

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591118

研究課題名(和文) トロンビン受容体の活性制御異常の分子機構解明と新たな動脈硬化治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic strategies for the treatment of atherosclerosis based on the elucidation of molecular mechanisms underlying dysregulation of signaling activity of thrombin receptor

研究代表者

平野 真弓 (Hirano, Mayumi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80336031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化の発症・進展に関わるトロンビン受容体の機能について以下の成果を得た。
1. トロンビンはトロンビン受容体PAR1を介してミオシン軽鎖のリン酸化を引き起こし、内皮細胞透過性を亢進させる。
2. 細胞辺縁部におけるミオシン軽鎖2リン酸化とアクチン線維束形成が内皮透過性亢進に重要な役割を果たす。
3. 血管病の形成に重要な役割を示すトロンビン受容体の脱感作障害(反応の持続性・反復性・不可逆性)モデル細胞を確立した。
4. 酸化ストレスと細胞外シグナル調節キナーゼERKが脱感作障害に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The present research project yielded the following achievements regarding the role of thrombin receptor in the pathogenesis and progression of atherosclerosis: 1. Thrombin receptor PAR1 induces the phosphorylation of myosin light chain, thereby increasing the permeability of endothelial cells. 2. The di-phosphorylation of myosin light chain and the actin filament formation at the cell periphery play a key role for the increase in endothelial permeability. 3. The present research established the cellular model, in which the desensitization mechanism for the thrombin receptor is impaired. Namely, the cells exhibited sustained, repetitive and irreversible response to thrombin receptor agonists. These phenomenon are indicators for impairment of receptor desensitization. 4. Oxidative stress and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) play a critical role for the impairment of receptor desensitization.

研究分野：医歯薬学・内科系臨床医学・循環器内科学・分子血管病態学

キーワード：血管内皮細胞 血管平滑筋細胞 トロンビン 受容体 血管透過性 脱感作

1. 研究開始当初の背景

虚血性心臓病、脳梗塞などの血管病の克服には、動脈硬化の予防と治療が最重要課題となる。血栓-血管壁相互作用を担うトロンビン受容体は、動脈硬化の病態形成に重要な役割を果たす。トロンビン受容体は G 蛋白質共役型受容体に属し、プロテイナーゼ活性化型受容体 (PARs: Proteinase-activated receptors) と称される。この受容体には 4 種のサブタイプがあり PAR1, PAR3, PAR4 がトロンビン受容体として働く。トロンビン受容体は、内皮細胞において NO 産生を介した血管弛緩・血小板凝集抑制の他、内皮細胞の活性化や内皮バリアー機能障害を引き起こす。平滑筋細胞においては、収縮、遊走、増殖、肥大、活性酸素産生などを引き起こす。トロンビン受容体は、炎症やサイトカインなどにより発現亢進することも知られている。

報告者はこれまでに、トロンビン受容体に関する血管病態学研究において、以下のことを明らかにした。

正常血管ではトロンビン受容体は主に内皮に発現することを報告した。さらに、トロンビンによる内皮バリアー機能障害の分子メカニズム (未発表)、NO 産生の分子機構 (JPET 2007)、蛋白質分解とリン酸化によるトロンビン受容体の活性制御機構 (Biochem Pharmacol 2004; Br J Pharmacol 2003; Eur J Pharmacol 2000) を明らかにした。平滑筋においては、バルーン傷害血管では肥厚病変形成に先立ち受容体発現が亢進する (Am J Physiol 2006)。くも膜下出血では、トロンビンが受容体発現を誘導し、血管攣縮が引き起こされる (Stroke 2007, Br J Pharmacol 2007)。くも膜下出血後の攣縮血管では酸化ストレスにより受容体の脱感作機構が障害され、攣縮の持続性、反復性、不可逆性に関わることを見出した。以上のことから、「トロンビン受容体の活性制御異常 (=発現亢進と脱感作障害)」が血管攣縮などの血管病の病態形成に重要な役割を果たすことを見出した。また、くも膜下出血後のトロンビン受容体発現亢進と攣縮反応性亢進に対するトロンビン受容体拮抗薬の予防効果を明らかにし、新たな攣縮治療薬としての有効性を示した。(Stroke 2007)

