

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	石田 美織
学位論文題目			
Force-inhibiting effect of Ser/Thr protein phosphatase 2A inhibitors on bovine ciliary muscle			
(ウシ毛様体筋におけるSer/Thrプロテインホスファターゼ2A阻害剤の収縮抑制効果)			
共著者名			
竹谷浩介、宮津基、吉田晃敏、高井章			
Journal of Smooth Muscle Research 第51巻 平成27年 掲載予定			
研究目的			
<p>眼球の毛様体筋は副交感神経支配の平滑筋で、水晶体厚を変化させ焦点の調節を行っており、ムスカリン受容体刺激による迅速な反応および収縮の持続を特徴とする。毛様体筋の収縮にCa²⁺流入が必要であることは明らかであるが、その収縮調節機構は解明されていない。</p> <p>オカダ酸はクロイソカイメンから単離されたC38脂肪酸で、種々の平滑筋においてCa²⁺非依存性収縮を引き起こすことが報告され、また低濃度においては逆に収縮を阻害することが見出されてきた。</p> <p>オカダ酸のこれらの効果は濃度依存性であり、高濃度オカダ酸はSer/Thrプロテインホスファターゼ1 (PP1) を阻害することからリン酸化ミオシンを蓄積させ収縮させると考えられた。一方、より低濃度のオカダ酸はPP2Aを選択的に阻害することから、平滑筋収縮への阻害効果は、PP2Aの阻害に起因する可能性が考えられて来たが、メカニズムはいまだ未解決の問題のままである。</p> <p>本研究では、ウシ毛様体筋 (BCM) の収縮におけるPP2Aの役割を検討した。</p>			
材料・方法			
<p>摘出した新鮮なウシの眼から硝子体および水晶体を除去した後、毛様体筋を強膜輪から採取した。</p> <p>比較対照には異なる種の平滑筋として、これまで十分に研究されており、オカダ酸が収縮抑制効果を示すことが既報されている、モルモットの盲腸ヒモの平滑筋を使用した。オスのモルモット (3-10週齢) を犠牲死させ盲腸ヒモを採取した。平滑筋組織は実験まで水冷生理食塩水 (PSS) で保存した。</p> <p>等尺性張力測定は、0.5×2 mmに切り出した平滑筋組織を用いた。筋切片の端部をレーヨン単繊維で圧トラン</p>			

スデューサへセットし、30 °CのPSSを充填した340 μ lのチャンバー内に取り付けた。平滑筋切片を約30分間、40 mgの静止張力下で平衡化し、筋収縮機能をコリン作動薬であるカルバコール (CCh) への反応で確認した。筋切片は、CCh(2 μ M)、またはCa²⁺誘発性の収縮への反応を観察するためCa²⁺イオノフォアであるイオノマイシン(20 μ M)で持続性収縮を誘導し、3種のプロテインホスファターゼ阻害剤(オカダ酸、フォストリエシンおよびルブラトキシシンA)を種々の濃度で投与した。投与薬剤への反応後張力が一定化するか、または投与30分後の張力を測定し評価した。

さらにCa²⁺感受性亢進が平滑筋収縮に影響を与えている可能性を検証するためRhoキナーゼ阻害剤であるY27632を、またプロテインキナーゼC α (PKC α)がオカダ酸の収縮抑制効果のメカニズムに関与するという仮説が報告されておりこの検証のため広域PKC阻害剤であるG66983を、それぞれ用いてオカダ酸による効果への作用を確認した。

