

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893150

研究課題名(和文)血管攣縮分子機構に関する新規シグナル分子の探索

研究課題名(英文) Research for novel signaling molecule involving vascular smooth muscle abnormal contraction

研究代表者

張 影 (ZHANG, Ying)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10711260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：血管攣縮は、突発的に、脳・心筋梗塞などの重篤な血管病を誘発し、我が国突然死の主因として恐れられているにも拘らず、根本的な治療法が見つかっていない。本研究では、新たな治療標的を探するため、スフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)による血管平滑筋異常収縮シグナル伝達『SPC Fyn Rhoキナーゼ』経路の中で、全く未解明のFynとRhoキナーゼの間の分子機構に着目し、Fyn下流の新規分子としてパキシリンを見出した。新たな治療分子標的として血管攣縮治療に創薬開発の根拠を提供する事を目指す。

研究成果の概要(英文)：Vascular abnormal contraction, such as coronary artery and cerebrovascular vasospasm, is an important cause leading to myocardial infarction, ventricular arrhythmias, and sudden death. We have previously demonstrated that 「sphingosylphosphorylcholine (SPC)/Fyn/Rho-kinase」 pathway involed in abnormal contraction of vascular smooth muscle (VSM). However, the molecular mechanisms by which Fyn functions in SPC-induced contraction remains unclear. Here, we identified the association of paxillin and the active Fyn by use of matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) time-of-flight mass spectrometry. Immunostaining assay and immunoprecipitation assay further demonstrated that paxillin directly associated with constitutively active Fyn (CA-Fyn) and the activated Fyn by SPC. In addition, the siRNA-mediated knockdown of paxillin prevented SPC from inducing contraction.

研究分野：医歯薬学・生体機能分子制御学

キーワード：血管攣縮 血管平滑筋

1. 研究開始当初の背景

(1) 厚生労働省平成 23 年人口動態統計によると、我が国死因の 1 位は悪性新生物、2 位は心疾患、4 位は脳血管疾患となっている。この中で、2 位と 4 位を合計すると、「血管病」の死因は 1 位の悪性新生物と並び、原因解明と治療法開発が急務である。中でも、血管攣縮(血管異常収縮)は、心筋梗塞、脳梗塞などの急性発症で重篤な血管病を突発的に引き起こし、突然死の主因として恐れられているにも拘らず、根本的な治療法が見つからない。正常血圧維持を担う血管の正常収縮は、細胞質 Ca<sup>2+</sup>濃度により制御されるのに対して、血管攣縮は、Rho キナーゼを介した Ca<sup>2+</sup>濃度に依存しない血管平滑筋の異常収縮による事が知られている。しかしながら、Rho キナーゼ自体は、他の重要な生理機能(細胞分裂・遊走など)も制御しているため、その阻害薬の使用は得策ではない。しかし、Rho キナーゼを活性化して異常収縮を引き起こす原因分子が不明であるため、血管攣縮の従来の治療としては、止むを得ず、原因の分かっている正常収縮を阻害する Ca<sup>2+</sup>拮抗薬などが使用され、その結果、難治例や副作用としての低血圧などを生じてきた。実際の医療現場は、くも膜下出血後の脳血管攣縮のように『発症を予測していても対応策がなく患者さんの命を救えない』という悲惨な現状にある。早急に、血管異常収縮を選択的に抑制する特効薬を開発する必要があり、そのためには、Rho キナーゼを活性化する Ca<sup>2+</sup>非依存性の異常収縮の原因分子の同定とそのシグナル伝達機構を解明し、血管異常収縮の治療標的分子を見出す事が必須である。

(2) 我々は Rho キナーゼを活性化する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)を発見した。更に、SPC の下流シグナル経路についても検討し、Src ファミリーチロシンキナーゼを見出し、中でもヒトで 9 種類報告されているファミリータンパクの中で、Fyn のみが血管平滑筋異常収縮に關与する事を証明した。そこで、世界に先駆けて、『SPC Fyn Rho キナーゼ』経路を発見した。しかしながら、Fyn は直接 Rho キナーゼを活性化出来ないため、Fyn と Rho キナーゼの間にある分子 X が存在すると推測し、血管平滑筋異常収縮『SPC Fyn Rho キナーゼ』経路において、Fyn と Rho キナーゼの間に新規シグナル分子が存在するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では『SPC Fyn Rho キナーゼ 異常収縮』経路に注目しているが、Fyn と Rho キナーゼの間の分子機構は全く不明であるので、その間に存在するであろう新規 Fyn 下流分子を探索し、同定する。更に絞り込みを進め新規 Fyn 下流分子を同定し、機能解析によりその新規分子が血管攣縮に關与する事が証明できれば、新たな治療分子標的として血