本研究は、動脈硬化の新たな治療標的と期待されるトロンビン受容体の観点から、受容体の発現亢進と脱感作異常の分子機構を明らかにすることにより従来の予防、治療法にはない新たな戦略の開発を目指す。製薬企業 2 社が開発中のトロンビン受容体拮抗薬は第相臨床試験を完了しており (Lancet 2009; Eur Heart J 2010; Circulation) トロンビン受容体を標的とした治療が実現可能となった。さらに、動脈硬化の初期病変形成には、トロンビンによる内皮バリアー障害が、動脈硬化進行期の肥厚病変形成にはトロンビンによる平滑筋の遊走・増殖が重要な役割を果たす事が示唆される。

2. 研究の目的

トロンビン受容体の視点に立って動脈硬化の病態を明らかにすることは、分子病態の理解のみならず、予防と治療法の開発に新たな展開をもたらす。そのために以下の点を明らかにすることを目的とする。

1. トロンビン受容体の活性制御異常の分子機構を明らかにする。
 - 発現亢進の分子機構解明
 - 脱感作障害の分子機構解明
2. トロンビン受容体の病態学的役割を明らかにする。
 - 内皮バリアー機能障害の分子機構解明
 - 平滑筋肥厚病変形成におけるトロンビン受容体の役割解明

3. 研究の方法

発現亢進を引き起こす因子や病態の同定。動脈硬化危険因子などを内皮細胞や平滑筋細胞に負荷し、トロンビン受容体の発現を解析する。

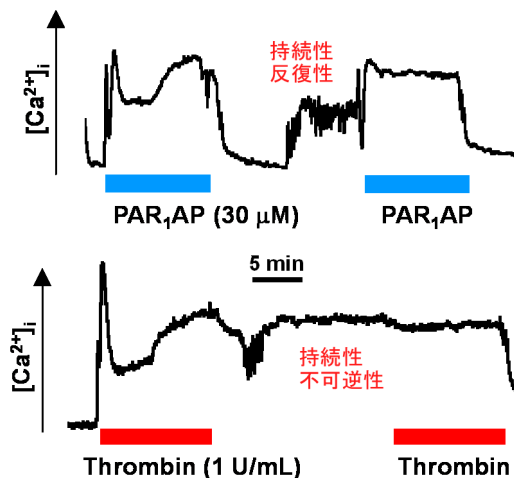
脱感作障害モデル細胞を用いた実験
トロンビン反応の持続性・反復性・不可逆性を有するモデル系を確立し、脱感作障害のシグナル伝達経路を明らかにする。

培養内皮細胞を用いた血管透過性実験
トロンビン刺激から内皮細胞収縮、透過性亢進に至るまでのシグナル伝達経路を明らかにする。

トロンビン受容体拮抗薬の治療効果検証
モデル動物のバリアー機能障害に及ぼす受容体拮抗薬の治療効果を検証する。

4. 研究成果

- 1) トロンビン受容体の脱感作障害機構解明
トロンビンおよび PAR1 活性化ペプチド (PAR1AP) による脱感作障害 (持続性・反復性・不可逆性) を有するモデル細胞を確立した。

