

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670271

研究課題名(和文) トロンビン受容体を標的とする核心的脳血管攣縮治療法の開発

研究課題名(英文) Development of innovative and ultimate strategies for the treatment of cerebral vasospasms with thrombin receptor as a therapeutic target

研究代表者

平野 勝也 (Hirano, Katsuya)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：80291516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管攣縮は、くも膜下出血患者に遅発性に発症し、生命及び神経学的予後を左右する重篤な合併症である。従来にはない視点から攣縮機序の核心に迫り、トロンビン受容体を標的とした新たな治療法を確立することを目指して研究を行った。その結果、本研究では、攣縮発症に基盤となる、トロンビン受容体の脱感作障害、トロンビンによる内皮バリアー障害、トロンビンが引き起こす貯蔵部作動性カルシウム流入の機序について明らかにした。本研究成果により新たな脳血管攣縮治療法開発の基盤が整った。

研究成果の概要(英文)：Cerebral vasospasm is one of critical complications that develop after subarachnoid hemorrhage and influence vital and neurologic prognosis of the patients. The present study aims to develop innovative and ultimate strategies for the treatment of cerebral vasospasm with thrombin receptor as a therapeutic target, based on the understanding of the central mechanism of pathogenesis of vasospasm. As a result, the present research elucidated the mechanisms underlying (1) impairment of desensitization of thrombin receptor PAR1, (2) thrombin-induced endothelial barrier disruption and (3) thrombin-induced store-operated calcium influx. All these aspects play a critical role for the development of cerebral vasospasm. The findings of the present study therefore consolidated the basis for the development of a novel therapeutic strategy with PAR1 as a therapeutic target for the prevention and treatment of cerebral vasospasm.

研究分野：分子血管病態学、細胞内シグナル伝達、循環生理学

キーワード：トロンビン 受容体 脱感作障害 内皮バリアー機能 ミオシン軽鎖リン酸化 細胞内カルシウムシグナル 蛋白質リン酸化 活性酸素

### 1. 研究開始当初の背景

脳血管攣縮は、くも膜下出血患者の70%以上に遅発性に発症し、生命及び神経学的長期予後を左右する重篤な合併症である。攣縮誘発因子の増加と血管収縮性の亢進が、攣縮発症に重要な役割を果たすと考えられている。多種多様な物質が攣縮誘発因子として報告されているが、どの因子が重要な役割を果たすのか、遅発性発症をどう説明するのかについて疑問が残る。一方、血管収縮性の亢進は、遅発性発症を説明できるが、その機序には不明な点が多い。また、現行の薬物治療(Ca<sup>2+</sup>拮抗薬、エンドセリン受容体拮抗薬、スタチン、硫酸Mg、Rhoキナーゼ阻害剤、TXA<sub>2</sub>合成阻害剤、PDE3阻害剤、ラジカル除去剤など)では、攣縮予防は不十分である。

### 2. 研究の目的

研究代表者がこれまでに行ってきた研究成果から、攣縮発症機序におけるトロンビン受容体 PAR<sub>1</sub> の重要性が示唆された。すなわち、くも膜下出血後に PAR<sub>1</sub> の「発現亢進」と「脱感作障害」が生じ、その結果、脳血管はトロンビンに対する収縮反応性を獲得し、不可逆的収縮を引き起こされるとする仮説である。これは、①脳血管攣縮の特徴である不可逆的収縮を説明する点、②出血から攣縮の遅発性発症までを包括的に説明する点で、攣縮発症の核心に迫る機序と考えられ、PAR<sub>1</sub> は攣縮治療の核心的な治療標的として期待される。

本研究は上記仮説を証明し、新たな攣縮治療法の開発を目指す。そのため、PAR<sub>1</sub> の「発現亢進」と「脱感作障害」の分子機構を明らかにする。PAR<sub>1</sub> の「不可逆的活性」を阻害するインバーサゴニストを探索する。PAR<sub>1</sub> を標的とする新たな攣縮治療法を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培養細胞実験：

① 血管平滑筋細胞 A7r5 を用いて、Fura-2 蛍光測定法によりトロンビン受容体刺激が引き起こすカルシウム濃度上昇反応を観察する。この反応指標に、受容体の脱感作障害を評価するとともに、脱感作障害を回復させる薬物を探索し、その機序を明らかにする。

