

氏 名	さわ だ なお き 澤 田 直 樹
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2353 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Inhibition of Rho - Associated Kinase Results in Suppression of Neointimal Formation of Balloon-Injured Arteries. (Rho-Associated Kinase 阻害によりバルーン傷害血管の新生内膜形成は抑 制される)
論文調査委員	(主 査) 教 授 成 宮 周 教 授 篠 山 重 威 教 授 中 尾 一 和

論 文 内 容 の 要 旨

低分子量 G 蛋白 Rho のエフェクターである Rho-associated kinase (ROCK) はミオシン軽鎖リン酸化を介してカルシウム感受性を上昇させることにより、血管平滑筋細胞 (VSMC) のトーンスを増強させる。我々はこれまでにナトリウム利尿ペプチドやアンギオテンシン II などの血管作動性物質が血管トーンスの調節のみならず VSMC の遊走・増殖をも制御することを明らかにしてきた。今回、VSMC のトーンス調節系である Rho-ROCK 経路の VSMC の遊走・増殖調節における意義を、主として ROCK 特異的阻害薬 Y-27632 を用いて検討した。

培養ヒト大動脈 VSMC の DNA 合成は Y-27632 (0.3-30 μ M) 処理により用量依存的に抑制された。VSMC に RhoA あるいは ROCK の dominant negative 体を発現させたところ、BrdU の取り込みは有意に抑制された。また Y-27632 処理により、PDGF-BB, LPA により誘導される VSMC の遊走も用量依存的に抑制された。

Y-27632 を正常圧 Wistar ラットに全身持続投与し、頸動脈バルーン傷害を施行した。Y-27632 投与期間中、収縮期血圧は対照に比し 20-30mmHg 低下し、血管組織中 Y-27632 濃度は、既報および上記の *in vitro* での結果から示唆される有効かつ特異的な ROCK 阻害濃度に一致した。Y-27632 は傷害 14 日目の新生内膜形成を用量依存的かつ著明に抑制した (内膜・中膜比; 対照群: 0.92 ± 0.21 , Y-27632 (35mg/kg/day) 投与群: 0.34 ± 0.06 , Y-27632 (70mg/kg/day) 投与群: 0.22 ± 0.02)。同程度の降圧を示すヒドララジン投与群では新生内膜形成は影響されず、Y-27632 による新生内膜抑制作用は血圧下降を介するものでないことが示された。

ROCK はミオシンフォスファターゼ調節サブユニットである MYPT1 のリン酸化により酵素活性を抑制し、その結果ミオシン軽鎖 (MLC₂₀) のリン酸化量を上昇させる。今回 MYPT1 および MLC₂₀ のリン酸化はバルーン傷害血管で亢進していたが、Y-27632 投与傷害血管では非傷害血管レベルにまで抑制されていた。この結果から、傷害血管における ROCK の活性化が示唆された。

Rho による細胞増殖の制御機構として Cyclin-dependent kinase inhibitor のひとつである p27^{kip1} の発現減少が報告されている。また、p27^{kip1} の発現減少はバルーン傷害血管における VSMC 増殖と相関することも明らかにされている。今回傷害 7 日後の血管では VSMC の増殖を反映して、p27^{kip1} の発現は非傷害血管に比し減少していた。一方、Y-27632 の投与により p27^{kip1} の発現レベルは非傷害血管と同程度にまで回復していた。この結果から Y-27632 による新生内膜抑制効果の少なくとも一部は VSMC 増殖抑制作用を介していると考えられた。

本研究により *in vitro* および *in vivo* において VSMC の増殖・遊走制御における ROCK の意義が解明され、ROCK が血管トーンスのみならず血管リモデリングをも制御していることが示された。また ROCK 活性化は高血圧症ならびに増殖性血管病変に共通の要因であると考えられた。したがって ROCK 阻害は血管トーンス・血管リモデリングの双方を制御する細胞内シグナル経路を抑制するものであり、高血圧症・動脈硬化症などに対する有効な治療法として期待される。

論文審査の結果の要旨

低分子量 G 蛋白 Rho およびそのエフェクターである Rho-Associated Kinase (ROCK) は血管平滑筋のカルシウム感受性上昇を介して血管トーンスを増強し、高血圧症の病態生理において重要な役割を果たすことが報告されている。本研究では血管リモデリングにおける ROCK の意義を検討した。

培養ヒト血管平滑筋細胞 (VSMC) の DNA 合成は、ROCK 特異的阻害薬である Y-27632 処理、および Rho または ROCK のドミナントネガティブ体遺伝子の導入によって抑制された。さらに VSMC の遊走も Y-27632 処理により用量依存的に抑制された。

Wistar ラットに Y-27632 を全身持続投与し、頸動脈バルーン傷害を施行すると、傷害血管の新生内膜形成は Y-27632 投与群において対照群に比し有意に抑制された。傷害血管では ROCK の基質であるミオシンフォスファターゼ調節サブユニットおよびミオシン軽鎖のリン酸化が上昇しており、ROCK 活性の亢進が示唆された。また、傷害血管ではサイクリン依存性キナーゼインヒビター p27^{kip1} の発現が減少していたが、これは Y-27632 投与により解除された。これらの結果から、ROCK は in vitro および in vivo において VSMC の遊走・増殖を調節していることが明らかになった。

以上の研究は ROCK の血管リモデリングにおける意義の解明に貢献し、高血圧症・動脈硬化症の成因の研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年2月7日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。