

高血圧性血管病におけるRho-kinaseの関与：高血圧症における新たな治療標的

向井，靖
九州大学大学院医学研究院循環器内科学

<https://doi.org/10.15017/7183628>

出版情報：福岡醫學雑誌. 93 (8), pp.129-134, 2002-08-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



第4回福岡医学会賞受賞者及び受賞論文紹介

高血圧性血管病における Rho-kinase の関与

—— 高血圧症における新たな治療標的 ——

九州大学大学院医学研究院循環器内科学

向 井 靖

Involvement of Rho-kinase in Hypertensive Vascular Disease —— A Novel Therapeutic Target in Hypertension ——

FASEB J. 15: 1062-1064, 2001.

FASEB J (online). 10: 1096/fj.00-0735fje, 2001.

はじめに

高血圧は致死的心血管イベントの重要な危険因子であり、我が国における患者数は1千万人以上に及ぶと推計されている。本態性高血圧の成因は他因子的であり、血管因子、神経因子、腎臓・体液因子など、それぞれ重要性を示す成績があるが、その病態生理はまだ十分解明されていない点が多い。少なくとも、高血圧の発症・維持においては、末梢血管抵抗の増加が極めて重要であることは広く理解されているが、この末梢血管抵抗の増加は抵抗血管の反応性および構築の変化によりもたらされる。アゴニスト刺激により血管平滑筋(VSMC)が収縮する際には、ミオシン軽鎖(myosin light chain, MLC)のリン酸化を生じることが張力発生の主要な機序であるが、このリン酸化の程度は Ca^{2+} /カルモジュリン依存性ミオシン軽鎖キナーゼ(myosin light chain kinase, MLCK)とミオシンフォスファターゼ(myosin phosphatase, MLCPh)の活性のバランスにより制御されている。

Rho-kinase (ROK α /ROCK II, p160ROCK/ROK β /ROCK Iはアイソフォーム)は、アゴニストの下流で低分子量G蛋白であるRhoを介して活性化され、myosin-binding subunit (MBS)のリン酸化を介してミオシンフォスファターゼの活性を抑制する。このRho-kinaseを介する細胞内シグナル伝達系が、アゴニストによる Ca^{2+} 感

受性の増強と過収縮の発生に中心的役割を果たしていることが最近明らかとなり、注目されている。我々は、Rho-kinaseを介した平滑筋の過収縮が、冠動脈スパズムにおいて重要な役割を果たしていることを報告している。高血圧の血管は、種々の刺激に対し収縮反応の亢進を示すが、その機序として、Rho-kinaseを介するシグナル伝達系が重要である可能性がある。

また、Rho/Rho-kinaseを介する細胞内シグナル伝達は、トロンビン・アンギオテンシンII・血小板由来増殖因子(PDGF)・セロトニンなどにより活性化され、平滑筋収縮のみならず、平滑筋細胞や炎症細胞、線維芽細胞などの血管構成細胞の接着・遊走・増殖・肥大に関与する。こうしたデータの蓄積から、Rho-kinaseは動脈硬化などの血管病変の形成にも関与していることが強く示唆される。

そこで、本研究では、高血圧血管に認められる反応性および構築の異常にRho-kinaseが重要な役割を果たしているのではないかという仮説に基づき、本態性高血圧のモデルであるspontaneously hypertensive rat (SHR)の血管を用いて検討した。その結果、Rho-kinaseの発現および活性がSHRの血管において亢進しており、血管収縮能の亢進や、高血圧性血管病変の形成に直接関与していることを明らかにした。したがって、この分子が、高血圧症における新たな治療標的となる可能性が示された。

実験材料および方法

動物

4 週齢の若年齢および 15 週齢の成熟齢の雄 SHR および対照群として WKY を実験に用いた。収縮期血圧 (mmHg) は、4 週齢では、 133 ± 10 および 110 ± 8 (SHR vs. WKY, $P < 0.05$), 15 週齢においては、 224 ± 12 および 130 ± 8 (SHR vs. WKY, $P < 0.01$) であった。Rho-kinase 阻害薬である fasudil は、経口投与後、さらに選択的な Rho-kinase 阻害作用をもつ hydroxyfasudil となるので、in vivo の実験には fasudil を、in vitro の実験には hydroxyfasudil をそれぞれ用いた。

