

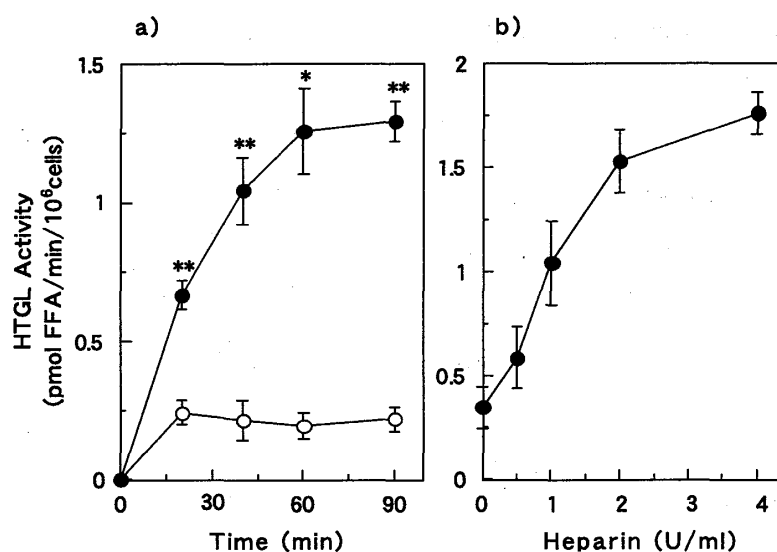


Fig. 1. Effects of Heparin on Release of HTGL Activity

(a) The hepatocytes were incubated for 0-90 min with heparin (2U/ml, ●) or without (○).

(b) The hepatocytes were incubated for 60 min with various concentrations (0-4U/ml) of heparin.

Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

長因子(EGF)受容体などのチロシンキナーゼを抑制することで知られている桂皮酸誘導体 ST-638²⁸⁾の共存によって大きく阻害されことから、ヘパリンの作用発現にチロシンキナーゼの関与が示唆された(Fig. 2)。そこで初代培養肝細胞中のチロシンキナーゼ活性を測定したところ、ホスホチロシンホスファターゼ(PTPase)活性が高いためか、測定が困難なため、初代培養肝細胞の膜画分からチロシンキナーゼの部分精製を行った(Fig. 3)。部分精製したチロシンキナーゼ標品とヘパリンとを共存させてアッセイしたところ、チロシンキナーゼの活性は、時間の経過及びヘパリンの濃度の増加に伴い、著しく増強された(Fig. 4)。また、このヘパリンによるチロシンキナーゼの活性上昇は、膜に対する選択性の高いチロシンキナーゼ阻害剤により大きく抑制された(Fig. 5)。

現在のところ、ヘパリンの直接的な受容体は発見されていない。近年、いくつかの細胞の表面において、ヘパリンが結合する特異的なタンパク質が存在することが明らかになりつつある²⁹⁾。Looらは、ヘパリン及びヘパラン硫酸が繊維芽細胞成長因子(FGF)受容体4と結合すると報告している³⁰⁾。またGaoらは、ヘパリン及びヘパラン硫酸がFGFの濃度に依存することなくFGF受容体の自己リン酸化を刺激すると報告している³¹⁾。従来、ヘパリンによるHTGLの遊離は、ヘパリンの電荷的な作用によるものとされてきた。しかしそれだけでなく、ヘパリンがおそらく細胞膜上の特定部位に存在するチロシンキナーゼをなんらかのかたちで刺激することによりHTGLの遊離を促進していることが示唆された。また、チロシンキナーゼ活性の部分

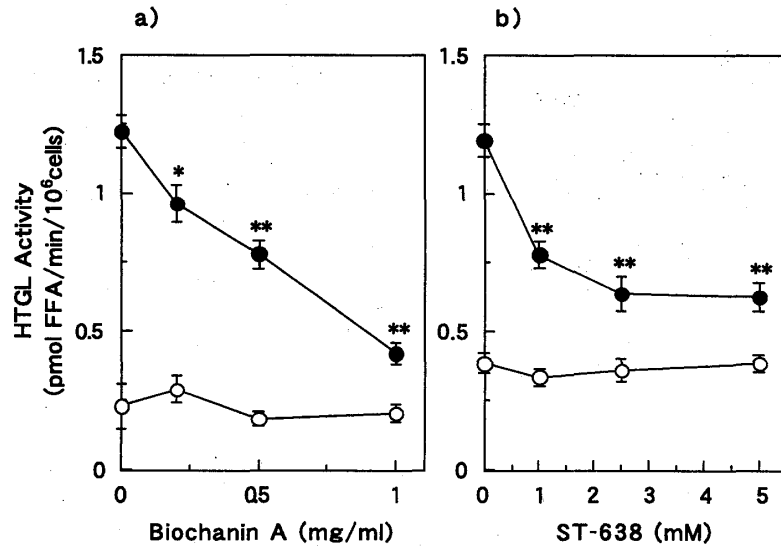


Fig. 2. Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL Activity by Heparin
 (a) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) in the presence of biochanin A. (b) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) in the presence of ST-638. Significant differences compared with the heparin-treated group without biochanin A or ST-638: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

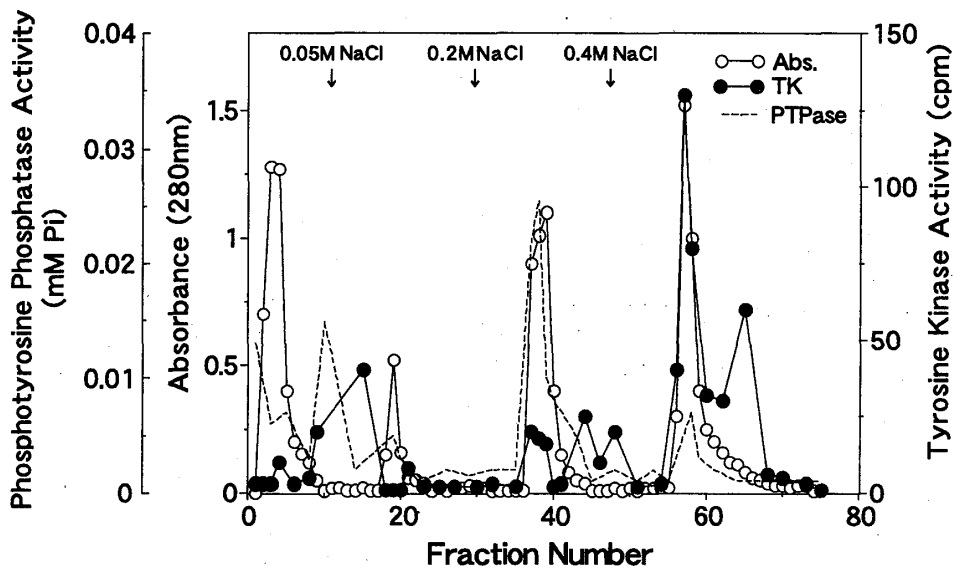


Fig. 3. Separation of Tyrosine Kinase and Phosphotyrosine Phosphatase by chromatography on DEAE-Cellulofine

The membrane fraction of hepatocytes was prepared and applied to DEAE-Cellulofine column. Tyrosine kinase activity of column fractions was measured by using of Poly (Glu, Tyr).

