

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590883

研究課題名(和文) 血管病変形成初期における内皮細胞プロテイナーゼ活性化型受容体の役割

研究課題名(英文) Role of endothelial proteinase-activated receptors in the early phase of the development of vascular lesions.

研究代表者

平野 真弓 (HIRANO MAYUMI)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：80336031

研究成果の概要(和文)：動脈硬化初期病変形成の要因となる血管内皮細胞の透過性亢進におけるプロテイナーゼ活性化型受容体(PAR1)の役割を明らかにした。PAR1は、血液凝固因子トロンビンにより活性化され、(1) G蛋白質 $G\alpha_{13}$ を介し、細胞外 Ca^{2+} 非依存性、Rho キナーゼ依存性のミオシン軽鎖二リン酸化を引き起こす経路、(2) G蛋白質 $G\alpha_q$ を介し、 Ca^{2+} 依存性でミオシン軽鎖二リン酸化を伴わない2つのシグナル伝達経路を介して内皮細胞の透過性を亢進させた。

研究成果の概要(英文)：The present study elucidated the role of proteinase-activated receptors (PARs) in the early phase of the development of atherosclerotic vascular lesions. Thrombin increased endothelial permeability by two distinct pathways by activating PAR1; one is mediated by $G\alpha_{13}$, and independent of Ca^{2+} , but dependent of Rho kinase-mediated MLC di-phosphorylation; other is mediated by $G\alpha_q$, and independent of MLC di-phosphorylation, but dependent on Ca^{2+} .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010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：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子血管病態学

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞は、種々の生理活性物質を産生し、血管の恒常性維持や血管緊張調節に関わる。また、内皮細胞は血管内腔を覆い血管壁のバリアーとして血管透過性を調節している。一方、内皮細胞は種々の血管障害因子に曝されると血管保護作用が傷害されるのみならず、内皮細胞は活性化を受ける。その結果、血液凝固系の活性化、炎症細胞の動員、平滑筋の遊走・増殖、血管透過性の亢進など

を引き起こし、動脈硬化の病変形成と病態生理に重要な役割を果たす。

特に血液凝固系は血管壁細胞と相互作用し、血管機能に重大な影響を及ぼす。この凝固系と血管壁細胞の相互作用を仲介するのがプロテイナーゼ活性化型受容体 (proteinase-activated receptor; PAR) である。この受容体は、トロンビンなどの蛋白質分解酵素により細胞外領域が切断され、活性化される特殊な G 蛋白質共役型受容体であり、

4種のサブタイプ (PAR1-4) が同定されている。PARs は、正常血管の内皮細胞に発現し、NO 産生を介して血管弛緩作用や血小板凝集抑制作用を発揮する。一方、内皮細胞を活性化したり、細胞間接触を障害し、血管透過性を亢進させる。しかしながら、動脈硬化初期過程において重要な役割を果たす内皮細胞の活性化や透過性亢進における PARs の役割やメカニズムには不明な点が多い。従って、PARs という新しい視点から、凝固系と血管内皮細胞の相互作用の仕組みを明らかにすることは、動脈硬化病変形成の初期過程を理解し、新たな治療標的を確立する上で重要である。

2. 研究の目的

本研究では、動脈硬化病変形成の初期過程を理解し新たな治療標的の確立を目指すために、PARs を介する、凝固系と血管内皮細胞の相互作用の仕組みを分子レベルで明らかにすることを目的とする。

- (1) PARによる内皮細胞活性化と透過性亢進の分子機構を明らかにする。
- (2) PARの発現調節機構を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) PAR による内皮細胞活性化と透過性亢進の分子機構を明らかにする。
 - ① トロンビンや受容体活性化ペプチドを用いて PAR 刺激した際、発現変化する遺伝子を同定し、そのシグナル伝達を明らかにする。
 - ② 透過性亢進に関わる PAR のサブタイプ、および低分子量 G 蛋白質、接着分子、細胞骨格蛋白質を同定し、そのシグナル伝達経路を明らかにする。
- (2) PAR の発現調節機構を明らかにする。血管病の発症に関わる要因や因子の中で発現変化を引き起こす因子を同定し、そのシグナル伝達機構を明らかにする。

