

## 原 著 (第14回徳島医学会賞受賞論文)

# ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)における Lysophosphatidylcholine(LPC) 刺激による VEGF レセプターのトランスアクチベーション

藤 田 佳 子<sup>1)</sup>, 吉 栖 正 典<sup>2)</sup>, 井 澤 有 紀<sup>1)</sup>, 兼 松 康 久<sup>1)</sup>,  
玉 置 俊 晃<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部病態情報医学講座情報伝達薬理学分野

<sup>2)</sup> 奈良県立医科大学医学部薬理学講座

(平成17年5月2日受付)

(平成17年5月13日受理)

Lysophosphatidylcholine(LPC)は、動脈硬化発症に関わる酸化LDLの主要構成成分であり、接着分子、ケモカインや活性酸素種産生などさまざまな血管内皮の反応を引き起こすことが知られており<sup>1,2)</sup>、血管の炎症部位や動脈硬化病巣部位に集まっていることが報告されている<sup>3)</sup>。近年、LPCの受容体として、細胞増殖や免疫反応に応答するG2A、GPR4などのGタンパク共役型受容体(GPCR)が報告されている<sup>4,5)</sup>。また、LPCによってmitogen-activated protein(MAP)kinaseが活性化されることも報告されている<sup>6)</sup>。しかしながら、内皮細胞におけるLPCによる細胞内情報伝達機構の詳細は未だ明らかにはなっていない。今回われわれは、LPCによる血管内皮細胞の増殖について、vascular endothelial growth factor(VEGF)受容体の一つfetal liver kinase-1/kinase-insert domain-containing receptor(Fik-1/KDR)の関与(transactivation)とその細胞内分子機構について検討を行った。

### 実験方法

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用い、LPCによって刺激した。Fik-1/KDR活性の測定はFik-1/KDRの抗体を用いて免疫沈降し、リン酸化したチロシン残基特異的抗体4G10を用いたImmune blotにて行った。ERK1/2、Aktの活性化、活性化Srcの測定はphospho-specific抗体を用いたWestern blot法にて行った。細胞の増殖性は、LPC刺激後24時間培養しMTT assayにて評価した。HUVECへの不活性SrcプラスミドのtransfectionはCytoPure-huv Transfection Reagentを用い、transfection 24時間後にアッセイを行った。実験に用いた阻害剤は、

Fik-1/KDR活性化阻害剤としてSU1498、VTKi、ERK1/2の上流にあるMEK1/2の阻害剤としてPD98059、U0126、Srcの活性化阻害剤としてHerbimycin A(HA)、PP2を使用した。

### 結 果

HUVECにおいて、LPCの刺激に応答してFik-1/KDRが活性化された。LPCはFik-1/KDRを10分をピークとして活性化し、それはLPC1μMから20μMまで濃度依存であった。LPCによるFik-1/KDRの活性化は、Fik-1/KDR活性化阻害剤SU1498、VTKiの前処置によって抑制された。また、不活性SrcをtransfectしたHUVECにおいて、LPCによるFik-1/KDRの活性化が抑制され、Src阻害剤でも同様の結果が得られた。さらに、Fik-1/KDRの下流に存在する、ERK1/2、AktもLPCによって活性化された。LPCによって活性化されたERK1/2、Aktは、Fik-1/KDR活性化阻害剤SU1498、VTKi、不活性SrcのtransfectまたSrc阻害剤HA、PP2によって抑制された。これらのことより、HUVECでのLPC刺激によるFik-1/KDRのtransactivationへのc-Src、ERK1/2、Aktの関与が示唆された。

最後に、LPCによるFik-1/KDRのtransactivationを介したHUVECの増殖を確認した。LPCによるHUVECの増殖は、Fik-1/KDR活性化阻害剤SU1498、VTKi、MEK1/2阻害剤PD98059とU0126、Src阻害剤HA、PP2の前処置、不活性Srcのtransfectによって抑制された。以上のことより、c-Srcを介したLPCによるHUVECの増殖にはFik-1/KDRの活性化(transactivation)が関与している可能性が示唆された。

