

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06875

研究課題名(和文)新規に同定した細胞接着斑分子paxillinが血管攣縮における役割の解明

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・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10711260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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。血管攣縮の病的シグナル『SPC/Fyn/Rhoキナーゼ(ROK)』経路の中、FynとROK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。そこで、本研究は、細胞、組織、生体レベルで、特にpaxillinノックアウト(KO)マウス作製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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Paxillinと血管攣縮との関連およびメカニズムが明らかに解明して、「細胞接着斑は血管攣縮に関与する」という新説を提唱する事となり、学術的な新発見となった。更に、今なお増加している血管攣縮による狭心症、心筋梗塞、脳血管障害などの重篤な疾病の治療法開発において、paxillinが新規分子創薬標的として、新しい治療法の開発、創薬候補探索などに応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The abnormal contraction of vascular smooth muscle (VSM) is a major cause of cardiovascular and cerebrovascular spasm. We previously demonstrated that sphingosylphosphorylcholine (SPC) induces this abnormal contraction via the SPC/Fyn/Rho-kinase pathway. However, the detailed mechanisms involved in abnormal contraction of VSM are incompletely elucidated. Here, we identified paxillin as a novel signalling molecule acting downstream of active Fyn and examined its role in the SPC-induced abnormal contraction of VSM by using of paxillin knockdown vascular smooth muscle cells and paxillin knockout mice. Our result showed that paxillin deletion inhibited the SPC-induced abnormal contraction of VSM.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：血管異常収縮 paxillin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省平成 23 年人口動態統計によると、我が国死因の 1 位は悪性新生物、2 位は心疾患、4 位は脳血管疾患となっている。この中で、2 位と 4 位を合計すると、「血管病」の死因は 1 位の悪性新生物と並び、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拘らず、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 (ROK) 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。しかしながら、ROK 自体は、他の重要な生理機能(細胞分裂・遊走など)も制御しているため、その阻害薬の使用は得策ではない。しかし、ROK 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『発症を予測している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効薬を開発するため、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、血管異常収縮のみを観察する研究方法を開発し、血管攣縮の原因分子の探索を行い、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、『SPC Fyn ROK』経路を発見した。しかし、Fyn は直接 ROK 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(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、これらを全面解明する必要がある。

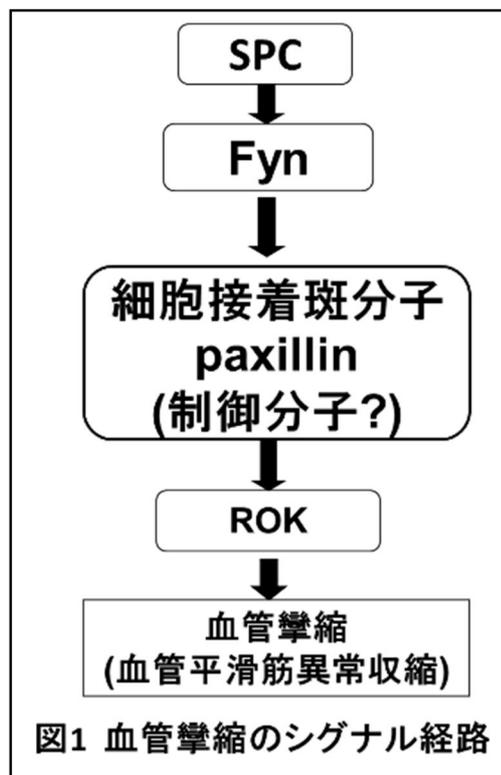


図1 血管攣縮のシグナル経路

2. 研究の目的

血管攣縮の病的シグナル『SPC Fyn ROK』経路の中、Fyn と ROK 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。そこで、本研究では、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う。

3. 研究の方法

本研究では、細胞、組織、生体レベルで paxillin の血管攣縮に果たす役割を解明するため、下記の実験を行った。

(1) 細胞レベルで機能欠失の分子生物学的アプローチにより paxillin と血管異常収縮の関連を検証するため、paxillin shRNA を用いて、ヒト冠状動脈平滑筋細胞に導入して、paxillin 半永久的ノックアウトしたヒト冠状動脈平滑筋細胞を作成した。

(2) 生体レベルで機能欠失の分子生物学的アプローチにより paxillin と血管異常収縮の関連を検証するため、Cre-loxP システムを用いた平滑筋組織特異的 paxillin ノックアウトマウスを作成した。タモキシフェンの投与量および投与後血管平滑筋には paxillin がノックアウトされたかどうか、western blot および免疫染色法で検討した。