② 培養内皮細胞を用いて、トロンビンが引き起こす内皮バリアー障害の機序を明らかにする。内皮バリアー機能は、経内皮細胞電気抵抗の測定により評価する。バリアー障害の細胞内機序としてミオシン軽鎖リン酸化を、Phos-tag SDS-PAGE 法により1リン酸化と2リン酸化(pMLC、ppMLC)に分けて定量解析する。pMLC、ppMLC およびアクチン線維の局在を蛍光染色法により評価する。

③ 培養内皮細胞を用いて、カルシウム再添加プロトコルにより、小胞体カルシウムの枯渇に伴う貯蔵部作動性カルシウム流入を評価する。小胞体カルシウムセンサー蛋白質 STIM1 のリン酸化を Phos-tag SDS-PAGE

法により解析する。その機能的意義を明らかにするために、リン酸化部位変異体を HeLa 細胞に発現させ、カルシウム流入に及ぼす影響を検証する。

④ トロンビン受容体の発現調節機構に関して、プロモーター解析、シグナル伝達解析により分子機構を明らかにする。

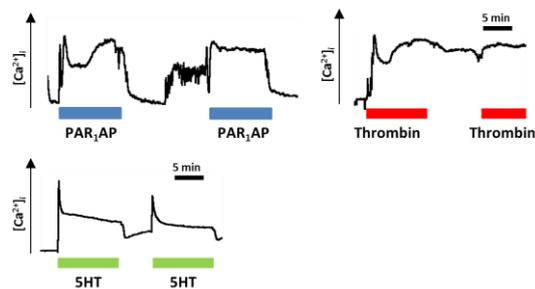
(2) モデル動物実験：培養細胞実験で明らかとなる分子の生体における役割、治療標的としての有効性を検証し、新規治療法を開発する。PAR<sub>1</sub> 発現亢進と脱感作障害の同時阻害、あるいは、不可逆的活性を有する PAR<sub>1</sub> の阻害による攣縮治療戦略の有効性を検証する。

(3) 治療薬物の探索：不可逆的に活性された PAR<sub>1</sub> を阻害するインバーサゴニストのスクリーニングに必要なアッセイ系を確立し、化合物ライブラリーの探索を行い、候補化合物を同定する。

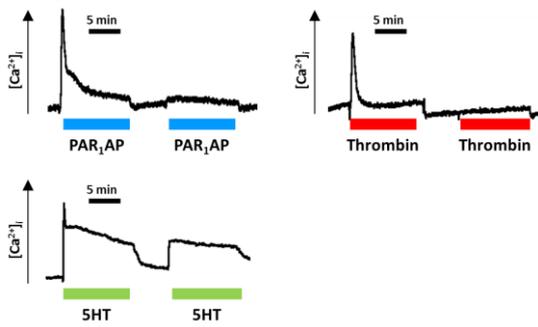
### 4. 研究成果

(1) 血管平滑筋細胞における PAR<sub>1</sub> 脱感作障害に活性酸素と蛋白質リン酸化酵素 ERK が関与することを、培養平滑筋細胞 A7r5 を用いて明らかにした。

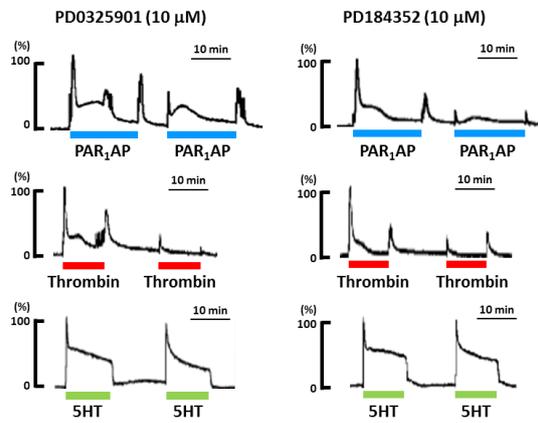
① A7r5 細胞において、トロンビン(Thrombin) および PAR<sub>1</sub> 活性化ペプチド(PAR<sub>1</sub>AP) は持続的な細胞質カルシウム濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 上昇反応を引き起こした。1回目の刺激の後、2回目の PAR<sub>1</sub>AP 刺激を行うと1回目と同程度の反応が認められた。トロンビンが引き起こす反応はトロンビンを除去しても不可逆的に持続した。この現象は、A7r5 細胞において PAR<sub>1</sub> の脱感作機構が障害されていることを示す。一方、セロトニン(5HT) のカルシウム濃度上昇反応も PAR<sub>1</sub>AP と同様の特徴を示した。(下図)



