

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：12301  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22790242  
 研究課題名（和文）  
 スフィンゴ脂質による血管攣縮機構の解明とミオシン阻害剤による攣縮減衰効果  
 研究課題名（英文）  
 Reveal of basospasms signal transduction with sphingosyl phosphorylcholine And the inhibitory effects of blebbistatin  
 研究代表者  
 田中 秀幸（TANAKA HIDEYUKI）  
 群馬大学・大学院保健学研究科・助教  
 研究者番号：70343085

研究成果の概要（和文）：平滑筋細胞におけるスフィンゴ脂質（SPC）の作用機序の一部を解明することが出来た。さらに、SPC の攣縮効果はミオシン阻害剤(blebbistatin)によって打ち消されることが推測された。

研究成果の概要（英文）：A part of intracellular signal transduction was revealed with sphingosyl phosphorylcholine(SPC) of smooth muscle cell. And it was suggested that Blebbistatin inhibited the basospasms with SPC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：分子形態学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：Sphingosyl phosphorylcholine (SPC)、マグナポディア、共焦点レーザー顕微鏡、Blebbistatin、血管攣縮性動脈硬化、電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管平滑筋細胞は様々の生理活性物質に対し形転換を起こすことと、遊走することが報告されている。遊走能を獲得した平滑筋細胞が血管内皮下にプラークを形成することは、血管狭窄による動脈硬化を引き起こす。

(2) 血管攣縮性動脈硬化の原因とされる物質のなかでスフィンゴ脂質 Sphingosyl phosphorylcholine (SPC) の分子的作用機序は明確にされていなかった。

(3) 形質転換する平滑筋細胞内ではアクチン細胞骨格の remodeling が知られている。

2. 研究の目的

(1) モルモット脳底動脈由来細胞 (Gba-SM4) を用い、Sphingosyl phosphorylcholine (SPC) に対して遊走能を獲得するかを確認し、その際のアクチン細胞骨格の remodeling 機構を調べる。

(2) ミオシン阻害剤である blebbistatin を主とする情報伝達系の阻害剤を用い、SPC の作用機序を調べるとともに、SPC 攣縮の減衰効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 血管攣縮性動脈硬化に Sphingosyl phosphorylcholine (SPC) が関与するのかを検証するために、Boyden chamber 法による

SPC に対するモルモット脳底動脈平滑筋細胞 (Gba-SM4) の遊走能を調べた。

(2) SPC の作用によって平滑筋細胞にどのような影響があるのかを検証するため、SPC を作用させた Gba-SM4 細胞に蛍光免疫染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡観察によってアクチン細胞骨格とミオシンとの局在関係を調べた。

(3) 予備実験において Gba-SM4 に SPC を作用させるとアクチン細胞骨格であるストレスファイバーが増強されるとともに細胞膜領域ではマグナポディアと呼ばれる毛羽立った特殊な細胞突起が出現することが確認されている為、マグナポディアの出現頻度を解析した。

(4) SPC による遊走能亢進の際の分子的作用機序を検討する為、G 蛋白質の阻害剤である PT-x、p38 の阻害剤 SB203580、rho kinase の阻害剤 Y-27632、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) の阻害剤 ML-7 を SPC に共添加し、SPC の情報伝達阻害をマグナポディアの出現率として検証した。

(5) 生化学 (化学エネルギー) 的解析において Blebbistatin はミオシン分子に特異的に作用することを報告されているが、分子形態的影響は不明確であった。そこで Rotary-shadowing 法と Negative-staining 法によって分子形態的影響を検討した。

(6) Blebbistatin が平滑筋細胞内においてどのような挙動を示すのかを検討するため、Gba-SM4 (平滑筋培養細胞) でのアクチン細胞骨格への影響を調べることにした。GFP- $\beta$  (beta) アクチン発現細胞を作製し、Blebbistatin を作用させて共焦点レーザー顕微鏡でアクチン細胞骨格の観察を行なった。

(7) SPC (Sphingosyl phosphorylcholine) と Bebbistatin を共添加した Gba-SM4 がどのような細胞形態学的影響を示すかを調べる為、共焦点レーザー顕微鏡を用い、蛍光抗体染色を行ない、細胞形態を解析した。

(8) つぎに、ラット盲腸紐の平滑筋組織において、同様に Blebbistatin の収縮阻害もしくは SPC の攣縮効果をトランスジューサーによって、等張性収縮力を測定し、さらに、SPC 前処理後 Blebbistatin を作用させて SPC 攣縮効果阻害を検証した。

