

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23659113

研究課題名(和文)血管攣縮の原因シグナル分子の産生機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism for production of causal factor of vasospasm

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管攣縮の原因分子であるSPCの産生の分子機構を解明することを目指した。当初は、これまでの脂質代謝の概念・常識に従って、酵素的反応によってスフィンゴリエリンからSPCが産生されるであろうと予想して、SPC産生酵素を同定する事を目標に研究をスタートさせた。しかしながら、SPC産生活性を絞り込んでいく過程の中で、溶液中で、酸化ストレスおよび酸性条件下で非酵素的にSPCが産生されるという画期的な現象を発見することができた。

そのため、研究途中からは、この非酵素的にSPCが産生される分子機構を解明することを目指した研究を行った。その結果、OHラジカルがSPC産生に必須であることを発見した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the molecular mechanism of causal factor of vasospasm, SPC. Surprisingly, SPC was not produced by the enzymatic reaction, but by the non-enzymatic reaction. We discovered that OH radical plays an essential role of the non-enzymatic production of SPC.

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

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞や心筋梗塞などの重篤な循環器系疾患(血管病)は、我が国死因ならびに突然死の主因の大部分を占めている。また、血管病の原因として、血管攣縮(痙攣したように突発する血管平滑筋のCa²⁺非依存性の異常収縮)が注目されている。特に、この血管攣縮は突発する特徴を有しているため、我が国の突然死の主因となっている。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事が、国民衛生上の緊急かつ最重要課題である。

申請者は、血管異常収縮の原因分子スフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)を世界で初めて同定したが(Circ Res, 2002)、その産生機構は不明なままであった。その産生機構が解明し、選択的にSPC生成機構を阻害できれば、血管攣縮の根本的治療法に直結することが可能である。

2. 研究の目的

本研究では、血管攣縮の原因分子であるSPCの産生の分子機構を解明することを目指した。

当初は、これまでの脂質代謝の概念・常識に従って、酵素的反応によってスフィンゴミエリンからSPCが産生されるであろうと予想して、SPC産生酵素を同定する事を目標に研究をスタートさせた。

しかしながら、SPC産生活性を絞り込んでいく過程の中で、溶液中で、酸化ストレスおよび酸性条件下で非酵素的にSPCが産生されるという画期的な現象を発見することができた。

そのため、研究途中からは、この非酵素的にSPCが産生される分子機構を解明することを目指した研究を行った。

3. 研究の方法

SPCの検出感度が本研究の成功に必須の条件である。我々は、SPC測定について特異的なカラムを使用したLC-MS質量分析による測定方法を独自に開発し特許を取得した。本研究では、この独自開発の実験技術を使用してSPCを検出して実験を行った。

インフュージョン導入法によるLC-MS分析を行った。これまでのSPC産生溶液においては、SMを完全に溶解させるため、TritonX-100を含む溶液を用いていたが、直接的なインフュージョン導入法では分析を阻害するため、TritonX-100を含まない溶液を用いて反応を行った。LC-MS分析の結果としては、SPCのm/zである465.3付近にシグナルの僅かな増加が認められた。

4. 研究成果

血管攣縮(=血管異常収縮)の原因分子として同定されたスフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)は細胞膜成分のスフィンゴミ

エリン(SM)の脱アシル化によって生成される脂質であり、その産生機構を解明することが本研究の目標である。『脂質代謝は酵素反応で制御される』という常識に従い、我々も含めて世界中の脂質研究者がその酵素の同定に挑戦し続けていたが徒労に終わっていた。

本研究は、その難題に挑戦したのであるが、これまでの研究者同様、そのような酵素活性を上手く検出することが出来なかった。

そのような中、SPC産生活性を絞り込んでいく過程の中で、非酵素的産生の可能性を着想し、検討してみると、溶液中で酸化ストレスによりSMからSPCが産生される事が観察された。さらに、その反応の特異性を示すために、色々な活性酸素の作用を検討したところ、活性酸素の中でもOHラジカルに特有な反応である事を見出した。さらに、これらの反応が起こる細胞レベルでの基盤として、マクロファージがヘモグロビンを含む赤血球を貪食した時にSPCが産生される事、さらに、この細胞レベルの反応がOHラジカルによって引き起こされることが観察された。

