

## 【第144回生涯教育講座】

血管平滑筋異常収縮シグナル伝達機構の  
解明と機能性食品の開発きし ひろ 子  
岸 博 子

キーワード：血管平滑筋異常収縮，スフィンゴシルホスホリルコリン，膜ラフト，  
エイコサペンタエン酸，柑橘類由来フラボノイド

## 要 旨

血管平滑筋異常収縮は、臓器に虚血をもたらす病的な収縮であり、細胞質カルシウムイオン濃度の上昇を伴わないカルシウム非依存性の収縮である。血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達経路として、スフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)/Srcファミリーチロシンキナーゼ(Src-TK)/Rhoキナーゼ経路が報告されている。著者らはSPC/Src-TK/Rhoキナーゼ経路による血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達が、コレステロール依存性である事を見出し、コレステロールとスフィンゴ脂質に富んだ細胞膜ドメインである膜ラフトに異常収縮のシグナル分子が移動して活性化する事を明らかにした。更に、血管平滑筋異常収縮を選択的に抑制するエイコサペンタエン酸(EPA)を含有する機能性食品を、企業との共同研究で開発した。近年は柑橘類由来フラボノイドが血管平滑筋異常収縮抑制作用を有する事を見出し、血管平滑筋異常収縮の予防・治療への応用を目指している。

■背景：血管平滑筋異常収縮の  
シグナル伝達

血管平滑筋は血管壁を構成し、収縮と弛緩を繰り返す事により、血圧や血流を制御している。血管攣縮は、臓器に虚血をもたらす病的な収縮であり、冠攣縮性狭心症やくも膜下出血後の遅発性脳血管攣縮などの疾患を引き起こす。血圧や血流を制御する生理的収縮（正常収縮）と血管攣縮（異

常収縮）のメカニズムは異なり、前者は細胞質カルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )濃度によって制御されるカルシウム依存性収縮であるのに対し、後者は細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を伴わないカルシウム非依存性収縮である<sup>1)</sup>。

カルシウム依存性収縮とカルシウム非依存性収縮のそれぞれの分子機構について説明する（図1）。まず、カルシウム依存性収縮について述べる。細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇すると、 $\text{Ca}^{2+}$  はカルシウム結合タンパク質のカルモデュリン(CaM)と結合し、 $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 複合体を形成する。 $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 複合体は平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼ

Hiroko KISHI

島根大学医学部 生理学講座（環境生理学）

連絡先：〒693-8501 島根県出雲市塩冶町89-1

島根大学医学部 生理学講座（環境生理学）

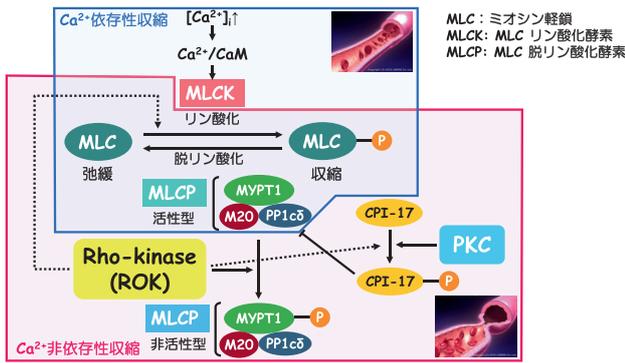


図1 カルシウム依存性収縮とカルシウム非依存性収縮の分子機構

(MLCK) を活性化し、MLCK は平滑筋ミオシン軽鎖 (MLC) をリン酸化する。平滑筋ミオシンは MLC のリン酸化により活性化し、アクチンとの相互作用が可能になり収縮が起こる。(これは、骨格筋や心筋のミオシンは基本的に活性が高く、トロポニン・トロポミオシンによりアクチンとの相互作用を抑制しているのを、Ca<sup>2+</sup>がトロポニンと結合し抑制を解除して収縮が起こる事と大きく異なる。) 細胞質 Ca<sup>2+</sup> 濃度が低下すると、平滑筋ミオシン脱リン酸化酵素 (MLCP) が MLC を脱リン酸化する事によって、平滑筋ミオシンは不活性化し、アクチンと相互作用ができなくなり弛緩が起きる<sup>2)</sup>。

