

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09159

研究課題名(和文) プロテイナーゼ活性化型受容体1を介する血管機能障害の分子機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism underlying the vascular dysfunction mediated by proteinase-activated receptor 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：プロテイナーゼ活性化型受容体1(PAR1)を介する血管機能障害の分子機構について以下の点を明らかにした。

1. 内皮細胞のトロンピンによるバリアー障害において、細胞辺縁部のミオシン軽鎖2リン酸化とアクチン繊維束形成が初期事象として重要な役割を果たす。2. Rho-Rho キナーゼ経路が、細胞辺縁部におけるミオシン軽鎖2リン酸化とアクチン繊維束形成に関与する。3. 血管平滑筋細胞において凝固因子X1aは、PAR1とL型カルシウムチャネルを介し細胞内カルシウム濃度を上昇させる。4. モノクローリンを用いた肺高血圧モデルラットにおいて、肺動脈でのPAR1の発現増加が病態形成に重要な役割を果たす。

研究成果の概要(英文)：1. Myosin di-phosphorylation and peripheral actin bundle formation as initial events during endothelial barrier disruption. 2. The Rho-Rho kinase pathway plays an important role in the peripheral localization of ppMLC and actin filament formation during the initial phase of the thrombin-induced endothelial barrier disruption. 3. The coagulation factor X1a induces Ca²⁺ signal via proteinase-activated receptor 1(PAR1) and L-type Ca²⁺ channel in vascular smooth muscle cells. 4. Specific and increased expression of thrombin receptor PAR1 in pulmonary artery plays a key role in the pathogenesis of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats.

研究分野：医歯薬学 内科系臨床医学 循環器内科学 分子血管学

キーワード：プロテイナーゼ活性化型受容体(PAR1) 血管内皮細胞 血管透過性 内皮バリアー障害 ミオシン軽鎖
リン酸化 アクチン 血管平滑筋細胞 肺高血圧症

1. 研究開始当初の背景

- (1) PARs は、アゴニストであるプロテイナーゼにより細胞外領域が切断されることで活性化される特殊な G 蛋白質共役型受容体である (Cell 1991; Nature 2000)。4 種類のサブタイプ (PAR1、PAR2、PAR3、PAR4) が知られており、PAR1 が主要なトロンビン受容体として機能する。
- (2) トロンビンによるプロテイナーゼ活性化型受容体 (PAR1) の活性化は、内皮依存性血管弛緩反応、内皮細胞バリアー障害、内皮活性化、平滑筋の収縮、遊走、増殖、活性酸素産生などを引き起こす。
- (3) PAR1 は、トロンビン以外にも、MMP1、APC など多様なプロテイナーゼにより活性化され、それぞれ異なるシグナル伝達経路を有し様々な機能を発揮する。PAR1 活性化から血管機能障害を介した血管病の病変形成に至る分子機構は複雑で不明な点が多い。

PAR1 の血管病態学に関する申請者のこれまでの知見

<内皮作用>

- (1) トロンビンが引き起こす内皮 NO 産生において、PAR1 を介した Ca^{2+} 依存性の NO 産生機構と、PAR4 を介した Ca^{2+} 非依存性の NO 産生機構が関与することを初めて明らかにした。
- (2) PAR1 による内皮バリアー機能障害において、ミオシン軽鎖の 2 リン酸化と 1 リン酸化は異なる制御を受け、細胞辺縁部におけるミオシン軽鎖 2 リン酸化とそれによるアクチン線維束形成がバリアー障害において重要な役割を果たすことを見出した。

<平滑筋作用：体循環>

- (1) バルーン血管傷害による肥厚病変形成前に COX 依存性に PAR1 の発現が亢進することを見出した。
- (2) くも膜下出血モデルの攣縮血管において、PAR1 の発現亢進により、本来トロンビンに対する収縮反応性を示さない脳血管が収縮反応性を獲得することを見出した。
- (3) くも膜下出血後、酸化ストレスの作用により PAR1 の脱感作機構が障害され、一旦活性化された PAR1 は不可逆的活性を獲得し、脳血管攣縮の特徴とされる不可逆的血管収縮を引き起こすことを見出した。
- (4) PAR1 拮抗薬は、くも膜下出血後の PAR1 発現亢進と血管攣縮性を抑制した。

<平滑筋作用：肺循環>

- (1) モノクロタリン誘発肺高血圧症モデルラットにおいて、PAR1 の肺動脈収縮作用が亢進することを見出した。
- (2) PAR1 拮抗薬の投与により、肺高血圧症モデルラットにおいて、肺動脈圧上昇、右室肥大、中膜肥厚を抑制し、生存率を大幅に改善することを見出した。

