

学位授与番号：甲 956 号

氏 名：湯本正寿

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 26 年 2 月 12 日

学位論文名：

ブレビスタチン（ミオシンⅡ阻害薬）はモルモットのスキンド気管平滑筋標本のカルシウムによって引き起こされた（また、感受性が高まった）収縮力を抑制する

主論文名：

Blebbistatin, a myosin II inhibitor, suppresses Ca²⁺-induced and “sensitized”- contraction of skinned tracheal muscles from guinea pig .

（ブレビスタチン（ミオシンⅡ阻害薬）はモルモットのスキンド気管平滑筋標本のカルシウムによって引き起こされた（また、感受性が高まった）収縮力を抑制する。）

学位審査委員長：森川利昭教授

学位審査委員：竹森重教授、桑野和善教授

論文要旨

論文提出者名

湯本 正寿

指導教授名 上園 晶一

Blebbistatin, a myosin II inhibitor, suppresses Ca^{2+} -induced and "sensitized"- contraction of skinned tracheal muscles from guinea pig

(ブレビスタチン (ミオシン II 阻害薬) はモルモットのスキンド気管平滑筋標本のカルシウムによって引き起こされた (また、感受性が高まった) 収縮力を抑制する。) **Journal of Smooth Muscle Research** 第 49 巻、2013 年

II 型ミオシン ATPase の阻害薬として知られる blebbistatin (ブレビスタチン) は、平滑筋型ミオシン ATPase 活性及び平滑筋生筋収縮についても 10 μ M 程度で抑制する。我々は、ブレビスタチンの平滑筋収縮抑制メカニズムを調べるため、モルモット盲腸紐の細胞膜を化学的に破壊したスキンド標本を用いた収縮実験を行った。そして、ブレビスタチンはスキンド盲腸紐標本の Ca^{2+} 活性化収縮張力を 10 μ M 程度で非可逆的に抑制した。この際、収縮の Ca^{2+} 感受性及び、ミオシン軽鎖リン酸化レベルはブレビスタチンによって影響されないことから、ブレビスタチンは収縮反応の最下流であるミオシン-アクチン結合を直接的に抑制すると結論された。標本のミオシン・アクチンフィラメント配列はブレビスタチンによって攪乱されることから、ミオシン・アクチン間の空間的な解離が収縮抑制を引き起こすことが示唆された、

気管平滑筋のミオシン・アクチン両フィラメントは消化管平滑筋の収縮フィラメントに比べて構造的に不安定とされる。我々は、気道平滑筋ではブレビスタチンによるミオシン・アクチン配列攪乱が盲腸紐に比べて強く起こるため、より収縮が抑制される、という仮説を立て、モルモット気管平滑筋スキンド標本を用いて検証を行った。

ブレビスタチンは 10 μ M 以上で、 Ca^{2+} 活性化収縮張力を、収縮の Ca^{2+} 感受性及びミオシン軽鎖リン酸化程度に影響することなく非可逆的に抑制した。又、ミオシンホスファターゼ阻害薬 tautomycin による Ca^{2+} 非依存性収縮も非可逆的に抑制した。収縮抑制の程度は、盲腸紐スキンド標本の収縮抑制程度に比べて強く、仮説を支持する結果になった。更に、ブレビスタチンは GTP- γ S によっておこる収縮の増強 (感作された収縮) 時にも、同様に収縮張力を抑制した。

以上の結果から、気管平滑筋に於いてもブレビスタチンは収縮フィラメント活性を制御する細胞内情報伝達系ではなく、ミオシン・アクチンフィラメントに直接作用し、平滑筋収縮を抑制することが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

湯本正寿氏の学位申請論文は、主論文 1 編、参考論文 2 編からなり、主論文の原題は、「Blebbistatin, a myosin II inhibitor, suppresses Ca^{2+} -induced and "sensitized"-contraction of skinned tracheal muscles from guinea pig」、日本語標題は「ブレビスタチン(ミオシン II 阻害薬)はモルモットのスキンド気管平滑筋標本のカルシウムによって引き起こされた(また、感受性が高まった)収縮力を抑制する。」であり、Journal of Smooth Muscle Research 2013 年 10 月 4 日号に Published online として掲載された。

以下学位審査論文の要旨と審査委員会における審査結果の要旨を記載する。

ブレビスタチンは新しい II 型ミオシンの特異的 ATPase 阻害薬である。

湯本氏は盲腸紐の化学的スキンド標本にブレビスタチンを使用したところ、非可逆性の収縮抑制が見られ、この反応では Ca^{2+} 感受性及び、ミオシン軽鎖リン酸化レベルがブレビスタチンによって影響されないことから、収縮反応の最下流であるミオシン-アクチン結合を直接的に抑制することが判明した。標本のミオシン、アクチンフィラメント配列がブレビスタチンによって攪乱されることが示唆されたことから、より不安定なミオシン-アクチンフィラメント構造を有する気管平滑筋を用いた研究を行った。

初めにモルモットから気管平滑筋の少切片を取り出し、 β -escin+Ca ionophore

A23187 を用いて細胞膜に穴を開けスキンド標本を作成した。本筋肉標本の張力を測定するとともに、MLC20 のリン酸化の様子をウェスタンブロット法で評価した。

その結果、① Ca^{2+} 活性化収縮はブレビスタチンの投与下に用量依存性に低下したが、カルシウムイオン濃度依存性の収縮効果は保たれていた。②ブレビスタチン投与によっても MLC20 磷酸化には影響は見られなかった。③myosin phosphatase の阻害薬である taunomycin によって引き起こされる収縮をブレビスタチンは量依存的に抑制した。④感作された気管支平滑筋異常収縮モデルを用いた測定ではブレビスタチンは収縮を用量依存的に抑制した。

以上から、①ブレビスタチンは気管平滑筋モデルの収縮張力を抑制するが、MLC20 磷酸化レベルには影響を及ぼさない、②myosin phosphatase の阻害下でも収縮を抑制する、③感作された状態でも同様に収縮力を抑制する、④収縮力抑制は最大張力 F_{\max} には影響を及ぼさない、と総括した。ブレビスタチンは気管平滑筋の収縮を磷酸化レベルに影響を及ぼさずに抑制することから湯本氏は、気管支喘息への治療薬としての可能性がある結論づけた。

平成 26 年 1 月 29 日、審査委員長森川利昭および、竹森重、桑野和善両審査委員出席のもとに公開学位審査会を開催し、湯本氏による研究概要の発表に続いて口頭試験を実施した。口頭試験では以下の質問があった。(1)ブレビスタチンの平滑筋抑制メカニズムは何か。(2)軽鎖リン酸化がどのようにミオシンを活性化させるのか。(3)ミオシンフィラメントの構造に作用して収縮を抑制するというのは具体的にどのようなことか。(4)塩酸ファスジルによる平滑筋の収縮抑制効果はどのような機序によるか。(5)ブレビスタチンが気道過敏性の治療薬として好ましくないことになるとしたら、どのような可能性が考えられるか。(6)他臓器の平滑筋に対する選択性はどうか。

これらの質問に対し、湯本氏は多数の文献的知見と予備的な実験のデータを踏まえて適切に回答し活発な討論がなされた。その後、審査委員会において慎重に審議した結果、湯本氏の研究は、ブレビスタチンの気管平滑筋に対する薬理作用をスキンド平滑筋標本を用いて検討し、平滑筋の収縮メカニズムと、その新しい阻害薬の可能性を検討した研究で、学位論文として価値があるものと認定した。