(3) 上記(1)で作成したヒト冠状動脈平滑筋細胞を用いて、異常収縮の刺激因子である SPC で刺激して、収縮を KEYENCE 顕微鏡でリアルタイム観察を記録した。また、(2)で作成した平滑筋組織特異的 paxillin ノックアウトマウスの血管を用いて、異常収縮の刺激因子である SPC で刺激して、収縮を DMT マルチワイヤ-ミオグラフシステムで観察を記録した。

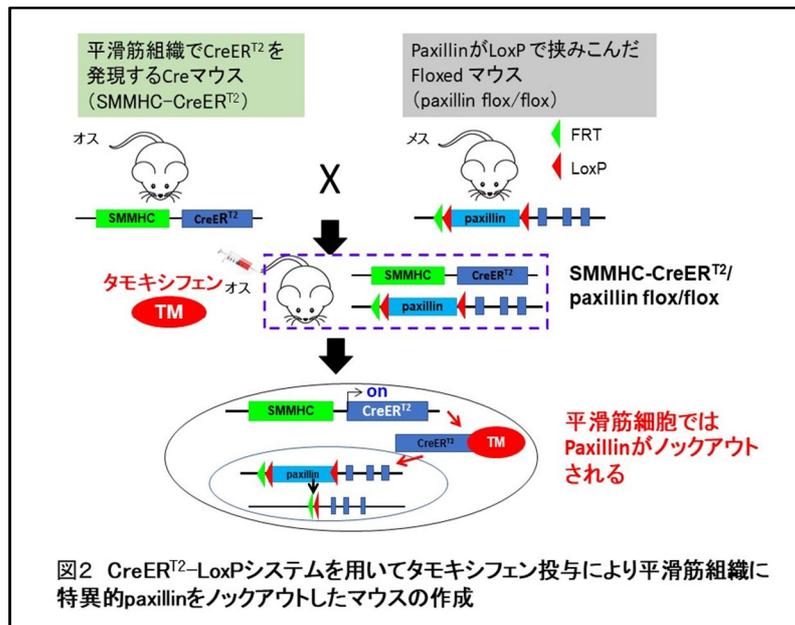
(4) 脳血管攣縮モデルマウスを作成し、脳血流量を評価した。タモキシフェン投与ありと投与なしの SMMHC-Cre^{ERT2}/paxillin flox/flox マウスの血管攣縮モデルを作成し、異常収縮の刺激因子である SPC で刺激して、血管攣縮が惹起されるか生体レベルで解析した。

(5) PaxillinはROKの上流分子となるため、paxillinノックダウンしてROKの活性化が抑制されるかを検討した。指標としてミオシン軽鎖ホスファターゼのミオシン結合サブユニット Myosin phosphatase targeting subunit 1 (MYPT1) のリン酸化抗体を Western Blot で調べた。

4. 研究成果

(1) Paxillin shRNA を用いて、ヒト冠状動脈平滑筋細胞に導入して、paxillin ノックアウトした細胞を作成した。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 shRNA をトランスフェクションした細胞に比べて、paxillin shRNA をトランスフェクションした細胞では、SPC により、誘発した収縮が抑制された。

(2) 平滑筋組織特異的 paxillin ノックアウトマウスを作成するため、タモキシフェンによる誘導で平滑筋組織で Cre を活性化できるマウス (SMMHC-CreER^{T2}) および、paxillin 遺伝子の exon2 から exon5 の領域を loxP で挟み込んだ loxP マウス (paxillin flox/flox) を作成した (図2)。上記作成した両種のマウスを交配させて、paxillin をノックアウトする事が可能なマウスが誕生した (SMMHC-CreER^{T2}/paxillin flox/flox)。このマウスをタモキシフェンで誘導により、Cre が平滑筋組織で発現すると、loxP で挟み込まれた paxillin 遺伝子領域が除去されてフレームシフト変異が起こり、平滑筋特異的 paxillin ノックアウトすることができる。Cre-loxP システムを用いた平滑筋組織特異的 paxillin ノックアウトマウスを作製するため、タモキシフェンの投与量を決めた。SMMHC-CreER^{T2}/paxillin flox/flox マウスにタモキシフェンを単回投与 (5 mg) と連続投与 (1 mg × 5 days) し、投与後 10 日、20 日、30 日にマウスから 3 種類の筋組織 (心筋、平滑筋、骨格筋) および非筋組織を摘出した。その後、摘出した組織は液体窒素で凍結し、SK ミルを用いて超低温条件下で超強力破砕する事により、タンパク質を抽出した。Western Blot 法を用いて paxillin の発現パターンを解析した。更に血管の切片を作成し、免疫染色を行って、KEYENCE 蛍光顕微鏡で paxillin の発現パターンも解析した。Western Blot と免疫染色の方法により、タモキシフェン連続投与後 30 日に心筋組織と骨格筋組織には、paxillin が発現したが、平滑筋組織では paxillin がノックアウトされたことがわかった。よって、平滑筋組織特異的 paxillin ノックアウトマウスの作成ができた。