一方、カルシウム非依存性収縮の分子機構では、Rho キナーゼやプロテインキナーゼ C(PKC) が重要な役割を果たす。Rho キナーゼは MLCP のサブユニットである MYPT1 をリン酸化する事により MLCP を非活性型にする。PKC は CPI-17をリン酸化する事により CPI-17(PKC-potentiated inhibitory protein of PP1, Mr = 17kDa)を活性化し、活性化された CPI-17は MLCP を抑制する。この他に、Rho キナーゼが CPI-17をリン酸化するという報告や、Rho キナーゼが直接 MLC をリン酸化するという報告もある。

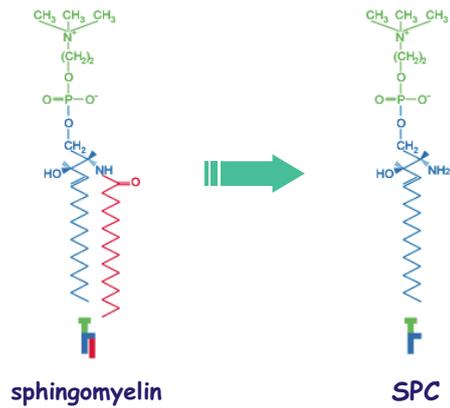


図2 SPC の産生経路

いずれも細胞質 Ca<sup>2+</sup> 濃度の増加を必要とせずに MLC のリン酸化を増加させ、収縮を引き起こすので、カルシウム非依存性収縮と言われる<sup>1)</sup>。

以上の様に、Rho キナーゼは血管平滑筋異常収縮の重要なシグナル分子である。Rho キナーゼを活性化する分子として、低分子量 G タンパク質の RhoA が有名であるが、これに加えて、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)が報告されている<sup>3)</sup>。SPC は、細胞膜脂質の成分であるスフィンゴミエリンが脱アシル化される事によって生成される (図2)。著者らは脳脊髄液中の SPC 濃度を質量分析で定量し、くも膜下出血患者の脳脊髄液中 SPC 濃度が対照群 (正常圧水頭症および髄膜腫術後患者) と比較して約20倍増加している事を見出した<sup>4)</sup>。

カルシウム指示薬 Fura-2は、Ca<sup>2+</sup>濃度が高くなると340nm 励起の蛍光強度が上昇し、380nm 励起の蛍光強度が低下する。そのときの蛍光強度比 (R=F340/F380) をとると、色素の濃度、光源の強度、細胞の大きさ等に関係なく Ca<sup>2+</sup> 濃度と対応づけられる。この性質を利用し、ブタ冠状動脈から血管平滑筋を単離し、平滑筋の走行に沿って長さ 4 mm 幅 1 mm 程度の条片を作成し、平滑筋条片に Fura-2 を負荷すると、細胞質 Ca<sup>2+</sup>

