

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380077

研究課題名(和文) 血管異常収縮を選択的に阻害する食品成分の同定と作用機序の解明

研究課題名(英文) Identification of food component which selectively inhibits abnormal vascular contraction

研究代表者

小林 誠 (KOBAYASHI, Sei)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80225515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管異常収縮の分子機構を解明すると共に、血管の正常機能(=血圧維持を担う正常収縮)を抑制せず、異常収縮のみを選択的に阻害する食品成分を同定することを目的とした。

血管異常収縮の分子機構の中で、申請者らが発見したFynチロシンキナーゼとRhoキナーゼを仲介する新規のシグナル分子を同定した。次に、正常収縮には影響を与えずに、異常収縮のみを抑制する食品として、大豆加工食品、および薬用植物サラシアを発見した。さらに、カラムクロマトによる精製とタンデム型質量分析を応用して、大豆加工食品であるオカラから2つの異常収縮を抑制する特効薬分子を同定した。以上の成果より、2つの特許を出願した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the molecular mechanism of abnormal vascular contraction and to identify the food component which selectively inhibit abnormal vascular contraction without affecting the normal contraction.

In this study, we identified the novel signal mediator mediating between Fyn tyrosine kinase and Rho-kinase in the regulation of abnormal vascular contractions.

We identified the food component which selectively inhibit abnormal vascular contraction without affecting the normal contraction. By these results we applied two patents.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：病態生理 血管攣縮 血管異常収縮 血管病 機能性食品

## 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞や心筋梗塞などの血管病は、我が国の死因ならびに突然死の主因である。突発する血管病の原因として、血管攣縮（血管平滑筋の  $Ca^{2+}$ 非依存性の異常収縮）が注目されている。しかしながら、そのメカニズムの詳細は不明なままである。

従って、この血管異常収縮を引き起こすメカニズムを解明する事により、血管病の根本的な予防法や治療法を開発することが、国民衛生上の緊急・最重要課題である。

申請者らは、独自に開発した研究手法（細胞質カルシウム濃度と血管平滑筋収縮の同時測定法、筋肉の細胞膜に小孔をあけるスキンド法）を駆使し、血管異常収縮の原因分子としてスフィンゴ脂質の一種であるスフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)と、その下流のシグナル分子として Src family チロシンキナーゼの一種である Fyn を世界で初めて同定した(Circ Res, 2002)。すなわち、世界で初めて「SPC Fyn Rho キナーゼ 血管の異常収縮」の全経路を次々に発見した実績を有する。

脳梗塞や心筋梗塞などの血管病は、合計すると我が国死因の第2位であり、また、突然死の主原因となる致死性の難病でもある。通常、血管は、細胞質  $Ca^{2+}$ 依存性に収縮する事により、血圧や血流を一定に保っている（正常収縮）が、血管病の本態である血管の異常収縮は、この  $Ca^{2+}$ では説明がつかない、Rho キナーゼを介した  $Ca^{2+}$ 非依存性の収縮によって引き起こされる。しかしながら、この異常収縮の制御機構が不明なため抑制薬が開発できず、仕方なく、原因の解っている正常収縮を抑制する薬物（ $Ca^{2+}$ 拮抗薬など）が用いられてきた。その結果、治療効果が不十分なだけでなく、正常収縮の抑制、即ち血圧の低下が生じている。従って、血管異常収縮のメカニズムを早急に解明し、血管病の根本的な予防法や治療法を開発し、血管病による突然死を撲滅することが、国民衛生上の最重要課題である。

申請者らが開発したスキンド標本は、細胞膜情報伝達機構と血管収縮能を保持しながら、細胞膜にのみ高分子量物質が通過できる小孔を開けた生体組織標本であり(JBC 1989)、細胞質  $Ca^{2+}$ 濃度を一定値に固定できるため、 $Ca^{2+}$ 非依存性収縮のみを観察できるのみならず、細胞膜情報伝達に影響する因子を細胞内環流する事によって、細胞膜を通過し難い未知のシグナル分子の効果を直接観察する事が可能である。申請者らは、更にこのスキンド法と遺伝子工学を統合する事によってリコンビナント蛋白を細胞内へ急速導入する実験系を構築し(PNAS 1996)、世界に先駆けて、血管の  $Ca^{2+}$ 非依存性収縮を引き起こす原因分子を次々に同定し、SPC(FEBS Lett 2000) Fyn(Circ Res 2002) Rho キナーゼ(JBC 1997) 血管異常収縮という経路を明らかにした。さらに最近、これらの病的シグ

ナル伝達に、コレステロールが必須である事を発見し(Circ Res 2006)、脂質異常症と血管病・突然死を直接リンクする初めての報告として注目され、また、ヒトの血管病においてSPCが異常高値となる事が報告され、今や、コレステロール SPC/Fyn/Rho キナーゼ経路は血管病の主因として注目されている(Editorial 総説: Circ Res 2002,及び 2006、Nature2004等)。しかしながら、コレステロールが限局して蓄積した細胞膜上マイクロドメインの関与や、血管異常収縮の原因分子であるSPCの産生機構、SPC/Fyn/Rho キナーゼ経路を媒介するシグナル分子の関与については不明瞭な点が多く、この経路及びそのクロストークについて世界中の多数の研究室から報告がなされているが、しばしば真逆の報告があり、血管異常収縮のシグナル伝達の研究は混乱を極めている状況にある。従って、申請者らの世界初・独自開発の分子細胞生理学的実験技術・実験装置（特許出願）を駆使して、血管異常収縮の分子機構の全容を解明し、その経路を選択的に阻害する特効薬開発に繋げるという着想に至った。