## 考 察

アンジオテンシン II, エンドセリンなどによる GPCR 刺激から, epidermal growth factor 受容体, VEGF 受容体等のチロシンリン酸化型受容体が活性化される transactivation はいくつか報告されている<sup>7,8)</sup>。Transactivation が心肥大やがん, また血管病変に影響を与えていることも報告されている<sup>9,10)</sup>。しかし, 酸化 LDL の主要構成成分である LPC についての transactivation は未だ報告されていない。われわれの今回の検討で, 血管内皮細胞において, LPC 刺激によって VEGF 受容体の一つである Flk-1/KDR が c-Src を介して transactivation を起こすことが明らかとなった。Flk-1/KDR の活性化は下流に存在する Akt, ERK1/2 の活性化を引き起こし, 細胞の遊走, 増殖, 内皮細胞の活性化を引き起こすことが知られている。われわれの結果でも, Flk-1/KDR の活性化に引き続き, ERK1/2, Akt の活性化, HUVEC の増殖が確認された。Flk-1/KDR のリガンドである VEGF による反応とすべて同じ反応を確認することはできなかったが, Flk-1/KDR の活性化, 内皮細胞の活性化が LPC によって引き起こされた (図)。

LPC は酸化 LDL の主要構成成分として, 動脈硬化の

原因の一つとして考えられている。LPC による Src を介した Flk-1/KDR 活性化( transactivation )は, HUVEC の増殖に関与している可能性があり, 内皮細胞活性化に基づく動脈硬化形成初期相に関わっていることが示唆された。

## 文 献

- 1) Kume, N., Cybulsky, M.I., and Gimbrone, M.A., Jr : 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) Kugiyama, K., Sugiyama, S., Ogata, N., Oka, H., *et al.* : Burst production of superoxide anion in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis*, 143 : 201-204, 1999
- 3) Ross, R. : Atherosclerosis an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.*, 340 : 115-126, 1999
- 4) Zhu, K., Baudhuin, L.M., Hong, G., Williams, F.S., *et al.* : Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G protein-coupled receptor GPR 4.