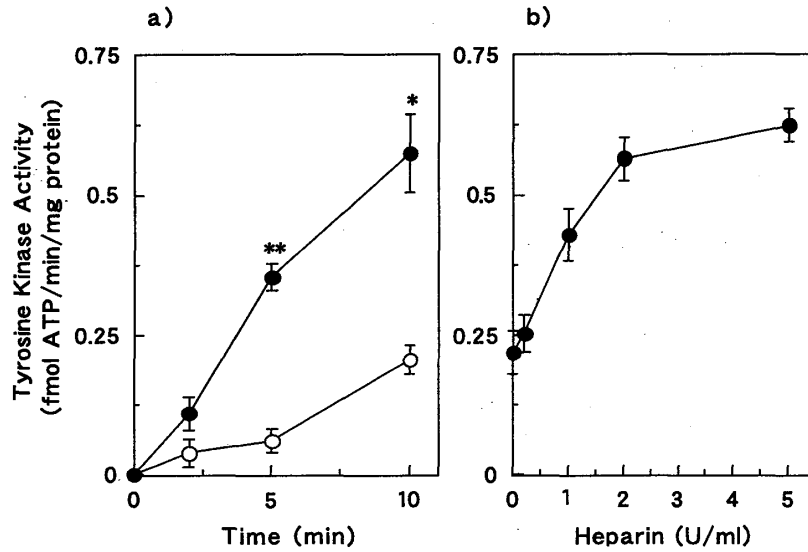


Fig. 4. Increasing Effect of Heparin on Tyrosine Kinase Activity in Hepatocytes

(a) The partially purified tyrosine kinase preparation from the hepatocytes was incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) over a 10-min period. (b) The partially purified tyrosine kinase preparation from the hepatocytes was incubated for 10 min with various concentrations (0-5U/ml) of heparin.

Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$

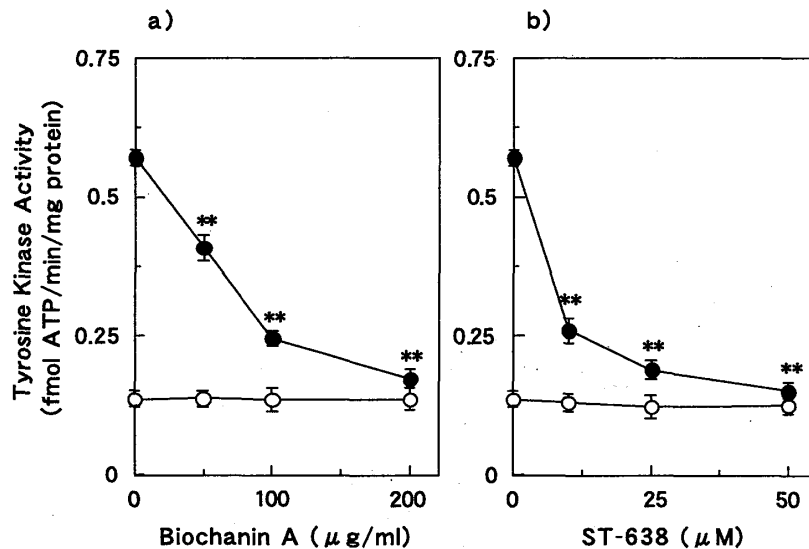


Fig. 5. Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors on Increase in Tyrosine Kinase Activity by Heparin

(a) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) in the presence of biochanin A. (b) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) in the presence of ST-638.

Significant differences compared with the heparin-treated group without biochanin A or ST-638: ** $p < 0.01$.

精製や阻害剤に対する感受性からヘパリンが刺激しているチロシンキナーゼは、成長因子受容体に代表されるような受容体型チロシンキナーゼである可能性が示唆された。

2. ヘパリンによるHTGLの遊離に対するホスホリパーゼCの関与

第1章において、ヘパリンが細胞表面に存在する受容体型のチロシンキナーゼを刺激することで、HTGLの遊離が引き起こされることを示してきた。受容体型のチロシンキナーゼとしては、EGF、FGF及び血小板由来成長因子(PDGF)など成長因子の受容体が知られている²⁴⁾。近年、これら成長因子の受容体の活性化に伴って、ホスホリパーゼC γ のリン酸化と活性化が起こることが報告されている^{32,33)}。ホスホリパーゼCは、ホスファチジルイノシトール4,5二リン酸(PIP₂)を分解して、ジアシルグリセロール(DG)とイノシトール1,4,5三リン酸(IP₃)の2つのセカンドメッセンジャーを産生することで、生体内のシグナル伝達において重要な役割を果たしている^{34,35)}。

本章では、ヘパリンによるHTGLの遊離に対する、チロシンキナーゼに調節を受ける因子としてホスホリパーゼCの関与について検討を行った。

ホスホリパーゼCは、様々な組織に存在しており、細胞膜に存在するイノシトールリン脂質からIP₃やDGを生成することでホスファチジルイノシトール代謝回転において中心的な役割を果たしている³⁴⁾。また、数々のホルモンや神経伝達物質が、ホスホリパーゼCの活性化を介し細胞内のIP₃やDG量を増加させることで作用を発現していることが知られている³⁶⁾。すなわち、Kavokらは、ラット肝細胞においてチロキシンがホスホリパーゼCを介して短時間でDGを生成すると報告している³⁷⁾。またChajek-Shaulらは、培養心細胞においてホスホリパーゼCの活性化がリポタンパク質リパーゼの遊離を促進すると報告している³⁸⁾。

ヘパリンによる肝細胞からのHTGLの遊離は、ホスホリパーゼC阻害剤であるU-73122³⁹⁾の共存によって著しく抑制され(Fig. 6)、これは、ヘパリンの効果がホスホリパーゼCの活性化と密接に関与していることを示唆している。そこで、肝細胞におけるホスホリパーゼC活性の挙動を調べた。すると、肝細胞内ホスホリパーゼC活性は、ヘパリンと肝細胞との温置時間の経過及びヘパリンの濃度の増加に伴い増強された(Fig. 7)。

ところで、ホスホリパーゼCは、受容体型のチロシンキナーゼやGTP結合タンパク質によって活性調節されることが知られている³⁶⁾。Yangらによると、ラット肝細胞においてもEGFがチロシンキナーゼを介するホスホリパーゼCの活性化によってIP₃を生成することが明らかにされている⁴⁰⁾。またNojiriらも、EGFによってホスホリパーゼCのチロシン残基のリン酸化が起きることを報告している⁴¹⁾。

本研究においても、ヘパリンによるホスホリパーゼCの活性増強が、チロシンキナーゼ阻害剤によって抑制されたことより、ホスホリパーゼCの活性化はチロシンキナーゼを介することが示唆された(Fig. 8)。

また、本酵素の遊離は、小胞体にあるCa²⁺-ATPaseを特異的に阻害することで小胞体からの

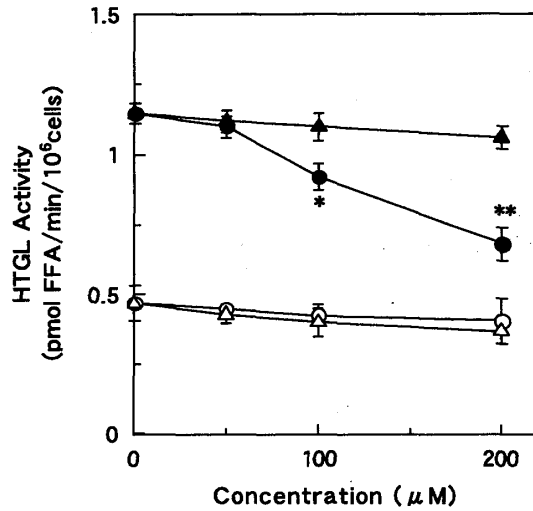


Fig. 6. Effects of Phospholipase C Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL Activity by Heparin
 The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●, ▲) or without (○, △) in the presence of U-73122 (○, ●) and U-73343 (△, ▲).
 Significant differences compared with the heparin-treated group without U-73122 or U-73343: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

