

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
可児 佳代子	主査 教授 花 房 俊 昭 副査 教授 窪 田 隆 裕 副査 教授 勝 間 田 敬 弘 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 北 浦 泰
主論文題名 HMG-CoA Reductase Inhibitor, Pitavastatin, Prevents Migration of Cultured Smooth Muscle Cells by Suppressing Myosin Light Chain Phosphorylation (HMG-CoA 還元酵素阻害剤ピタバスタチンは培養平滑筋細胞においてミオシン軽鎖のリン酸化を抑制することにより細胞の遊走を阻害する)	
学位論文内容の要旨	
<p>《目的》 虚血性心疾患に対する HMG-CoA 還元酵素阻害剤(スタチン)の有用性が証明されている。その効果発現には、脂質低下作用以外に抗炎症作用などの多面的作用の関与が注目されている。低分子量 G 蛋白の1つである Rho は血管平滑筋細胞の収縮や遊走を制御するミオシンリン酸化において重要な役割を果たすが、最近スタチンが Rho を抑制することが明らかになった。そこで申請者は新規の脂溶性スタチン(pitavastatin)を用い、ブタ冠動脈平滑筋細胞の遊走能、接着能およびミオシン軽鎖のリン酸化に及ぼす影響を分析した。</p> <p>《方法》 実験に使用する血管平滑筋細胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)はブタ冠動脈よりコラゲナーゼを用い酵素的に採取後培養し、遊走能、接着能、ミオシン軽鎖のリン酸化について検討した。スタチン群としては、VSMC を pitavastatin (10 μ M) 存在下 10%FCS にて 16 時間培養後実験を行った。またコレステロール生合成系の成分であるメバロン酸(MVA)およびゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)を pitavastatin 添加の 24 時間前に加え、スタチンの効果に対する影響も検討した。 細胞遊走能は改良型 Boyden chamber 法を用い、PDGF-BB 刺激下で 37°C、4時間での VSMC の遊走細胞数を顕微鏡にて数えて評価した。 接着能は VSMC を fibronectin でコートした 96 穴プレパラート上にて1時間培養後洗浄し、接着した細胞数を染色し吸光度を測定することにより評価した。 ミオシン軽鎖のリン酸化はグリセロール PAGE 法にて検討した。得られたバンドのリン酸化比率は NIH イメージを用いて計測した。 また、ミオシン軽鎖のリン酸化に関与する2つの酵素である Rho キナーゼおよびミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)の作用を明らかにするため、Rho キナーゼ阻害薬である Y-27632 及び MLCK 阻害薬である ML-9 を用い、VSMC の遊走能、ミオシン軽鎖リン酸化に及ぼす効果を検討した。</p> <p>《結果》 1) Pitavastatin は VSMC の遊走能を濃度依存的に抑制した。その抑制効果はコレステロール生合成系の上流にある MVA を添加した群では完全に解除されたが、下流にある GGPP を添加した群では</p>	

部分的な解除にとどまった。

2) Pitavastatin は VSMC の細胞突起形成を阻害することにより接着能を抑制し、ミオシンのリン酸化も抑制した。それらの抑制効果は遊走能の抑制効果と同様、MVA 添加群では完全に解除され、GGPP 添加群では部分的な解除にとどまった。

3) Rho キナーゼ阻害薬 Y-27632 及び MLCK 阻害薬 ML-9 を用いた検討では、遊走能およびリン酸化抑制効果は ML-9 より Y-27632 の方が強く、さらに両方を作用させた群で最も強く、pitavastatin と同等の抑制効果が認められた。

《考 察》

本研究において、pitavastatin が濃度依存的に VSMC の遊走能、接着能、ミオシンリン酸化を抑制すること、またその抑制効果は MVA あるいは GGPP を加えることにより、それぞれ完全あるいは部分的に解除されること、さらに、pitavastatin のリン酸化抑制効果は Rho キナーゼ阻害薬 Y-27632 あるいは MLCK 阻害薬 ML-9 単独の効果より強く、両者を作用させた場合と同等の効果を有することが明らかになった。