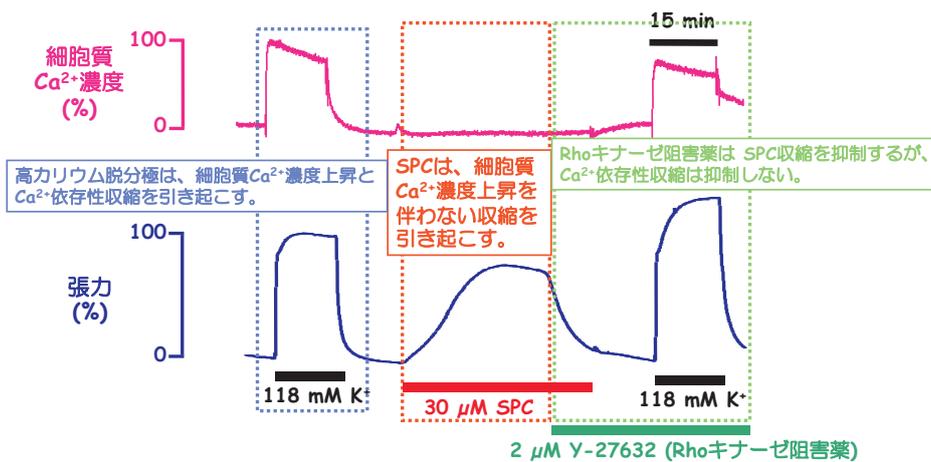


図3 プタ冠状動脈血管平滑筋条片の細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度-張力同時測定

濃度と張力を同時に測定できる。この実験系で SPC は細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を伴わない収縮、すなわちカルシウム非依存性収縮を引き起こす事が観察された<sup>5)</sup>。更に、この SPC による収縮は、Rho キナーゼ阻害薬 Y-27632 によって抑制された (図3)。以上の様に、SPC は Rho キナーゼを活性化してカルシウム非依存性の血管異常収縮を引き起こす事が示された。

更に、SPC による Rho キナーゼの活性化には、Src ファミリーチロシンキナーゼ (Src-TKs) の活性化が必要である。ブタ冠状動脈血管平滑筋組織を SPC で刺激すると、Src-TK と Rho キナーゼの双方が活性化されるが、Src-TK 阻害薬 PP1 は SPC による Src-TK の活性化と Rho キナーゼの活性化を両方とも抑制する一方で、Rho キナーゼ阻害薬 Y-27632 は SPC による Rho キナーゼの活性化のみを抑制し、SPC による Src-TK の活性化を抑制しなかった<sup>6)</sup>。更に、Src-TK 阻害薬 PP1 は、ブタ冠状動脈平滑筋において、SPC によるカルシウム非依存性収縮を抑制した<sup>6)</sup>。これらの結果から、SPC は Src-TK の活性化を介して Rho キナーゼを活性化し、カルシウム非依存性血管平滑筋異常収縮を引き起こす事が示された。

### ■血管平滑筋異常収縮シグナル伝達経路の コレステロール依存性と膜ラフトの関与

前項の様に、SPC/Src-TK/Rho キナーゼ経路が血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達を担う事が報告されたが、著者らは血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達経路がコレステロール依存性である事を見出した。手術材料として得られたヒト血管を用いて収縮実験を行うと、血中コレステロール濃度が正常な患者由来の血管平滑筋は SPC で刺激しても収縮しなかったのに対し、血中コレステロール濃度が高値の患者由来の血管平滑筋は顕著な SPC による収縮が見られた<sup>7)</sup> (図4)。そこで、SPC による血管平滑筋異常収縮が真にコレステロール依存性か検証するため、以下の実験を行った。ウサギに高コレステロール餌を与えて高コレステロール血症ウサギを作成し、得られた血管平滑筋を2つに分け、一方はそのまま (対照群) 一方はコレステロール除去薬  $\beta$  シクロデキストリンで処理後 ( $\beta$ CD 群) に収縮実験を行った。