(9) 生理学的解析を行なった (8) の条件の試料を用い、電子顕微鏡によって細胞内微細形態を解析した。薬理的だけでなく生理学的・形態学的にも SPC の攣縮効果が Blebbistatin によって解消するかを検証することにした。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞遊走獲得性に対し Sphingosyl phosphorylcholine (SPC) が関与するのかを検証するために、Boyden chamber 法を用い

SPC に対するモルモット脳底動脈平滑筋細胞 (Gba-SM4) の遊走能を調べた。

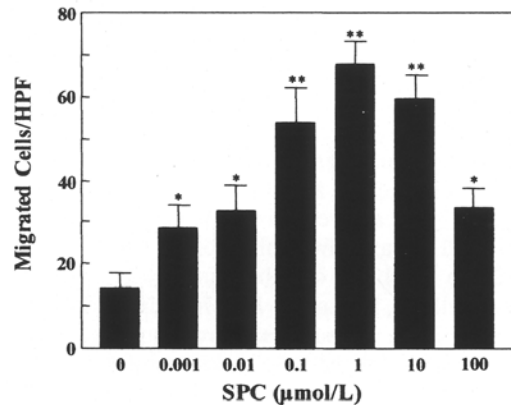


図1. Boyden chamber 法による細胞遊走能の測定

その結果、SPC への遊走能を示す多孔性膜透過率が増加した (図1)。このことから、SPC は血管攣縮に関与することが示唆された。

(2) SPC の作用によって平滑筋細胞にどのような影響があるのかを検証するため、SPC を作用させた Gba-SM4 細胞に蛍光免疫染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡観察によってアクチンの局在関係を調べた (図2)。

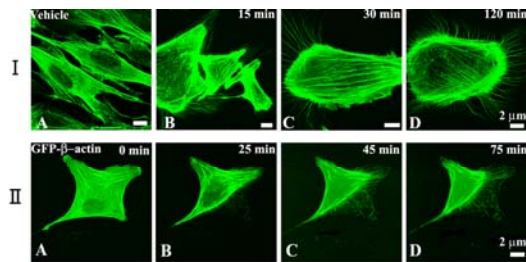


図2. 共焦点レーザー顕微鏡による蛍光抗体染色像 (I) と GFP アクチン導入細胞の観察像 (II) Gba-SM4 に SPC (1 μM) を作用させて経時変化を観察した。

Gba-SM4 に SPC を作用させるとアクチン細胞骨格であるストレスファイバーが増強されるとともに細胞膜領域ではマグナポディアと呼ばれる毛羽立った特殊な細胞突起が出現した。

(3, 4) マグナポディアの出現を遊走能の上昇、つまり血管攣縮の現象として認められたため、SPC による遊走能亢進の際の分子的作用機序を検討することにした。G 蛋白質の阻害剤である PT-x、p38 の阻害剤 SB203580、rho kinase の阻害剤 Y-27632、最下流に相当するミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) の阻害剤 ML-7 を SPC に共添加し、SPC の情報伝達阻害効果をマグナポディアの出現頻度として共焦点レーザー顕微鏡を用い検証した (図3, 4)。その結果、SPC で増加したマグナポディアの出現率が G 蛋白質の阻害剤である PT-x、p38 の阻害剤 SB203580、rho kinase の阻害剤 Y-27632、最下流に相当するミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) の阻害剤 ML-7 の共添加によ

てマグナポディアの出現率が減少した。

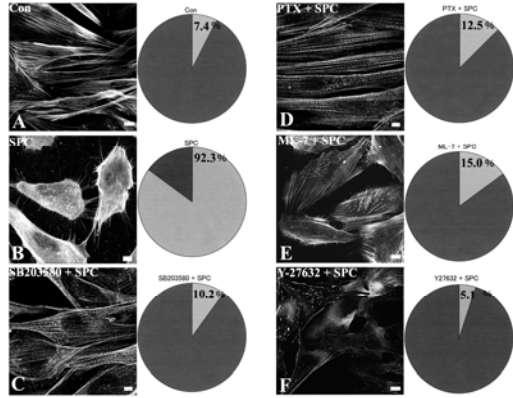


図3. 4 SPCと情報伝達系阻害剤によるマグナポディアの出現頻度

このことから、SPCの作用点はG蛋白質の上流であることが示唆された。ただし、マグナポディアの出現が残存したことから、複数の作用点もしくは他経路経由の作用が推測された。