以上の国内外の研究の動向およびこれまでの研究成果から、PAR1 が引き起こす内皮作用が血管病の発症初期に、平滑筋作用

(収縮、増殖) が血管病の進展に関わることを示唆された。

2. 研究の目的

PAR1 の活性化が引き起こす内皮機能障害は血管病の発症初期に、平滑筋収縮や増殖は血管病の進展に重要な役割を果たすことから、PAR1 の観点から血管病の病態形成機序を明らかにすることにより発症初期から伸展期に至る時間軸の中で血管病の病態の全貌を明らかにできるという着想を得た。PAR1 による血管機能障害の分子機構を明らかにすることによって、新たな血管病治療法の開発が期待される。そのため、本研究では、病態モデル動物や培養細胞を用いて以下の 3 点を明らかにする。

- (1) PAR1 による内皮機能障害 (内皮バリアー機能障害) の分子機構を明らかにする。
- (2) PAR1 による平滑筋機能障害 (収縮性亢進や増殖異常) の分子機構を明らかにする。
- (3) PAR1 を標的とした血管病治療の有効性を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) PAR1 による内皮機能障害 (内皮バリアー機能障害) の分子機構を明らかにする。ブタ大動脈内皮細胞を用いる。ミオシン軽鎖 1 リン酸化と 2 リン酸化は Phos-tag SDS PAGE 電気泳動法、内皮透過性は径内皮電気抵抗測定法 (TEER) で解析する。分子機構を明らかにするため各種阻害剤を用いて解析する。
- (2) PAR1 による平滑筋機能障害 (収縮性亢進や増殖異常) の分子機構を明らかにする。ラット大動脈平滑筋細胞 (A7r5) に PAR1 biased agonist (MMP1、APC など) を作用させ、Fura2 蛍光測定法による Ca^{2+} 濃度変化で収縮性を評価する。
- (3) PAR1 を標的とした血管病治療の有効性を明らかにする。

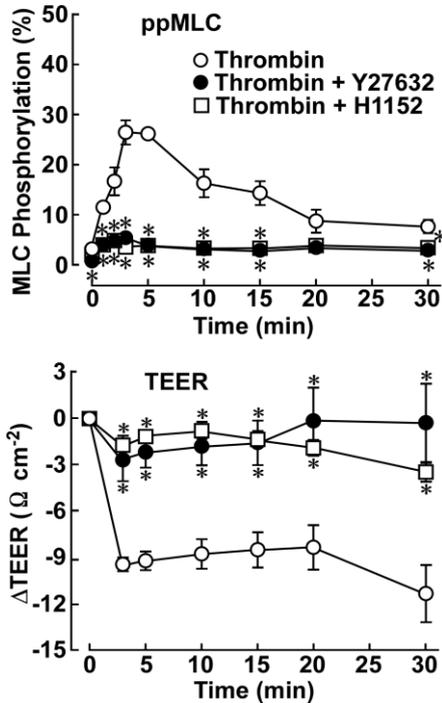
PAR1 ノックアウトマウスで肺高血圧症病態モデルを作製し、血行動態や病理所見を評価して病態形成における PAR1 の役割を明らかにする。PAR1 拮抗薬を用いて病態形成における PAR1 阻害の有効性を検証する。

4. 研究成果

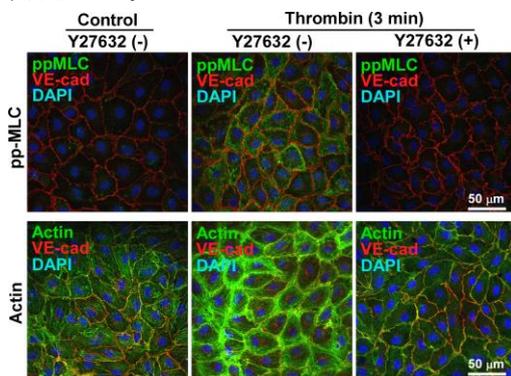
- (1) PAR1 による内皮機能障害 (内皮バリアー機能障害) の分子機構を明らかにする。これまでにトロンビンによる PAR1 活性化により血管内皮細胞のバリアー機能が障害され血管透過性が亢進すること。ミオシン軽鎖 2 リン酸化の上昇が透過性亢進と一致すること。さらに透過性亢進の初期事象として、ストレスファイバー形成に先立つ細胞辺縁部でのミオシン軽鎖 2 リン酸化とアクチン線維束形成が重要であることを明らかにした。