② NADPH オキシダーゼ阻害剤 diphenyleneiodonium chloride (DPI) 存在下に7日間培養した A7r5 細胞では、PAR<sub>1</sub>AP、トロンビンのいずれに対する[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇反応も一過性の反応となり、PAR<sub>1</sub>AP による2回目の反応性は著しく減弱し、トロンビンの反応も可逆的となった。これに対し、DPI はセロトニンの反応性には影響を与えなかった。PAR<sub>1</sub> の脱感作障害には活性酸素が関与することが明らかとなった。(次頁図)



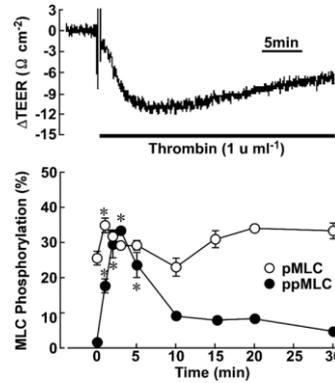
③ ERK1/2 阻害剤 PD0325901 および PD184352 存在下に、PAR<sub>1</sub>AP およびトロンビン刺激を行うと、いずれの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇反応も、DPI 処理の場合と同様に、一過性の反応となり、PAR<sub>1</sub>AP による 2 回目の反応性は消失し、トロンビンの反応は可逆的となった。一方、セロトニンの反応は影響を受けなかった。PAR<sub>1</sub> の脱感作障害に ERK1/2 を介した蛋白質リン酸化反応に関わることが明らかとなった。(下図)



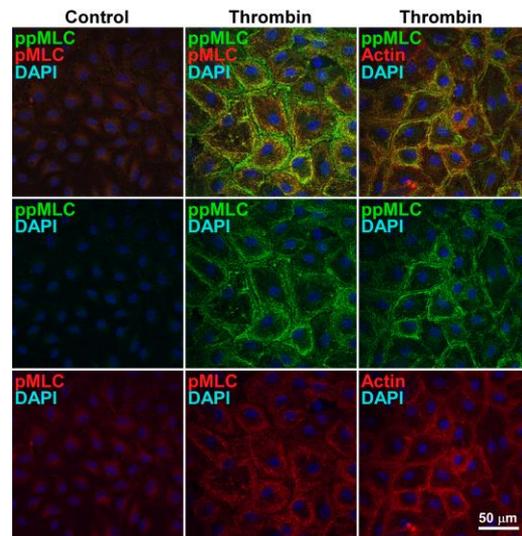
(2) 連携研究者と共同で A7r5 細胞のリン酸化プロテオーム解析を行った。不純物の混入なく、細胞由来の蛋白質の特異的解析が可能となったことが確認された。PAR<sub>1</sub> の脱感作障害には PAR<sub>1</sub> 自体のリン酸化反応の障害が示唆される。また、ERK1/2 によるリン酸化を受ける蛋白質も重要な役割を果たす。今後、プロテオーム解析を行いこれらの点を明らかにする。

(3) 内皮バリアー障害は攣縮発症の引き金として重要な役割を果たす。本研究では、トロンビンが引き起こす内皮バリアー障害の分子機構の詳細を明らかにした。特に、細胞辺縁部に生じるミオシン軽鎖 2 リン酸化 (ppMLC) とそれによるアクチン線維束形成が、バリアー障害の初期事象として重要な役割を果たすことが初めて明らかとなった。

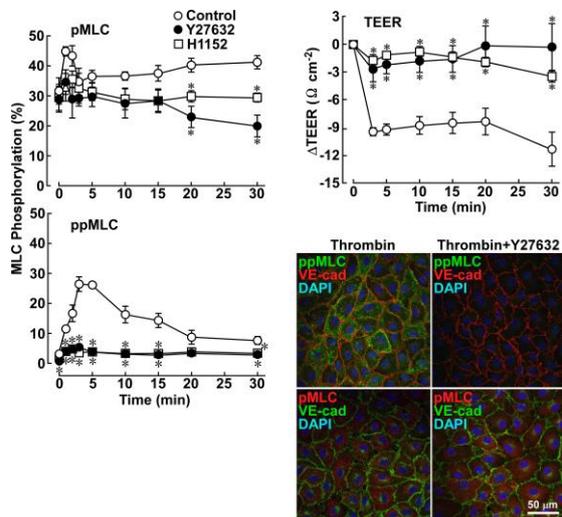
① トロンビンで刺激すると、経内皮細胞電気抵抗 (TEER) は刺激 3 分に最大に達する持続的低下を示した。ppMLC は刺激 3 分を最大に一過性の増加を示したが、一リン酸化 pMLC はわずかに変動し、2 相性の経過を示した。(下図)



