

令和元年6月17日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08496

研究課題名(和文) 血管平滑筋異常収縮シグナル伝達においてカルパインと細胞骨格が果たす役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the involvement of calpain and cytoskeletal proteins in the signal transduction of abnormal vascular smooth muscle contraction

研究代表者

岸 博子 (KISHI, Hiroko)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40359899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：正常血圧の調節を担う血管の正常収縮が細胞質カルシウム濃度の上昇を必要とするカルシウム依存性の収縮であるのに対し、心筋梗塞やくも膜下出血後脳血管攣縮などの急性発症で致死的な虚血性疾患を引き起こす血管の異常収縮は細胞内カルシウム濃度の上昇を伴わずに起こるカルシウム非依存性の収縮である。研究代表者らは異常収縮シグナル伝達におけるカルパインおよび細胞骨格関連蛋白質V1の関与を解明する事を目的に研究を行い、異常収縮刺激時にカルパイン活性が上昇する事、カルパインによるV1の切断部位、および、カルパイン阻害薬が正常収縮に影響を与えずに血管異常収縮を特異的に抑制する事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：血管異常収縮のシグナル伝達機構は正常収縮と異なりカルシウム非依存性であるが詳細は不明であった。本研究は血管異常収縮シグナル伝達において新規の機構を解明したものである。

社会的意義：血管異常収縮が引き起こす心筋梗塞やくも膜下出血後脳血管攣縮はしばしば難治性である。本研究はこれらの疾患の特効薬開発のための新規のターゲットとしてカルパインおよび細胞骨格V1を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Whereas normal vascular contraction which regulates normal blood pressure is cytosolic Ca²⁺-dependent, abnormal vascular contraction which plays a critical role in the pathophysiology of sudden and fatal ischemic diseases such as myocardial infarction and post-SAH cerebral vasospasm, is Ca²⁺-independent, that is, it does not require cytosolic Ca²⁺ elevation. In this research project, we attempted to clarify the involvement of calpain and cytoskeletal proteins in the signal transduction of abnormal vascular smooth muscle contraction. We found that sphingosylphosphorylcholine (SPC) induced calpain activation as well as abnormal contraction in vascular smooth muscle. We also revealed the cleavage site of V1 by calpain using mass spectrometry. Furthermore, we found a calpain inhibitor inhibited abnormal vascular contraction without affecting normal vascular contraction.

研究分野：平滑筋生理学

キーワード：血管平滑筋 異常収縮 細胞骨格 カルパイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管平滑筋異常収縮は、急性発症で致死的な血管攣縮を引き起こす。正常血圧を制御する血管平滑筋正常収縮が細胞質 Ca^{2+} 濃度依存性であるのに対し、血管平滑筋異常収縮は細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇を必要としない Ca^{2+} -sensitization (Ca^{2+} 感受性増強) による収縮である。我々は、血管平滑筋異常収縮に特異的なシグナル伝達経路として、SPC/Fyn/ROK 経路を、世界で初めて明らかにした。更に、focused proteomics の手法により、Fyn 下流の新規異常収縮シグナル分子として、細胞骨格関連分子群を同定し、『血管異常収縮のシグナル伝達は、細胞骨格構築の変化、すなわち、リモデリングによって引き起こされる。』という、全く新しい概念を提唱した。同定した分子群の一つである細胞骨格関連分子 V1 は、SPC 刺激により N 末端が切断・除去される限定分解を受け、蛋白分解酵素であるカルパインの関与が示唆された。しかも、カルパイン阻害薬は、SPC による血管平滑筋異常収縮を抑制した。

2. 研究の目的

上記の研究成果を背景として、本研究では、血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達系におけるカルパインの重要性、および、細胞骨格関連分子 V1 分解断片の、血管平滑筋異常収縮に果たす役割、の 2 点を解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 質量分析による細胞骨格関連分子 V1 のカルパインによる切断部位の決定