本研究での結果

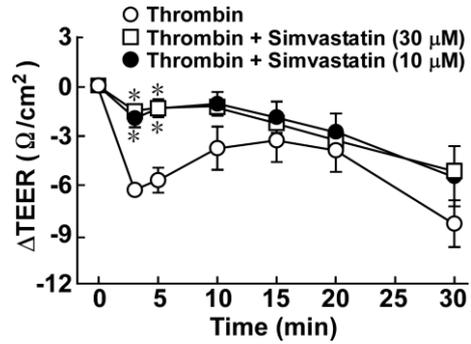
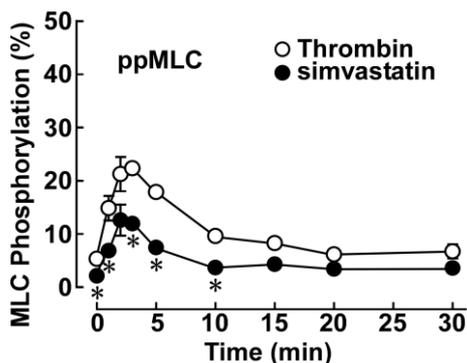
①2種類の Rho kinase 阻害剤 Y27632, H1152 を 30 分前投与すると、トロンビンによるミオシン軽鎖 2 リン酸化の上昇と透過性亢進が抑制された。



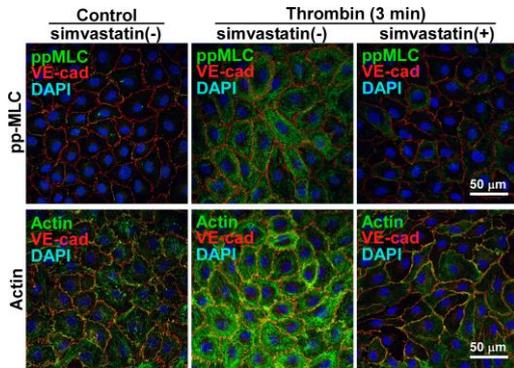
②Rho-kinase 阻害剤 Y27632 の前投与によりトロンビンによる細胞辺縁部におけるミオシン軽鎖 2 リン酸化とアクチン線維束形成が抑制された。



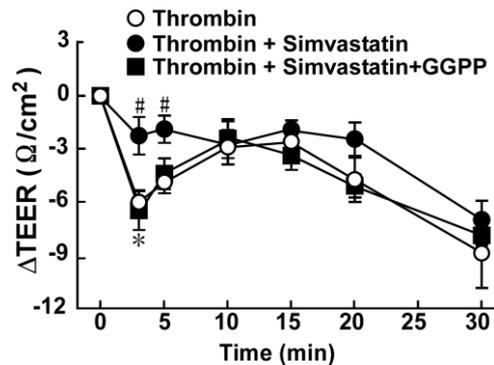
③Rho-Rho kinase 経路阻害剤シンバスタチンを前処置すると、トロンビンによるミオシン軽鎖 2 リン酸化と透過性亢進が抑制された。



④Rho-Rho kinase 経路の阻害剤シンバスタチン前投与によりトロンビンによる細胞辺縁部におけるミオシン軽鎖 2 リン酸化とアクチン線維束形成が抑制された。

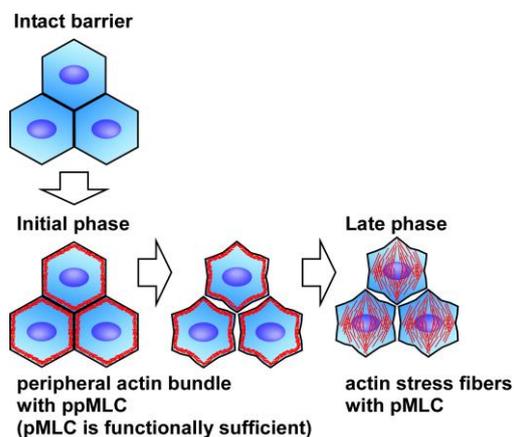


⑤シンバスタチンが HMG-CoA からメバロン酸への代謝経路を阻害することから、メバロン酸の下流の中間代謝産物ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) とシンバスタチンを同時投与すると、トロンビンによる透過性亢進はシンバスタチン未処理の対象群と同程度にまで回復した。