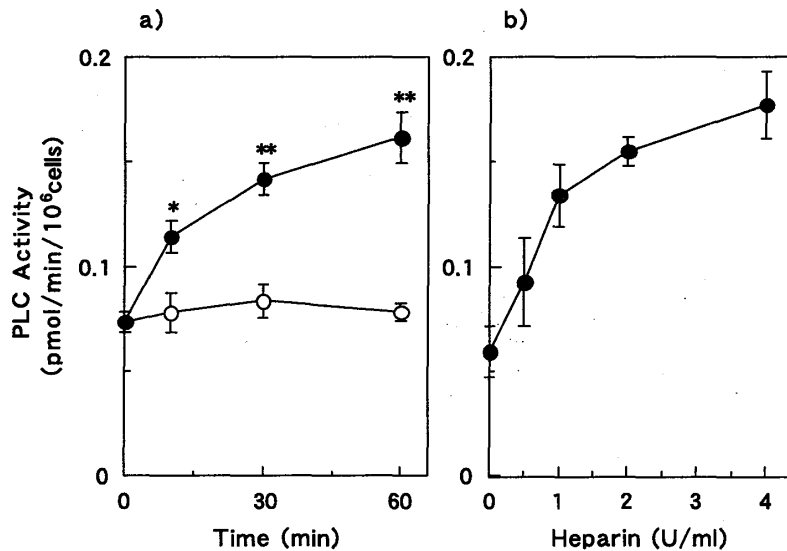


Fig. 7. Increasing Effect of Heparin on Phospholipase C Activity in Hepatocytes

(a) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) over a 60-min period.
 (b) The hepatocytes were incubated for 60 min with various concentrations (0-4U/ml) of heparin.
 Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

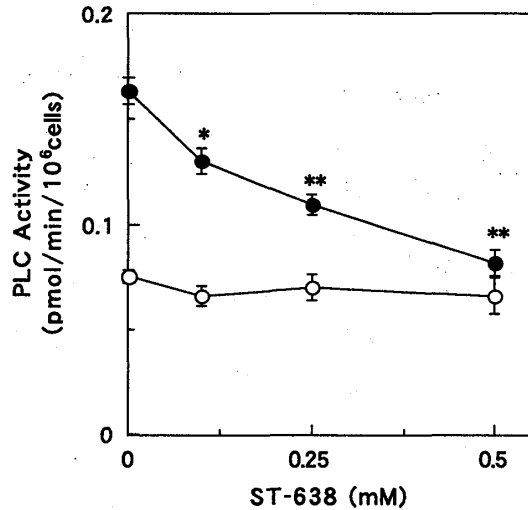


Fig. 8. Effect of Tyrosine Kinase Inhibitor on Increase in Phospholipase C Activity by Heparin

The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) in the presence of ST-638.

Significant differences compared with the heparin-treated group without ST-638: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

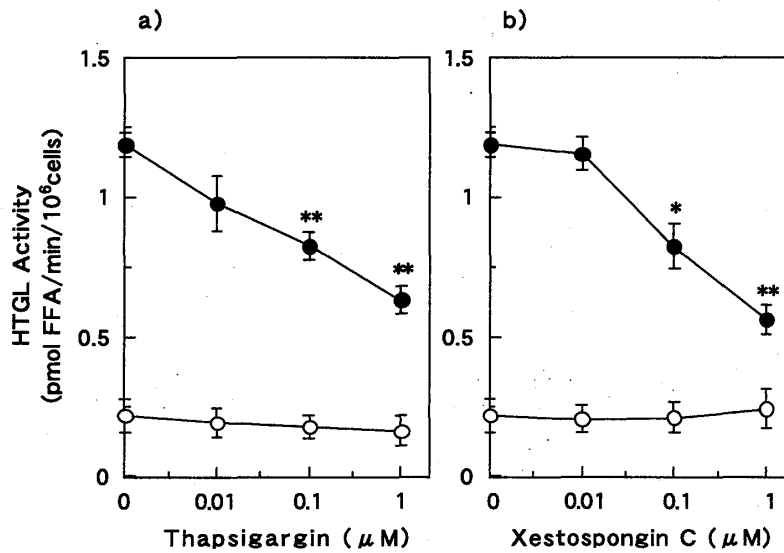


Fig. 9. Effects of Thapsigargin and Xestospongine C on the Stimulatory Release of HTGL Activity by Heparin

(a) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) in the presence of thapsigargin. (b) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○)

in the presence of xestospongine C. Significant differences compared with the heparin-treated group without thapsigargin or xestospongine C: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Ca²⁺ 放出を阻害する Thapsigargin⁴²⁾及び小胞体に存在する IP₃ 受容体の特異的阻害剤である Xestospongin C⁴³⁾の共存によっても抑制された(Fig. 9)。すなわち、第1章の結果も含め、ヘパリンによる HTGL の遊離は、ヘパリンが細胞表面の特定部位に存在するチロシンキナーゼを刺激し、その刺激が細胞内のホスホリパーゼ C を活性化し、これによる IP₃ の産生、さらにこの IP₃ の増加による小胞体からの Ca²⁺ 放出が密接に関与していることが示唆された。

3. ヘパリンによる HTGL の遊離に対する Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の関与

生体内において Ca²⁺ は、細胞内及び細胞間のシグナル伝達において重要な働きをしている。Ca²⁺ は多くの場合、カルモジュリンと結合して多くの Ca/カルモジュリン依存性の経路(リン酸化、脱リン酸化、イオンチャネルなど)を制御する⁴⁴⁾。その内、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ(CaMK)は、多くの細胞に存在し、Ca²⁺ をセカンドメッセンジャーとするさまざまな細胞内情報伝達機構に重要な役割を果たしている^{44,45)}。

これまでヘパリンによる HTGL の遊離には、ホスホリパーゼ C を介する小胞体からの Ca²⁺ 放出が重要な一役を担っていることを示してきた。そこで、本酵素の遊離に対する、細胞内 Ca²⁺ 環境の関与について検討を行ったところ、ヘパリンによる作用は、細胞内 Ca²⁺ キレート剤 Quin2-AM⁴⁶⁾及び Ca²⁺ イオノフォア A23187⁴⁷⁾の共存によって抑制された(Fig. 10)。これは、ヘパリンによる肝性リパーゼの遊離が、細胞内の特定の Ca²⁺ 濃度によって調節を受けていることを示唆している。多くの場合、Ca²⁺ はカルモジュリンなどの Ca²⁺ 結合タンパク質と結合することでその機能を発現する⁴⁴⁾。さらに Ca²⁺ とカルモジュリンの複合体が CaMK を活性化することで様々な機能を発現していく⁴⁴⁾。Velasco らは、ラット肝細胞においてオカダ酸が CaMK- II を介してカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ I を活性化すると報告している⁴⁸⁾。また、Connelly⁴⁹⁾ は、肝細胞をバソプレッシンで刺激すると CaMK- II が活性化され、ピルビン酸キナーゼのリン酸化が起こることを示している⁴⁹⁾。さらに、Erdodi らは、骨格筋において、ヘパリンによって活性化される Ca²⁺ 依存性過リン酸分解酵素の存在を示している⁵⁰⁾。一方で、血管平滑筋細胞やメサンギウム細胞においてヘパリンが CaMK- II のリン酸化と活性化を阻害するという報告もされている^{51,52)}。ヘパリンによる HTGL の遊離は、ナフトレンスルフォナマイド誘導体で Ca²⁺ 存在下、カルモジュリンを阻害する W-7⁵³⁾に対し高い感受性を示した(Fig. 11)。また本酵素の遊離は、CaMK- II の特異的阻害剤である KN-93⁵⁴⁾および KN-93 とは異なるタイプで、CaMK- II を特異的に阻害する合成ペプチドである Myristoylated AIP⁵⁵⁾の共存によっても抑制された(Fig. 12)。さらに肝細胞とヘパリンとを温置したところ、細胞内における CaMK- II 活性は、ヘパリンと肝細胞との温置時間の経過並びに温置したヘパリンの濃度の増加に伴って著しく上昇した(Fig. 13)ことから、肝性リパーゼの遊離には、カルモジュリンの活性化に伴う CaMK- II の活性上昇が密接に関与していることが示唆された。ところで、Melien らによると、肝細胞においてノルエピネフリンによって誘導された extracellular signal regulated kinase (ERK) のリン酸化が、カルモジュ

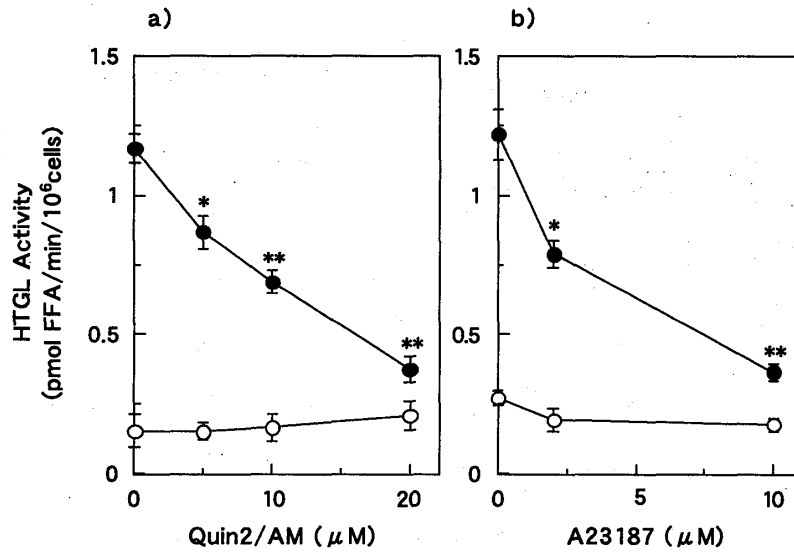


Fig. 10. Effects of Ca²⁺-Modulators on the Stimulatory Release of HTGL Activity by Heparin

(a) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) in the presence of Quin2/AM. (b) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) in the presence of A23187.

