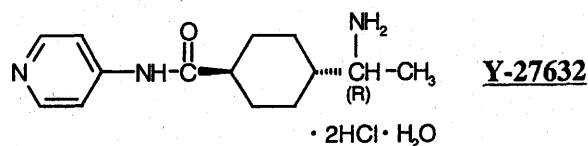


氏 名	う え は た ま さ よ し 上 畑 雅 義
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 640 号
学位授与の日付	平 成 13 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	低分子量 G 蛋白 Rho の標的蛋白質の細胞機能に関する研究

論文調査委員 (主 査)
教 授 市 川 厚 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 河 合 明 彦

論 文 内 容 の 要 旨

低分子量 G 蛋白質のひとつである Rho は、細胞運動や細胞接着などさまざまな細胞機能の分子スイッチとして働いていることが知られており、平滑筋においてはカルシウム感受性の調節機構を介して収縮弛緩制御に関与していると考えられている。一方、ピリジン誘導体: Y-27632 はウエルファイド株式会社にて創製された新規合成化合物で、平滑筋弛緩作用を有することが明らかとなっている。



著者は Y-27632 の平滑筋弛緩作用機序解析を進め、Y-27632 は Rho のエフェクター分子として Rho のシグナルを下流に伝える働きを持っていると考えられている ROCK を阻害することにより平滑筋弛緩作用を発揮していることを明らかにした。更に Y-27632 が、各種細胞機能および病態における Rho/ROCK の関与を明らかにする上で、有用なツールとなりうることを示した。

第一章 平滑筋弛緩薬 Y-27632 の作用機序解析

Y-27632 はウサギ大動脈標本において、フェニレフリンによる収縮を濃度依存的に弛緩させたが、カルシウム流入を引き起こす KCl による収縮に対しては弱い弛緩作用を示すにとどまった。さらに、ブタ冠動脈標本において Y-27632 は種々のアゴニストによる収縮をほぼ同濃度で弛緩させた。このことから Y-27632 はアゴニスト収縮に共通する平滑筋収縮機構に作用していると考えられた。この収縮機構としては細胞内カルシウムの上昇に基づく機構とカルシウム感受性を亢進させる機構が知られている。そこでスキンド標本を用い、両機構に対する Y-27632 の抑制作用を検討した。Y-27632 はカルシウム感受性の亢進に基づき、Rho の活性化が関与する GTPγS 収縮に対して、濃度依存的な抑制作用を示したが、カルシウム収縮に対しては抑制作用を示さなかった。これらの結果から、Y-27632 の作用点は Rho の活性化を介するカルシウム感受性機構のどこかであることが示唆された。

Y-27632 の分子標的を探索するため、放射性ラベルした Y-27632 の誘導体を合成し、Photoaffinity labeling を実施した。その結果、分子量約 150 kDa の蛋白質が特異的に検出され、部分アミノ酸配列よりこれが Rho の下流に存在する Ser/Thr protein kinase の一つである p160ROCK (Rho associated coiled-coil forming kinase) であると推定した。ヒト血小板より p160ROCK を精製し、Y-27632 およびその関連化合物について p160ROCK 阻害作用を検討した。その結果、p160ROCK 阻害作用と平滑筋弛緩作用との間には正の相関性が認められた。Y-27632 の選択性を検討するため p160ROCK (ROCK-I) と同様に Rho で活性化され、kinase domain で高い homology が報告されている ROK α (Rho キナーゼ, ROCK-II) に対する化合物の阻害作用を組み替え蛋白質を用いて検討したところ、ROCK-I とほぼ同一濃度で阻害作用が

認められた。Rhoにより活性化されるプロテインキナーゼとしてはROCKのほかPKNやCitron kinaseが知られている。Y-27632のPKNおよびCitron kinaseに対する阻害作用(Ki値)はROCKと比較して10数倍以上弱かった。

以上、著者はY-27632の平滑筋弛緩作用がROCK-I/-II阻害作用により引き起こされていることを明らかにした。さらに、Rho/ROCKを介するカルシウム感受性機構がアゴニスト収縮において重要な役割を果たしていることも明らかにした。

