

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18970

研究課題名(和文)血管病発症におけるシグナル伝達機構の解明および分子標的治療法の探索

研究課題名(英文) Searching for the novel signalling molecule in 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・助教

研究者番号：10711260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000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、狭心症、心筋梗塞、脳血管障害などの急性発症で重篤な疾病を引き起こし、上記疾患の合計死亡数は、がんとほぼ並んで我が国の死因の第2位となり、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。本研究では新規分子創薬標的探索のため、血管攣縮シグナル『スフィンゴシルホスホリルコリン(SPC) Fyn Rhoキナーゼ(ROK)』経路中、プルダウンアッセイと質量分析計によりFyn下流に存在する新規分子paxillinを発見した。更に表面プラズモン共鳴法により、活性型Fynとpaxillinとの結合部位を同定した。

研究成果の概要(英文)：Vascular abnormal contraction, known as vasospasm, including cardiovascular and cerebrovascular vasospasm, remains a significant source of morbidity and mortality in sudden death and in patients after subarachnoid hemorrhage. We previously demonstrated that sphingosylphosphorylcholine (SPC) induced this abnormal vascular contraction via a SPC/Fyn/Rho-kinase(ROK) signalling pathway. However, molecular mechanisms between Fyn and ROK remain unclear. In the present study, we identified paxillin as a novel signalling molecule acting downstream of Fyn. Our results indicate that paxillin may be a new therapeutic target for vascular abnormal contraction.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：血管攣縮 paxillin Fyn Rho-kinase

### 1. 研究開始当初の背景

血管平滑筋の異常収縮である血管攣縮は、狭心症、心筋梗塞、脳血管障害などの急性発症で重篤な疾病を引き起こし、上記疾患の合計死亡数は、がんとほぼ並んで我が国の死因の第2位となり、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。

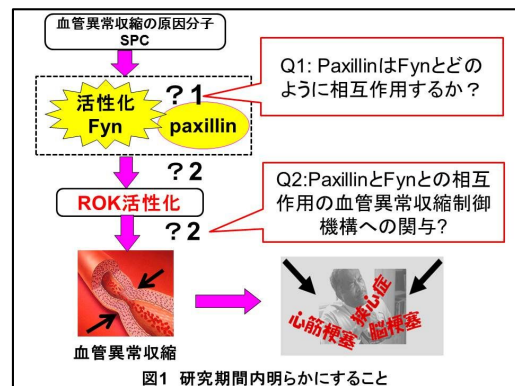
血管正常収縮は、細胞質  $Ca^{2+}$  濃度によって調節されており、血圧維持に重要な役割を果たしている。細胞質  $Ca^{2+}$  濃度が上昇すると、 $Ca^{2+}$  はカルモジュリンと結合し、複合体になる。その後、 $Ca^{2+}$ ・カルモジュリン複合体はミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) を活性化し、活性化された MLCK が収縮タンパク質であるミオシンの軽鎖 (MLC) をリン酸化し、ミオシンが活性化され、アクチンとの滑り運動が可能となり、収縮が生じる。ミオシン軽鎖ホスファターゼ (MLCP) によって MLC が脱リン酸化されると、ミオシンは不活性化され、弛緩が起きる。これに対して、血管異常収縮は、Rho キナーゼ (ROK) を介した  $Ca^{2+}$  非依存性の収縮で、 $Ca^{2+}$  非依存性に活性化された ROK が、MLCP のミオシン結合サブユニット (MYPT1) をリン酸化して MLCP の活性を抑制する。そのために MLC のリン酸化レベルを上昇させることによって異常収縮を引き起こす。更に血管異常収縮に特異的なシグナル伝達機構の上流分子として、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) を同定した。実際に、動物モデルにおいて、SPC を髄腔内に注入すると著明な脳血管攣縮を引き起こす。また、くも膜下出血の発症後に高頻度で起こる脳血管攣縮の患者さんに対して、タンデム型質量分析計を用いて患者さんの髄液中の SPC 濃度を測定したところ、ヒトくも膜下出血患者の SPC 濃度は、対照群のくも膜下出血以外の疾患 (脳腫瘍、正常圧水頭症) 患者と比較して、異常に高値を示した。これらの所見は、SPC が、血管異常収縮を引き起こす重要なシグナル分子であることが解った。しかしながら、*in vitro* の実験系では、SPC は直接 ROK を活性化しないため、他のシグナル分子の介在が示唆された。我々は、この介在分子をスクリーニングし、Src ファミリーチロシンキナーゼの一種である Fyn を発見し、『SPC Fyn ROK』系というシグナル伝達機構を明らかにした。上述のように、異常収縮である血管攣縮は細胞質  $Ca^{2+}$  濃度に依存していないため、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。早急に、血管異常収縮を抑制する特効薬を開発する必要があり、そのためには、血管異常収縮の原因分子の同定とそのシグナ