Significant differences compared with the heparin-treated group without Quin2/AM or A-23187: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

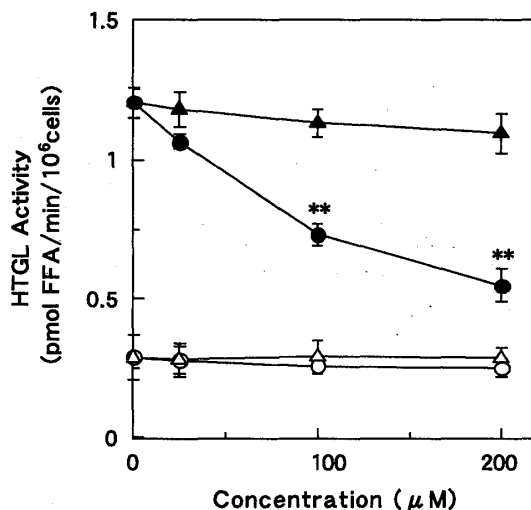


Fig. 11. Effects of Calmodulin Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL Activity by Heparin

The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●, ▲) or without (○, △) in the presence of W-7 (○, ●) and W-5 (△, ▲).

Significant differences compared with the heparin-treated group without W-7 or W-5: ** $p < 0.01$

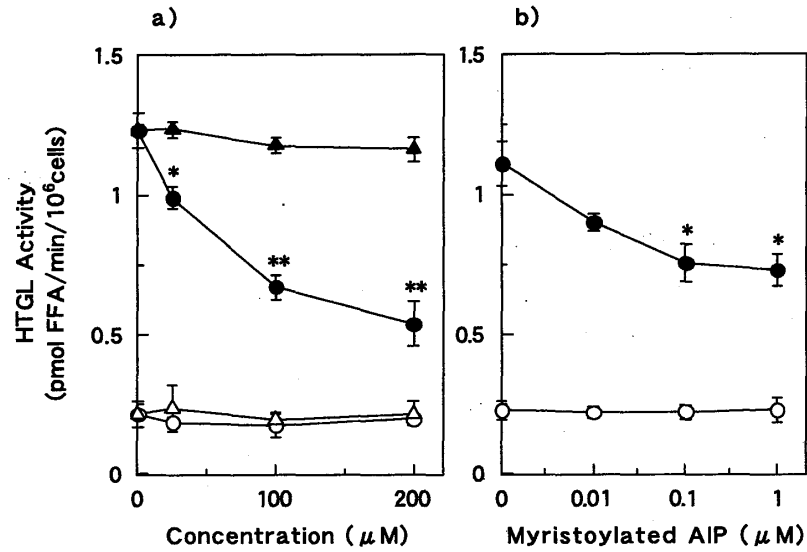


Fig. 12. Effects of CaMK- II Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL Activity by Heparin

(a) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●, ▲) or without (○, △) in the presence of KN-93 (○, ●) and KN-92 (△, ▲). (b) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) in the presence of myristoylated AIP.

Significant differences compared with each heparin-treated group without CaMK-inhibitors: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

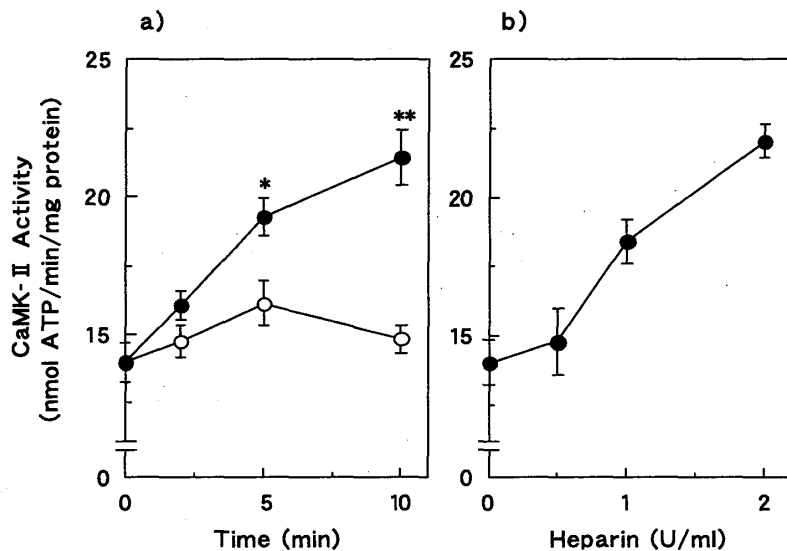


Fig. 13. Increasing Effect of Heparin on CaMK- II Activity in Hepatocytes

(a) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) over a 10-min period.

(b) The hepatocytes were incubated for 10 min with various concentrations (0-2U/ml) of heparin.

Significant differences compared with the control: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

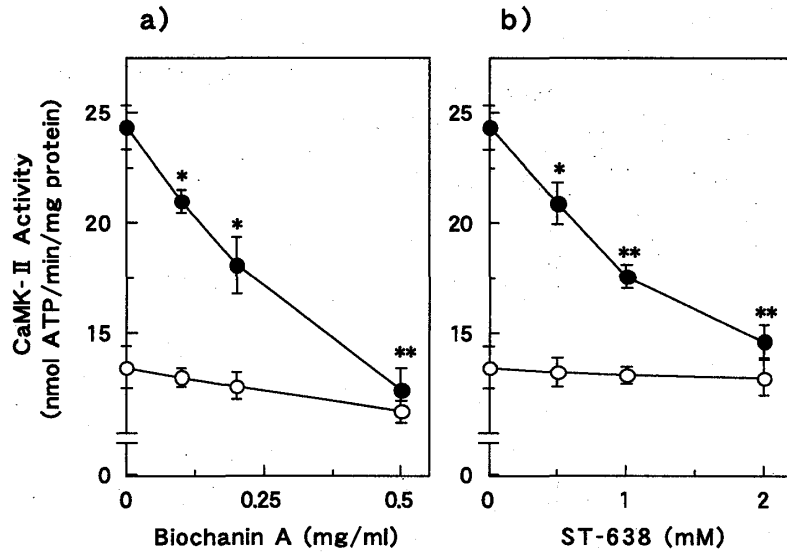


Fig. 14. Effect of Tyrosine Kinase Inhibitors on Increase in CaMK- II Activity by Heparin

(a) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) in the presence of biochanin A. (b) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) in the presence of ST-638.