スタチンの細胞遊走抑制の機序としては、酸化ストレスの抑制、Ras や Rho といった G 蛋白の関与したシグナル伝達の抑制などが知られている。また、ミオシン軽鎖のリン酸化が平滑筋細胞の遊走に必要であることも広く知られている。今回、申請者はスタチンがミオシン軽鎖のリン酸化を抑制することを報告したが、グリセロール PAGE 法を用いて示したのは申請者が最初である。

スタチンはコレステロール生合成経路において HMG-CoA 還元酵素を阻害し MVA の合成を抑制する。遊走、接着、ミオシン軽鎖リン酸化に対するスタチンの抑制効果は、MVA により完全に解除されたが、GGPP では部分的な解除にとどまった。MVA は HMG-CoA 還元酵素の直接の生成物であり、それゆえその添加によりスタチンの抑制効果は完全に解除されたと考えられる。一方、GGPP はコレステロール生合成系から分枝した経路の産物であり、Rho や Rac といった G 蛋白のシグナル伝達に関与しているため、GGPP の添加による抑制解除効果が不完全であった可能性が考えられる。ミオシン軽鎖のリン酸化制御には Rho キナーゼおよび MLCK の両方の系が関与している。今回の実験において Rho キナーゼ阻害薬は MLCK 阻害薬よりリン酸化抑制効果が強く、その両方を加えた群での抑制効果は最強で、スタチンの抑制効果と同等であった。以上より、pitavastatin のミオシン軽鎖リン酸化抑制効果は、Rho カスケードのみならず MLCK 等の系の抑制をも介して作用している可能性が考えられる。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	可 児 佳 代 子
論文審査担当者		主 査 教 授 花 房 俊 昭	
		副 査 教 授 窪 田 隆 裕	
		副 査 教 授 勝 間 田 敬 弘	
		副 査 教 授 林 秀 行	
		副 査 教 授 北 浦 泰	
主論文題名			
<p>HMG-CoA Reductase Inhibitor, Pitavastatin, Prevents Migration of Cultured Smooth Muscle Cells by Suppressing Myosin Light Chain Phosphorylation (HMG-CoA 還元酵素阻害剤ピタバスタチンは培養平滑筋細胞においてミオシン軽鎖のリン酸化を抑制することにより細胞の遊走を阻害する)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>申請者は本研究において、新規のスタチンである pitavastatin が冠動脈平滑筋細胞にどのような影響を及ぼすかについて分析している。</p> <p>その結果、pitavastatin はブタ冠動脈平滑筋細胞の遊走能、接着能、ミオシン軽鎖リン酸化を抑制した。スタチンがミオシン軽鎖のリン酸化を抑制することをグリセロール PAGE 法にて示したのは申請者が最初である。その抑制効果は、コレステロール生合成系にて HMG-CoA 還元酵素の直接生産物であるメバロン酸(MVA)を加えると完全に解除されるが、コレステロール生合成系から分枝した経路の産物であるゲラニルゲラニルピロリン酸(GGPP)を添加しても部分的な解除にとどまった。GGPP は Rho や Rac などの G 蛋白のシグナル伝達に関与しており、MVA と GGPP の抑制解除効果の差は Rho あるいは Rac 以外の経路が関与している可能性が考えられる。ミオシン軽鎖のリン酸化制御には Rho キナーゼおよびミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)の両方の系が関与している。本研究の結果、pitavastatin のリン酸化抑制効果は、Rho キナーゼ阻害薬(Y-27632)あるいは MLCK 阻害薬(ML-9)単独より強く、両者を作用させた場合と同等の効果を有することが明らかになった。以上の成績より、pitavastatin によるミオシンリン酸化抑制効果のメカニズムとして、Rho カスケードのみならず MLCK 等の系の抑制をも介して作用している可能性が示された。</p> <p>本研究により、スタチンがいかなる機序で多面的作用を発揮するかについての一端が明らかになった。</p> <p>以上より、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Bulletin of the Osaka Medical College 53(3): 175-181, 2007</p>			