(3) タモキシフェン投与ありと投与なしの SMMHC-CreER^{T2}/paxillin flox/flox マウスの胸部大動脈、腸間膜動脈、脳底動脈を用いて、DMT マルチワイヤ-ミオグラフィシステムで、高カリウム脱分極による正常収縮、また異常収縮因子である SPC による異常収縮を検討し、比較した。結果により、paxillin ノックアウトしたマウスの胸部大動脈では、SPC による収縮は、control マウスに比べて、有意差に抑制された。腸間膜動脈と脳底動脈について、現段階で有意差な結果がないが、今後、n の数を増やして、追加実験をする予定である。

(4) タモキシフェン投与ありと投与なしの SMMHC-CreER^{T2}/paxillin flox/flox マウスを用いて、脳血管攣縮モデルマウスを作成した。しかし、作成後 24 時間以内で死亡率が高くて、血管攣縮まで測定することができなかった。今後、脳血管攣縮モデルマウス作成について更に検討する予定である。

(5) PaxillinはROKの上流分子となるため、paxillin ノックアウトしてROKの活性化を調べた。ヒト冠状動脈平滑筋細胞において、paxillin がノックアウトすると、異常収縮の刺激因子である SPC の刺激により ROK の活性化が抑制された。一方、平滑筋組織特異的 paxillin ノックアウトマウスの血管組織において、同じく SPC の刺激により ROK の活性化も抑制されたことが分かった。