Significant differences compared with the heparin-treated group without biochanin A or ST-638: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

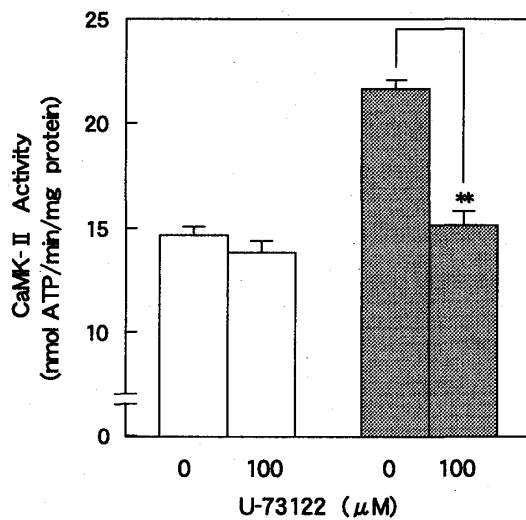


Fig. 15. Effect of Phospholipase C Inhibitor on Increase in CaMK- II Activity by Heparin

The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, hatched bar) or without (white bar) in the presence of U-73122.

Significant differences compared with the heparin-treated group without U-73122: ** $p < 0.01$.

リン阻害剤によって阻害されるのに対し、CaMK-II阻害剤によっては阻害されないという報告⁵⁶⁾もあり、本章における検討においても、ヘパリンからの刺激によって活性化されたカルモジュリン自身がHTGLの遊離を調節している可能性も併せて考えられる。

一方、ヘパリンによるCaMK-II活性の増強は、チロシンキナーゼ及びホスホリパーゼC阻害剤によって阻害される(Fig. 14, 15)。すなわち、ヘパリンによる肝性リパーゼの遊離は、チロシンキナーゼを介するホスホリパーゼCの活性化による小胞体からのCa²⁺の放出と、このCa²⁺放出に賦活化されたカルモジュリン-CaMK-IIを介する経路が密接に関与していることが示唆された。

4. ヘパリンによるHTGLの遊離に対するロイコトリエン合成系の関与

これまでの章において、ヘパリンが様々なタンパク質リン酸化反応を介してHTGLの遊離を促進することを明らかにしてきた。ところで、最近、Leslieらは、ヘパリンがマクロファージの細胞質ホスホリパーゼA₂を活性化すると報告している⁵⁷⁾。またShalitらは、ヘパリンやヘパリン硫酸がE-マスト細胞中のロイコトリエンB₄及びロイコトリエンC₄の生成を上昇させると報告⁵⁸⁾しており、ヘパリンの作用のひとつとしてアラキドン酸カスケードへの関与が示唆されている。ロイコトリエン、プロスタグランジンは、アラキドン酸からそれぞれリポキシゲナーゼとシクロオキシゲナーゼを介して生成され、平滑筋収縮や炎症反応のメディエーターとして働いている⁵⁹⁾。一般に肝臓は、ロイコトリエンやプロスタグランジンの主要な異化臓器とされてきた⁶⁰⁾。しかし近年の報告において、肝臓においてもロイコトリエンやプロスタグランジンが合成されることが明らかになりつつある^{61,62)}。すなわち、Huwylerらは、ラット肝細胞中にロイコトリエンB₄を合成する酵素が存在すると報告している⁶³⁾。また、Fiedlerらは、ロイコトリエンB₄が肝臓に存在するperoxisome proliferator-activated receptor(PPAR)αのリガンドであることを報告している⁶⁴⁾。しかし、HTGLの遊離とアラキドン酸カスケードの関与を示す報告はされていない。そこで本章では、ヘパリンによるHTGLの遊離に対するアラキドン酸カスケード系の関与、特にロイコトリエン合成系の関与について検討を行った。

ホスホリパーゼA₂は、細胞外からの様々な刺激によって細胞膜のリン脂質からアラキドン酸を生成するアラキドン酸カスケードの開始の律速酵素となっている⁶⁵⁾。また、ホスホリパーゼA₂は、リン酸化を受けることで活性化するとされており、Goldbergらは、受容体型のチロシンキナーゼからの刺激によってホスホリパーゼA₂が活性化すると報告している⁶⁶⁾。またBonventreらは、EGFで腎メサンギウム細胞を刺激するとホスホリパーゼA₂の活性化が起こると報告している⁶⁷⁾。

ホスホリパーゼA₂は様々な組織に存在しており、その局在性、分子量、Ca²⁺要求性、基質特異性に基づいて細胞質型、分泌型及びCa²⁺非依存性型ホスホリパーゼA₂に分類されている⁶⁸⁾。この内、細胞質型のホスホリパーゼA₂はアラキドン酸含有のリン脂質に対して高い基質特異性をもつCa²⁺要求性の酵素であり、アラキドン酸代謝において深い関わりを持つとされている⁶⁵⁾。

また、Murakamiらの報告によると、細胞質型のホスホリパーゼA₂と共にCa²⁺要求性の酵素である分泌型のホスホリパーゼA₂によるアラキドン酸生成が示されている⁶⁹⁾。本実験においても、ヘパリンによるHTGLの遊離は、アクリジン誘導体で一般的なホスホリパーゼA₂阻害剤であるQuinacrine⁷⁰⁾の共存により著しく抑制された。また、本酵素の遊離は、分泌型及び細胞質型ホスホリパーゼA₂を阻害するManoalide⁷¹⁾によっても抑制され、さらに細胞質型ホスホリパーゼA₂の特異的阻害剤であるAACOCF₃⁷²⁾の共存によっても著しく抑制された(Table 1)。そこで肝細胞におけるホスホリパーゼA₂活性について検討を行ったところヘパリンと肝細胞の温置時間の経過に及び肝細胞と温置したヘパリンの濃度の増加に伴い著しく上昇した(Fig. 16)。このヘパリンによるホスホリパーゼA₂活性の増強は、種々のホスホリパーゼA₂阻害剤の共存によって抑制され、特に細胞質型ホスホリパーゼA₂を特異的に阻害するAACOCF₃に対して高い感受性を示した(Table 2)ことから、ヘパリンによって活性化されるホスホリパーゼA₂は、各阻害剤に対する感受性からCa²⁺依存性の細胞質型ホスホリパーゼA₂であることが示唆された。また、ヘパリンによるHTGLの遊離は、シクロオキシゲナーゼ阻害剤であるIndomethacin⁷³⁾、Aspirin⁷⁴⁾及びトロンボキサン合成酵素阻害剤OKY-046⁷⁵⁾さらにはトロンボキサンA₂受容体アンタゴニストONO-3708⁷⁶⁾の存在下、ほとんど変化が認められなかった(Table 3)のに対し、5-リポキシゲナーゼ阻害剤であるNDGA⁷⁷⁾の存在下、その濃度の増加に伴って抑制された(Fig. 17a)。また、本酵素の遊離は、より特異的で強力な5-リポキシゲナーゼ阻害剤AA-861⁷⁸⁾の共存によっても著しく抑制された(Fig. 17b)ことより、本酵素の遊離には、アラキドン酸代謝系の中でもロイコトリエン合成

Table 1. Effects of Phospholipase A₂ Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL Activity by Heparin

The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml) or without in the presence of various agents. No significant changes in the basal HTGL activity were observed with any single inhibitors. Significant differences compared with no addition of inhibitors: **p*<0.05 and ***p*<0.01.

Chemicals	Relative HTGL Activity (%)
None	100
Quinacrine (10 μM)	64.0 ± 3.7 **
(50 μM)	11.0 ± 2.0 **
Manoalide (10 μM)	82.2 ± 2.7
(50 μM)	74.5 ± 1.9 *
AACOCF ₃ (10 μM)	57.4 ± 1.8 **
(50 μM)	13.7 ± 1.6 **

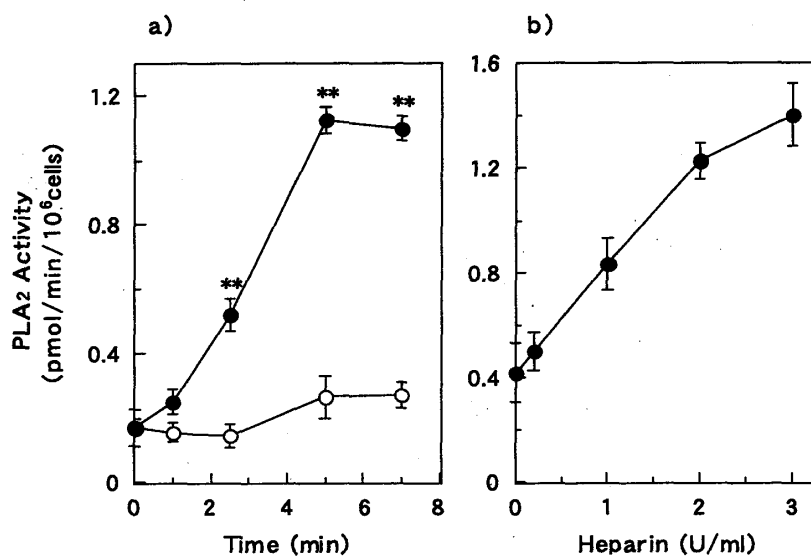


Fig. 16. Increasing Effect of Heparin on Phospholipase A₂ Activity in Hepatocytes

(a) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) over a 7-min period.