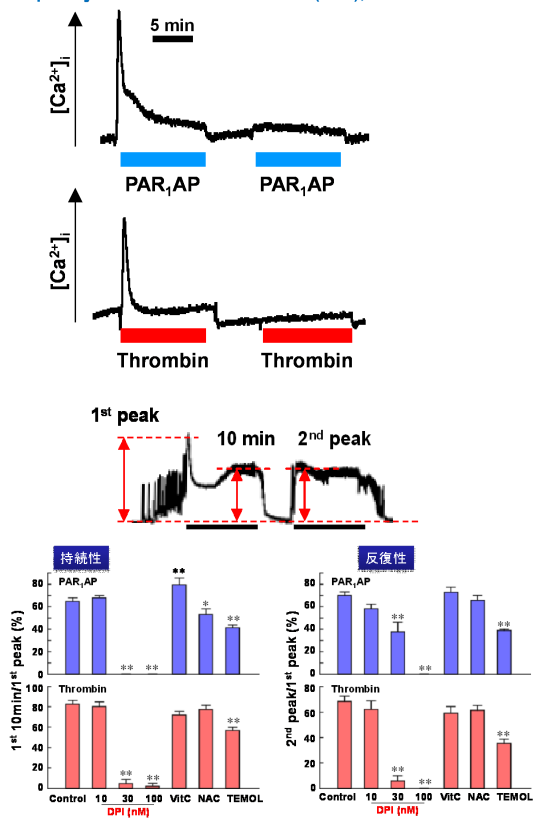


脱感作障害は、Fura2 を用いた $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応で評価した。

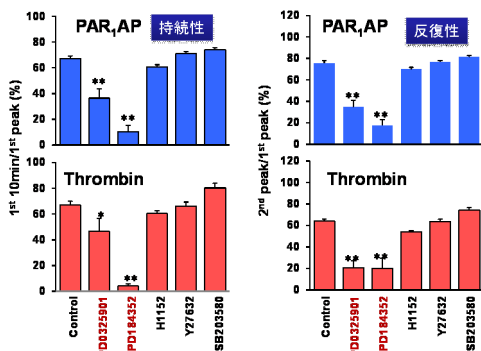
PAR₁AP は一過性の[Ca²⁺]_i上昇に続き、持続的な上昇(刺激 10 分後で最大値の 65%)を引き起こした。刺激を除くと[Ca²⁺]_iは刺激前値に戻り、2 回目の刺激を行うと 1 回目の 70%の反応が得られた。トロンビンも持続的な[Ca²⁺]_i上昇を引き起こした。この反応はトロンビンを除去しても持続した。

抗酸化剤により脱感作障害が抑制された。NADPH オキシダーゼ阻害剤のジ・フェニレン・ヨードニウム・クロライド(DPI 100nM)により、PAR₁AP およびトロンビンに対する反応は一過性となり、2 回目の反応性も減弱した。TEMPOL もこの反応性をわずかに抑制したがビタミン C、N-アセチル L-システイン(NAC)では抑制効果は認められなかった。

Diphenyleneiodonium chloride (DPI), 100 nM



2 種類の ERK 阻害剤によりトロンビンと PAR₁AP の反応は、一過性となり、2 回目の反応性も減弱した。



A7r5 細胞において、トロンビンおよび PAR₁AP による[Ca²⁺]_i上昇は、持続性、反復性、不可逆性であり受容体の脱感作障害が示唆された。この脱感作障害は、NADPH オキシダーゼ阻害剤および ERK 阻害剤により、一過性、非反復性、可逆性の反応に転換したことから、A7r5 細胞における PAR1 脱感作機構障害には酸化ストレスと ERK が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

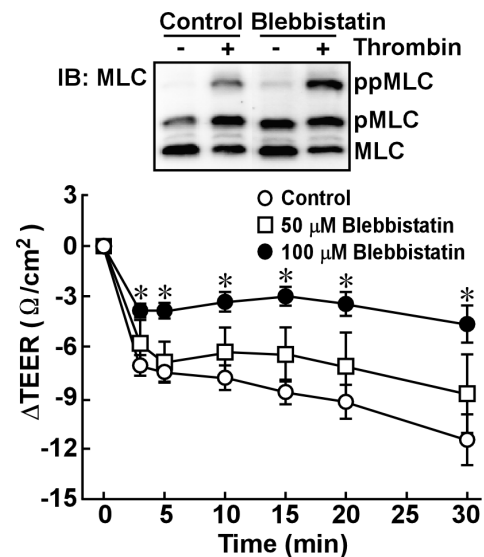
2. トロンビン受容体の病態学的役割を明らかにする。

1) 内皮バリアー機能障害の分子機構解明

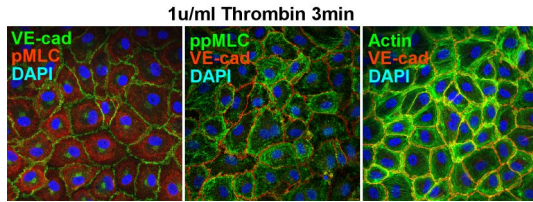
内皮細胞の透過性亢進が動脈硬化の初期病変形成に重要な役割を果たす。すでにブタ大動脈内皮細胞を用いた経内皮電気抵抗測定法によりトロンビンが内皮透過性を亢進していることを見出した。また、Phos-tag SDS PAGE 電気泳動法により、ミオシン軽鎖 1 リン酸化 (pMLC) とミオシン軽鎖 2 リン酸化 (ppMLC) の解析を行った結果、この透過性亢進と一致して ppMLC が生じること。Rho キナーゼ阻害剤は ppMLC と透過性亢進を抑制することを明らかにした。