ル伝達機構を解明し、血管異常収縮の治療標的分子を見出す事が必須である。

我々血管異常収縮の『SPC Fyn ROK』病的シグナル経路を発見したが、*in vitro* で Fyn は直接 Rho キナーゼを活性化出来ないため、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って、細胞接着斑タンパク質 paxillin を発見した。更に、*in vitro* で paxillin の組換えタンパク質と組換え Fyn の相互作用を表面プラズモン共鳴法による分子間相互作用解析装置で解析したところ、paxillin は活性型 Fyn と結合し、非活性型 Fyn と結合しないことがわかった。そこで、「血管攣縮のシグナル伝達において、細胞接着斑タンパク質 paxillin 自身および paxillin と Fyn との相互作用は重要な役割を果たすのではないか？」という着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞接着斑タンパク質 paxillin と Fyn との相互作用の詳細、およびその相互作用の血管異常収縮制御機構への関与について、解明する (図1)。更に、本研究により、paxillin と Fyn との相互作用のメカニズムが明らかになれば、その相互作用を阻害する分子治療薬を探索・開発し、血管攣縮治療の突破口を開く事になる。



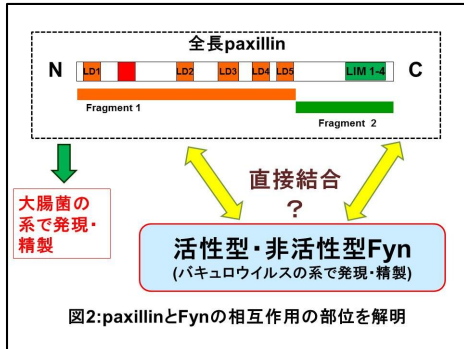
### 3. 研究の方法

既にプルダウンアッセイと機能プロテオミクスにより Fyn 下流新規分子として細胞接着斑タンパク質 paxillin を同定し、Fyn と paxillin が結合することを証明した。本研究では、細胞接着斑タンパク質 paxillin と Fyn との相互作用の詳細、および、その相互作用の血管異常収縮制御機構への関与について解明する。そのために、分子レベルで組換えタンパク質 paxillin のフラグメント (大腸菌で発現・精製) と組換え Fyn (バキュロウイルスの系で発現・精製) を用いて、表面プラズモン共鳴法による分子間の直接の相互作用解析により paxillin と Fyn の相互作用の部位を解明した。また、免疫染色法を用いて、細胞内で paxillin のフラグメントと Fyn との局在も観察した。

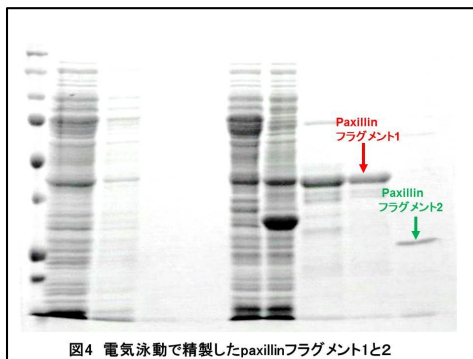
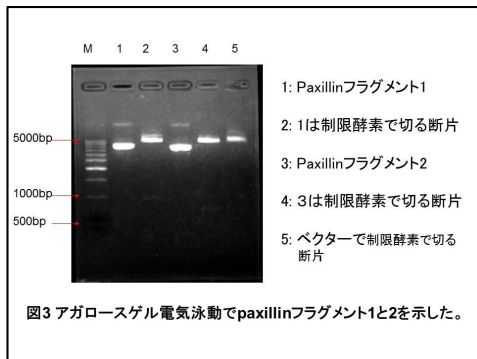
#### 4. 研究成果