(b) The hepatocytes were incubated for 5 min with various concentrations (0-3U/ml) of heparin.

Significant differences compared with the control: ***p*<0.01.

tabl 2. Effects of Phospholipase A₂ Inhibitors on Increase in Phospholipase A₂ Activity by Heparin

The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml) or without in the presence of various agents.

No significant changes in the basal PLA₂ activity were observed with any single inhibitors.

Significant differences compared with no addition of inhibitors: ***p*<0.01.

Chem icals	Relative PLA ₂ Activity (%)
None	100
Quinacrine (10 μ M)	38.3 ± 1.2 **
(50 μ M)	20.4 ± 1.6 **
Manoalide (10 μ M)	88.6 ± 3.3
(50 μ M)	69.8 ± 2.2 **
AACOCF ₃ (10 μ M)	35.9 ± 2.9 *
(50 μ M)	15.9 ± 2.5 **

Table 3. Effects of Various Chemicals on the Stimulatory Release of HTGL Activity by Heparin

The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml) or without in the presence of various agents. No significant changes in the basal HTGL activity were observed with any single inhibitors.

Chemicals	Relative HTGL Activity (%)
None	100
Indomethacin (50 μ M)	106.5 \pm 3.1
(200 μ M)	106.3 \pm 4.3
Aspirin (50 μ M)	99.9 \pm 1.5
(200 μ M)	101.5 \pm 2.7
OKY-046 (25 μ M)	105.8 \pm 0.2
(50 μ M)	93.1 \pm 3.4
ONO-3708 (25 μ M)	96.0 \pm 2.1
(50 μ M)	96.4 \pm 2.7

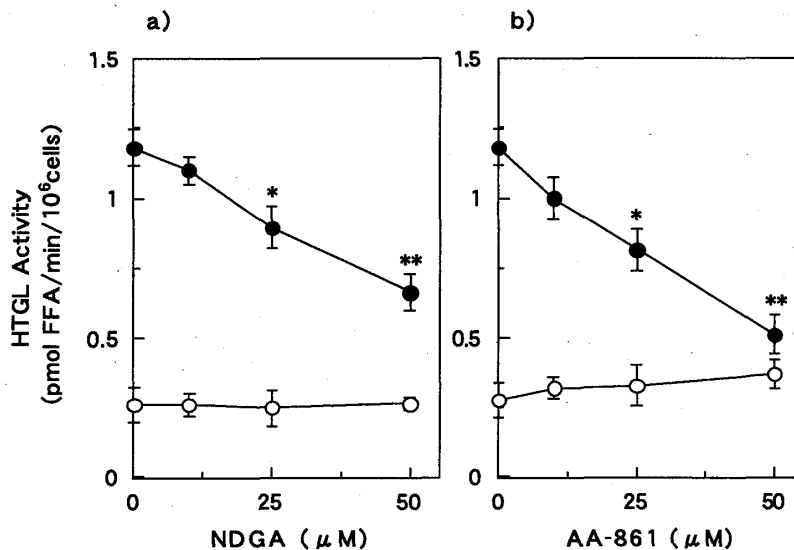


Fig. 17. Effects of 5-Lipoxygenase Inhibitors on the Stimulatory Release of HTGL Activity by Heparin

(a) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) in the presence of NDGA. (b) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) in the presence of AA-861.

Significant differences compared with the heparin-treated group without NDGA or AA-861: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

系の密接な関与が示唆された。そこで、細胞内におけるロイコトリエンB₄量の変動について検討を行ったところ、細胞内ロイコトリエンB₄量は、培養肝細胞とヘパリンとの温置時間5分においてもっとも高値となる一過性の上昇を示した(Fig. 18a)。またロイコトリエンB₄は、肝細胞をヘパリン0~3U/ml存在下、5分間温置したところ、ヘパリンの濃度の増加に伴い上昇しており(Fig. 18b)、HTGLの遊離には、細胞質型ホスホリパーゼA₂の活性化によって賦活化されたロイコトリエン合成系の亢進による細胞内ロイコトリエンB₄量の変動が、密接に関与していることも示唆された。なお、Sakagamiらは、肝臓のクッパー細胞においてロイコトリエンが合成されることを示している⁷⁹⁾。しかし、本実験において肝細胞の調製におけるクッパー細胞の混入率は生体染色法⁸⁰⁾により2%以下であることを確認しており、本実験下でのヘパリンによるロイコトリエンの合成の観察は肝実質細胞におけるものである。

近年、アラキドン酸カスケードはチロシンキナーゼのほかにも様々なリン酸化酵素によって調節をうけていることが報告されている。すなわち、Linらは、細胞質型ホスホリパーゼA₂の505番目のセリン残基がmitogen-activated protein(MAP) kinaseによってリン酸化されることで活性化することを明らかにしている⁸¹⁾。また、Muthalifらは、CaMK- IIが細胞質型ホスホリパーゼA₂を活性化することでアラキドン酸の遊離を増加させると報告している⁸²⁾。さらに、Sanoらの報告によると、ホスホリパーゼCとホスホリパーゼA₂のリン酸化によってロイコトリエンC₄の合成が調節されていることが示されている⁸³⁾。また最近、Yokomizoらは、チロシンキナーゼを介する細胞内Ca²⁺の上昇が5-リポキシゲナーゼの活性化に重要であると示唆している⁸⁴⁾。

ヘパリンによって上昇したホスホリパーゼA₂活性及び細胞内ロイコトリエンB₄量の上昇は、

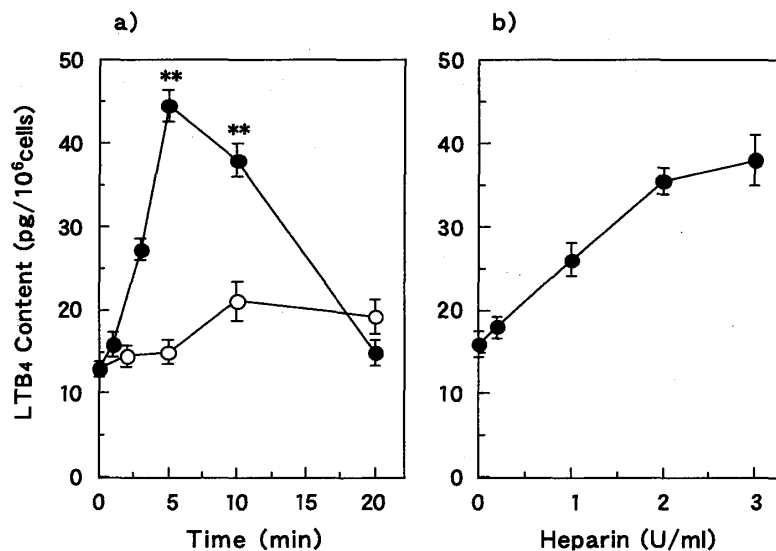


Fig. 18. Increase in Leukotriene B₄ Content in Hepatocytes by Heparin

(a) The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml, ●) or without (○) over a 20-min period.

(b) The hepatocytes were incubated for 5 min with various concentrations (0-3U/ml) of heparin.

