

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06782

研究課題名（和文）新規に同定した細胞接着斑分子paxillinが血管攣縮を制御するメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism by which paxillin controls vascular abnormal contraction

研究代表者

張 影（ZHANG, YING）

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：10711260

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：血管平滑筋の異常収縮である血管攣縮は、心筋梗塞、脳梗塞などの急性発症で重篤な血管病を引き起こし、突然死の主因であり、根本的な治療法が見つかっていない。本研究では、異常収縮刺激時活性化されたFynによりPaxillinが真にチロシンリン酸化されるかに注目し、活性化されたFynによるPaxillinのチロシンリン酸化部位を同定した。更に同定したPaxillinのチロシンリン酸化部位が血管攣縮に果たす役割について、細胞レベルで検証した。本研究により新規血管攣縮制御機構が解明され、全く新しい治療法開発の基盤となる事が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、PaxillinのTyr31のリン酸化はSPCによる血管平滑筋の異常収縮を制御する可能性が高いと示唆された。本研究により新規血管攣縮制御機構が解明され、全く新しい治療法開発の基盤となる事が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Vasospasm, which is abnormal contraction of vascular smooth muscle, causes acute and serious vascular diseases such as myocardial infarction and cerebral infarction, and is the main cause of sudden death, for which no fundamental treatment has been found. In this study, we focused on whether paxillin is phosphorylated by the activated Fyn during stimulation of abnormal contractions, and which tyrosine site of paxillin is phosphorylated by the activated Fyn. Furthermore, we verified the role of the identified tyrosine phosphorylation site of paxillin in vasospasm at the cellular level. This research will elucidate a new vasospasm control mechanism and is expected to serve as the basis for the development of completely new treatments.

研究分野：医学

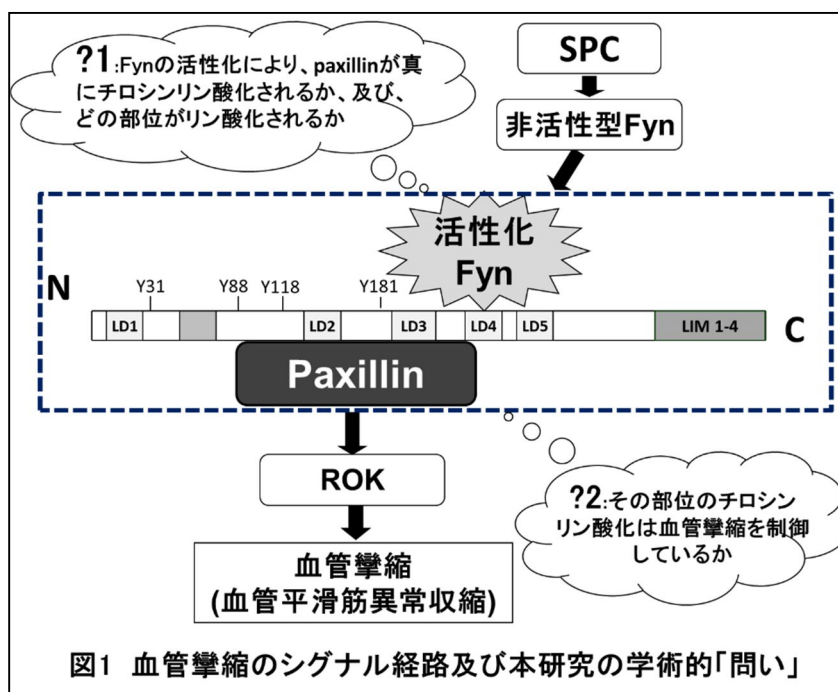
キーワード：血管病 異常収縮 Paxillin Fyn

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心疾患や脳血管疾患に代表される「血管病」は、日本における死亡原因において1位の悪性新生物に次ぐ2位となっている。血管病の原因解明と治療法開発が急務である。中でも、血管攣縮は、心筋梗塞、脳梗塞などの急性発症で重篤な血管病を突発的に引き起こし、突然死の主因として恐れられているにも関わらず、根本的な治療法が見つかっていない。正常血圧維持を担う血管の正常収縮は、細胞質  $Ca^{2+}$  濃度により制御されるのに対して、血管攣縮は、Rho キナーゼを介した  $Ca^{2+}$  濃度に依存しない血管平滑筋の異常収縮による事が知られている。しかし、Rho キナーゼを活性化して異常収縮を引き起こす原因分子が不明であるため、血管攣縮の従来の治療としては、止むを得ず、原因の分かっている正常収縮を阻害する  $Ca^{2+}$  拮抗薬などが使用され、その結果、難治例や副作用としての低血圧などを生じてきた。実際の医療現場は、くも膜下出血後の脳血管攣縮のように『発症を予測していても対応策がなく患者さんの命を救えない』という悲惨な現状にある。血管攣縮を抑制する特效薬を開発するため、その原因分子の同定とシグナル伝達機構を解明し、血管攣縮の治療標的分子を見出す事が必須である。