(1)分子レベルで paxillin と Fyn との相互作用の部位を同定した。

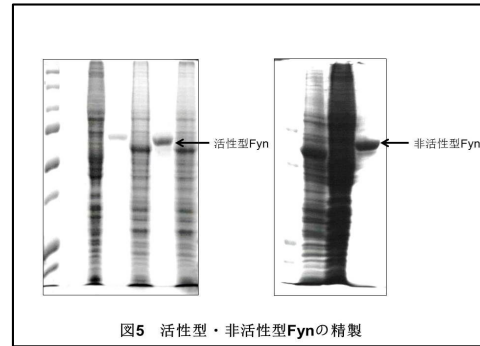
Paxillin と Fyn がどのように結合するかを明らかにするため、二つの paxillin のフラグメントを作成し、*in vitro* で paxillin のフラグメントの組換えタンパク質と組換え Fyn の相互作用を表面プラズモン共鳴法による分子間相互作用解析装置で検討した(図 2)。



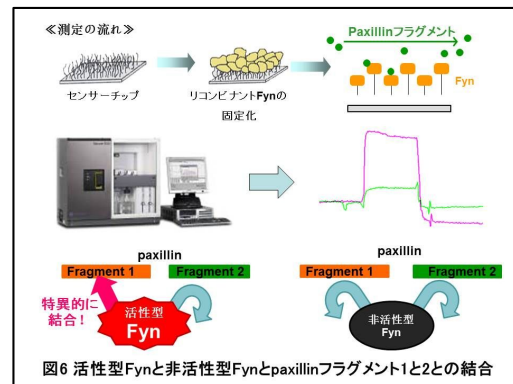
具体的には、以下の三つの実験を行った。  
Paxillin フラグメントの作成、発現と精製：購入した Halo-Tag 付きの全長 paxillin ベクターを用いて、PCR などのバイオ技術で paxillin のフラグメント 1 とフラグメント 2(図 3)を作成した。その後、大腸菌で発現・精製した(図 4)。



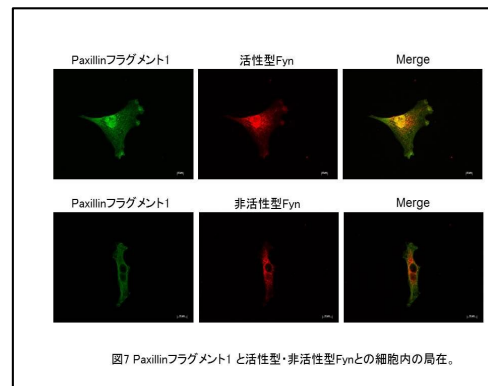
活性化型と非活性化型 Fyn の発現と精製：すでに研究室が独自作成した His-Tag 付き活性化型 Fyn および非活性化型 Fyn のベクターを、バキュロウイルス遺伝子発現ベクター系で発現・精製した(図 5)。



表面プラズモン共鳴法により、paxillin フラグメント 1 と 2 と活性化型・非活性化型 Fyn の分子間相互作用を解析した。Paxillin フラグメント 1 と活性化型 Fyn と結合し、非活性化型 Fyn と結合しなかった。一方、paxillin フラグメント 2 と活性化型 Fyn、非活性化型 Fyn 両者とも結合しなかったことが解った(図 6)。



(2) ヒト冠状動脈平滑筋細胞に paxillin フラグメント 1 と活性化型 Fyn を同時に過剰発現し、免疫染色で paxillin フラグメント 1 と活性化型 Fyn との細胞内の共局在したことが観察された(図 7)。



#### 今後の展望

Paxillin は細胞遊走に重要な役割をしているので、ノックアウトマウスを作製すると胚性致死もしくは生まれても発育不全のために成熟個体での機能解析を行うことは不可能