Significant differences compared with the control: ***p*<0.01

チロシンキナーゼ阻害剤、さらにはホスホリパーゼC、カルモジュリン及びCaMK- II 阻害剤によって抑制された(Table 4, 5)ことから、第1章から第3章の結果も含め、ヘパリンによるHTGLの遊離には、細胞表面に存在するチロシンキナーゼからの刺激によるホスホリパーゼC-カルモジュリン-CaMK- II を介するホスホリパーゼA₂の活性化が密接に関与していることが示唆された。

Table 4. Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors on Increases in Phospholipase A₂ Activity and Leukotriene B₄ Content by Heparin

The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml) or without in the presence of various agents. No significant changes in the basal PLA₂ activity and LTB₄ content were observed with any single inhibitors.

Significant differences compared with no addition of inhibitors: **p*<0.05 and ***p*<0.01.

Chemicals		Relative PLA ₂ Activity (%)	Relative LTB ₄ Content (%)
None		100	100
Biochanin A	(0.2mg/ml)	69.8±3.0 *	61.7±2.6 **
	(1.0mg/ml)	21.2±2.3 **	22.4±1.5 **
ST-638	(20 μ M)	87.9±2.2	68.4±2.0 **
	(100 μ M)	25.3±1.9 **	10.6±1.6 **

Table 5. Effects of Various Ca²⁺ Modulators on Increases in Phospholipase A₂ Activity and Leukotriene B₄ Content by Heparin

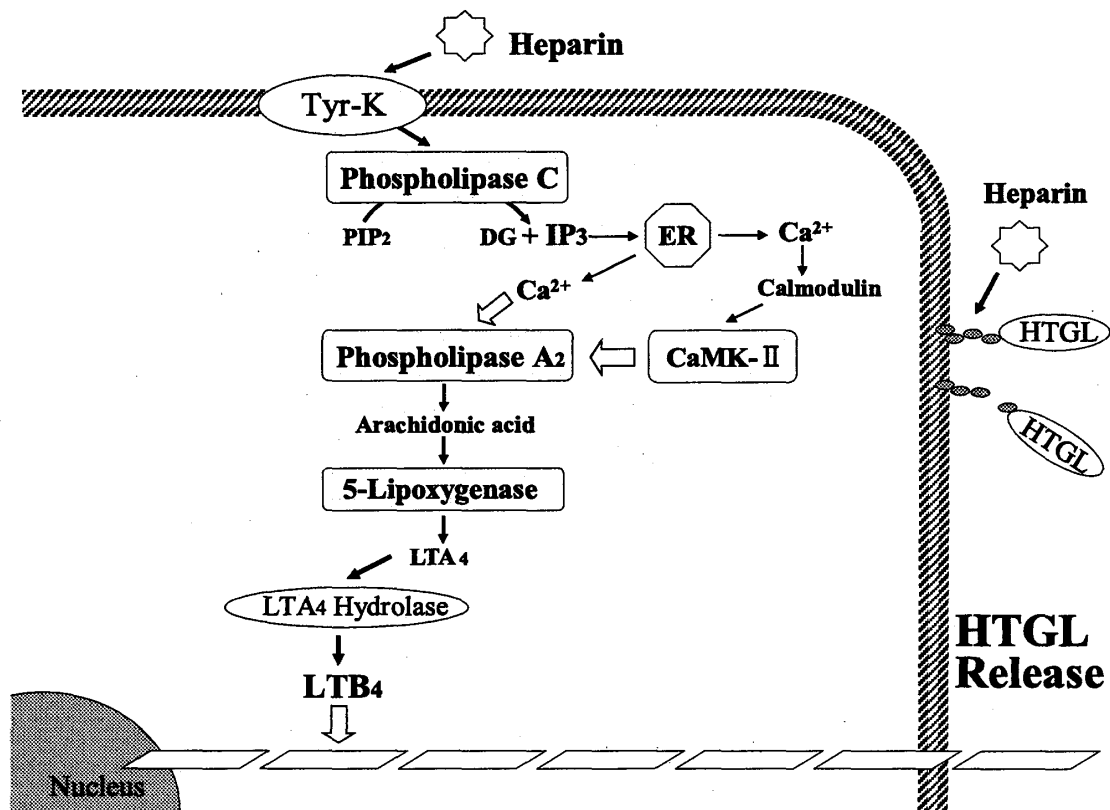
The hepatocytes were incubated with heparin (2U/ml) or without in the presence of various agents. No significant changes in the basal PLA₂ activity and LTB₄ content were observed with any single inhibitors.

Significant differences compared with no addition of inhibitors: ***p*<0.01.

Chemicals		Relative PLA ₂ Activity (%)	Relative LTB ₄ Content (%)
None		100	100
Thapsigargin	(0.1 μ M)	32.2±2.4 **	22.7±2.5 **
Xestospongin C	(0.1 μ M)	37.2±2.2 **	18.7±2.4 **
Quin2/AM	(20 μ M)	9.6±1.4 **	8.3±1.3 **

おわりに

ヘパリンは、これまでの結果も踏まえ、肝細胞膜の特定部位に存在するチロシンキナーゼを介するホスホリパーゼCの活性化を引き起こす。これにより、 IP_3 が産生され、 IP_3 の増加は小胞体を刺激し、これにより小胞体からの Ca^{2+} 放出が生じる。これは細胞内 Ca^{2+} 準位を増加させ、 Ca^{2+} とカルモジュリンに依存したCaMK-IIの活性上昇が起こる。さらに、CaMK-IIの活性上昇は、ホスホリパーゼA₂を活性化させ、ロイコトリエン合成系の亢進、特に5-リポキシゲナーゼ、ロイコトリエンA₄水解酵素を介する細胞内ロイコトリエンB₄準位の一過的な上昇を引き起こす。すなわち、HTGLの遊離は、ヘパリンによるこれらの細胞内シグナル伝達を介して引き起こされていることが明らかとなった。



Scheme 1. HTGL signal transduction pathway

本総説は、学位論文（田頭尚士、福山大学、2006年3月）の要録である。

引用文献

- 1) Smith L.C., Pownall H.J., Gotto A.M. Jr., *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 751-757 (1978).
- 2) Nilsson-Ehle P., Garfinkel A.S., Schotz M.C., *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 667-693 (1980).
- 3) Landin B., Nilsson A., Twu J.S., Schotz M.C., *J. Lipid Res.*, **25**, 559-563 (1984).
- 4) Connelly P.W., *Clin. Chim. Acta*, **286**, 243-255 (1999).
- 5) Connelly P.W., Hegele R.A., *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **35**, 547-572 (1998).
- 6) LaRosa J.C., Levy R.I., Windmueller H.G., Fredrickson D.S., *J. Lipid Res.*, **13**, 356-363 (1972).
- 7) Assmann G., Krauss R.M., Fredrickson D.S., Levy R.I., *J. Biol. Chem.*, **248**, 1992-1999 (1973).
- 8) Kuusi T., Nikkila E.A., Virtanen I., Kinnunen P.K.J., *Biochem. J.*, **181**, 245-246 (1979).
- 9) Laposata E.A., Laboda H.M., Glick J.M., Strauss J.F., *J. Biol. Chem.*, **262**, 5333-5338 (1987).
- 10) McLean J., *Am. J. Physiol.*, **41**, 250-257 (1916).
- 11) Charles A.F., Scott D.A., *J. Biol. Chem.*, **102**, 431-435 (1933).
- 12) Ehrlich J., Stivala S.S., *J. Pharm. Sci.*, **62**, 517-544 (1973).
- 13) Ragazzi E., Chinellato A., *Gen. Pharmacol.*, **26**, 697-701 (1995).
- 14) Hook M., Bjork I., Hopwood J., Lindahl U., *FEBS Lett.*, **66**, 90-93 (1976).
- 15) Engelberg H., *Pharmacol. Rev.*, **48**, 327-352 (1996).
- 16) Regelson W., *Adv. Chemother.*, **3**, 303-370(1968).
- 17) Emmison N., Zammit V.A., Agius L., *Biochem. J.*, **285**, 655-660 (1992).
- 18) Morita T., Mikami F., Kanagawa A., Sera M., Ueki H., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 3287-3289 (1991).
- 19) Morita T., Sakata K., Kanagawa A., Ueki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 577-580 (1994).
- 20) Morita T., Mikami F., Kanagawa A., Ueki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 199-200 (1993).
- 21) Morita T., Shimada Y., Ueki H., Kanagawa A., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1371-1373 (1996).
- 22) Morita T., Fujiwara A., Ueki H., Kanagawa A., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 549-554 (2000).
- 23) Hunter T., Cooper J.A., *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 897-930 (1985).
- 24) Ullrich A., Schlessinger J., *Cell*, **61**, 203-212 (1990).
- 25) Plowman G., Sudarsanam S., Bingham J., Whyte D., Hunter T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 13603-13610 (1999).
- 26) Morita T., Kanagawa A., Fujii M., Ueki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 724-726 (1994).
- 27) Geahlen R.L., Koonchanok N.M., McLaughlin J.L., Pratt D.E., *J. Nat. Prod.*, **52**, 982-986 (1989).
- 28) Shiraishi T., Domoto T., Imai N., Shimada Y., Watanabe K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 322-328 (1987).
- 29) Imai K., Iida T., Takano Y., Uozumi N., *J. Chromatogr. B*, **780**, 1-12 (2002).
- 30) Loo B.M., Kreuger J., Jalkanen M., Lindahl U., Salmivirta M., *J. Biol. Chem.*, **276**, 16868-16876 (2001).
- 31) Gao G., Goldfarb M., *EMBO J.*, **14**, 2183-2190 (1995).