SPC 刺激したブタ冠状動脈平滑筋組織の抽出液を電気泳動し、限定分解された V1 断片に相当するバンドを切り出し、プロテアーゼで消化して得られたペプチドを高感度タンデム型質量分析計(研究室現有)で解析した。限定分解で除去された N 末端領域由来のペプチドは質量分析で検出されないことから、V1 のカルパインにより切断される部位を決定した。

(2) 異常収縮刺激におけるブタ冠状動脈平滑筋組織カルパイン活性の経時的変化の解析

ブタ冠状動脈平滑筋組織の抽出液のカルパイン活性を測定し、SPC 刺激によるカルパイン活性の経時的変化を解析した。

(3) 血管平滑筋異常収縮および正常収縮に対するカルパイン阻害薬の抑制効果の検証

予備実験において、カルパイン阻害薬は SPC による血管平滑筋異常収縮を抑制したが、至適濃度や特異性については不明だった。さらにブタ冠状動脈平滑筋組織以外でもカルパイン阻害薬が異常収縮抑制作用を示すかは不明だった。そこで、ブタ冠状動脈平滑筋組織を用い、高カリウム脱分極刺激 (Ca^{2+} 依存性正常収縮)、U46619 刺激 (Ca^{2+} 依存性収縮と Ca^{2+} -sensitization の両方を引き起こす)、SPC 刺激 (Ca^{2+} -sensitization による異常収縮) に対する種々の濃度のカルパイン阻害薬の抑制作用を検討した。更に、マウス脳底動脈平滑筋組織におけるカルパイン阻害薬の異常収縮抑制効果を検証した。

4. 研究成果

(1) 質量分析による細胞骨格関連分子 V1 のカルパインによる切断部位の決定

北九州食肉センターで採取したブタ冠状動脈から中膜平滑筋組織を単離し平滑筋条片を作成した。この平滑筋条片を 37 に加温し 95% O_2 、5% CO_2 を通気した Krebs 液中に 15 分静置した後 30 μ M SPC (Enzo) で 5 分間及び 30 分間刺激し、抽出用バッファーを加え、超音波ホモジナイズして抽出液を作成した。これを SDS-PAGE 後 PVDF 膜に転写し、クマシーブリリアントブルー染色で蛋白質のバンドを可視化した。V1 の全長およびその限定分解断片に相当する分子量のバンドを切り出し(図 1、 ~)、PVDF 膜上のタンパク質を DTT とモノヨード酢酸で還元 S アルキル化後、LysC(和光純薬)で 37 で 18 時間消化し、得られた消化ペプチドを ZipTipC18 で脱塩した。脱塩したペプチドは 2%アセトニトリル/0.1%ギ酸に再溶解後、逆相カラムを接続した nanoLC(DiNa, KYA テクノロジー)に注入し、高感度タンデム型質量分析計 QTRAP4500 で MS/MS 解析してペプチドのアミノ酸配列を決定した。

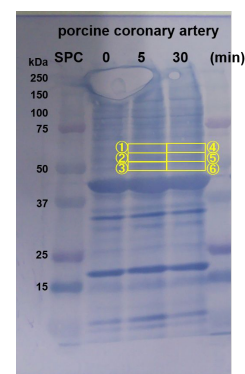


図 1 PVDF 膜に転写したブタ冠状動脈平滑筋組織抽出液の SDS-PAGE 像と切り出したバンドの位置

QTRAP4500 で MS/MS 解析してペプチド

その結果、本来の V1(band に相当)よりも分子量が小さい band から V1 が検出された。更に、この band から、V1 の最も C 末端のペプチドが検出された事から、band は V1 の C 末端側の断片である事が確認出来た。一方で、104 番目のアミノ酸残基より N 末端のペプチドは検出されなかった事から、ブタ冠状動脈平滑筋組織におけるカルパインによる V1 の切断部位は 104 番目のアミノ酸残基より N 末端に位置すると考えられた。(図 2)