- * 実験には、培養ブタ大動脈内皮細胞を用いた。
- * PARs の活性化には、トロンビンや受容体活性化ペプチド (PAR1:TFLLR, PAR4:AYPGKF) を用いた。
- * 透過性の亢進は、経内皮細胞電気抵抗 (TEER: Transendothelial electric resistance) 測定法で評価した。
- * ミオシン軽鎖リン酸化は、Phos-tag™ 電気泳動法を用いて定量解析を行った。
- * 細胞内 Ca²⁺濃度変化は Fura2 蛍光測定法を用いた。
- * 申請者らが確立したヒト免疫不全ウイルス

ス蛋白質 TAT の細胞侵入性ペプチドを用いて、細胞膜を温存した生理的条件下でシグナル伝達蛋白質やその変異体を直接内皮細胞へ導入した。

4. 研究成果

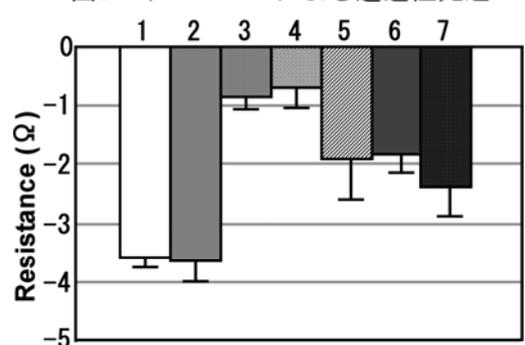
(1) 主な研究成果

本研究では、トロンビンによる透過性亢進に関わる PARs のサブタイプ、および低分子量 G 蛋白質、シグナル伝達分子を同定し、そのシグナル分子機構を明らかにした。

① トロンビンは PAR1 受容体を介して血管内皮細胞の透過性を亢進させた。

コンフルエントに達した血管内皮細胞をトロンビンで刺激し、経内皮細胞電気抵抗 (TEER) 測定法を用いて透過性を評価した。トロンビン刺激直後から濃度依存性に透過性の亢進が認められた。この透過性の亢進は5分後にピークに達し、その後徐々に回復した。この時、抵抗値は刺激前を0とすると5分後には-3.56Ωに低下した。また、PAR1 活性化ペプチドで刺激した際の抵抗値は-3.64Ωで、PAR4 活性化ペプチドでは-0.87Ωを示した (図1)。これらの結果から、トロンビンによる透過性の亢進は、主に PAR1 受容体を介していることが明らかとなった。

図1 トロンビンによる透過性亢進



- ② トロンビンによる透過性の亢進は、G 蛋白質 α サブユニット Gαq、Gα13、Rho キナーゼを介することを明らかにした。

トロンビンの透過性亢進に関わる G 蛋白質 α サブユニットのタイプを明らかにするためにヒト免疫不全ウイルス蛋白質 TAT の細胞侵入性ペプチドを用いて、G 蛋白質 α サブユニットを直接細胞へ導入した。こ

の方法を用いることで遺伝子導入が困難である内皮細胞に迅速、且つ細胞膜を温存した生理的条件下で α サブユニット蛋白質をドミナントネガティブとして導入でき、透過性亢進に対する効果を検討した。その結果、 $G\alpha i$ は透過性亢進を抑制しなかったが、 $G\alpha q$ 、 $G\alpha 13$ は、透過性亢進を一部抑制した。 $G\alpha q$ 薬理的阻害剤(YM254890)や $G\alpha 13$ の下流で働くRhoキナーゼの阻害剤(Y27632)もトロンビンによる透過性亢進を一部抑制した。(図1)。

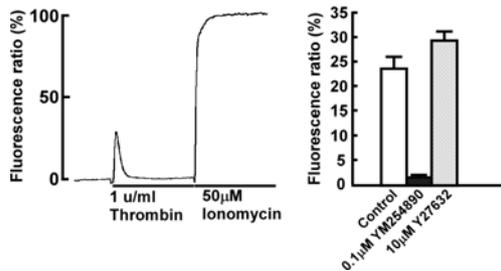
以上の結果から、トロンビンは(i) PAR1— $G\alpha q$ 、(ii) PAR1— $G\alpha 13$ —Rhoキナーゼを介する2つの経路により透過性亢進を引き起こすことが明らかとなった。