対照群の血管平滑筋は SPC により収縮したが、 $\beta$ CD 群の血管平滑筋では SPC による収縮が抑制された。一方で、高カリウム脱分極によるカル

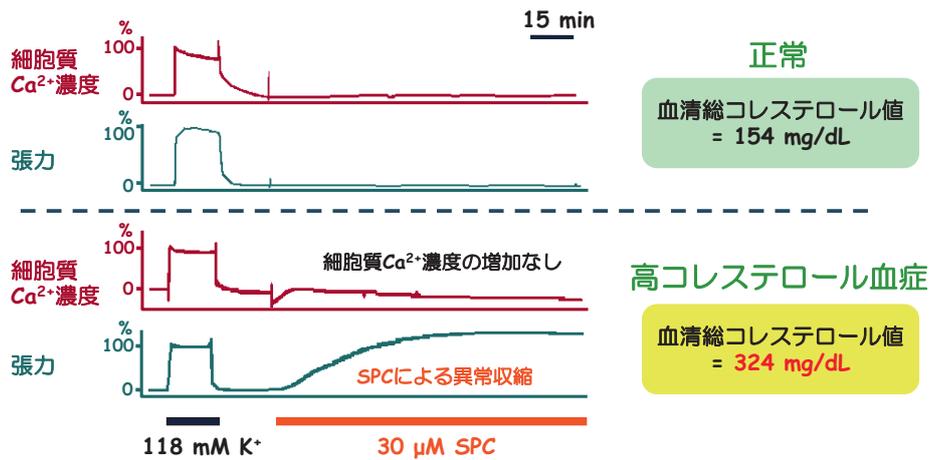


図4 SPCによる血管平滑筋異常収縮のコレステロール依存性(ヒト血管)

シウム依存性収縮やアドレナリン作動薬のフェニレフリンによる収縮はβCD群でも抑制されずに観察された<sup>7)</sup>(図5)。

血管平滑筋異常収縮シグナル伝達経路がコレステロール依存性である事のメカニズムを解明するため、著者らは膜ラフトという構造に着目した。膜ラフトはコレステロールやスフィンゴ脂質に富んだ細胞膜ドメインの一種で、シグナル分子が集積し、細胞内シグナル伝達の「場」を提供すると考えられている。血管平滑筋細胞をコレステロール除去薬βCDで処理すると、膜ラフト局在タン

パク質のカベオリン-1が細胞膜から除去され、膜ラフトが破壊される事が示された。βCDで処理していない対照群の血管平滑筋細胞をSPCで刺激するとRhoキナーゼが細胞膜に移動したが、βCDで膜ラフトを破壊した血管平滑筋細胞では、SPCによるRhoキナーゼの細胞膜への移動が抑制された<sup>7)</sup>。以上の実験結果から、SPC/Src-TK/Rhoキナーゼ経路による血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達は、膜ラフトを介して行われる事が示唆された。

■エイコサペンタエン酸(EPA)は血管平滑筋異常収縮を選択的に抑制する

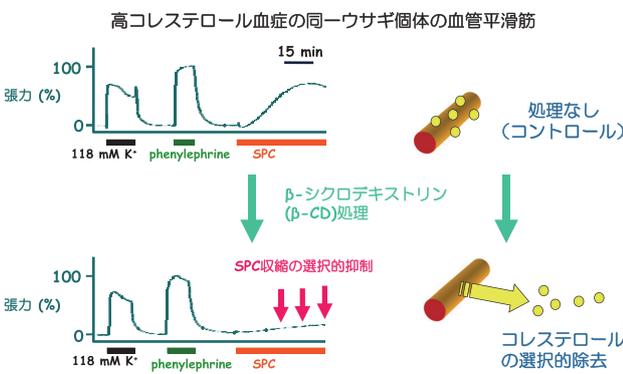


図5 選択的コレステロール除去による、血管平滑筋異常収縮のコレステロール依存性の確認

EPAは魚油に多く含まれ、炭素数20のうち二重結合を5個含むオメガ3多価不飽和脂肪酸の一種である。ブタ冠状動脈平滑筋条片を用いた収縮実験において、EPAはSPCによるカルシウム非依存性収縮を抑制する一方で、高カリウム脱分極によるカルシウム依存性収縮を抑制しなかった(図6)<sup>8)</sup>。血管平滑筋細胞をSPCで刺激すると、Src-TKの一種であるFynは細胞質から細胞膜に移動するが、EPAはこのSPCによるFynの細胞膜への移動を抑制した<sup>8)</sup>。更に、EPAはSPC