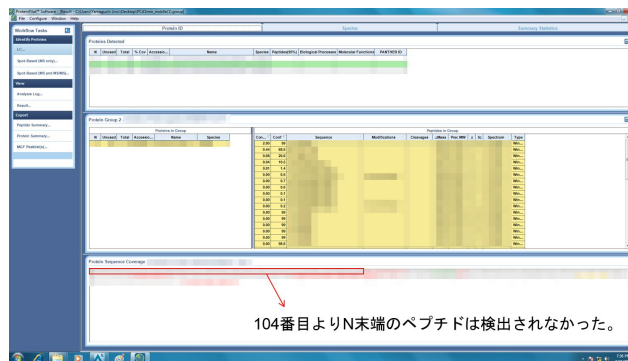


図 2 質量分析による V1 断片の検出

(2) 異常収縮刺激におけるブタ冠状動脈平滑筋組織カルパイン活性の経時的变化の解析

前項と同じ方法でブタ冠状動脈平滑筋組織の抽出液を調製し、カルパイン活性を Calpain Activity Assay Kit (BioVision)を用いて測定した。SPC 刺激していないコントロールを 100% とすると、カルパイン活性は SPC 刺激 5 分後に 114%まで上昇し、30 分後には 98.5%と刺激前とほぼ同じ値に戻った(図 3)。

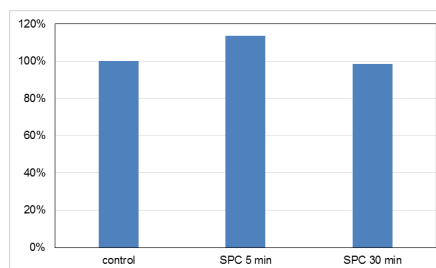


図 3 ブタ冠状動脈平滑筋組織抽出液のカルパイン活性

(3) 血管平滑筋異常収縮および正常収縮に対するカルパイン阻害薬の抑制効果の検証

ブタ冠状動脈平滑筋組織において、カルパイン阻害薬 PD150606(10, 30, 50, 100 μ M)は、SPC 収縮(30 μ M)および U46619 収縮(100 nM)を抑制したが、高カリウム脱分極(118 mM K^+)収縮は抑制しなかった。

マウス脳底動脈血管平滑筋組織において、SPC(10 μ M)は異常収縮を惹起し、カルパイン阻害薬 PD150606(5 μ M)はこれを抑制した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Dietary Adherence, Self-Efficacy, and Health Behavior Change of WASHOKU-modified DASH Diet: A Sub-analysis of the DASH-JUMP Study.
Kawamura A, Inagaki J, Umemoto S, Kajiya K, Kishi H, Mitarai M, Oda H, Kobayashi S.
Current Hypertension Reviews, 2019 Mar 18. 査読有
DOI: 10.2174/1573402115666190318125006. [Epub ahead of print]
2. Add-on therapy with traditional Chinese medicine: An efficacious approach for lipid metabolism disorders.
Ying Zhang, Hiroko Kishi and Sei Kobayashi
Pharmacological Research, 134: 200-211, August 2018. 査読有
DOI: 10.1016/j.phrs.2018.06.004
3. The nutritional characteristics of the hypotensive WASHOKU-modified DASH diet: a sub-analysis of the DASH-JUMP study
Atsuko Kawamura, Katsuko Kajiya, Hiroko Kishi, Junko Inagaki, Makoto Mitarai, Hiroshi Oda, Seiji Umemoto and Sei Kobayashi
Current Hypertension Reviews, Volume14, 2018 Apr 4. 査読有
DOI: 10.2174/1573402114666180405100430
4. Omega-3 and omega-6 DPA equally inhibit the sphingosylphosphorylcholine-induced Ca^{2+} -sensitization of vascular smooth muscle contraction via inhibiting Rho-kinase activation and translocation.
Ying Zhang, Min Zhang, Bochao Lyu, Hiroko Kishi and Sei Kobayashi
Scientific Reports, 7, Article number: 36368, 07 February 2017. 査読有
DOI: 10.1038/srep36368
5. Effects of the DASH-JUMP dietary intervention in Japanese participants with