次いで、トロンビンによる透過性亢進を引き起こす2つの経路 PAR1— $G\alpha q$ 、PAR1— $G\alpha 13$ —Rhoキナーゼの詳細を明らかにするために細胞内 Ca^{2+} 濃度変化、及び収縮蛋白質ミオシン軽鎖のリン酸化を検討した。

③ トロンビンによる Ca^{2+} 濃度上昇は $G\alpha q$ を介する。

Fura2蛍光測定法を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定した。内皮細胞をトロンビンで刺激すると急速で一過性の Ca^{2+} 濃度上昇が認められた。この上昇は $G\alpha q$ 阻害剤によりほぼ完全に抑制されたが、Rhoキナーゼ阻害剤では抑制されなかった(図2)。

図2 トロンビンによる Ca^{2+} 濃度上昇

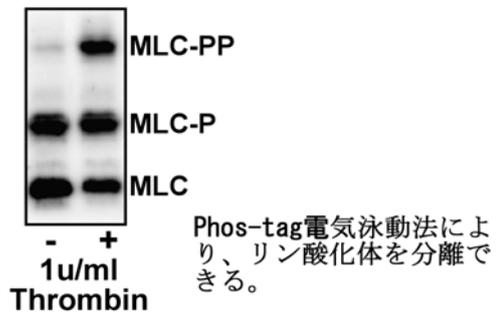


④ Phos-tag™ 技術を用いたミオシン軽鎖リン酸化の新たな定量法を開発した。

従来、MLCのリン酸化は、尿素グリセロール電気泳動法やリン酸化特異抗体を用いたウェスタンブロット法で検出を行っていたが、Phos-tag™ 技術(リン酸基と特異的に結合する化合物 Phos-tag を含むポリアクリルアミドゲルにおいて、リン酸化蛋白質は非リン酸化蛋白質と比べ移動度が遅くなる。)を用い、簡便にミオシン軽鎖のリン酸化を定量解析する新たな方法(Phos-tag™ 電気泳動法)を開発した。この方法により、総ミオシン軽鎖の中に占める1リン酸化と2リン酸化の

定量解析が可能となり、それぞれの機能解析を行うことが初めて可能となった(図3)。

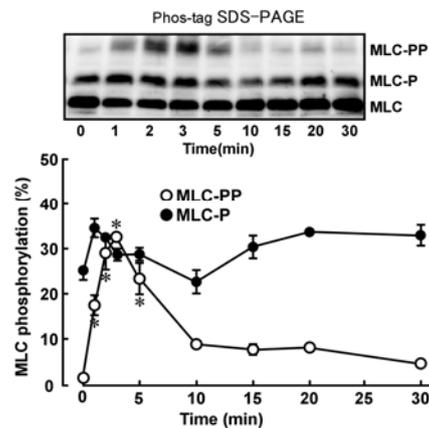
図3 Phos-tag™ 電気泳動法



⑤ トロンビンは、一過性のミオシン軽鎖の二リン酸化を引き起こすが、一リン酸化は有意な変化を示さないことを明らかにした。

Phos-tag™ 電気泳動法を用いて解析すると、ミオシン軽鎖のリン酸化は、トロンビン刺激前に比べて、一リン酸化は、有意な変化は認められなかったが、二リン酸化は、3分後をピークとする一過性の上昇を示した。(図4)。