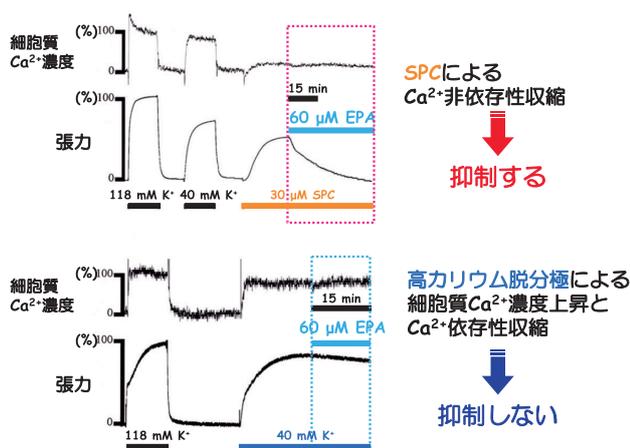


図6 エイコサペンタエン酸 (EPA) による選択的血管平滑筋異常収縮抑制

### ■産学連携：EPA を含有する機能性食品の開発

EPA は魚油に含まれるため、食品として摂取する事が可能である。著者らは企業と共同で EPA を含有する機能性食品を開発した。開発にあたり、克服すべき問題が2点あった。1つは EPA が炭素原子二重結合を持つため、魚油からの抽出過程で加熱する事により立体構造が変化し、血管平滑筋異常収縮抑制作用が低下する事である。この問題を克服するため、EPA の立体構造を変化させない抽出法を開発し特許を出願した<sup>10)</sup>。

もう1つは、EPA を摂取しても血中濃度が上昇しないケースが存在する事である。これらのケースでは、EPA の腸管からの吸収が低下していると考えられた。そこで、EPA の吸収を高めるための食品を7種類見出し、特許を出願した<sup>11)</sup>。

これらの特許を企業と共同出願し、血管異常収縮抑制作用が高い構造を保ったまま抽出した EPA に、腸管からの EPA の吸収を高める食品を添加した機能性食品を開発した (図7)。この共同研究の成果により、優れた発明や意匠を生み出した技術者・研究開発者を顕彰する公益社団法人発明協会の会長奨励賞を受賞した。

### ■柑橘類由来フラボノイドの血管平滑筋異常収縮抑制作用

EPA の原料である魚油は、気候変動や海洋汚染の影響を受けやすい。そこで著者らは食用植物由来で血管平滑筋異常収縮抑制作用を有する物質を探索し、柑橘類由来フラボノイドであるヘスペレチンとタンゲレチンを見出した (図8)。

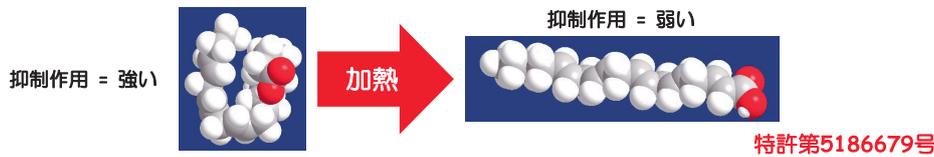
ヘスペレチンは柑橘類の果汁に多く含まれ、抗酸化作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用、脂質

による Src-TK の活性化と Rho キナーゼの活性化も抑制した<sup>6)</sup>。以上の結果より、EPA は SPC による Fyn の膜ラフトへの移動を抑制する事によって、血管平滑筋異常収縮を選択的に抑制する事が示唆された。

イヌの髄腔内自家血注入によって作成したくも膜下出血モデルでは、脳底動脈の血管径が注入7日後に有意に減少し、血管攣縮が観察されたが、EPA の髄腔内投与により血管径は自家血注入前とほぼ同程度となり、EPA が *in vivo* で血管攣縮を抑制する事が示唆された<sup>8)</sup>。更に、国内の前向き多施設無作為化臨床試験で、くも膜下出血後の遅発性脳血管攣縮に対する EPA の予防効果が検証された。EPA は高脂血症や高脂血症治療薬として市販されている。これをくも膜下出血脳動脈瘤クリッピング術後患者に2,700mg/日30日間投与したところ、EPA 投与群の症候性脳血管攣縮および脳梗塞の頻度が EPA 非投与群と比較して有意に低かった<sup>9)</sup>。この様に、EPA が血管攣縮の抑制に有効である事が、*in vivo* およびヒト臨床試験で示された。