high-normal blood pressure and stage 1 hypertension: an open-label single-arm trial. Atsuko Kawamura, Katsuko Kajiya, Hiroko Kishi, Junko Inagaki, Makoto Mitarai, Hiroshi Oda, Seiji Umemoto and Sei Kobayashi
Hypertension Research, 39: 777–785, 2016. 査読有
DOI: 10.1038/hr.2016.76

〔学会発表〕(計 24 件)

1. Hiroko Kishi, The involvement of calpain in abnormal vascular smooth muscle contraction induced by SPC and U46619, 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress, 2019 年
2. Ying Zhang, Direct Fyn-paxillin binding controls migration of coronary artery smooth muscle cells, 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress, 2019 年
3. 浅田 充夫、食品から発見された、血管攣縮と癌細胞遊走を同時に抑制可能な新規の水溶性特効薬成分、第 124 回山口大学医学会学術講演会、2019 年
4. 大濱 円奈、癌細胞遊走を制御する新規シグナル分子の分子機構の解明：チロシンリン酸化の重要性、第 124 回山口大学医学会学術講演会、2019 年
5. 張 影、血管平滑筋の Ca^{2+} 非依存性収縮と細胞遊走を制御する新規シグナル分子の同定、筋生理の集い、2018 年
6. 岸 博子、SPC/Fyn/ROK 系による血管平滑筋収縮の Ca^{2+} -sensitization における、カルパインの役割、第 60 回日本平滑筋学会総会、2018 年
7. 張 影、ドコサペンタ塩酸(DPA)は、n-3 と n-6 の両系統とも同じ力価で、Rho キナーゼの細胞内移動と活性化を抑制する事によって血管異常収縮を抑制する、第 60 回日本平滑筋学会総会、2018 年
8. 張 影、活性型 Fyn チロシンキナーゼのパキシリン N 末端への直接結合は血管平滑筋細胞のストレスファイバー形成と細胞遊走を制御する、第 60 回日本平滑筋学会総会、2018 年
9. 浅田充夫、血管攣縮と癌細胞遊走の両方を阻止できる新規の水溶性食品成分の発見、第 60 回日本平滑筋学会総会、2018 年
10. 呂 博超、Compound A suppresses the Fyn/Rho-kinase mediated Ca^{2+} -sensitization of vascular smooth muscle contraction、第 60 回日本平滑筋学会総会、2018 年
11. 張 敏、The novel compound from soybean strongly and selectively inhibits the Rho-kinase-mediated Ca^{2+} -sensitization of vascular smooth muscle contraction、第 60 回日本平滑筋学会総会、2018 年
12. 倉原 琳、エイコサペンタエン酸 (EPA) による肺動脈高血圧病態の改善効果、第 60 回日本平滑筋学会総会、2018 年
13. Hiroko Kishi, The involvement of membrane rafts in the signal transduction of abnormal vascular smooth muscle contraction mediated by SPC/Fyn/ROK pathway: Part II, 第 95 回日本生理学会大会、2018 年
14. Shiori Yokobayashi, Fyn-mediated tyrosine phosphorylation of a novel signaling molecule, paxillin controls stress fiber formation and migration of cancer cells, 第 95 回日本生理学会大会、2018 年
15. Ying Zhang, Omega-3 and omega-6 docosapentaenoic acid (DPA) equally inhibit the Ca^{2+} -sensitization of abnormal vascular contractions via inhibiting the Rho-kinase activation and translocation, 第 95 回日本生理学会大会、2018 年
16. Sei Kobayashi, Pathophysiology of the common signaling pathway regulating vasospasm and cell migration, 第 95 回日本生理学会大会、2018 年
17. 岸 博子、スフィンゴシルホスホリルコリンが誘発する血管平滑筋異常収縮シグナル分子の細胞内局在の変化の検討、第 59 回日本平滑筋学会総会、2017 年
18. 張 影、パキシリンは N 末端と活性型 Fyn との相互作用により血管平滑筋細胞遊走を制御する、第 59 回日本平滑筋学会総会、2017 年
19. 張 敏、The novel compound from soybean strongly and selectively inhibits the Rho-kinase-mediated Ca^{2+} -sensitization of vascular smooth muscle contraction, 第 59 回日本平滑筋学会総会、2017 年
20. Hiroko Kishi, The involvement of membrane rafts in the signal transduction of abnormal vascular smooth muscle contraction mediated by SPC/Fyn/ROK pathway, 第 94 回日本生理学会大会、2017 年
21. Ying Zhang, Paxillin as a novel signaling molecule regulates actin stress fiber formation and migration of vascular smooth muscle cells by its N-terminus binding to