摘出血管張力測定

張力測定用アンプに接続された 2 本のフックを有するミオグラフィシステムを用い、これに摘出血管を設置して張力測定を行った。アゴニスト(フェニレフリン, セロトニン)による用量依存的な収縮反応を記録し、Rho-kinase 阻害薬, hydroxyfasudil ($3 \sim 10 \mu\text{M}$) の抑制効果を検討した。冠動脈においては膜透過標本を作製し、 Ca^{2+} 感受性の直接的検討を行った。SHR における Rho-kinase の機能亢進が高血圧発症初期より認められるか否かを検討するため、4 週齢の WKY および SHR より摘出した上腸間膜動脈にても同様の検討を行った。

半定量的 RT-PCR による血管壁における Rho-kinase mRNA 測定

血管壁における $\text{ROK}\beta/\text{ROCK I}$ の mRNA 発現を RT-PCR 法を用い検討した。総 RNA サンプルを両群の総頸動脈からそれぞれ抽出し、RNA からの逆転写産物を PCR 増幅に使用した。バンド濃度は β -actin のバンド濃度で補正した。

MBS リン酸化体のウェスタンブロット (間接的 Rho-kinase 活性測定)

Rho-kinase による特異的なリン酸化部位である Ser-854 にてリン酸化された MBS に対する特異抗体を用いて、血管壁から抽出した蛋白のウェスタンブロットを行った。

Rho-kinase 阻害薬 (Fasudil) の in vivo 長期投与および組織学的検討

SHR に Rho-kinase 阻害薬, fasudil を 4 週齢より 5 ケ月間、飲水中にて経口投与した。治療期

間終了後、組織標本を作製して冠動脈の中膜肥厚や血管周囲線維化を定量評価した。

結 果

Fasudil/hydroxyfasudil による急性降圧効果

Fasudil (30 mg/kg) の単回経口投与により、SHR に特異的な降圧効果を認めた。

高血圧血管の収縮能と Rho-kinase

フェニレフリンおよびセロトニンによる総頸動脈、冠動脈の収縮は SHR において WKY に比し有意に亢進していた (図 1 A)。Hydroxyfasudil ($3 \mu\text{M}$) は WKY の血管収縮には有意な抑制を示さなかったのに対し、SHR では有意な収縮抑制効果を認めた (図 1 A)。腸間膜動脈の微小血管においても、hydroxyfasudil ($10 \mu\text{M}$) により SHR の血管収縮のみが有意に抑制された。

冠動脈の膜透過標本においては、 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ により誘発される Ca^{2+} 感受性の増強は SHR において WKY に比し有意に亢進していた。hydroxyfasudil ($3 \mu\text{M}$) は、SHR における Ca^{2+} 感受性の増強を有意に抑制したが、WKY では有意な抑制効果を示さなかった。

高血圧血管における Rho-kinase の mRNA 発現・活性

Rho-kinase の mRNA 発現は、SHR において WKY に比し有意に亢進していた (図 1 B)。ウェスタンブロット法では、セロトニン ($1 \mu\text{M}$) 刺激時の SHR の血管壁における MBS (Rho-kinase の基質) のリン酸化は有意に亢進していた (図 1 C)。この MBS のリン酸化の亢進は hydroxyfasudil ($3 \mu\text{M}$) により抑制された (図 1 C)。

若年齢 SHR の血管収縮における Rho-kinase の関与

腸間膜動脈における収縮反応は若年齢の SHR において、むしろ高血圧発症後より顕著に、WKY に比し亢進しており、hydroxyfasudil ($10 \mu\text{M}$) により、SHR の血管では血管収縮が有意に抑制された。

高血圧性血管病変の形成と Rho-kinase

低用量の fasudil 投与では SHR の血圧は低下しなかったのに対し、高用量では有意な降圧を認めた。Fasudil の長期投与により、血管病変形成はいずれの用量においても有意に (降圧効果とは独立して) 抑制された (図 2 A, B)。Fasudil の長

