

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金 命 宣

### 論文題目

妊娠に伴う子宮平滑筋収縮機構の変化に関する比較生物学的研究

Comparative studies on the changes in contractile system in uterine smooth muscle during pregnancy

近年、欧米はもちろんのこと日本においてもヒト組織の医学研究への積極的な利用が重要視されている。医薬品開発の過程において、前臨床試験では実験動物を用いて薬効や安全性を調べているが、臨床試験の段階でヒトに無効であったり、副作用が見つかったりして、開発が中止される事例が多数ある。このような事例は実験動物とヒトの種差に起因することが多く、種差による反応性の相違を前臨床試験の早期に見いだすために、ヒト組織やヒト組織由来の細胞を用いた実験系を新薬開発に積極的に取り入れる努力が必要である。

平滑筋臓器である子宮筋は、妊娠の一定期間、胎児を受容するために静的状態を維持し、妊娠期の末期に近づくと徐々に活動を始め、分娩時には強力な収縮張力を発生して胎児を分娩する。それゆえに、妊娠維持及び分娩に関連される疾病の理解及び管理のためには子宮筋の収縮弛緩機構と妊娠による子宮筋の機能変化に関する知見が必要だと思われる。

これまで、実験動物特にラットを用いた子宮平滑筋の収縮機構に関する報告は多い。しかし、ヒトの子宮平滑筋の収縮機構に関する知見は断片的であり、ラットとヒトの子宮収縮機構の相違点と類似点に着目した研究は少ない。本研究は、実験動物として利用されるラットとヒトの子宮平滑筋組織を用いて妊娠に伴う子宮筋の収縮蛋白系の機構変化について解明することを目的として行われた。

### 第一章 Protein Kinase C と CPI-17

#### 1. ラット子宮筋における Protein Kinase C (PKC) の役割

ラットの子宮筋においてホルボールエステル(DPB)投与により高濃度 K 収縮は抑制され、その作用は妊娠子宮筋で大きかった。cPKC 特異的活性薬 THX も DPB と同様の成績を示した。ウエスタンブロット法により、子宮筋では cPKC のうち PKC $\alpha$  が主に発現することを確認した。妊娠のステージが進むにつれて、PKC $\alpha$  の蛋白質発現は増加し、妊娠末期 21 日に最大に達した。一方、PKC  $\epsilon$ ,  $\zeta$  は妊娠のステージを追うごとに発現が減少することが見出された。長時間 THX を処理すると PKC $\alpha$  量は減少し、DPB による収縮抑制作用が有意に弱められることが観察された。cPKC 特異的阻害薬 Go6976 を投与すると THX および DPB による収縮抑制作用は著明に減弱した。以上のことからラットの子宮筋では PKC の活性化は収縮抑制に働き、その収縮抑制には cPKC が関与することが示唆された。

## 2. ヒトの子宮筋における PKC の役割

非妊娠および妊娠子宮筋にホルボールエステル(PDBu)を投与すると、どちらの筋においてもラットと異なり持続性収縮が発生したが、妊娠子宮筋における反応の方が有意に大きかった。また、この時の PDBu 処理による収縮は Ser19 ミオシン軽鎖のリン酸化の増加に伴って起こることが明らかとなった。非妊娠子宮筋では cPKC 特異的阻害薬 Go6976 は PDBu 収縮に影響を及ぼさなかったのに対し、妊娠子宮筋では Go6976 は PDBu 収縮を抑制した。さらに、PKC $\beta$ 特異的阻害薬 LY333531 も妊娠子宮筋でのみ PDBu 収縮を著明に抑制した。RT-PCR により PKC $\alpha, \beta, \gamma$  mRNA の発現を調べたところ、PKC $\alpha, \gamma$  は非妊娠と妊娠の間に有意な差は見られなかったが、非妊娠と比べ妊娠子宮筋で PKC $\beta$  mRNA の発現が増加した。またミオシンホスファターゼ MLCP を阻害するシグナル分子で PKC の基質となる CPI-17 の mRNA と蛋白質発現は、非妊娠と比べ妊娠子宮筋で発現が増加することが観察された。以上の結果から、ヒトの妊娠子宮筋においては PKC $\beta$  と PKC により活性化される CPI-17 の発現が増加し、MLCP を抑制して収縮力を増加させる情報伝達経路を強化して分娩に備えていると考えられた。

## 第二章 Rho/ROCKs 系と Rnd

### 1. ラットの子宮筋における Rnd1 の役割

発情期の非妊娠ラットの子宮平滑筋では収縮制御系の Ca 感受性の増加が認められたが、妊娠のステージを追うことに Ca 感受性の増加機構が減少し、妊娠 21 日目には完全に消滅することを見出した。この知見に基づき Ca 感受性増加機構に関与する RhoA、ROCK の mRNA の発現について検討したが、非妊娠と妊娠ラットの間でこれらの分子の発現量に差は認められなかった。しかし、内因性の RhoA 制御 GTP 結合蛋白質 Rnd1 の mRNA の発現が妊娠ステージに従って増加し、分娩直後では減少していることを見出した。Rnd1 は、RhoA による Ca 感受性の増加の制御を介して、出産時に子宮筋の収縮を制御する機構として働く可能性が考えられ、妊娠・分娩を理解する上で、きわめて重要な分子と考えられた。

### 2. 妊娠に伴うラットとヒトの子宮筋における Rnd 蛋白質の発現の変化

RhoA、ROCK1、ROCK2 の mRNA は非妊娠と妊娠ラット子宮筋で同様に発現していた。Rnd1、Rnd2、Rnd3 の mRNA 発現は妊娠ラット子宮筋で有意に増加した。次に 卵巣摘出ラットでの Rnd 蛋白質の発現に対する、ステロイドホルモン、エストロゲンとプロゲステロンの効果を調べた。その結果、これらのステロイドホルモンが Rnd1、Rnd2、Rnd3 の mRNA 発現を増加させることが分かった。これに対して、ヒト子宮筋においては、RhoA、ROCK1、Rnd2、Rnd3 の mRNA 発現は非妊娠と妊娠の間で差は認められなかったが、ROCK2 と Rnd1 の mRNA 発現は非妊娠子宮筋より妊娠子宮筋で有意に増加した。

以上のように、本研究は子宮平滑筋収縮機構における PKC の役割を比較生物学的観点から総合的に検討したものであり、学術上寄与するところは少なくない。よって審査員一同は本論文が博士（獣医学）の学位に値するものと判断した。