

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07261

研究課題名(和文) 中間径フィラメントビメンチンを介した新規血管平滑筋異常収縮シグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the novel signaling pathway of vimentin-mediated abnormal vascular smooth muscle contraction

研究代表者

岸 博子 (Kishi, Hiroko)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40359899

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)：血管平滑筋異常収縮は、狭心症、心筋梗塞、脳血管障害などの急性発症で致死的な疾病を引き起こす。申請者らはこれまでに、血管平滑筋異常収縮に特異的なシグナル伝達経路として、SPC/Fyn/ROK経路を見出した。更に、Fyn下流の新規異常収縮シグナル分子としてビメンチンを同定し、異常収縮刺激時にカルパイン・プロテアーゼによってビメンチンが切断される事を明らかにした。カルパイン・プロテアーゼにより生成される相当の長さのビメンチン断片を強制発現した血管平滑筋細胞ではROKの活性化とミオシン軽鎖リン酸化の増加がみられ、ビメンチン断片が血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達を亢進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管平滑筋異常収縮は、生体において血管攣縮を引き起こす病的な収縮であり、細胞質カルシウム濃度の上昇を必要としないCa²⁺非依存性の収縮である。従来、Rhoキナーゼ(ROK)が血管平滑筋異常収縮の重要なシグナル分子として知られるが、ROKの上流のシグナル伝達機構は不明であったため、特効薬が開発されず、血管攣縮は治療抵抗性である。本研究成果は異常収縮刺激時にカルパイン・プロテアーゼにより生成されたビメンチン断片が血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達を亢進させる事を示唆しており、新規の血管平滑筋収縮機構の解明や血管攣縮治療薬の開発に繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：Abnormal vascular smooth muscle contraction induces acute and fetal diseases such as myocardial infarction and cerebral ischemia. We previously identified sphingosylphosphorylcholine/Fyn/Rho kinase (ROK) pathway as novel and specific signaling pathway to mediate abnormal vascular smooth muscle contraction. Furthermore, we identified vimentin as a downstream signaling molecule of Fyn and found that vimentin was cleaved by calpain protease upon abnormal vascular smooth muscle contraction. The overexpression of vimentin fragment induced ROK activation and myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells, suggesting that vimentin fragment facilitate the signal transduction which mediates abnormal vascular smooth muscle contraction.

研究分野：血管平滑筋生理学

キーワード：血管平滑筋 異常収縮 ビメンチン カルパイン Rhoキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

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致死的な疾病を引き起こし、これらの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位であり、しかも突然死の主原因である。正常血圧維持に必要な正常収縮のシグナル伝達機構が Ca^{2+} 依存性であるのに対し、生体で血管攣縮を引き起こす血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達機構は、細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇を必要とせず、 Ca^{2+} 非依存性である。従来、Rho キナーゼ (ROK) が血管平滑筋異常収縮の重要なシグナル分子として知られるが、ROK の上流のシグナル伝達機構は不明であったため、特効薬が開発されず、血管攣縮は治療抵抗性である。血管攣縮治療の突破口を開くには、細胞質 Ca^{2+} 非依存性の血管平滑筋異常収縮の細胞内シグナル伝達機構の全容を解明し、血管攣縮治療の標的分子を見出し、正常収縮を抑制せずに異常収縮を選択的に抑制できる特効薬の開発が必須である。申請者らはこれまでに、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) を世界で初めて発見し、血管平滑筋異常収縮に特異的なシグナル伝達経路として、SPC/Fyn/ROK 経路を見出した。興味深い事に、異常収縮のシグナル分子である Fyn が、ストレスファイバー形成のシグナル分子として機能する事も発見した。