② pMLC と ppMLC の細胞内局在にも違いがあることを見出した。すなわち、pMLC は刺激前から核周辺の細胞質に局在し、トロンビン刺激後も局在には変化はなかった。ppMLC はトロンビン刺激前に検出されないが、刺激後 3 分に細胞辺縁部に局在することが観察された。さらに、ppMLC の局在に一致してアクチン線維束形成が認められた。(下図)

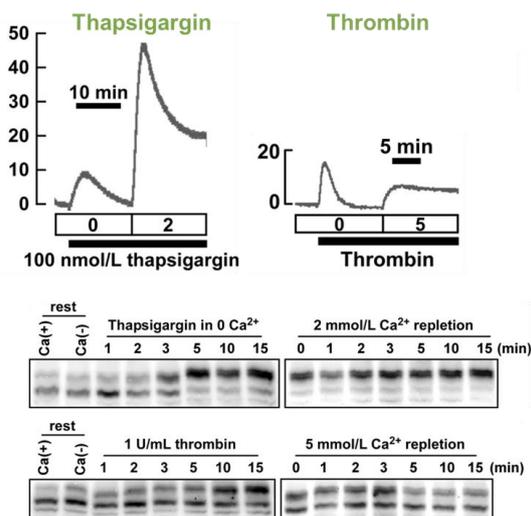


③ Rho キナーゼ阻害剤 (Y27632, H1151) は、トロンビンが引き起こす細胞辺縁部の ppMLC とアクチン線維束形成、バリアー障害の持続相における pMLC、および、TEER の低下を抑制した。(下図)

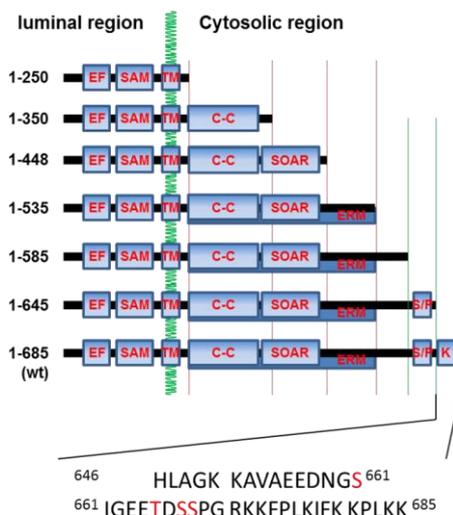


(4) 貯蔵部作動性カルシウム流入は、小胞体貯蔵カルシウム量の低下をカルシウムセンサー蛋白質 STIM1 が感知することによって誘導される細胞外からのカルシウム流入機構である。平滑筋収縮および内皮バリアー障害に関与するとされている。本研究では、STIM1 の C 末端領域にある 4 つのアミノ酸残基に生じるリン酸化反応が貯蔵部作動性カルシウム流入に必要であることを明らかにした。

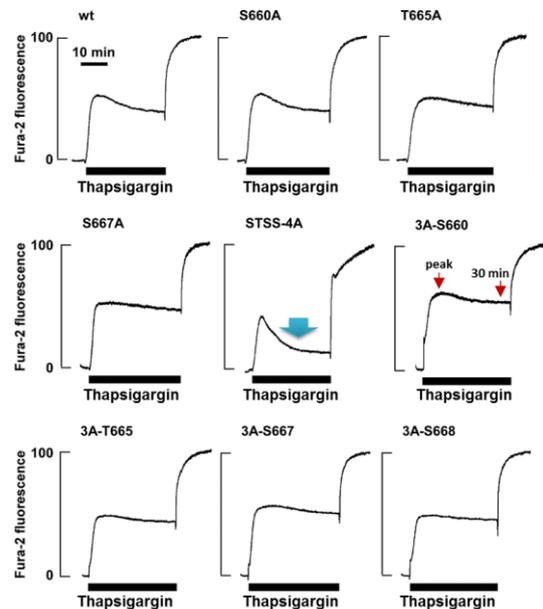
① タブシガルギンおよびトロンピンは、小胞体からのカルシウム放出を引き起こし、貯蔵部作動性カルシウム流入を誘発する。小胞体からのカルシウム放出に伴い、STIM1 のリン酸化が増加した。(下図)



② STIM1 の領域欠損変異体の解析から、小胞体カルシウムの枯渇に伴う STIM1 のリン酸化は、C 末端 646-685 残基に生じることが明らかとなった。この領域にはリン酸化される可能性のあるアミノ酸は 4 残基あった (下図)。