- 32) Meisenhelder J., Suh P.G., Rhee S.G., Hunter T., *Cell*, **30**, 1109-1122 (1989).
- 33) Burgess W.H., Dionne C.A., Kaplow J., Mudd R., Friesel R., Zilberstein A., Schlessinger J., Jaye M., *Mol. Cell Biol.*, **10**, 4770-4777 (1990).
- 34) Kim M.J., Kim E., Ryu S.H., Suh P.G., *Exp. Mol. Med.*, **32**, 101-109 (2000).
- 35) Rossier M.F., Bird G.S., Putney J.W.Jr., *Biochem. J.*, **274**, 643-650 (1991).
- 36) Clapham D.E., *Cell*, **80**, 259-268 (1995).
- 37) Kavok N.S., Krasinikova O.A., Babenko N.A., *BMC Cell Biol.*, **2:5**, 1-7 (2001).
- 38) Chajek-Shaul T., Halimi O., Ben-Naim M., Stein O., Stein Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **1014**, 178-183 (1989).
- 39) Kayali A.G., Eichhorn J., Haruta T., Morris A.J., Nelson J.G., Vollenweider P., Olefsky J.M., Webster N.J.G., *J. Biol. Chem.*, **273**, 13808-13818 (1998).
- 40) Yang L., Camoratto A.M., Baffy G., Raj S., Manning D.R., Williamson J.R., *J. Biol. Chem.*, **268**, 3739-3746 (1993).
- 41) Nojiri S., Hoek J.B., *Hepatology*, **32**, 947-957 (2000).
- 42) Papp B., Enyedi A., Kovacs T., Sarkadi B., Wuytack F., Thastrup O., Gardos G., Bredoux R., Levy-Toledano S., Enouf J., *J. Biol. Chem.*, **266**, 14593-14596 (1991).
- 43) Miyamoto S., Izumi M., Hori M., Kobayashi M., Ozaki H., Karaki H., *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 650-654 (2000).
- 44) Schulman H., *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, **22**, 39-112 (1988).
- 45) Colbran R.J., Schworer C.M., Hashimoto Y., Fong Y.L., Rich D.P., Smith M.K., Soderling T.R., *Biochem. J.*, **258**, 313-325 (1989).
- 46) Tsien R.Y., Pozzan T., Rink T.J., *J. Cell Biol.*, **94**, 325-334 (1982).
- 47) Thode J., Pershadsingh H.A., Ladenson J.H., Hardy R., McDonald J.M., *J. Lipid Res.*, **30**, 1299-1305 (1989).
- 48) Velasco G., Guzman M., Zammit V.A., Geelen M.J.H., *Biochem. J.*, **321**, 211-216 (1997).
- 49) Connelly P.A., Sisk R.B., Schulman H., Garrison J.C., *J. Biol. Chem.*, **262**, 10154-10163 (1987).
- 50) Erdodi F., Gergely P., Bot G., *Int. J. Biochem.*, **16**, 1391-1394 (1984).
- 51) Mishra-Gorur K., Singer H.A., Castellet J.J. Jr., *Am. J. Pathol.*, **161**, 1893-1901 (2002).
- 52) Miralem T., Templeton D.M., *Biochem. J.*, **330**, 651-657 (1998).
- 53) Hidaka H., Sasaki Y., Tanaka T., Endo T., Ohno S., Fujii Y., Nagata T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 4354-4357 (1981).
- 54) Sumi M., Kiuchi K., Ishikawa T., Ishii A., Hagiwara M., Nagatsu T., Hidaka H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 968-975 (1991).
- 55) Ishida A., Kameshita I., Okuno S., Kitani T., Fujisawa H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 806-812 (1991).

- 56) Melien O., Nilssen L.S., Dajani O.F., Sand K.L., Iversen J.G., Sandnes D.L., Christoffersen T., *BMC Cell Biol.*, **3**, 1-11 (2002).
- 57) Leslie C.C., Voelker D.R., Channon J.Y., Wall M.M., Zelarney., *Biochim. Biophys. Acta*, **963**, 476-492 (1988).
- 58) Shalit M., Shoam H., Seno N., Razin E., *Life Sci.*, **39**, 903-910 (1986).
- 59) Samuelsson B., *Science*, **220**, 568-575 (1983).
- 60) Harper T.W., Garrity M.J., Murphy R.C., *J. Biol. Chem.*, **261**, 5414-5418 (1986).
- 61) Perez H.D., Roll F.J., Bissell D.M., Shak S., Goldstein I.M., *J. Clin. Invest.*, **74**, 1350-1357 (1984).
- 62) Morita I., Chang W.C., Murota S., *Prostaglandins*, **14**, 403-406 (1977).
- 63) Huwyler J., Burgin M., Zeugin T., Gut J., *Mol. Pharmacol.*, **39**, 314-323 (1991).
- 64) Fiedler J., Simon F.R., Iwahashi M., Murphy R.C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **299**, 691-697 (2001).
- 65) Kudo I., Murakami M., Hara S., Inoue K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1170**, 217-231 (1993).
- 66) Goldberg H.J., Viegas M.M., Margolis B.L., Schlessinger J., Skorecki K.L., *Biochem. J.*, **267**, 461-465 (1990).
- 67) Bonventre J.V., Gronich J.H., Nemenoff R.A., *J. Biol. Chem.*, **265**, 4934-4938 (1990).
- 68) Six D.A., Dennis E.A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1488**, 1-19 (2000).
- 69) Murakami M., Shimbara S., Kambe T., Kuwata H., Winstead M.V., Tischfield J.A., Kudo I., *J. Biol. Chem.*, **273**, 14411-14423 (1998).
- 70) Daniels I., Lindsay M.A., Keany C.I.C., Burden R.P., Fletcher J., Haynes A.P. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **5**, 683-689 (1998).
- 71) Husain S. Abdel-Latif A.A., *c* 127-144 (1998).
- 72) Bartoli F., Lin H.K., Ghomashchi F., Gelb M.H., Jain M.K., Apitz-Castro R., *J. Biol. Chem.*, **269**, 15625-15630 (1994).
- 73) Stanford N., Roth G.J., Shen T.Y., Majerus P.W., *Prostaglandins*, **13**, 669-675 (1977).
- 74) Roth G.J., Stanford N., Majerus P.W., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3073-3076 (1975).
- 75) Naito J., Komatsu H., Ujiie A., Hamano S., Kubota T., Tsuboshima M., *Eur. J. Pharmacol.*, **91**, 41-48 (1983).
- 76) Kondo K., Seo R., Omawari N., Imawaka H., Wakitani K., Kira H., Okegawa T., Kawasaki A., *Eur. J. Pharmacol.*, **168**, 193-200 (1989).