図4 トロンビンによるミオシン軽鎖リン酸化

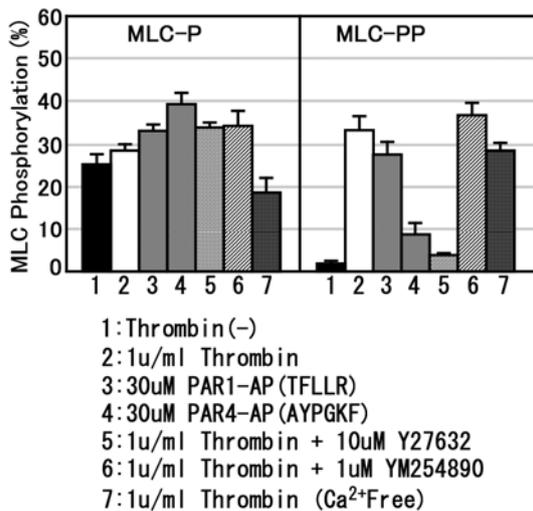


⑥ トロンビンによるミオシン軽鎖二リン酸化は、PAR1及びRhoキナーゼを介するが、細胞外 Ca^{2+} やG蛋白質 $G\alpha q$ に依存しないことを明らかにした。

トロンビン刺激3分後を比較すると、PAR1活性化ペプチドはトロンビンと同等の二リン酸化の増加を示したが、PAR4活性化ペプチドでは二リン酸化の増加はわずかであった。Rhoキナーゼ阻害剤は、ミオシン軽鎖一リン酸化には影響を与えなかったが、二リン酸化をほぼ完全に抑制した。 $G\alpha q$ 阻害剤は、ミオシン軽鎖一リン酸化および二リン酸化の抑制効果はなかった。細

胞外 Ca^{2+} を除去すると、ミオシン軽鎖リン酸化は抑制されたが、二リン酸化は影響を受けなかった (図5)。

図5 ミオシン軽鎖リン酸化 (刺激3分後)

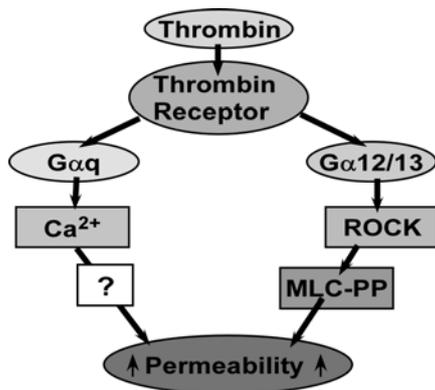


まとめ

トロンビン刺激すると、主に PAR1 を介して急速で一過性の Ca^{2+} 濃度上昇、ミオシン軽鎖の二リン酸化、および透過性亢進を生じることを明らかにした。

さらにトロンビンが、2つの経路を介して内皮細胞の透過性を亢進させることを明らかにした。

- (i) $G\alpha_{13}$ 、 Ca^{2+} 非依存性、Rho キナーゼ依存性のミオシン軽鎖の二リン酸化を伴う経路
- (ii) $G\alpha_q$ 、 Ca^{2+} 依存性でミオシン軽鎖二リン酸化を伴わない経路



(2) 国内外における位置づけとインパクト
 動脈硬化初期病変形成において内皮細胞の透過性亢進が重要な役割を果たす。中でも血液凝固因子であるトロンビンが透過性亢進を引き起こす現象はすでに知られていた。また昨今、トロンビンなどのプロテナーゼによって活性化される受容体が明らかとなったが、その詳細は不明であった。

本研究は、トロンビンが引き起こす透過性亢進に関わる受容体を特定し、そのシグナル伝達経路を初めて明らかにした。このことは、動脈硬化初期の病変形成の過程を理解するうえで非常に重要な成果となる。さらにこのシグナル伝達経路に関わる分子を標的とした新たな治療法の開発に貢献できる研究である。

(3) 今後の展望

PARs は、炎症や酸化ストレスなどにより発現亢進や活性制御異常が認められる。一方、生活習慣病や喫煙、炎症、酸化ストレスなどの動脈硬化危険因子が内皮細胞を活性化し、病変の形成初期や進展に重要な役割を果たすことが知られている。したがって PARs が生活習慣病と動脈硬化をつなぐ分子として働いていることが推察される。今後、様々な動脈硬化危険因子による病変形成初期におけるプロテナーゼ活性化型受容体 (PARs) の役割を明らかにしたい。

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7件)