我々は、Rho キナーゼを活性化する血管平滑筋異常収縮の原因分子として、スフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)を発見した。更に、SPC の下流シグナル経路についても検討し、Src ファミリーチロシンキナーゼを見出し、中でもヒトで9種類報告されているファミリータンパクの中で、Fyn のみが血管平滑筋異常収縮に関与する事を証明した。そこで、『SPC Fyn Rho キナーゼ』シグナル経路を発見した。しかし、Fyn は直接 Rho キナーゼを活性化できないため、Fyn 下流の新規シグナル分子を探索したところ、プルダウンアッセイと機能プロテオミクスにより、細胞接着斑タンパク質 Paxillin を同定した。更に、活性化した Fyn は Paxillin の N 末端と相互作用することを見出した(図1)。しかし、新規に発見した細胞接着斑分子である Paxillin は血管攣縮のシグナル経路において、真の中間制御分子ではないか、また Paxillin はどのように血管攣縮を制御しているかについて検討した。更に、チロシンキナーゼである Fyn は Paxillin と結合すると、Paxillin のチロシンがリン酸化されて、血管攣縮に重要な役割を果たすと考えられるものの、異常収縮刺激時に活性化された Fyn により Paxillin が真にチロシンリン酸化されるかについては、依然未解明である。



### 2. 研究の目的

血管攣縮の病的シグナル『SPC Fyn Rho キナーゼ』経路の中、Fyn と Rho キナーゼの間の分子機構は不明のままである。我々は細胞接着斑分子である Paxillin は Fyn 下流の新規シグナル分子として発見した。更に細胞、組織、生体レベルで、特に Paxillin ノックアウトマウス作成の実験系を構築して *in vivo* で新規に発見した細胞接着斑分子である Paxillin と血管攣縮との関連を全面解明するという研究を行った。チロシンキナーゼである Fyn は Paxillin と結合すると、Paxillin のチロシンがリン酸化されるか不明である。そこで、本研究では、(1) 活性化された Fyn による Paxillin のチロシンリン酸化部位を同定する。(2) 同定した Paxillin のチロシンリン酸化部位が血管攣縮に果たす役割について検討する。

### 3. 研究の方法

本研究では、血管平滑筋異常収縮刺激時、Fyn の活性化による Paxillin のチロシンリン酸化部位の同定、および、そのリン酸化が血管異常収縮に果たす役割を解明するため、下記の実験を行った。

(1) ブタ冠状動脈平滑筋組織及びヒト冠状動脈平滑筋細胞に、SPC を処置し、抗リン酸化 Paxillin 抗体を用いたウェスタンブロット解析によって、Paxillin のチロシンリン酸化の変化を調べた。

(2) HaloTag-Fyn の活性型、非活性型及び野生型ベクターをヒト冠状動脈平滑筋細胞に導入し、過剰発現させて、72 時間後に活性型、非活性型及び野生型 Fyn の過剰発現が、Paxillin のチロシンリン酸化に与える影響について、抗リン酸化 Paxillin 抗体を用いたウェスタンブロットを解析した。

(3) Fyn siRNA をヒト冠状動脈平滑筋細胞内に導入し、Fyn のノックダウンが Paxillin のチロシンリン酸化に与える影響を調べた。

(4) 同定した Paxillin のチロシンリン酸化部位を変異させ、リン酸化できないようにした変異体作成し、ヒト冠状動脈平滑筋細胞に導入して、SPC により異常収縮刺激し、細胞の収縮を抑えるかを研究室現有のタイムラプス顕微鏡を用いて検討した。

### 4. 研究成果

(1) ブタ冠状動脈平滑筋組織を、SPC により異常収縮刺激し、既知 Paxillin N 末端にある 4 か所部位のチロシンリン酸化 (Tyr31、 Tyr88、 Try118 と Try181) の変化を調べた。結果により、SPC の刺激で Paxillin の Tyr31 のリン酸化が増加したことが分かった。

(2) ヒト冠状動脈平滑筋細胞を、SPC により異常収縮刺激し、既知 Paxillin N 末端にある 4 か所部位のチロシンリン酸化 (Tyr31、 Tyr88、 Try118 と Try181) の変化を調べた。結果により、SPC の刺激で Paxillin の Tyr31 のリン酸化が増加したことが分かった。

(3) Fyn siRNA を用いて、ヒト冠状動脈平滑筋細胞に導入して、Fyn のノックダウンが Paxillin N 末端にある 4 か所部位のチロシンリン酸化 (Tyr31、 Tyr88、 Try118 と Try181) に与える影響を調べたところ、Paxillin の Tyr31 のリン酸化が減少したことが分かった。

(4) 既知 Paxillin N 末端にある 4 か所部位 (Tyr31、 Tyr88、 Try118 と Try181) のチロシンリン酸化変異プラスミドを作成した。

(5) Paxillin の Tyr31 変異プラスミドをヒト冠状動脈平滑筋細胞にトランスファクションした。その後、異常収縮の刺激因子である SPC で刺激して、細胞の収縮をリアルタイムで観察し、記録した。結果により、control 細胞では、SPC の刺激で収縮した。一方、Paxillin の Tyr31 変異プラスミドを過剰発現した細胞では SPC の刺激より、誘発した収縮が抑制された。