更に、申請者らは Fyn がどのようにして ROK を活性化するかを解明するため、Fyn がチロシンキナーゼである事に着目し、抗チロシンリン酸化抗体による免疫沈降とタンデム型質量分析計を組み合わせた focused proteomics を独自に考案し、Fyn 下流の新規異常収縮シグナル分子として複数の細胞骨格関連分子を同定し、『血管異常収縮のシグナル伝達は、細胞骨格構築の変化、すなわち、リモデリングによって引き起こされる。』という、全く新しい概念を提唱した。

ビメンチンは上記の方法で同定された異常収縮シグナル分子群の一つだが、その後の検証で異常収縮刺激時にカルパインにより N 末端が切断・除去される限定分解を受ける事が判明した。更に、カルパイン阻害薬 PD150606 は、高カリウム脱分極による Ca^{2+} 依存性収縮を全く抑制せずに SPC による異常収縮を特異的に抑制した事から、SPC/Fyn/ROK 経路による血管平滑筋異常収縮におけるカルパインと限定分解によって生じたビメンチン断片の関与が示唆された。

2. 研究の目的

前述のような学術的背景から申請者らは、『構造蛋白として知られるビメンチンが、真に、カルパイン活性依存的に血管平滑筋異常収縮のシグナル分子として機能するのか?』という学術的「問い」に至り、1) 限定分解で生じたビメンチン断片は、どのようにして、血管平滑筋異常収縮のシグナル分子として機能するのか? 2) Ca^{2+} 依存性蛋白質分解酵素であるカルパインが、なぜ Ca^{2+} 非依存性の血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達において活性化するのか? の2点を解明する事を目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

ビメンチン断片がどのようにして異常収縮のシグナル伝達を行うかを解明するため、カルパインによる切断で生成されるビメンチン断片と同じ長さのビメンチン断片を HaloTag と

融合させた哺乳細胞発現ベクターを構築した。これらの HaloTag-ヒトビメンチン断片発現ベクターを、ヒト冠状動脈平滑筋細胞に Nucleofector を用いて遺伝子導入を行った。過剰発現したビメンチン断片を HaloTag 蛍光リガンドにより可視化し、フィラメント形成能を蛍光顕微鏡で評価した。更に、ROK の活性化状態を抗リン酸化 myosin phosphatase targeting subunit 1 (T853)抗体、ミオシン軽鎖のリン酸化状態を抗リン酸化 myosin light chain(Ser19)抗体 によるウェスタンブロット解析で評価した。