成 績

- ・ウシ毛様体筋に対するオカダ酸の効果。 低濃度オカダ酸(1 μ M)はCChによって収縮を誘導したBCMに対しては張力の変化を引き起こさなかった。一方でイオノマイシンによって収縮させたBCMに対しては低濃度オカダ酸は収縮を減衰させた。
- ・ウシ毛様体筋に対する、他の選択的PP2A阻害薬の効果。 フォストリエシン(3 μ M)は低濃度オカダ酸での実験結果と同様、BCMにおいてCCh誘発収縮を阻害せず、イオノマイシン誘発収縮は完全に阻害した。一方で、ルブラトキシシンA(10 μ M)はBCMに対し、CCh誘発収縮もイオノマイシン誘発収縮も、完全に阻害した。
- ・モルモット盲腸ヒモ紐に対するPP2A阻害薬の効果。 比較対象としたモルモット盲腸ヒモの平滑筋においては、BCMとは対照的に、イオノマイシン誘発収縮だけでなくCCh誘発収縮も、3つの阻害剤のいずれも収縮を抑制する効果を示した。
- ・PP2A阻害薬の濃度依存性効果。 高濃度オカダ酸はBCMと盲腸の両方で、またCCh誘発収縮およびイオノマイシン誘発収縮どちらも、持続的な収縮を増強させる効果を認めた。フォストリエシンとルブラトキシシンAは高濃度投与しても収縮を増強させる効果は認めなかった。
- ・ROCK阻害薬の効果。 Y-27632(20 μ M)は単独で、BCMのCCh誘発性の収縮張力を約半分に減少させたが、引き続き低濃度オカダを投与しても張力に変化を及ぼさなかった。
- ・PKC阻害薬の効果。 G66983は、収縮させたいずれの筋切片に対しても有意な変化を引き起こさなかった。またオカダ酸による収縮抑制効果も阻害しなかった。

考 案

本研究において3種の異なるPP2A阻害薬が示した結果から、これまで報告されて来た低濃度オカダ酸の平滑筋収縮に対する抑制効果は、PP2A阻害によるものであったと考えられた。つまり、PP2Aが平滑筋の収縮力の維持において何らかの役割を果たしているとは仮定し得る。高濃度条件においてはオカダ酸のみが収縮増強効果

を示したことは、フォストリエシンとルブラトキシンAが今実験での濃度ではPP1を阻害しないことから、PP1への阻害効果の差によって説明できると考えられる。

オカダ酸（およびフォストリエシン）がCCh誘発性のBCMにおいては収縮を阻害しなかったことはこれまで他の平滑筋において報告されてきたものと異なる独特な結果で、本研究の重要な検討課題である。一つに、Rhoキナーゼ依存性機構を介してのCa²⁺感受性亢進によってオカダ酸の収縮抑制効果がマスクされた可能性があったが、今回のRhoキナーゼ阻害薬を用いた検討結果、またウシ毛様体筋以外のモルモット盲腸ヒモを含む種々の平滑筋においてはアゴニスト誘発性の収縮をオカダ酸が抑制することが報告されているため考えにくい。

これまで、平滑筋の収縮はミオシンのリン酸化のバランスによって調節されていると考えられて来たが、オカダ酸によって阻害される別の何らかの重要な収縮調節機構が存在する可能性があり、解明のためにより詳細な研究が必要とされている。

オカダ酸が平滑筋に存在する何らかの弛緩因子を活性化していると仮定する場合、オカダ酸がCCh誘発性に収縮しているBCMを弛緩させることができなかったことから、弛緩因子がこの条件下では不活性のままになっているのかもしれない。この弛緩因子の候補の一つとしてPKC α が以前、イヌ動脈を用いた研究で提案されていたが、本研究では、PKC α 阻害薬を投与してもオカダ酸による収縮抑制は阻害されなかった。

結 論

低濃度のオカダ酸は、PP2Aの阻害を介して平滑筋収縮を阻害した。




一方でウシ毛様体筋をCChで収縮させた場合には、オカダ酸の収縮抑制効果に抵抗性を示した。このようなオカダ酸の弛緩効果に耐性のある収縮の報告はごく僅かしかされておらず、この独特な反応は、イオノマイシンで収縮させた場合とを比較することにより、今後平滑筋の収縮調節メカニズムを解明することに繋がる可能性がある。

引 用 文 献

- 1) Takai A, Bialojan C, Troschka M, Rüegg JC. Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. FEBS Lett. 1987 Jun 8;217(1):81-4.
- 2) Obara K, Mitate A, Nozawa K, Watanabe M, Ito Y, Nakayama K. Interactive role of protein phosphatase 2A and protein kinase C α in the stretch-induced triphosphorylation of myosin light chain in canine cerebral artery. J Vasc Res. 2010 Jan;47(2):115-27.
- 3) Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J,

Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997 Oct 30;389(6654):990-4.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	石田 美織
<div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;"> 審査委員長 船越 洋  </div> <div style="text-align: right; margin-bottom: 10px;"> 審査委員 柏柳 誠  </div> <div style="text-align: right;"> 審査委員 加藤 剛志  </div>			
学位論文題目 Force-inhibiting effect of Ser/Thr protein phosphatase 2A inhibitors on bovine ciliary muscle (ウシ毛様体筋における Ser/Thr プロテインフォスファターゼ 2A 阻害剤の収縮抑制効果)			
<p>眼球毛様体筋は、水晶体厚を変化させ目の焦点の調節機能を担う。また、毛様体筋の収縮程度の調節により繊維柱帯を広げてシュレム管からの眼房水流出を変化させ眼房圧調節機能を担う。一方で、その障害は近視／遠視や緑内障などの病態修飾に関わるため、毛様体筋の調節（収縮）機構の解明は重要な課題である。毛様体筋は副交感神経支配の平滑筋で、アセチルコリン受容体刺激による迅速な反応および収縮の持続を特徴とする。この収縮には Ca^{2+} 流入が必要であることと、ミオシンのリン酸化バランスにより説明されてきたが、その収縮機構は未だ十分解明されていない。</p> <p>本研究では、オカダ酸と他の Protein Phosphatase 2A (PP2A) 阻害剤を用いて、ウシ毛様体筋細片の収縮調節を <i>in vitro</i> で解析した。</p> <p>毛様体筋の収縮刺激としては、アセチルコリン作動薬であるカルバコールと inonomecin を用いた。オカダ酸低濃度処理により、カルバコールによる毛様体筋細片の収縮に対して張力の変化を引き起こさなかったが、</p>			

ionomycin による収縮は減衰させた。PP2A 阻害薬であるフォストリエシンは、オカダ酸低濃度処理と同様の結果を示した。一方で、PP2A 阻害薬ルブラトキシシン A は、毛様体筋細片のカルバコールと ionomycin 誘発収縮のどちらも阻害した。モルモット盲腸ヒモ紐を用いたところ、3 剤ともカルバコールと ionomycin 誘発性収縮を抑制した。以上から、オカダ酸の低濃度処理による毛様体筋収縮抑制作用は PP2A を介すると考えられた。

フォストリエシンとルブラトキシシン A はどちらも高濃度処理においても毛様体筋収縮を増強することはなかったが、オカダ酸高濃度処理により、カルバコールと ionomycin 処理による毛様体筋の持続収縮を増強した。フォストリエシンとルブラトキシシン A は高濃度でも PP1 作用を示さず、一方でオカダ酸は高濃度において PP1 作用をもつことから、この作用は PP1 作用の差で説明可能と考えられた。

但し、オカダ酸低濃度とフォストリエシン処理においては、モルモット盲腸ヒモ紐と異なり、毛様体筋のカルバコールによる収縮効果を抑制しなかったが、この結果はこれまでの報告とは異なっていた。この差が、毛様体筋であるためか種の相違かの区別はついていないが、前者である場合には、ヒトの毛様体筋収縮調節機構を考える上で重要な新知見と言える。Rock 阻害剤 Y-27632 処理により、カルバコール誘発性収縮を半分に減少させたが、引き続き低濃度のオカダ酸処理をしても張力に変化を及ぼさなかった。PKC 阻害剤である Go6983 ではオカダ酸による収縮抑制効果を阻害しなかった。したがって、オカダ酸低濃度処理で認めたウシ毛様体筋細片と他の平滑筋との相違は、ミオシンのリン酸化バランスによっては説明されない新しい調節分子機序の存在を推察させる。本研究は毛様体筋の収縮機序に新しい知見を提示したもので、基礎分野に加えて眼科領域に於いても重要な進歩を与えるものである。論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対しても適切な回答が得られ、提出者はこの領域において十分な知識を有することが示された。以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものであると判定した。