具体的には、OHラジカル依存的なSPC産生が特異的な反応であるかどうかを検討するため、SM分解産物について、インフュージョン導入法によるLC-MS分析を行った。これまでのSPC産生溶液においては、SMを完全に溶解させるため、TritonX-100を含む溶液を用いていたが、直接的なインフュージョン導入法では分析を阻害するため、TritonX-100を含まない溶液を用いて反応を行った。LC-MS分析の結果としては、SPCのm/zである465.3付近にシグナルの僅かな増加が認められ、また、それ以外のいくつかのm/zにおいても増加が認められた。以上のことは、OHラジカル依存的に複数のSM分解産物が生じている可能性、および、SPC産生量については、溶液組成の影響を受ける可能性を強く示唆している。

本研究では、SPC産生メカニズムの基盤として、マクロファージのライソゾーム中における赤血球消化を想定している。そこで、ヒト単球系細胞THP-1を、PMA刺激によりマクロファージ様細胞に分化させた後、赤血球(オプソニン化あり・なし)や赤血球膜ゴーストを貪食させ、細胞内に生じるOHラジカルの量を蛍光指示薬であるHPFを用いて検出した。結果としては、これまでの実験でSPCが産生された条件である、オプソニン化赤血球を貪食させた場合のみ、OHラジカルの著明な増加が認められた。以上のことから、ヘモグロビンを含む赤血球の貪食・消化の過程でOHラジカルが産生され、そのOHラジカルが赤血球膜のSMに作用してSPCが生じている可能性が強く示唆された。

我が国、突然死の主因とされている血管攣縮の根本的治療法の開発に直結すると期待される。

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4件)

Y. Kagawa, Y. Yasumoto, K. Sharifi, M. Ebrahimi, A. Islam, H. Miyazaki, Y. Yamamoto, T. Sawada, H. Kishi, S. Kobayashi, M. Maekawa, T. Yoshikawa, E. Takaki, A. Nakai, H. Kogo, T. Fujimoto, Y. Owada. Fatty acid-binding protein 7 regulates function of caveolae in astrocytes through expression of caveolin-1. **Glia**. 2015 May;63(5):780-94. 査読有 doi: 10.1002/glia.22784.

An BC, Sakai T, Komaba S, Kishi H, Kobayashi S, Kim JY, Ikebe R, Ikebe M. Phosphorylation of the kinase domain regulates autophosphorylation of myosin IIIA and its translocation in microvilli. **Biochemistry**. 2014 Dec 16;53(49):7835-45. 査読有 doi: 10.1021/bi501247z.

加治屋勝子, 岸博子, 高田雄一, 張影, 木村友彦, 宮成健司, 萩原弘, 小林誠. 食品成分による血管病予防の新展開. **FFI ジャーナル**. 2012; 284-289. 査読有

Xu D, Kishi H, Kawamichi H, Kajiya K, Takada Y, Kobayashi Sei. Sphingosylphosphorylcholine induces stress fiber formation via activation of Fyn-RhoA-ROCK signaling pathway in fibroblasts. **Cell Signal**. 2012 Jan;24(1):282-9. 査読有 doi: 10.1016/j.cellsig.2011.09.013.

[学会発表](計5件)

Ying Zhang, 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合同大会, 2015年3月21~23日(神戸国際会議場・展示場・兵庫県神戸市)

Kenji Miyanari, Discovery of novel Salacia-derived components which specifically inhibit the ROK-mediated Ca²⁺-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合同大会, 2015年3月21~23日(神戸国際会議場・展示場・兵庫県神戸市)

張影, 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重要性, 第56回日本平滑筋学会, 2014年8月6~8日(新横浜プリンスホテル・神奈川県横浜市)

Sei Kobayashi (招待講演), The roles of direct phosphorylation of myosin light-chain by Rho-kinase in Ca²⁺-sensitization of smooth muscle contraction, 第91回日本生理学会, 2014年3月16~18日(鹿児島大学・鹿児島県鹿児島市)

Sei Kobayashi (招待講演), Important role of lipid mediators in molecular mechanisms of abnormal vascular contraction, 第89回日本生理学会, 2012年3月30日(長野県松本文化会館・長野県松本市)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計3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

名称: 血管弛緩作用を有するペプチド及び血管弛緩剤
発明者: 小林誠, 木村友彦, 岸博子, 加治屋勝子, 高田雄一, 白土絵里.
権利者: 山口大学, 林兼産業株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2013-185832
出願年月日: 平成 25 年 9 月 9 日
国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等

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