管攣縮治療に創薬開発の根拠を提供する事を目指す。具体的には、以下の項目を明にする。

- (1) HaloTag プルダウンアッセイと機能プロテオミクス解析により、新規 Fyn 下流分子を同定する。
- (2) 細胞・組織・生体レベルでの機能解析により、新規 Fyn 下流分子の血管平滑筋異常収縮における役割を証明する。

3. 研究の方法

- (1) HaloTag プルダウンアッセイにより、非活性型 Fyn と結合せず、活性型 Fyn と選択的に結合するタンパク質群を、質量分析計を用いて、新規 Fyn 下流分子を同定する。
- (2) 免疫染色法により細胞内での Fyn と新規分子の局在を検討する。
- (3) 免疫沈降法を用いて、Fyn と新規分子の相互作用について検証する。
- (4) *in vitro* で新規分子の組換えタンパク質と組換え Fyn の相互作用を検討する。
- (5) 新規 Fyn 下流分子は Rho キナーゼの上流分子となるため、新規 Fyn 下流分子を、ノックダウンして Rho キナーゼの活性化が抑制されるかを検討する。
- (6) 細胞レベルで新規 Fyn 下流分子の機能解析を検討する。

4. 研究成果

本研究により、血管平滑筋異常収縮シグナル伝達『SPC Fyn Rho キナーゼ』経路において新規 Fyn 下流シグナル分子としてパキシリンを同定した。

(1) HaloTag 融合活性型 Fyn と、HaloTag 融合非活性型 Fyn 発現ベクターを構築し、HaloTag プルダウンアッセイにより、非活性型 Fyn とは結合せず、活性型 Fyn と選択的に結合するタンパク質群を、質量分析計を用いて、パキシリンというたんぱく質が新規 Fyn 下流分子として同定した(図 1)。

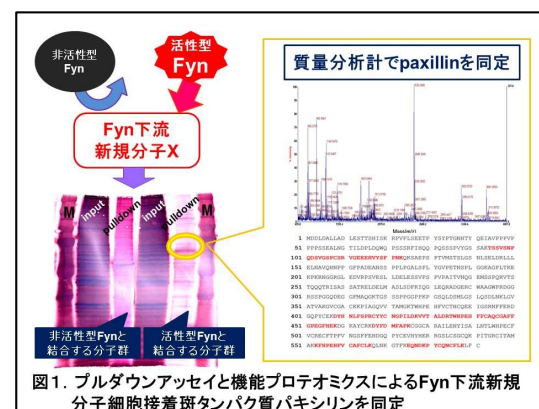


図1. プルダウンアッセイと機能プロテオミクスによるFyn下流新規分子細胞接着斑タンパク質パキシリンを同定

(2) HaloTag 融合活性型 Fyn を血管平滑筋細胞に過剰発現させ、免疫染色法により細胞内で活性型 Fyn とパキシリンの局在について検討し、ネガティブコントロール実験として HaloTag 融合非活性型 Fyn も同時に過剰発現し、パキシリンと細胞内の局在を蛍光顕微鏡

で観察した。結果により、活性型 Fyn はパキシリンと共同在したが、非活性型 Fyn とは共同在しなかったことが分かった ( 図 2 )

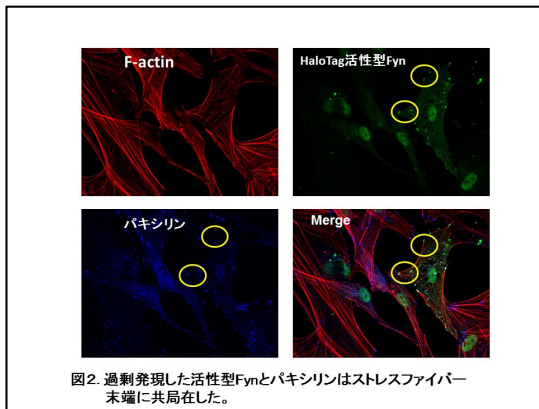


図2. 過剰発現した活性型Fynとパキシリンはストレスファイバー末端に共同在した。

(3) HaloTag 融合活性型 Fyn と非活性型 Fyn を血管平滑筋細胞に過剰発現させ、免疫沈降法を用いて、パキシリンは活性型 Fyn と結合し、非活性型 Fyn と結合しないことが証明した ( 図 3 )