第二章 細胞機能および病態におけるROCKの関与

Rhoは平滑筋収縮だけでなく主に運動や形態変化に関するさまざまな細胞機能に関与すると考えられている。これらの機能にROCKが関与するか否かを検討するため、Rhoの活性化に伴う細胞接着斑/ストレスファイバーの形成、神経突起の退縮および癌細胞の運動亢進に及ぼすY-27632の作用を検討した。その結果、いずれの機能においてもY-27632は抑制作用を示し、ROCKがRhoの下流でこれらの機能に関与することが明らかとなった。なお、これらの結果は既に報告されているROCKのドミナントネガティブ体等の発現実験の結果とも一致した。

Y-27632は細胞レベルだけでなく動物に投与することが可能なため、個体レベルにおけるROCKの関与を検討することが可能と考えられる。そこで著者は病態におけるROCKの関与を検討するため、高血圧および癌転移の動物モデルにおけるY-27632の作用を検討した。

自然発症高血圧ラットなどの高血圧モデル動物にY-27632を経口投与すると明らかな降圧作用が認められた。一方、正常血圧ラットに対しての作用は軽微なものであった。これらの結果は、高血圧の発症・維持にROCKの活性化が関与することを示唆するものと考えられる。

次に、癌細胞運動抑制作用を有するY-27632が実際の癌転移モデルで有効か否かを検討した。モデルとして、ラット腹腔にRhoを強制発現させた癌細胞を移植し腹膜への転移を観察する腹膜播種モデルを用いた。その結果、Y-27632を浸透圧ポンプにより持続的に投与することで、腹膜播種は著明に抑制されることが明らかとなった。

以上、著者は、Y-27632の平滑筋弛緩作用がカルシウム感受性機構に重要な役割を演じているROCKの阻害作用により発現していることを見出した。さらに、Y-27632が、Rho/ROCKの役割を解析するプローブとして使用可能であることを示し、また、高血圧や癌転移の病態においてRho/ROCKが重要な役割を演じていることも明らかにした。

今後さらにY-27632の作用を解析することで、さまざまな生命現象におけるRho/ROCKの役割が解明されるものと期待されると共に、病態における関与が解明され、新たな治療薬開発に結びつくことが期待されよう。

論文審査の結果の要旨

平滑筋の収縮は、細胞内の遊離Ca²⁺濃度により規定されるとするカルシウム依存性収縮機構がよく知られている。しかし、平滑筋収縮弛緩剤のアゴニストによる細胞内Ca²⁺濃度変化と平滑筋収縮力変化との間には、厳密な意味での相関関係は存在しないことがすでに明らかになっている。そこで、もう一つの収縮制御機構、すなわちカルシウム感受性機構が提唱されている。これは、カルシウムに依存しながらカルシウムに対する反応を増強させる機構が存在するというものである。カルシウム感受性機構の全体像は依然として不明であるが、GTPの非水解性アナログであるGTPγSによってカルシウム感受性機構の亢進が認められ、また、この機構に低分子量G蛋白質の一つであるRhoの活性化が関与することが報告された。さらに、Rhoの活性化によりMLCPが阻害されることが見出され、MLCKとは反対の方向からミオシン軽鎖のリン酸化レベルを上昇させることで収縮を起こすことが示唆された。このような研究背景のもと、本論文は、平滑筋弛緩作用を示すピリジン誘導体：Y-27632；((R)+trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexanecarboxamide 2HCl)の標的分子の探索から、Y-27632がRhoの下流に存在するSer/Thrプロテインキナーゼのp160ROCK(別名Rho associated coiled-coil forming kinase, Rho-kinase)に結合し、Rho-ROCKキナーゼを阻害することによりカルシウム感受性機構を介して平滑筋弛緩作用を示すことを初めて明らかにしたものである。さらに、Rhoが平滑筋収縮だけでなく多くの細胞において主に運動や形態変化に関する機能に関与すると考えられていることに着目し、Y-27632はRho-ROCKの役割を解析するプローブとして使用することが可能であると仮説し、それに基づいて、実際に線維芽細胞における外部刺激に伴うストレスファイバー形成、神経突起の退縮、および癌細胞の運動亢進におけるRho-ROCKの重要な役割を明らかにした。これら一連の基礎研究は、高血圧や癌転移をはじめ、種々の病態におけるRho-ROCKの制御をターゲットとする薬物の創製

が可能であることを示唆するものとして高く評価できる。さらに、本化合物の作用を解析することで、様々な生命現象における Rho-ROCK の役割とその病態における関与が解明され、新たな治療薬開発に結びつくことが期待できる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成12年12月8日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。