機能性食品の開発にあたり、EPAの2つの問題点を克服した。

### 1. EPAの低温抽出法の開発



### 2. EPAの腸からの吸収不全を改善する食材の発見



図7 EPAを含有する機能性食品の開発

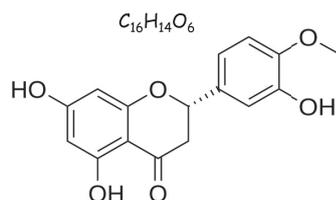
低下作用，血管保護作用，抗発がん作用などの薬理活性が報告されている<sup>12)</sup>。ブタ冠状動脈平滑筋条片を用いた収縮実験では，ヘスペレチンはSPCによるカルシウム非依存性収縮を100%近く抑制した一方で，高カリウム脱分極によるカルシウム依存性収縮はほとんど抑制しなかった。また，血管平滑筋細胞で，ヘスペレチンはSPCによるFynとRhoキナーゼの細胞膜への移動と活性化，および，SPCによるMLCのリン酸化を抑制した<sup>13)</sup>。

タンゲレチンは柑橘類の果皮に多く含まれ，抗酸化作用，抗炎症作用，抗腫瘍作用，肝保護作用，神経保護作用などの薬理活性が報告されている<sup>14)</sup>。ブタ冠状動脈平滑筋条片を用いた収縮実験では，

タンゲレチンはSPCによるカルシウム非依存性収縮を100%近く抑制した一方で，高カリウム脱分極によるカルシウム依存性収縮はほとんど抑制しなかった。また，血管平滑筋細胞で，ヘスペレチンはSPCによるFynとRhoキナーゼの細胞膜への移動と活性化，および，SPCによるMLCのリン酸化を抑制した<sup>15)</sup>。

以上の結果より，柑橘類由来フラボノイドのヘスペレチンとタンゲレチンは，SPC/Src-TK/Rhoキナーゼ経路を抑制する事によって，血管平滑筋異常収縮を抑制する事が示唆された。

ヘスペレチン  
(3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavanone)



タンゲレチン  
(5,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone)

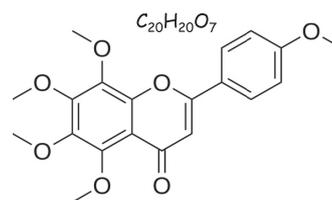


図8 ヘスペレチンとタンゲレチンの構造式

## ■まとめと今後の展望

著者らは血管攣縮を引き起こすカルシウム非依存性の血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達経路 SPC/Src-TK/Rho キナーゼ経路が、コレステロールとスフィンゴ脂質に富んだ細胞膜ドメインである膜ラフトをシグナル伝達の間とする事を見出した。多価不飽和脂肪酸の EPA は、異常収縮シグナル分子の膜ラフトへの移動を抑制する事により血管平滑筋異常収縮を選択的に抑制し、この研究

成果を応用し産学連携で EPA を含有する血管攣縮予防が可能な機能性食品を開発した。更に、柑橘類由来フラボノイドにも血管平滑筋異常収縮抑制作用がある事を見出し、血管攣縮予防・治療薬への応用が期待される。