(5) Blebbistatinのミオシンへの生化学(化学エネルギー)的阻害効果は既に検証されているため、分子形態的効果を検討した(図5)。

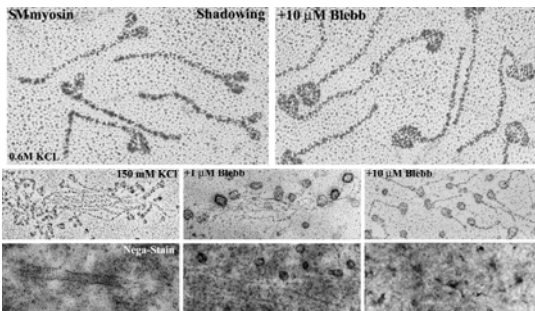


図5. Rotary-shadowing法とNegative-staining法によるミオシン形態変化

活性化したリン酸化ミオシン分子は二つの頭部ドメインが開いた状態であるが、Blebbistatinの効果で二つの頭部ドメインが閉じて大きなひとつの塊(グロビュラドメイン)を形成することが解明された。ミオシン頭部ドメインが一つの塊になることはアクトミオシン相互作用を阻害すると推測される。

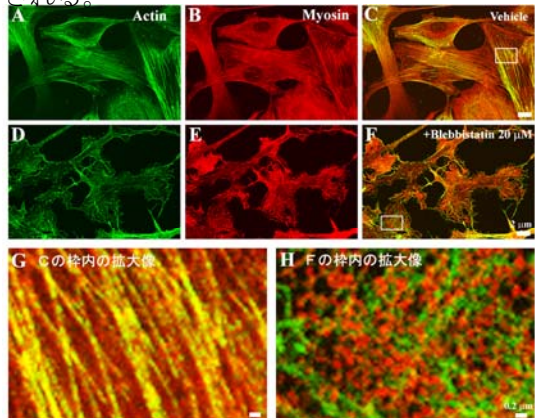


図6. 蛍光抗体染色像(Blebbistatinによるアクチン(緑)とミオシン(赤)への影響

Blebbistatinが平滑筋細胞内においてどのような挙動を示すのかを検討するため、Gba-SM4(平滑筋培養細胞)でのアクチン細胞骨格への影響を調べることにした(図6)。Blebbistatinの効果により細胞骨格として観察されるべきアクチンストレスファイバーは短く断片化され、細胞形態は収縮が阻害されていると推測される樹状形態へと変容していった。

SPC(Sphingosyl phosphoryl choline)を前処理した細胞にBlebbistatinを共添加させ、蛍光抗体染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した(図7)。

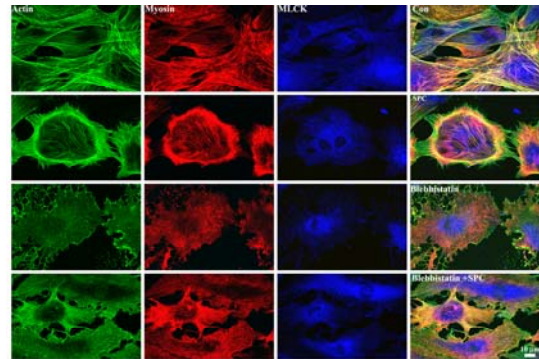


図7. SPCとBlebbistatinを共添加した際の蛍光抗体染色像

その結果、攣縮効果として確認されたマグナポディアが減少し、収縮阻害された細胞骨格へと遷移していった。

つぎに、ラット盲腸紐の平滑筋組織において、同様にBlebbistatinの収縮阻害もしくはSPCの攣縮効果をトランスジューサーによって、SPCの効果による等張性収縮力を測定し、さらに、SPCとBlebbistatinを共添加させてSPC攣縮効果阻害を検証した(図8)。

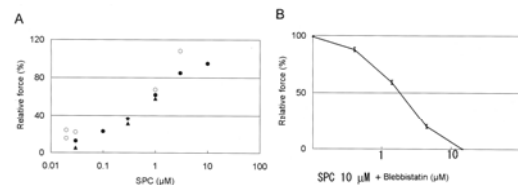


図8. 等張性収縮力測定の結果(A: SPC単独 B: SPC + Blebbistatinの共添加)

SPC単独効果ではリン酸化を伴わない攣縮が確認され、Blebbistatinとの共添加では収縮力の阻害が確認された。SPC前処理後のBlebbistatin効果ではSPCで誘発される攣縮がBlebbistatinで消失した。

張力測定に用いた平滑筋組織試料に蛍光抗体染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡で解析した(図9-A)。同様に電子顕微鏡でも観察した(図9-B)。その結果、SPC攣縮条件下で平滑筋組織内ではカルシウム収縮と同様の収縮状態もしくは若干の過収縮の状態が観察された。