4 . 研究成果

ヒト冠状動脈血管平滑筋細胞において、強制発現させた HaloTag 融合全長ビメンチンは内在性ビメンチンと同様のフィラメントを形成した。一方、HaloTag 融合ビメンチン断片はフィラメント形成能が低下していた。更に、HaloTag 融合ビメンチン断片を強制発現させた細胞は HaloTag 融合全長ビメンチンを強制発現させた細胞と比較して、myosin phosphatase targeting subunit 1 および myosin light chain のリン酸化が亢進していた。これらの結果から、ビメンチン断片は、ヒト冠状動脈平滑筋細胞において、異常収縮のシグナル伝達を亢進させる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Lu Qian, Kishi Hiroko, Zhang Ying, Morita Tomoka, Kobayashi Sei	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 Zhang Ying, Kishi Hiroko, Morita Tomoka, Kobayashi Sei	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 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hosoba Kosuke, Morita Tomoka, Zhang Ying, Kishi Hiroko, Yamamoto Takashi, Miyamoto Tatsuo	4. 巻 175
2. 論文標題 High-efficient CRISPR/Cas9-mediated gene targeting to establish cell models of ciliopathies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 85 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mcb.2022.07.020	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 Hiroko Kishi, Qian Lu, Tomoka Morita, Ying Zhang, Nan Li, Sei Kobayashi
2. 発表標題 The role of vimentin cleavage and calpain in the Ca ²⁺ -sensitization of vascular smooth muscle contraction
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2022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63回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2021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 Ca ²⁺ -sensitization of vascular smooth muscle contraction
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ying Zhang, Tomoka Morita, Bochao Lyu, Dan Cui, Hiroko Kishi, Min Zhang, Qian Lu, Nan Li, Eiji Ikeda, Sei Kobayashi
2. 発表標題 Deletion of Paxillin Attenuates Sphingosylphosphorylcholine (SPC)-Induced Abnormal Contraction of Vascular Smooth Muscle by Inhibiting Rho-kinase Activity
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoka Morita, Ying Zhang, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi
2. 発表標題 Sphingosylphosphorylcholine induced contraction in basilar arteries of Fyn knockout mice.
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Bochao Lyu, Dapeng Chen, Yuan Lin, Ying Zhang, Tomoka Morita, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi
2. 発表標題 Madagascine induces vasodilatation via AMPK-mediated eNOS activation and ROCK inhibition
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Qian Lu, Bochao Lyu, Ying Zhang, Tomoka Morita, Hiroko Kishi, Min Zhang, Nan Li, Minhui Xu, Sei Kobayashi
2. 発表標題 The inhibitory effect and mechanism exploration of compound H on sphingosylphosphorylcholine (SPC)-induced contraction in vascular smooth muscle
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nan Li, Min Zhang, Bochao Lyu, Ying Zhang, Hiroko Kishi, Tomoka Morita, Sei Kobayashi
2. 発表標題 Molecular mechanism of component T inhibiting abnormal vascular contraction and migration of MDA-MB-231 cancer cells
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Minhui Xu, Min Zhang, Bochao Lyu, Qian lu, Nan li, Ying Zhang, Tomoka Morita, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi
2. 発表標題 Compound B from traditional Chinese medicine inhibits the Rho-kinase (ROK)-mediated Ca ²⁺ -sensitization of vascular smooth muscle contraction induced by a spasmogen, sphingosylphosphorylcholine (SPC)
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会合同大会
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、張 敏、李 楠、徐 敏慧、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活性化とピメンチン断片化の役割の解明
3. 学会等名 第62回日本平滑筋学会総会
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 スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) による血管平滑筋のCa ²⁺ 感受性収縮におけるパキシリンの役割
3. 学会等名 第62回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Bochao Lyu, Dapeng Chen, Yuan Lin, Ying Zhang, Tomoka Morita, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi
2. 発表標題 Madagascine induces vasodilatation via activation of AMPK
3. 学会等名 第62回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Qian Lu, Bochao Lyu, Ying Zhang, Hiroko Kishi, Tomoka Morita, Min Zhang, Nan Li, Minhui Xu, Sei Kobayashi
2. 発表標題 Compound H inhibits sphingosylphosphorylcholine-induced contraction via suppressing Fyn/Rho-kinase pathway in vascular smooth muscle
3. 学会等名 第62回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nan Li, Min Zhang, Bochao Lyu, Ying Zhang, Hiroko Kishi, Tomoka Morita, Sei Kobayashi
2. 発表標題 The inhibitory mechanism of T on MDA-MB-231 breast cancer cell migration and the mechanism of inhibiting the SPC-induced abnormal contraction.
3. 学会等名 第62回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroko Kishi, Keisuke Shigenobu, Tatsuo Miyamoto
2. 発表標題 The role of vimentin cleavage in the signal transduction of abnormal vascular smooth muscle contraction
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岸 博子
2. 発表標題 血管平滑筋異常収縮の分子機構におけるカルパイン活性化およびビメンチン断片化の役割
3. 学会等名 筋生理の集い
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸 博子、森田 知佳、張 影、李 楠、宮本 達雄
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活性化およびピメンチン断片化の役割の解明
3. 学会等名 第74回日本生理学会中国四国地方会
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カルパイン活性化および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64回日本平滑筋学会総会
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	小林 誠 (Kobayashi Sei) (80225515)	山口大学・医学部・教授(特命) (15501)	
研究分担者	張 影 (Zhang Ying) (10711260)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (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)	

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