## 利益相反

著者は、オリエンタルバイオ株式会社と共同出願した特許のライセンス料、および、同社からの寄附金を受領している。

## 参 考 文 献

- 1) Somlyo A P, Somlyo A V,  $Ca^{2+}$  Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *Physiol Rev* 83: 1325-1358 (2003).
- 2) Kamm K E, Stull J T, The Function of Myosin and Myosin Light Chain Kinase Phosphorylation in Smooth Muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25: 593-620 (1985).
- 3) Todoroki-Ikeda N, Mizukami Y, Mogami K, Kusuda T, Yamamoto K, Miyake T, Sato M, Suzuki S, Yamagata H, Hokazono Y, Kobayashi S. Sphingosylphosphorylcholine induces  $Ca^{2+}$  -sensitization of vascular smooth muscle contraction: possible involvement of Rho-kinase. *FEBS Lett* 482: 85-90 (2000).
- 4) Kurokawa T, Yumiya Y, Fujisawa H, Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Kishi H, Miwa S, Mogami K, Kato S, Akimura T, Soma M, Ogasawara K, Ogawa A, Kobayashi S, Suzuki M, Elevated concentrations of sphingosylphosphorylcholine in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage: A possible role as a spasmogen. *Journal of Clinical Neuroscience* 16: 1064-1068 (2009).
- 5) Shirao, S, Kashiwagi S, Sato M, Miwa S, Nakao F, Kurokawa T, Todoroki-Ikeda N, Mogami K, Mizukami Y, Kuriyama S, Haze K, Suzuki M, Kobayashi S, Sphingosylphosphorylcholine Is a Novel Messenger for Rho-Kinase-Mediated  $Ca^{2+}$  Sensitization in the Bovine Cerebral Artery: Unimportant Role for Protein Kinase C. *Circulation Research* 91: 112-119 (2002).
- 6) Nakao F, Kobayashi S, Mogami K, Mizukami Y, Shirao S, Miwa S, Todoroki-Ikeda N, Ito M, Matsuzaki M, Involvement of Src Family Protein Tyrosine Kinases in  $Ca^{2+}$  Sensitization of Coronary Artery Contraction Mediated by a Sphingosylphosphorylcholine-Rho-Kinase Pathway. *Circulation Research* 91: 953-960 (2002).
- 7) Morikage N, Kishi H, Sato M, Guo F, Shirao S, Yano T, Soma M, Hamano K, Esato K, Kobayashi S, Cholesterol Primes Vascular Smooth Muscle to Induce  $Ca^{2+}$  Sensitization Mediated by a Sphingosylphosphorylcholine-Rho-Kinase Pathway. *Circulation Research* 99: 299-306 (2006).
- 8) Shirao S, Fujisawa H, Kudo A, Kurokawa T, Yoneda H, Kunitsugu I, Ogasawara K, Soma M, Kobayashi S, Ogawa A, Suzuki M, Inhibitory Effects of Eicosapentaenoic Acid on Chronic Cerebral Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage: Possible Involvement of a Sphingosylphosphorylcholine-Rho-Kinase Pathway. *Cerebrovasc Dis* 26: 30-37 (2008).
- 9) Yoneda H, Yoneda H, Shirao S, Nakagawara J, Ogasawara K, Tominaga T, Suzuki M, A

- Prospective, Multicenter, Randomized Study of the Efficacy of Eicosapentaenoic Acid for Cerebral Vasospasm: The EVAS Study. *World Neurosurgery* 81: 309-315 (2014).
- 10) 特許第5186679号 血管病予防に効果を有する食品組成物
- 11) 特許第5504405号 血管病予防に効果を有する食品組成物
- 12) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hesperetin>
- 13) Lu Q, Kishi H, Zhang Y, Morita T, Kobayashi S, Hesperetin Inhibits Sphingosylphosphorylcholine-Induced Vascular Smooth Muscle Contraction by Regulating the Fyn/Rho-Kinase Pathway. *J Cardiovasc Pharm* 79: 456-466 (2022).
- 14) Ashrafizadeh M, Ahmadi Z, Mohammadinejad R, Afshar E G, Tangeretin: a mechanistic review of its pharmacological and therapeutic effects. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 31: 20190191 (2020).
- 15) Li N, Zhang Y, Morita T, Kishi H, Kobayashi S, Inhibitory mechanism of tangeretin, a citrus flavone on the sphingosylphosphorylcholine (SPC)-induced vascular smooth muscle contraction. *J Pharmacol Sci* 149: 189-197 (2022).