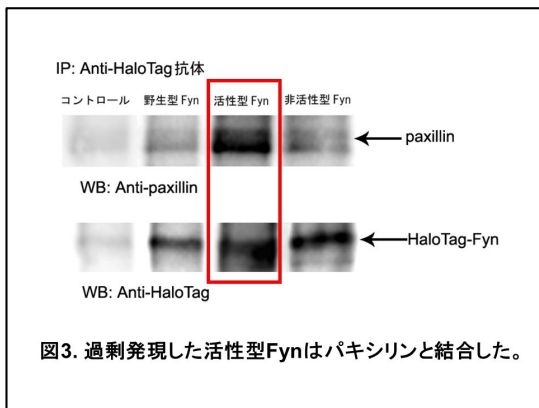


図3. 過剰発現した活性型Fynはパキシリンと結合した。

(4) パキシリンの組換えタンパク質を大腸菌で発現・精製することができた。また、遺伝子組換え Fyn をバキュロウイルス遺伝子発現ベクター系で発現と精製することも成功した。組換えパキシリンと既知の異常収縮シグナル分子 Fyn との直接作用を、研究室現有の表面プラズモン共鳴法による分子間相互作用解析装置で明らかに証明した ( 図 4 )。

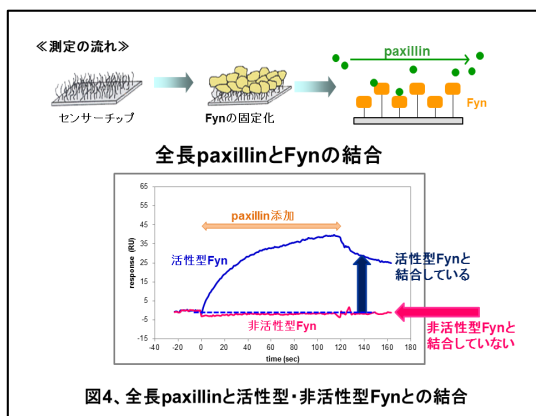


図4. 全長paxillinと活性型・非活性型Fynとの結合

(5) パキシリンをノックダウンして Rho キナーゼの活性化が抑制されるかを検討し、結果により、パキシリンをノックダウンした細胞には Rho キナーゼの活性が SPC により抑制されたことが分かった ( 図 5 )

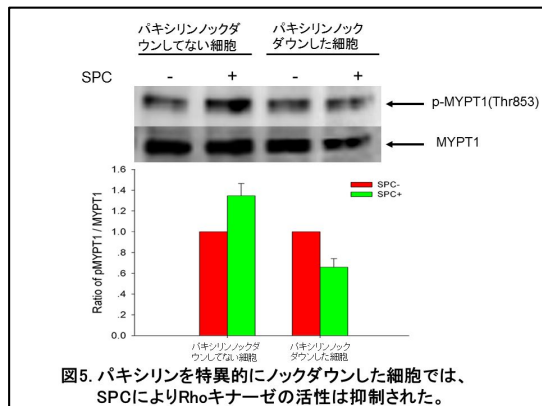


図5. パキシリンを特異的にノックダウンした細胞では、SPCによりRhoキナーゼの活性は抑制された。

(6) パキシリンを siRNA でノックダウンし、SPC 刺激によりパキシリンをノックダウンした血管平滑筋細胞の収縮は抑制された ( 図 6 )。

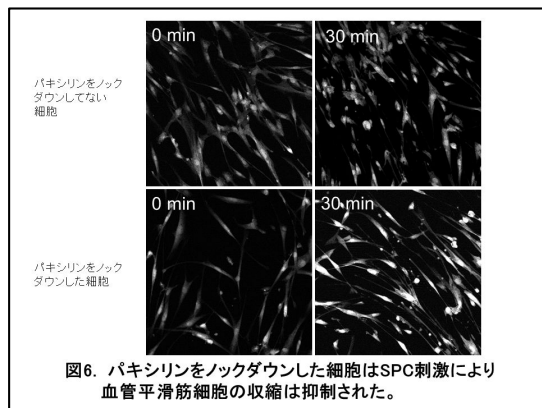


図6. パキシリンをノックダウンした細胞はSPC刺激により血管平滑筋細胞の収縮は抑制された。

(7) 本研究よりパキシリンは血管平滑筋異常収縮制御機構への関与を証明することで、血管平滑筋異常収縮シグナル伝達『SPC Fyn Rho キナーゼ』経路において、全く新しいシグナル分子の発見となるため、独創性は極めて高い。これらの研究結果を達成すれば、血管異常収縮の病的シグナル伝達機構を解く鍵となるだけでなく、血管病に対する真の分子標的治療法の確立に直結する。従って、無駄な薬剤投与や副作用を避けることができ、高齢化に伴う健康維持や医療費の抑制などにも大きく貢献出来る。