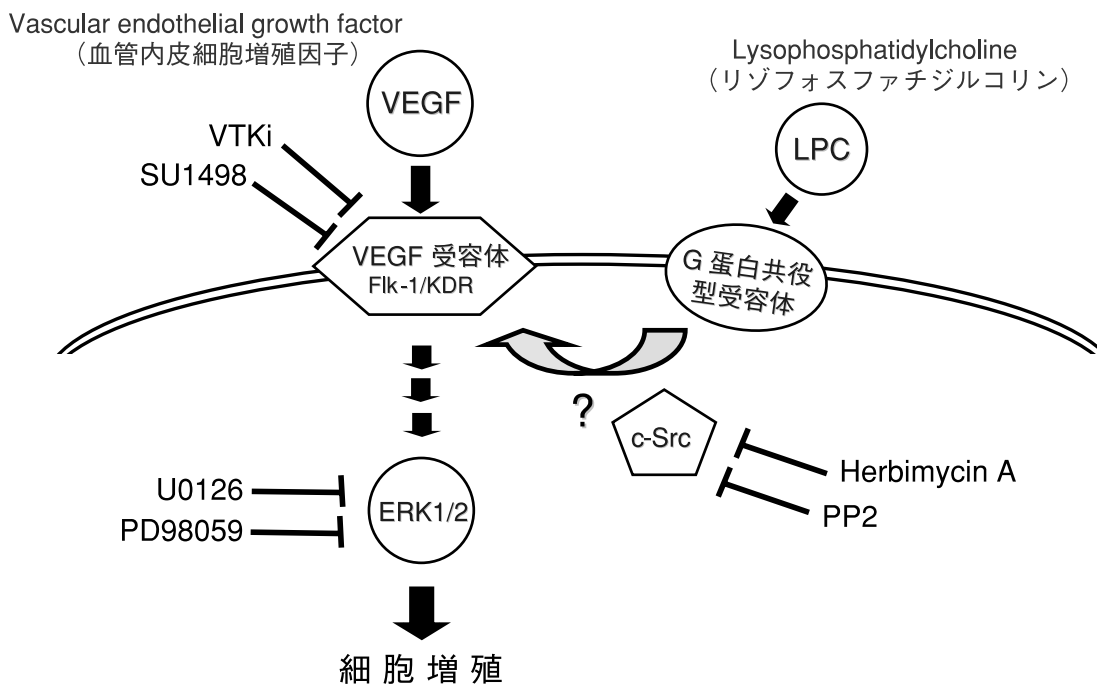


図 HUVEC の増殖を引き起こす c-Src を介した LPC による VEGF レセプターのトランスアクチベーションのシグナル伝達経路

- J. Biol. Chem., 276 : 41325-41335, 2001
- 5 ) Kabarowski, J.H., Xu, Y., and Witte, O.N. : Lysophosphatidylcholine as a ligand for immunoregulation. *Biochem. Pharmacol.*, 64 : 161-167, 2002
- 6 ) Wu, L.W., Mayo, L.D., Dunbar, J.D., Kessler, K.M., *et al.* : Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, 275 : 5096-5103, 2000
- 7 ) Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., *et al.* : EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, 402 : 884-888, 1999
- 8 ) Linseman, D.A., Benjamin, C.W., and Jones, D.A. : Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 270 : 12563-12568, 1995
- 9 ) Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., *et al.* : Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF : metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat. Med.*, 8 : 35-40, 2002
- 10 ) Gschwind, A., Prenzel, N., and Ullrich, A. : Lysophosphatidic acid-induced squamous cell carcinoma cell proliferation and motility involves epidermal growth factor receptor signal transactivation. *Cancer Res.*, 62 : 6329-6336, 2002

## *Lysophosphatidylcholine (LPC) transactivates vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor via c-Src in HUVEC*

*Yoshiko Fujita<sup>1)</sup>, Masanori Yoshizumi<sup>2)</sup>, Yuki Izawa<sup>1)</sup>, Yasuhisa Kanematsu<sup>1)</sup>, and Toshiaki Tamaki<sup>1)</sup>*

<sup>1)</sup> *Department of Pharmacology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan ;*  
*and* <sup>2)</sup> *Department of Pharmacology, Nara Medical University School of Medicine, Nara, Japan*

### SUMMARY

One of the major lipid components of oxidized low density lipoprotein, lysophosphatidylcholine (LPC) is involved in numerous biological processes as a bioactive lipid molecule and has been shown to be involved in the progression of atherosclerosis. As counter-ligands, G2A and GPR4 were identified with high binding affinity for LPC that are belonging to orphan G-protein-coupled receptors (GPCRs) at plasma membranes. Although several GPCR ligands transactivate receptor tyrosine kinases (RTKs) such as epidermal growth factor receptor, transactivation of RTK by LPC has not yet been reported. Here we observed for the first time that LPC treatment induces tyrosyl phosphorylation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (fetal liver kinase-1/kinase-insert domain-containing receptor, Flk-1/KDR) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors, SU1498 and VTKi inhibited Flk-1/KDR transactivation by LPC. Furthermore, we examined the effect of the Src family kinases inhibitors, Herbimycin A and PP2 on LPC-induced Flk-1/KDR transactivation. Herbimycin A and PP2 inhibited Flk-1/KDR transactivation in HUVEC, suggesting that c-Src is involved in LPC-induced Flk-1/KDR transactivation. Kinase-inactive (KI) Src transfection also inhibited LPC-induced Flk-1/KDR transactivation. In addition, LPC activated extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt, which are downstream effectors of Flk-1/KDR, and these were inhibited by SU1498, VTKi, Herbimycin A, PP2 and KI Src transfection in HUVEC. LPC-mediated HUVEC proliferation was shown to be secondary to transactivation because it was suppressed by SU1498, VTKi, Herbimycin A, PP2 and KI Src transfection. It is concluded that c-Src-mediated Flk-1/KDR transactivation by LPC may have important implications for the progression of atherosclerosis.

Key words : LPC, endothelial cells, Flk-1/KDR, c-Src, atherosclerosis