本研究では、

ミオシン ATPase 阻害剤 (Blebbistatin) を用い、トロンビン刺激すると ppMLC を抑制することなく、透過性を抑制した。このことから、トロンビンは内皮細胞の収縮を引き起こし、透過性を亢進させること明らかとなった。

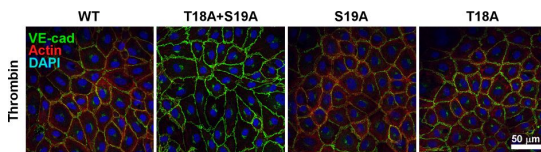
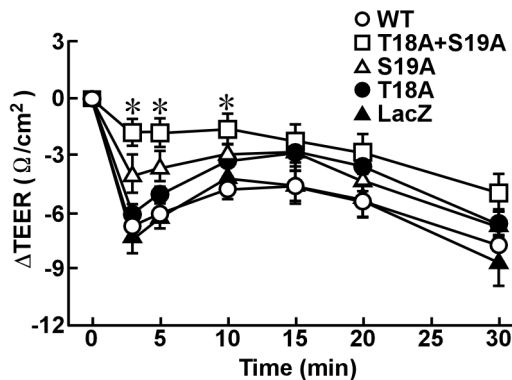


ミオシン軽鎖のリン酸化の局在を蛍光免疫染色法で明らかにした。pMLC は、トロンビン刺激前、細胞質に分布し刺激 3 分後も同様の分布を示した。一方、ppMLC は、トロンビン刺激前にはほとんど認められないが、トロンビン刺激 3 分後には細胞膜直下の細胞辺縁部に認められた。アクチンも細胞辺縁部に線維束を形成し、ppMLC と共局在していた。

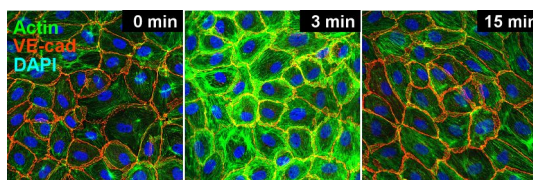


Thr18, Ser19 を Ala に変えリン酸化部位を欠損したミオシン軽鎖変異体を、アデノウイルス発現系を用いて内皮細胞に発現させ、バリアー機能障害における pMLC と ppMLC の役割を検討した。

2つのリン酸化部位 (Thr18, Ser19) の一方を欠損した場合、透過性の亢進は抑制されなかったが、2か所のリン酸化部位を欠損させた場合、透過性亢進は抑制された。この時、細胞辺縁部のアクチン線維束形成も抑制された。



トロンビン刺激後の時間経過に伴うアクチンの局在を検討した。トロンビン刺激を行うとアクチンストレスファイバーが認められるとの報告がある。本研究では、アクチンは ppMLC の発現経過時間および局在と同様の变化を示した。ppMLC の消失に伴い、細胞質でストレスファイバーを形成した。



これまでの結果から、内皮細胞において、トロンビンによる細胞辺縁部のアクチン線維束と ppMLC が求心性の収縮を生み出し、これが透過性亢進の初期事象に重要な役割を果たすこと。さらに細胞間接触の障害が辺縁部のアクチンを消失させ、アクチンストレスファイバー形成が透過性亢進の維持に関わることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(〔雑誌論文〕(計 0 件))

(〔学会発表〕(計 13 件))

【国際会議：一般演題】

1. [Hirano M](#), [Hirano K](#)
 Submembranous di-phosphorylation of myosin light chain and actin fiber formation play a critical role as an initial event during endothelial barrier disruption.
 11th International Symposium on Resistant Artery
 September 7-11, 2014, Banff, AB, Canada
 J Vasc Res 51(Suppl 2), 106, 2014 (DOI:10.1159/000369652)
2. [Hirano K](#), [Hirano M](#)
 Sub-junctional di-phosphorylation of regulatory myosin light chain plays a critical role during thrombin-induced endothelial barrier dysfunction.
 18th International Vascular Biology Meeting
 April 14 (14-17), 2014, Kyoto, Japan
3. [Hirano M](#), [Hirano K](#)
 Di-phosphorylation of myosin light chain and actin fiber formation in the submembranous region at inter-endothelial junction play a crucial role in thrombin-induced endothelial barrier disruption.
 American Heart Association Scientific Session, 2013
 November 18, 2013, Dallas, TX, USA
 Circulation 128:A12861, 2013
4. [Hirano K](#), [Hanada A](#), [Hirano M](#)
 Oxidative stress and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) are responsible for impaired desensitization and irreversible activation of thrombin receptor in vascular smooth muscle, which underlie cerebral vasospasm.
 American Heart Association Scientific Session, 2013
 November 17 (16-20), 2013, Dallas, TX, USA
 Circulation 128: A12708, 2013