であることが報告されている。今後 Cre-loxP システムや tamoxifen などによる遺伝子発現誘導システムを用いた paxillin の平滑筋特異的・時期特異的に欠損する paxillin コンディショナルノックアウトマウスの作製を挑戦し、paxillin と血管攣縮との関連を生体レベルで全面解明したいと考える。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Ying Zhang, Min Zhang, Bochao Lyu, Hiroko Kishi and Sei Kobayashi. Omega-3 and omega-6 DPA equally inhibit the sphingosylphosphorylcholine-induced  $Ca^{2+}$ -sensitization of vascular smooth muscle contraction via inhibiting Rho-kinase activation and translocation. Scientific Report, 2017 7:363-368. doi: 10.1038/srep36368. 査読有。

[学会発表](計 8 件)

1. Hiraishi Keizo, Kurahara Lin, Zhang Ying, Yamamura Aya, Kishi Hiroko, Kobayashi Sei, Koga Kaori, Onitsuka Miki, Inoue Ryuji. Contribution of tyrosine kinase FYN to vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. 第 95 回日本生理学会大会, サポートホール高松・かがわ国際会議場(香川)、2018 年 3 月 28 ~ 30 日
2. Hiroko Kishi, Miki Kajima, Katsuko Kajiya, Ying Zhang, Tomoka Morita, Bochao Lyu, Min Zhang, Sei Kobayashi. The involvement of membrane rafts in the signal transduction of abnormal vascular smooth muscle contraction mediated by SPC/Fyn/ROK pathway: Part II. 第 95 回日本生理学会大会, サポートホール高松・かがわ国際会議場(香川)、2018 年 3 月 28 ~ 30 日
3. Shiori Yokobayashi, Ying Zhang, Takafumi Okamoto, Tomoka Morita, Hiroko Kishi, Takeshi Yamamoto, Sei Kobayashi. Fyn-mediated tyrosine phosphorylation of a novel signaling molecule, paxillin controls stress fiber formation and migration of cancer cells. 第 95 回日本生理学会大会, サポートホール高松・かがわ国際会議場(香川)、2018 年 3 月 28 ~ 30 日
4. Ying Zhang, Min Zhang, Bochao Lyu, Hiroko Kishi, Tomoka Morita, and Sei Kobayashi. Omega-3 and omega-6 docosapentaenoic acid (DPA) equally inhibit the  $Ca^{2+}$ -sensitization of abnormal vascular contractions via inhibiting the Rho-kinase activation

and translocation. 第 95 回日本生理学会大会, サポートホール高松・かがわ国際会議場(香川)、2018 年 3 月 28 ~ 30 日

5. 倉原 琳、平石 敬三、張 影、山村 彩、岸 博子、小林 誠、古賀 佳織、鬼塚 美樹、阿部 弘太郎、塩井 成留実、井上 隆司。チロシンキナーゼ FYN が肺動脈高血圧の病態生理に果たす役割。第 68 回西日本生理学会、福岡大学中央図書館多目的ホール(福岡)、2017 年 10 月 6 ~ 7 日
6. 張 影、張 影、呂 博超、岸 博子、加治屋 勝子、森田 知佳、小林 誠。The novel compound from soybean strongly and selectively inhibits the Rho-kinase-mediated  $Ca^{2+}$ -sensitization of vascular smooth muscle contraction. 第 59 回日本平滑筋学会総会、福岡大学中央図書館多目的ホール・文系センター(福岡)、2017 年 8 月 23 ~ 25 日
7. 岸 博子、張 影、加治屋 勝子、森田 知佳、呂 博超、張 影、小林 誠。スフィンゴシルホスホリルコリンが誘発する血管平滑筋異常収縮シグナル分子の細胞内局在の変化の検討。第 59 回日本平滑筋学会総会、福岡大学中央図書館多目的ホール・文系センター(福岡)、2017 年 8 月 23 ~ 25 日
8. 張 影、岸 博子、森田 知佳、呂 博超、張 影、横林 志織、小林 誠。パキシリンは N 末端と活性型 Fyn との相互作用により血管平滑筋細胞遊走を制御する。第 59 回日本平滑筋学会総会、福岡大学中央図書館多目的ホール・文系センター(福岡)、2017 年 8 月 23 ~ 25 日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

張 影 (ZHANG, Ying)

山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 10711260

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

小林 誠 (KOBAYASHI, Sei)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

岸 博子 (KISHI, Hiroko)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授