しかしながら理想的には、SPC産生による血管異常収縮の『後』に作用する“治療薬・医薬品”ではなく、異常収縮そのものを予防する事が重要である。申請者らは、SPCによる病的な細胞内シグナル経路を特異的に遮断する物質として、魚油に多く含まれるエイコサペンタエン酸(EPA)を見出した（平成18-19年NEDO事業、機能性食品として製品化に成功、特許出願済）。EPAは、実際にヒトのくも膜下出血に対して著効を示し、特効薬の発見として多数のメディアで報道された。しかしながらEPAは、多価不飽和脂肪酸であるため酸化修飾を受けやすい事、海洋汚染等による漁獲量の変動で原料の安定供給が難しい事から、これらの問題点を克服する新たな血管異常収縮抑制物質が必要である。そこで、天然物を網羅解析したところ、食品中から、SPCによる血管異常収縮そのものを選択的に阻害する候補成分を複数個発見し始めている。そこで、本研究では、これらの粗精製中の複数の候補成分から、血管の正常機能（血圧維持を担う正常収縮）を抑制することなく、異常収縮のみを選択的に阻害できる成分をさらに抽出・精製することによって、食品由来の『血管病の特効薬成分』を同定し、その詳細な解析を行うという研究目的の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、血管異常収縮の分子機構を解明すると共に、血管の正常機能（=血圧維持を担う正常収縮）を抑制せず、異常収縮のみを選択的に阻害する食品成分を同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

申請者らは、これまで世界初・独自開発の実験技術や実験装置（一部は特許取得）を用いて、血管病の病院シグナル分子と分子機構を世界に先駆けて次々に明らかにしてきた。

本研究でも、それらの得意とする実験技術・装置、特に正常収縮と異常収縮を明確に分離して、選択的に異常収縮のみを抑制できる特効薬の探索方法は、特許を取得した独自の実験技術であり、本研究はその技術を主体に解析を行った。

### 4. 研究成果

以下の世界初の研究成果を得た。

血管異常収縮の分子機構の中で、申請者らが発見した Fyn チロシンキナーゼと Rho キナーゼを仲介する新規のシグナル分子を同定することができた。

次に、血圧の維持を担う血管の正常収縮には影響を与えずに、異常収縮のみを抑制する食品として、大豆加工食品、および薬用植物サラシアを発見した。さらに、カラムクロマトによる精製とタンデム型質量分析を応用して、大豆加工食品であるオカラから 2 つの異常収縮を抑制する特効薬分子を同定した。

以上の成果より、2 つの特許を出願した。

### 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)

Yoshiteru Kagawa, Yuki Yasumoto, Kazem Sharifi, Majid Ebrahimi, Ariful Islam, Hirohumi Miyazaki, Yui Yamamoto, Tomoo Sawada, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi, Motoko Maekawa, Takeo Yoshikawa, Eiichi Takaki, Akira Nakai, Hirishi Kogo, Yoyoshi Fujimoto, Yuji Owada, Fatty acid-binding protein 7 regulates function of caveolae in astrocytes through expression of caveolin-1, *Glia*, 査読有, 2015, 63, 780-794, DOI: 10.1002/glia.22784

BC An, Tsuyoshi Sakai, Shigeru Komaba, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi, JY Kim, Reiko Ikebe, Ikebe Mitsuo. Phosphorylation of the kinase domain regulates autophosphorylation of myosin IIIA and its translocation in microvilli, *Biochemistry*, 査読有, 2014, 53, 7835-7845, DOI:10.1021/bi501247z

H.Kishi, H.Kawamichi, K.Kojima, Y.Yamada, S.Kobayashi. Sphingosylphosphorylcholine induces stress fiber formation via

activation of Fyn-RhoA-ROCK signaling pathway in fibroblasts. 査読有, 2012, 24, 282-289, DOI:10.1016/j.cellsig.2011.09.013.

[学会発表](計 3 件)

Ying Zhang, Hiroko Kishi, Kenji Miyanari, Tomohiko Kimura, Ryodai Takagaki, Bchao Lyu, Sei Kobayashi. N-terminus of paxillin regulates actin stress fiber formation by binding to the active Fyn. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 21 日 ~ 23 日 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

Kenji Miyanari, Kazutaka Nojimoto, Katsuko Kajiya, Yuichi Takada, Tomohiko Kimura, Ying Zhang, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi. Discover of novel Salasia-derived components which specifically inhibit the ROK-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization of vascular smooth muscle contraction, 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 21 日 ~ 23 日 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

張 影、岸 博子、宮成 健司、木村 友彦、高柿 了大、呂 博越、小林 誠。アクチン・ストレスファイバー形成における、新規シグナル分子パキシリンと活性型 Fyn チロシンキナーゼとの相互作用の必要性 第 56 回日本平滑筋学会総会、2014 年 8 月 6 日 ~ 8 日 新横浜プリンスホテル(神奈川県横浜市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 2 件)

名称：血管攣縮抑制剤  
発明者：小林誠，高柿了大，岸博子，張影，加治屋勝子，渡邊和晃。  
権利者：山口大学，株式会社ラフィーネインターナショナル  
種類：特許  
番号：特願 2014-210258  
出願年月日：平成 26 年 10 月 14 日  
国内外の別：国内

名称：血管攣縮抑制剤  
発明者：高松日出子，小林誠，宮成健司，岸博子，  
権利者：株式会社タカマ  
種類：特許

番号：特願 2014-184678  
出願年月日：平成 26 年 9 月 10 日  
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
なし

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

小林 誠 (KOBAYASHI,Sei )  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：80225515

##### (2)研究分担者

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

加治屋 勝子 (KAJIYA,Katsuko )  
鹿児島大学・農学部・講師  
研究者番号：00379942

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  
(平成 25 年度より研究分担者に追加)

##### (3)連携研究者

なし