5. Hirano M, Hirano K
Myosin light chain di-phosphorylation at sub-membranous region plays a critical role during thrombin-induced barrier disruption in vascular endothelial cells. International Symposium on Regulatory Circuits in Cell Motility, honoring Dave Hartshorne. October 10-11, 2013, Philadelphia, PA, USA
 6. Hirano K, Kameda K, Hanada A, Hirano M
Oxidative stress and extracellular signal-regulated kinase (ERK) play a key role in impairment of receptor desensitization and prolongation of vascular reactivity in the cerebral artery after subarachnoid hemorrhage. American Heart Association, International Stroke Conference 2013 February 7 (6-8), 2013, Honolulu, USA Stroke 44 (2): ATMP113, 2013
 7. Hirano M, Hanada A, Hirano K
Rho kinase-mediated di-phosphorylation of myosin light chain in the sub-membranous regions and circumferential actomyosin contraction mediate thrombin-induced barrier disruption in vascular endothelial cells. American Heart Association, International Stroke Conference 2013 February 6, 2013, Honolulu, HI, USA Stroke 44 (2): AWP438, 2013
- 【国内会議：一般演題】
8. 平野真弓、平野勝也：
細胞辺縁部に局在するミオシン軽鎖 2 リン酸化とアクチン繊維束形成が内皮細胞バリアー障害の初期事象として重要な役割を果たす
第 4 4 回日本心脈管作動物質学会（高松、2015年2月6日-7日）血管38 (1), 38, 2015
 9. Hirano K, Hirano M
Distinct role of mono- and di-phosphorylation of myosin light chain (MLC) in thrombin-induced endothelial barrier disruption.
第 78 回日本循環器学会学術集会、2014 年 3 月 21 日-23 日、東京
Circ J. 2014;78 (Suppl I): OJ-065
 10. Hirano M, Hirano K
Role of mono- and di-phosphorylation of myosin light chain in thrombin-induced endothelial barrier disruption.
第 87 回日本薬理学会、2014 年 3 月 19 日-21 日、仙台
J Pharmacol Sci 124 (Suppl 1): 160P, 2014
 11. Hirano K, Hirano M
Submembranous di-phosphorylation of myosin light chain and actin fiber formation play a critical role in

thrombin-induced endothelial barrier disruption

第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日-18 日、鹿児島

12. 平野真弓、平野勝也.
血管平滑筋細胞トロンピン受容体の脱感作障害のメカニズム
第 55 回日本平滑筋学会総会、2013 年 8 月 7 日-8 日、旭川
13. Hirano K, Hirano M
Critical role of Rho-kinase-mediated subjunctional di-phosphorylation of myosin light chain (MLC) in thrombin-induced disruption of endothelial barrier.
第 77 回日本循環器学会学術集会、2013 年 3 月 15 日-17 日、横浜
Circ J 77 (Suppl I): I-1198, 2013

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

名称：トロンピン受容体アンタゴニストを有効成分とする肺高血圧症の予防治療剤
発明者：平野勝也、阿部弘太郎、平野真弓
権利者：エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社、九州大学
種類：特許
番号：特許出願 2012-207371
出願年月日：平成 24 年 9 月 20 日
国内外の別：国内

名称：トロンピン受容体アンタゴニストを有効成分とする肺高血圧症の予防治療剤
発明者：平野勝也、阿部弘太郎、平野真弓
権利者：エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社、九州大学
種類：特許
番号：PCT/JP2013/075150
出願年月日：平成 24 年 9 月 20 日
国内外の別：国際

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

- <http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/index.html>
- <http://www.molcar.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 真弓 (HIRANO, MAYUMI)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：8 0 3 3 6 0 3 1

(2) 研究分担者

平野 勝也 (HIRANO, KATSUYA)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：8 0 2 9 1 5 1 6