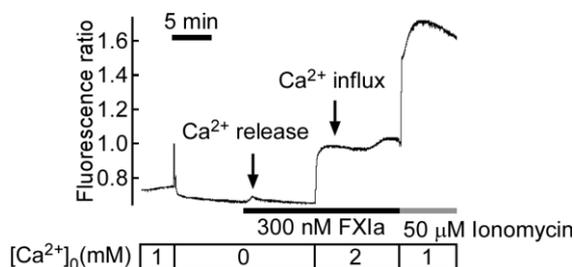
本研究では、トロンビンが引き起こす内皮バリアー障害の初期において、ストレスファイバー形成に先立って、細胞辺縁部におけるミオシン軽鎖 2 リン酸化とアクチン線維束が Rho-Rho kinase 経路を介して形成されることを見出した。このアクチン線維束形成が MLC2 リン酸化と時間的・空間的に一致すること、さらに細胞辺縁部のアクチン線維束が形成されるか、ストレスファイバーが形成されるかが細胞間接着の成熟度によって制御されることも明らかにした。

トロンビン刺激を受けると、Rho-Rho kinase 依存性にまず細胞縁部に MLC 2 リン酸化とアクチン線維束形成が生じ、求心性に細胞収縮が起こり、その結果として細胞間接着装置に間隙が生じると、透過性が亢進するとともに、細胞縁部のアクチン線維はストレスファイバーへと再編成され、透過性亢進の持続に関わることが示唆された。本研究により、従来の研究で見落とされていた内皮バリアー障害の初期事象が明らかとなった。

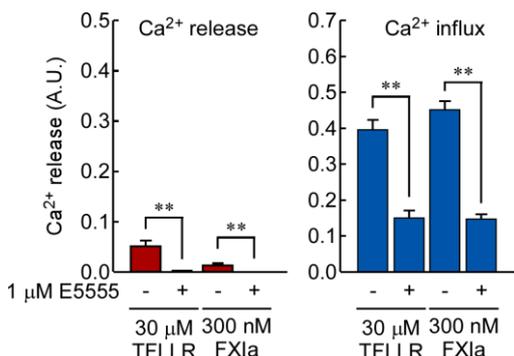


(2) PAR1 による平滑筋機能障害（収縮性亢進や増殖異常）の分子機構を明らかにする。

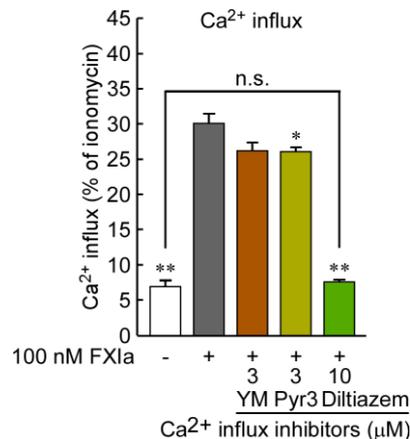
①ラット大動脈平滑筋 A7r5 細胞において凝固因子 XIa が引き起こす細胞内カルシウム濃度上昇反応を示す実記録。



②PAR1 活性化ペプチドおよび凝固因子 XIa が引き起こす細胞内カルシウム濃度上昇（カルシウム放出成分とカルシウム流入成分）を PAR1 拮抗薬（E5555）が抑制した。凝固因子 XIa が引き起こすカルシウム濃度上昇は PAR1 を介することが明らかとなった。



③凝固因子 XIa が引き起こすカルシウム流入に及ぼす貯蔵部作動性カルシウム流入阻害剤 (YM)、TRPC3 阻害剤 (Pyr3)、L 型カルシウムチャネル阻害剤 (Diltiazem) の影響



ラット大動脈平滑筋細胞において凝固因子 XIa がプロテイナーゼ活性化型受容体 (PAR1) を活性化させ、L 型カルシウムチャネルを介して細胞内のカルシウム濃度上昇を引き起こすことを明らかにした。これまで凝固因子 XIa の細胞に対する直接作用の報告は無く、直接作用を初めて明らかにした。

(3) PAR1 を標的とした血管病治療の有効性を明らかにする。

- ①モノクローリン誘発肺高血圧モデルラットを作製し、トロンビン受容体 PAR1 の発現を解析すると、モデル肺において優位な発現上昇が認められた。
- ②正常肺標本では PAR1 アゴニストペプチドに対する反応が認められないのに対して、モノクローリン誘発肺高血圧モデルラットの肺血管では圧上昇が認められた。
- ③PAR1 ノックアウトマウスは、低酸素誘発肺高血圧症の病態形成を抑制した。これらのことから、PAR1 が肺高血圧症の病態形成に重要な役割を果たし、新たな治療標的となることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