- ① Kameda K, Kikkawa Y, Hirano M, Matsuo S, Sasaki T, Hirano K, Combined argatroban and anti-oxidative agents prevents increased vascular contractility to thrombin and other ligands after subarachnoid hemorrhage. *Br J Pharmacol* (in press)2011 査読あり
- ② Maki J, Hirano M, Hoka S, Kanaide H, Hirano K, Thrombin activation of proteinase-activated receptor 1 potentiates the myofilament Ca^{2+} -sensitivity and induces vasoconstriction in porcine pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 159; 919-927, 2010 査読あり

- ③ Aman M, Hirano M, Kanaide H, Hirano K
Up-regulation of proteinase-activated
receptor-2 and increased response to
trypsin in endothelial cells after
exposure to oxidative stress in rat
aortas. *J Vasc Res* 47; 494-506, 2010
査読あり
- ④ Kikkawa Y, Kameda K, Hirano M, Sasaki T,
Hirano K, Impaired Feedback regulation of
the receptor activity and the
myofilament Ca²⁺ sensitivity
contributes to increased vascular
reactiveness after subarachnoid
hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*
30; 1637-1650, 2010 査読あり
- ⑤ Maki J, Hirano M, Hoka S, Kanaide H,
Hirano K, Involvement of reactive
oxygen species in the thrombin-induced
pulmonary vasoconstriction. *Am J
Resp Crit Care Med* 182; 1435-1444, 2010
査読あり
- ⑥ Maeda Y, Hirano K, Hirano M, Kikkawa Y,
Kameda K, Sasaki T, Kanaide H,
Enhanced contractile response of the
basilar artery to platelet-derived
growth factor in subarachnoid
hemorrhage. *Stroke* 40, 591-596, 2009
査読あり
- ⑦ Hirano K, Hirano M, Hanada A
Involvement of STIM1 in the
proteinase-activated receptor
1-mediated Ca²⁺ influx in vascular
endothelial cells. *J Cell Biochem* 108;
499-507, 2009 査読あり

[学会発表] (計6件)

- ① 平野真弓、平野勝也
Thrombin causes barrier dysfunction via
two distinct signal transduction
pathways in vascular endothelial cells
第84回日本薬理学会年会 2011.3.22 (誌
上開催)
- ② 平野真弓、花田亜希子、平野勝也
Involvement of two signaling pathways
in the thrombin-induced barrier
dysfunction in vascular endothelial
cells. 第63回日本薬理学会西南部会
(合同開催第20回日韓薬理学合同セミナー)
2010.11.26 (鹿児島)
- ③ 平野真弓、平野勝也
Differential regulation of the
thrombin-induced mono- and
di-phosphorylation of myosin light
chain in vascular endothelial cells
内皮細胞においてトロンビンが引き起こ
すミオシン軽鎖の1リン酸化と2リン酸化

は異なる制御を受ける。
第83回日本薬理学会年 2010.3.16-18
(大阪)

- ④ Hirano M, Hirano K
Phos-tag™ SDS-PAGE analysis revealed
differential requirement of Ca²⁺ source
for the thrombin-induced mono- and
di-phosphorylation of myosin light
chain in vascular endothelial cells.
International symposium of smooth
muscle research “Post-genomic
advances in the physiology of smooth
muscle”, Satellite Symposium of the
International Union of Physiological
Society World Congress 2009
2009.7.23 (名古屋)
- ⑤ 平野真弓、平野勝也
A new method for analyzing myosin light
chain phosphorylation with a
Phos-tag™ technology. Phos-tag™技術
を用いたミオシン軽鎖リン酸化の新たな
定量解析法第82回日本薬理学会年会
2009.3.16-18(横浜)
- ⑥ 平野真弓、平野勝也
トロンビンが引き起こす血管内皮細胞の
Ca²⁺流入におけるSTIM1の関与トランスポ
ーターワークショップIN福岡2008.11.2
(福岡)

[その他]

ホームページ等

九州大学・大学院医学研究院・附属心臓血
管研究施設・分子細胞情報学部門
<http://www.molcar.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 真弓 (HIRANO MAYUMI)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：80336031

(2) 研究分担者

平野 勝也 (HIRANO KATSUYA)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：80291516