## 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 )

[ 学会発表 ] ( 計 12 件 )

1. Hiroko Kishi, Ying Zhang, Kenji Miyanari, Tomohiko Kimura, Ryodai Takagaki, Bochao Lyu, Sei Kobayashi,

- The novel role of calpain in SPC/Fyn/ROK pathway which mediates the signal transduction of abnormal vascular smooth muscle contraction, The 92<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2015 年 3 月 22 日 神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市).
2. Tomohiko Kimura, Yuichi Takada, Katsuko Kajiya, Ying Zhang, Kenji Miyanari, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi, Novel fish-derived peptide fragments which induce endothelium-dependent and -independent vasorelaxation, The 92<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2015 年 3 月 22 日 神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市).
  3. Kenji Miyanari, Kazutaka Nojimoto, Katsuko Kajiya, Yuichi Takada, Tomohiko Kimura, Ying Zhang, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi. Discovery of novel Salacia-derived components which specifically inhibit the ROK-mediated Ca<sup>2+</sup>-sensitization of vascular smooth muscle contraction, The 92<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2015 年 3 月 22 日 神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市).
  4. Ying Zhang, Hiroko Kishi, Kenji Miyanari, Tomohiko Kimura, Ryodai Takagaki, Bochao Lyu, Katsuko Kajiya, Sei Kobayashi, N-terminus of paxillin regulates actin stress fiber formation by binding to the active Fyn, The 92<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2015 年 3 月 21 日 神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市).
  5. 高柿了大、岸博子、張影、木村友彦、宮成健司、呂博超、小林誠、大豆加工品より見出された血管攣縮抑制成分, 第 66 回日本生理学会中国四国地方会, 2014 年 11 月 2 日 情報通信交流館 e-とびあかがわ(香川県・高松市).
  6. 張影、岸博子、宮成健司、木村友彦、高柿了大、呂博超、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重要性, 第 56 回日本平滑筋学会, 2014 年 8 月 25 日 ~ 27 日 新横浜プリンスホテル(神奈川県・横浜市).
  7. 岸博子、張影、宮成健司、木村友彦、高柿了大、呂博超、小林誠, SPC/Fyn/ROK 経路による血管平滑筋収縮 Ca<sup>2+</sup>感受性亢進のシグナル伝達における、Fyn および ROK 活性化の経時的変化の検討。第 56 回日本平滑筋学会, 2014 年 8 月 25 日 ~ 27 日 新横浜プリンスホテル(神奈川県・横浜市).
  8. Katsuko Kajiya, Kazutaka Nojimoto, Hiroko Kishi, Yuichi Takada, Ying Zhang, Sei Kobayashi, Important role of cell membrane microdomain for Ca<sup>2+</sup>-sensitization of vascular smooth muscle contraction, The 91<sup>st</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2014 年 3 月 16 日 ~ 18 日 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市).
  9. Hiroko Kishi, Ying Zhang, Ryodai Takagaki, Kenji Miyanari, Tomohiro Kimura, Sei Kobayashi. The time course of Fyn and ROK activation in the signal transduction of abnormal vascular smooth muscle contraction. The 91<sup>st</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2014 年 3 月 16 日 ~ 18 日 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市).
  10. 張影、岸博子、加治屋勝子、宮成健司、木村友彦、小林誠, 血管平滑筋アクチン・ストレスファイバーの形成を担う新規シグナル分子の同定とその機能解析, 第 55 回日本平滑筋学会, 2013 年 8 月 6 日 ~ 7 日 旭川市大雪クリスタルホール(北海道・旭川市).
  11. 岸博子、張影、加治屋勝子、高田雄一、宮成健司、木村友彦、野地本和孝、小林誠, 血管異常収縮の新規シグナル分子として同定された細胞骨格関連分子の、Fyn との相互作用解析, 第 55 回日本平滑筋学会, 2013 年 8 月 6 日 ~ 7 日 旭川市大雪クリスタルホール(北海道・旭川市).
  12. 加治屋勝子、野地本和孝、岸博子、張影、高田雄一、小林誠, 血管異常収縮の新規シグナル分子として同定された細胞骨格関連分子の、Fyn との相互作用解析, 第 55 回日本平滑筋学会, 2013 年 8 月 6 日 ~ 7 日 旭川市大雪クリスタルホール(北海道・旭川市).
- 〔産業財産権〕  
出願状況(計 1 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 ネインタ 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
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
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

(2)研究協力者

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

(3)研究協力者

岸 博子 (KISHI, Hi roko)  
山口大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：40359899