1. [Hirano M, Hirano K](#)

Myosin di-phosphorylation and peripheral actin bundle formation as initial events during endothelial barrier disruption
Sci Rep 査読あり 6: 20989; 2016
doi: 10.1038/srep20989

〔学会発表〕 (計 16 件)

国際学会 (計 3 件)

- ① [Kuwabara Y, Tanaka M, Abe K, Hirano M, Hirooka Y, Sunagawa K, Hirano K](#)

Specific and increased expression of thrombin receptor PAR1 in pulmonary artery plays a key role in the pathogenesis of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats
American Heart Association Scientific Session 2016

- ② Hirano M, Hirano K
A role of myosin light chain phosphorylation and actin bundle formation at cell periphery as an initial event during thrombin-induced disruption of endothelial barrier.
HAKATA Cardiovascular Conference 2015
- ③ Kuwabara Y, Abe K, Hirano M, Hirooka Y, Hirano K, Sunagawa K
Proteinase Activated Receptor 1 (PAR₁) plays a key role in pathogenesis of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats.
HAKATA Cardiovascular Conference 2015

国内学会 (計 13 件)

- ① 平野真弓, 平野勝也
Rho-Rhoキナーゼ経路がトロンビンによる内皮バリアー障害の初期事象である細胞辺縁部アクチン繊維束形成に関わる
第47回日本心臓血管作動物質学会年会 2018
- ② 平野勝也, 桑原志実, 田中真理子, 阿部弘太郎, 平野真弓
トロンビン受容体 PAR1 の阻害は肺高血圧症の病態形成を抑制する。
第132回日本薬理学会近畿部会 2017
- ③ 平野勝也, 桑原志実, 田中真理子, 阿部弘太郎, 平野真弓
実験的肺高血圧症に対するプロテイナーゼ活性化型受容体1 (PAR1) 拮抗薬の治療的効果
第59回日本平滑筋学会総会 2017
- ④ 平野真弓, 平野勝也
トロンビンによる内皮バリアー障害の初期事象である細胞辺縁部アクチン線維束形成は Rho-Rho キナーゼ経路が関与する
第94回日本生理学会大会 2017
- ⑤ Kuwabara Y, Abe K, Hirano M, Hirooka Y, Sunagawa K, Hirano K
Increased expression of thrombin receptor, PAR1 is a new therapeutic target for pulmonary hypertension
第80回日本循環器学会学術集会 2016
- ⑥ Hirano K, Kuwabara Y, Abe K, Hirano M
Increased contractile effects of thrombin in pulmonary artery of monocrotaline-induced pulmonary hypertension
第93回日本生理学会大会 2016
- ⑦ 平野勝也, 桑原志実, 阿部弘太郎, 平野真弓
モノクロタリン誘発肺高血圧症におけるトロンビン受容体PAR1の発現亢進とトロン

ビンの肺動脈収縮作用の増強
第129回日本薬理学会近畿部会 2016

- ⑧ 平野勝也, 桑原志実, 阿部弘太郎, 平野真弓
モノクロタリン誘発肺高血圧モデルにおけるトロンビン受容体PAR1の肺動脈収縮作用の亢進
第58回日本平滑筋学会総会 2016
- ⑨ Hirano K, Hirano M
Peripheral actin bundle formation due to myosin light chain di-phosphorylation proceeds stress fiber formation during thrombin-induced endothelial barrier disruption
第33回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会 2016
- ⑩ 平野勝也, 桑原志実, 阿部弘太郎, 平野真弓
モノクロタリン誘発肺高血圧モデルにおけるトロンビン受容体 PAR₁ の肺動脈収縮作用の亢進
第58回日本平滑筋学会総会 2016
- ⑪ 平野勝也, 平野真弓
内皮バリアー障害の初期事象としてのミオシン2リン酸化の特異的役割
生理研研究会 2015 心臓・血管系の包括的な機能統合研究 2015
- ⑫ 平野勝也, 桑原志実, 阿部弘太郎, 平野真弓
モノクロタリン誘発肺高血圧モデルにおける肺動脈のトロンビンに対する収縮反応性の亢進
第57回日本平滑筋学会 2015
- ⑬ 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 2015

[その他]

ホームページ等

- <http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/index.html>
- <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・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 80336031

(2) 研究分担者

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