③ リン酸化される可能性のある 4 残基を全てアラニンに変異させた STIM1 を発現する HeLa 細胞 (青矢印の記録) では、タブシガルギンが引き起こす貯蔵部作動性カルシウム流入が障害された (下図)。



以上の研究成果により、攣縮発症に基盤となる、①トロンピン受容体の脱感作障害、②トロンピンによる内皮バリアー障害、③トロンピンが引き起こす貯蔵部作動性カルシウム流入の機序の一端が明らかになった。新たな脳血管攣縮治療法開発に向けた細胞学的基盤が整った。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Aizawa K, Takahari Y, Higashijima N, Serizawa K, Yogo K, Ishizuka N, Endo K, Fukuyama N, Hirano K, Ishida H. Nicorandil prevents sirolimus-induced production of reactive oxygen species, endothelial dysfunction and thrombus formation. *J Pharmacol Sci*, 査読有, 127(3): 284-291, 2015. doi: 10.1016/j.jphs.2014.12.017
- ② Nishimura A, Sunggip C, Tozaki-Saitoh H, Shimauchi T, Numaga-Tomita T, Hirano K, Ide T, Boeynaems J-M, Kurose K, Tsuda M, Robaye B, Inoue K, Nishida M. Purinergic P2Y6 receptors heterodimerize with angiotensin AT1 receptors to promote angiotensin II-induced hypertension. *Sci Signal*, 査読有, 9(411): ra7, 2016. doi: 10.1126/scisignal.aac9187

- ③ Hirano M, Hirano K.  
Myosin di-phosphorylation and peripheral actin bundle formation as initial events during endothelial barrier disruption.  
Sci Rep, 査読有, 6: 20989, 2016. doi: 10.1038/srep20989
- ④ Igarashi J, Okamoto R, Yamashita T, Hashimoto H, Karita S, Nakai K, Kubota Y, Takata M, Yamaguchi Y, Tokuda M, Sakakibara N, Tsukamoto I, Konishi R, Hirano K.  
A key role of PGC-1 $\alpha$  transcriptional coactivator in production of VEGF by a novel angiogenic agent COA-Cl in cultured human fibroblasts.  
Physiol Rep, 査読有, 4(6): 2016, e12742, 2016. doi: 10.14814/phy2.12742
- ⑤ 平野勝也.  
脳血管攣縮における細胞膜受容体の活性制御異常: トロンビン受容体 PAR<sub>1</sub> の役割. 血管, 査読有, 37 (4): 125-134, 2014
- ⑥ 平野勝也.  
血管平滑筋機能とカルシウム.  
CLINICAL CALCIUM, 査読無, 25 (1): 59-69, 2015
- ⑦ 平野勝也.  
プロテイナーゼ活性化型受容体の血管生物学.  
医学のあゆみ 256(5): 489-494, 2016

[学会発表] (計 5 件)

- ① 平野勝也, 平野真弓.  
STIM1 のリン酸化による貯蔵部作動性カルシウム流入の制御.  
第 56 回日本平滑筋学会. 2014 年 8 月 6-8 日, 横浜
- ② Hirano K.  
Vascular intrinsic biological clock in the regulation of myofilament calcium sensitivity.  
11th International Symposium on Resistant Artery, September 7-11, 2014, Banff, AB, Canada
- ③ 平野勝也, 花田亜希子, 平野真弓.  
貯蔵部作動性 Ca<sup>2+</sup> 流入持続相における STIM1 リン酸化反応の役割.  
第 67 回日本薬理学会西南部会. 2014 年 11 月 23 日, 北九州
- ④ Hirano K, Hanada A, Hirano M.  
Mechanism for impaired desensitization and irreversible activation of thrombin receptor in vascular smooth muscle.  
HAKATA Cardiovascular Conference 2015 年 5 月 29-30 日, 福岡

- ⑤ 平野勝也, 平野真弓.  
内皮バリアー障害におけるミオシン軽鎖 2 リン酸化の特異的役割.  
第 57 回日本平滑筋学会シンポジウム「ミオシン軽鎖リン酸化研究の新展開: 循環器研究からシステム生物学へ」.  
August 27 (25-27), 2015、宇部

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平野 勝也 (HIRANO, Katsuya)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号: 80291516

### (2) 研究分担者

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

### (3) 連携研究者

小林 誠 (Kobayashi, Sei)  
山口大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 80225515