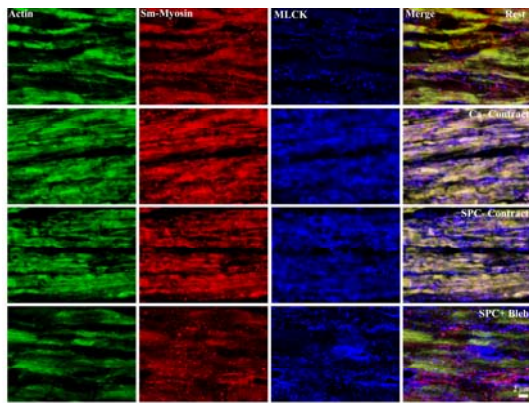


図9-A. 張力測定 (図8) 試料での蛍光抗体染色像  
(Rest, Ca-Contract は、弛緩、収縮条件でのコントロールを示す。  
SPC-Contract は収縮、SPC+Bleb は弛緩状態を示した)

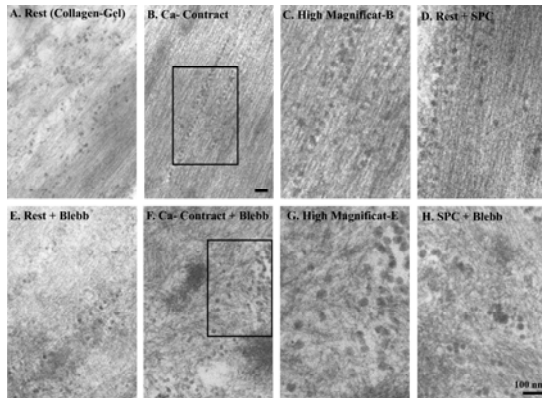


図9-B. 張力測定 (図8) 試料の電子顕微鏡観察像

アクチン線維の密集化とミオシンの線維化が確認され、本来のカルシウム収縮よりも線維化の密度が高かった。SPC 前処理後の Blebbistatin を作用させた条件では、Blebbistatin の効果によってアクチン線維の配向は乱れ、ミオシンの線維化も消失した。薬理的だけでなく生理学的・形態学的にも SPC の攣縮効果を Blebbistatin によって解消することが証明された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Sean E. Thatcher, Mike E. Fultz, Hideyuki Tanaka, Haruo Hagiwara, Hou-Li Zhang, Kohichi Hayakawa, Shingji Yoshiyama, Akio Nakamura, Hong-Hui Wang, Takeshi Katayama, Masaru Watanabe, Yuan Lin, Gray L. Wright, Kazuhiro Kohama, Myosin Light Chain Kinase / Actin Interaction in Phorbol Dibutyrate Stimulated Smooth Muscle Cells. Journal of Pharmacological Society、査読有、Vol. 116, No1, 2011, 116-127
- ② Hideyo Takatsuki, Hideyuki Tanaka, Kevin M Rice, Madhukar B Kolli, Siva K

Nalabotu, Kazuhiro Kohama, Parviz Famouri, Eric R Blough, Transport of single cells using an actin bundle-myosin bionanomotor transport system

Nanotechnology、査読有、Vol. 22, 2011, 245101 (8pp)

- ③ Zheyu Shen, Wei Wei, Hideyuki Tanaka, Kazuhiro Kohama, Guanghui Ma, Toshiki Dogashi, Yasuyuki Maki, Hong-Hui Wang, Jing-Xiu Bi, Sheng Dai, A galactosamine-mediated drug delivery carrier for targeted liver cancer therapy Pharmacological Research、査読有、Vol. 64, 2011, 410-419

[学会発表] (計 5 件)

- ① Hideyuki Tanaka, Haruo Hagiwara Morphological analysis of effects with arachidonic acid of smooth muscle cells 第 117 回日本解剖学会総会・学術集会、2012. 3. 27、山梨大学 (甲府)
- ② 田中 秀幸、萩原治夫 スフィンゴ脂質 (SPC) の作用による平滑筋細胞内アクチンの局在変化 第 43 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、2011. 9. 9、大阪医科大学 (高槻市)
- ③ Hideyuki Tanaka, Haruo Hagiwara Cytoskeletal effect of sphingosyl lipid (SPC) in smooth muscle cells. 第 116 回日本解剖学会総会・学術集会、2011. 3. 30、パシフィコ横浜 (横浜)
- ④ Hideyuki Tanaka, Masaru Watanabe, Takeshi Katayama, Kazuhiro Kohama Cytoskeletal effects of myosin inhibitors in muscle cells. 第 84 回日本薬理学会年会、2011. 3. 22、パシフィコ横浜 (横浜)
- ⑤ 田中 秀幸、萩原 治夫 ラット結腸平滑筋形質膜におけるデンスプラーク領域とカベオラ密集領域 第 42 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、2010. 9. 24、東レ総合研修センター (三島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 秀幸 (TANAKA HIDEYUKI)

群馬大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：70343085

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：