本研究では、Paxillin は Fyn 下流の新規分子として、SPC による血管平滑筋の異常収縮を制御することが解った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurahara Lin Hai, Hiraishi Keizo, Yamamura Aya, Zhang Ying, Abe Kohtarō, Yahiro Eiji, Aoki Mikiko, Koga Kaori, Yokomise Hiroyasu, Go Tetsuhiko, Ishikawa Kaori, Bo Zhang, Kishi Hiroko, Kobayashi Sei, Aoki-Shoi Narumi, Toru Satoh, Inoue Ryuji, Hirano Katsuya	4. 巻 148
2. 論文標題 Eicosapentaenoic acid ameliorates pulmonary hypertension via inhibition of tyrosine kinase Fyn	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 50～62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yjmcc.2020.08.013	査読の有無 有
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 Ying Zhang, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi	4. 巻 134
2. 論文標題 Add-on therapy with traditional Chinese medicine: An efficacious approach for lipid metabolism disorders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharmacological Research	6. 最初と最後の頁 200-211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.phrs.2018.06.004	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 張 影、小林 誠	4. 巻 1
2. 論文標題 血管攣縮の分子機構の解明とその分子標的治療法の開発	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 71-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
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18件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ying Zhang, Bochao Lyu, Tomoka Morita, Dan Cui, Hiroko Kishi, Min Zhang, Qian Lu, Nan Li, Eiji Ikeda, Sei Kobayashi
2. 発表標題 Role of paxillin in sphingosylphosphorylcholine (SPC)-induced Ca ²⁺ -sensitization contraction of vascular smooth muscle
3. 学会等名 第97回日本生理学会 3月17日～19日 誌上開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroko Kishi, Qian Lu, Tomoka Morita, Ying Zhang, Bochao Lyu, Min Zhang, Nan Li, Minhui Xu, Sei Kobayashi
2. 発表標題 The role of calpain activation and vimentin cleavage in the signal transduction of abnormal vascular smooth muscle contraction mediated by SPC/Fyn/ROK pathway
3. 学会等名 第97回日本生理学会 3月17日～19日 誌上開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sei Kobayashi, Bochao Lyu, Min Zhang, Ying Zhang, Hiroko Kishi, Tomoka Morita
2. 発表標題 Novel signaling molecules which can regulate both Ca ²⁺ -sensitization of vascular contraction and cancer cell migration
3. 学会等名 第97回日本生理学会 3月17日～19日 誌上開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張 影、呂 博超、森田 知佳、崔 丹、岸 博子、張 敏、路 倩、李 楠、池田 栄二、小林 誠
2. 発表標題 血管平滑筋異常収縮における新規分子パキシリンの関与について
3. 学会等名 2019年11月23～24日、第71回日本生理学会中国四国地方会、山口大学小串キャンパス（医学部）総合研究棟A（医修館）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊川 絢子、呂 博超、張 敏、張 影、小林 誠
2. 発表標題 食用成分から、血管攣縮を抑制する水溶性物質を発見する。
3. 学会等名 2019年11月23～24日、第71回日本生理学会中国四国地方会、山口大学小串キャンパス（医学部）総合研究棟A（医修館）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉原 琳、平石 敬三、張 影、山村彩、岸 博子、小林 誠、井上 隆司、平野 勝也
2. 発表標題 肺動脈性肺高血圧症に対するエイコサペンタエン酸の改善効果
3. 学会等名 2019年11月23～24日、第71回日本生理学会中国四国地方会、山口大学小串キャンパス（医学部）総合研究棟A（医修館）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 張 影、呂 博超、森田 知佳、崔 丹、岸 博子、張 敏、路 倩、李 楠、池田 栄二、小林 誠
2. 発表標題 パキシリンは血管攣縮を制御する新規シグナル分子である
3. 学会等名 2019年8月1～3日、第61回日本平滑筋学会総会、名古屋大学 野依記念学術交流館
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸 博子、路 倩、森田 知佳、張 影、呂 博超、張 敏、李 楠、小林 誠
2. 発表標題 血管平滑筋収縮のCa ²⁺ -sensitizationおよびCa ²⁺ 依存性収縮におけるカルパインの関与
3. 学会等名 2019年8月1～3日、第61回日本平滑筋学会総会、名古屋大学 野依記念学術交流館
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 張 影、張 敏、呂 博超、岸 博子、森田 知佳、路 倩、小林 誠
2. 発表標題 ドコサペンタエン酸 (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
3. 学会等名 2018年8月16 - 18日、第60回日本平滑筋学会総会、東京慈恵会医科大学 1号館講堂（東京）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 張 影、岸 博子、呂 博超、張 敏、森田 知佳、路 倩、小林 誠
2. 発表標題 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
3. 学会等名 2018年8月16 - 18日、第60回日本平滑筋学会総会、東京慈恵会医科大学 1号館講堂 (東京)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸 博子、張 影、森田 知佳、呂 博超、張 敏、路 倩、小林 誠
2. 発表標題 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
3. 学会等名 2018年8月16 - 18日、第60回日本平滑筋学会総会、東京慈恵会医科大学 1号館講堂 (東京)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Bochao Lyu, Min Zhang, Ying Zhang, Hiroko Kishi, Tomoka Morita, Sei Kobayashi
2. 発表標題 Compound A suppresses the Fyn/Rho-kinase mediated Ca ²⁺ -sensitization of vascular smooth muscle contraction
3. 学会等名 2018年8月16 - 18日、第60回日本平滑筋学会総会、東京慈恵会医科大学 1号館講堂 (東京)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Min Zhang, Ying Zhang, Bochao Lyu, Ryodai Takagaki, Hiroko Kishi, Katsuko Kajiyama, Tomoka Morita, Sei Kobayashi
2. 発表標題 The novel compound from soybean strongly and selectively inhibits the Rho-kinase-mediated Ca ²⁺ -sensitization of vascular smooth muscle contraction.
3. 学会等名 2018年8月16 - 18日、第60回日本平滑筋学会総会、東京慈恵会医科大学 1号館講堂 (東京)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅田 充夫、呂 博超、張 敏、張 影、岸 博子、森田 知佳、小林 誠
2. 発表標題 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
3. 学会等名 2018年8月16 - 18日、第60回日本平滑筋学会総会、東京慈恵会医科大学 1号館講堂 (東京)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉原 琳、平石 敬三、張 影、山村 彩、岸 博子、小林 誠、井上 隆司
2. 発表標題 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
3. 学会等名 2018年8月16 - 18日、第60回日本平滑筋学会総会、東京慈恵会医科大学 1号館講堂 (東京)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Min Zhang, Ying Zhang, Bochao Lyu, Ryodai Takagaki, Hiroko Kishi, Katsuko Kajiya, Tomoka Morita, Sei Kobayashi
2. 発表標題 Discovery of novel compound from soybean which selectively inhibits the normal vascular contraction leading to vasospasm
3. 学会等名 2018年10月27 - 28日、第70回日本生理学会中国四国地方会、愛媛大学医学部 創立40周年記念講堂 (松山)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ying Zhang, Min Zhang, Bochao Lyu, Hiroko Kishi, Tomoka Morita, Qian Lu, Nan Li, Sei Kobayashi
2. 発表標題 Direct Fyn-paxillin binding controls migration of coronary artery smooth muscle cells.
3. 学会等名 2019年3月28 - 30日、第9回FA0PS大会 神戸コンベンションセンター
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroko Kishi, Qian Lu, Tomoka Morita, Ying Zhang, Bochao Lyu, Min Zhang, Nan Li, Sei Kobayashi
2. 発表標題 The involvement of calpain in abnormal vascular smooth muscle contraction induced by SPC and U46619
3. 学会等名 2019年3月28 - 30日、第9回FAOPS大会 神戸コンベンションセンター
4. 発表年 2019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)	
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)	
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)	

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
---------	---------