以上の結果より、Paxillin の Tyr31 のリン酸化は SPC による血管平滑筋の異常収縮を制御する可能性が高いと示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nan Li, Ying Zhang, Tomoka Morita, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi.	4. 巻 149
2. 論文標題 Inhibitory mechanism of tangeretin, a citrus flavone on the sphingosylphosphorylcholine (SPC)-induced vascular smooth muscle contraction.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 189-197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2022.05.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Qian Lu, Hiroko Kishi, Ying Zhang, Tomoka Morita, Sei Kobayashi.	4. 巻 79
2. 論文標題 Hesperetin Inhibits Sphingosylphosphorylcholine-Induced Vascular Smooth Muscle Contraction by Regulating the Fyn/Rho-Kinase Pathway.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cardiovascular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 456-466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/FJC.0000000000001210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ying Zhang, Qian Lu, Nan Li, Ming Xu, Tatsuo Miyamoto, Jing Liu	4. 巻 8
2. 論文標題 Sulforaphane suppresses metastasis of triple-negative breast cancer cells by targeting the RAF/MEK/ERK pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41523-022-00402-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ying Zhang, Hiroko Kishi, Tomoka Morita, Sei Kobayashi	4. 巻 35
2. 論文標題 Paxillin controls actin stress fiber formation and migration of vascular smooth muscle cells by directly binding to the active Fyn	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101035RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Ying, Li Nan, Kobayashi Sei	4. 巻 22
2. 論文標題 Paxillin participates in the sphingosylphosphorylcholine-induced abnormal contraction of vascular smooth muscle by regulating Rho-kinase activation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 1404-1404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-023-01404-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Huanyu Zheng , Ryouichi Tsunedomi , Ming Xu , Ying Zhang , Hiroko Kishi , Sei Kobayashi , Shinobu Tomochika , Masao Nakajima , Hiroto Matsui , Yukio Tokumitsu , Yoshitaro Shindo , Michihisa Iida , Tatsuya Ioka , Hiroaki Nagano	4. 巻 44
2. 論文標題 Effect of Paxillin Expression and Phosphorylation on Colorectal Cancer Prognosis and Metastasis.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 511-520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16839.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Ying, Zheng Huanyu, Xu Ming, Maeda Noriko, Tsunedomi Ryouichi, Kishi Hiroko, Nagano Hiroaki, Kobayashi Sei	4. 巻 24
2. 論文標題 Fyn-Mediated Paxillin Tyrosine 31 Phosphorylation Regulates Migration and Invasion of Breast Cancer Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15980 ~ 15980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242115980	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 張 影、森田 知佳、小林 誠、岸 博子、宮本 達雄
2. 発表標題 Paxillinは活性型Fynに直接結合することにより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
3. 学会等名 第64回日本平滑筋学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸 博子、路 倩、森田 知佳、張 影、李 楠、小林 誠
2. 発表標題 血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達における中間径フィラメントピメンチン断片化の役割の解明
3. 学会等名 第 6 4 回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張 影、呂 博超、森田 知佳、岸 博子、路 倩、李 楠、小林 誠
2. 発表標題 異常収縮刺激時Fynの活性化によるpaxillinのチロシンリン酸化について
3. 学会等名 第 6 3回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸 博子、路 倩、森田 知佳、張 影、呂 博超、李 楠、小林 誠
2. 発表標題 血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達におけるカルパインの役割の解明
3. 学会等名 第 6 3回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田 知佳、張 影、岸 博子、小林 誠
2. 発表標題 Fyn KOマウスの脳底動脈と前腸間膜動脈のスフィンゴシルホスホリルコリンに対する反応性について
3. 学会等名 第 6 3回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nan Li, Ying Zhang, Hiroko Kishi, Tomoka Morita, Bochao Lyu, Sei Kobayashi.
2. 発表標題 Specific inhibitory effects of compound T, upon pre- or post-treated, on the sphingosylphosphorylcholine (SPC)-induced Ca <sup>2+</sup> -sensitization of vascular smooth muscle contraction through suppressing the Fyn/Rho-kinase signaling pathway, without affecting Ca <sup>2+</sup> -dependent contraction
3. 学会等名 第63回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平石敬三、倉原琳、張影、山村彩、井上隆司、平野勝也
2. 発表標題 エイコサペンタエン酸によるチロシンキナーゼFynを介した肺高血圧症改善効果に関する研究
3. 学会等名 第63回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ying Zhang, Qian Lu, Nan Li, Ming Xu, Tatsuo Miyamoto, Jing Liu
2. 発表標題 Sulforaphane suppresses metastasis of triple-negative breast cancer cells by targeting the RAF/MEK/ERK pathway to inhibit actin stress fiber formation
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岸 博子  (Kishi Hiroko)  (40359899)	山口大学・大学院医学系研究科・准教授    (15501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森田 知佳  (Morita Tomoka)  (70763796)	山口大学・大学院医学系研究科・助教   (15501)	削除2022年9月30日
研究分担者	小林 誠  (Kobayashi Sei)  (80225515)	山口大学・大学院医学系研究科・教授   (15501)	削除2022年6月10日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------