- active Fyn, 第 94 回日本生理学会大会、2017 年
22. Takafumi Okamoto, Tyrosine phosphorylation of paxillin regulates migration and invasion of cancer cells, 第 94 回日本生理学会大会、2017 年
 23. 張 敏、The novel compound from soybean has a strong inhibitory effect on the Rho-kinase-mediated Ca^{2+} -sensitization of vascular smooth muscle contraction, 筋生理の集い、2016 年
 24. Bochao Lyu, Compound X inhibits the ROK-mediated Ca^{2+} -sensitization of vascular smooth muscle contraction induced by a spasmogen, sphingosylphosphorylcholine, 第 68 回日本生理学会中国四国地方会、2016 年

〔図書〕(計 1 件)

Ying Zhang, Hiroko Kishi, Katsuko Kajiya, Tomoka Morita, Sei Kobayashi, Pan Stanford, Muscle Contraction and Cell Motility: Fundamentals and Developments edited by Haruo Sugi, Chapter 13, The pivotal role of cholesterol and membrane lipid rafts in the Ca^{2+} -sensitization of vascular smooth muscle contraction leading to vasospasm, 2016, 454 (333 -342)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：安息香酸誘導体を含む血管攣縮抑制剤、食品及び食品添加剤
発明者：小林 誠、岸 博子、高松 日出子、石川 敦子
権利者：株式会社タカマ、国立大学法人山口大学
種類：特許
番号：特願 2017-237056
出願年：2017 年
国内外の別：国内

取得状況 (計 2 件)

名称：SPC/Fyn/Rho キナーゼシグナル伝達経路の阻害剤
発明者：岸 博子、張 影、小林 誠
権利者：国立大学法人山口大学
種類：特許
番号：特許第 6501353 号
取得年：2019 年
国内外の別：国内

名称：血管弛緩作用を有するペプチド及び血管弛緩剤
発明者：小林 誠、木村 友彦、岸 博子、加治屋 勝子、高田 雄一、白土 絵里
権利者：国立大学法人山口大学、林兼産業株式会社
種類：特許
番号：特許第 6312191 号
取得年：2018 年
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~lily/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小林 誠

ローマ字氏名：(KOBAYASHI, Sei)

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：80225515

研究分担者氏名：張 影

ローマ字氏名：(ZHANG, Ying)

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：講師

研究者番号(8桁): 10711260

研究分担者氏名：森田 知佳

ローマ字氏名：(MORITA, Tomoka)

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：助教

研究者番号(8桁): 70763796

(2)研究協力者

研究協力者氏名：呂 博超

ローマ字氏名：(LYU, Bochao)

研究協力者氏名：張 敏

ローマ字氏名：(ZHANG, Min)

研究協力者氏名：路 倩

ローマ字氏名：(LU, Qian)

研究協力者氏名：李 楠

ローマ字氏名：(LI, Nan)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。