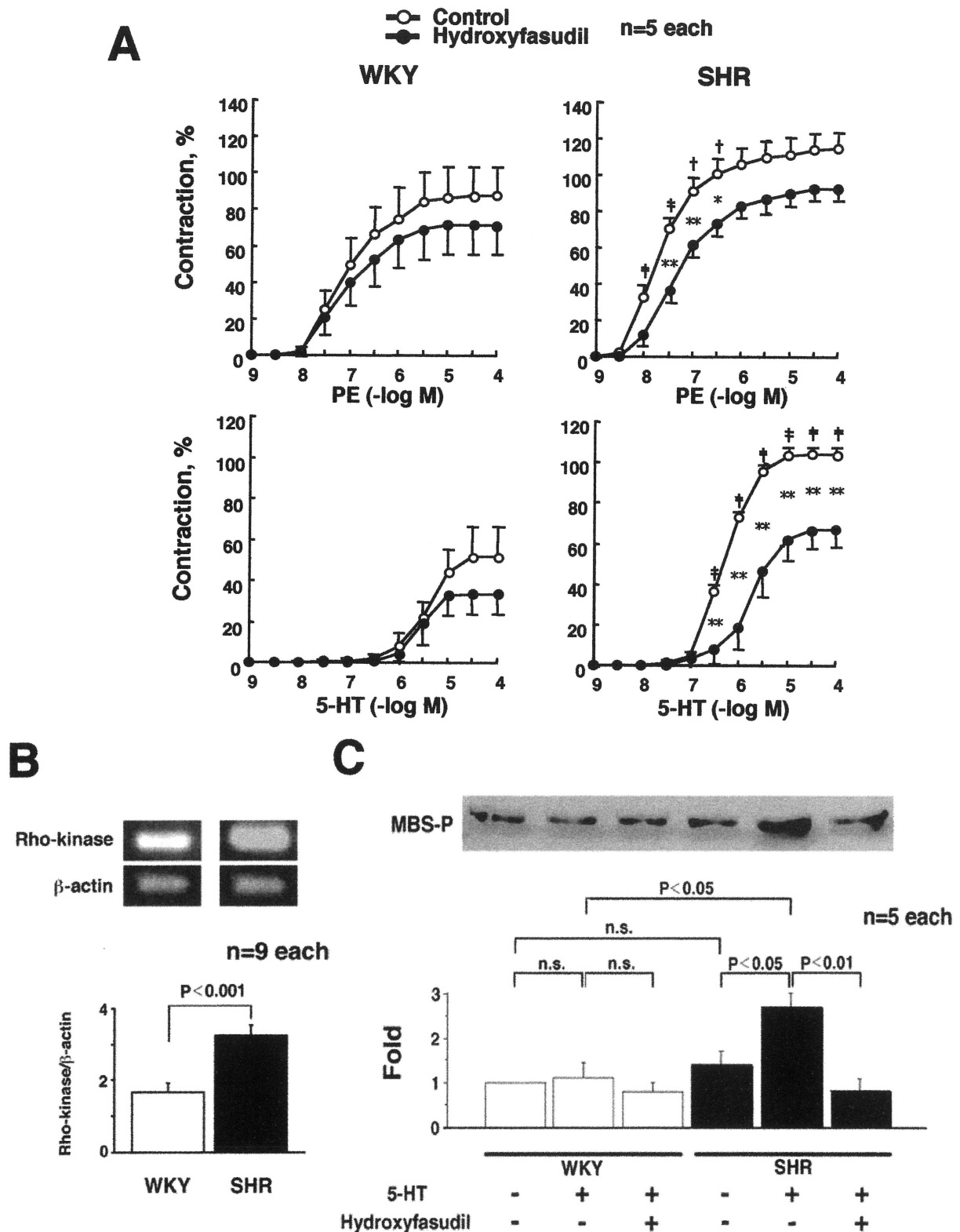


図1 (A) 総頸動脈における血管収縮反応。アゴニスト〔フェニレフリン (PE) およびセロトニン (5-HT)〕に対する用量依存性収縮反応を Rho-kinase 阻害薬, hydroxyfasudil ($3 \mu\text{M}$) の有無にて検討した。いずれのアゴニストに対する収縮反応も, SHR においては WKY に比し亢進していた。hydroxyfasudil により, SHR におけるアゴニスト収縮は著明に抑制されたが, WKY においては抑制を認めなかった。それぞれの発生張力は 118 mM の KCl による発生張力の%にて表示。+ $P<0.05$, † $P<0.01$ vs. WKY. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. control.

(B) 総頸動脈における Rho-kinase mRNA 発現 (RT-PCR 法)。Rho-kinase mRNA の発現は SHR の血管において WKY よりも有意に亢進していた。β-actin を内部コントロールとして用いた。

(C) 総頸動脈における MBS のリン酸化体 (MBS-P) に対するウェスタンブロット (間接的 Rho-kinase 活性の測定)。セロトニン ($1 \mu\text{M}$) 刺激時における MBS のリン酸化の程度は SHR において WKY に比し有意に亢進していた。また、このリン酸化の亢進は hydroxyfasudil ($3 \mu\text{M}$) 存在下では抑制された。

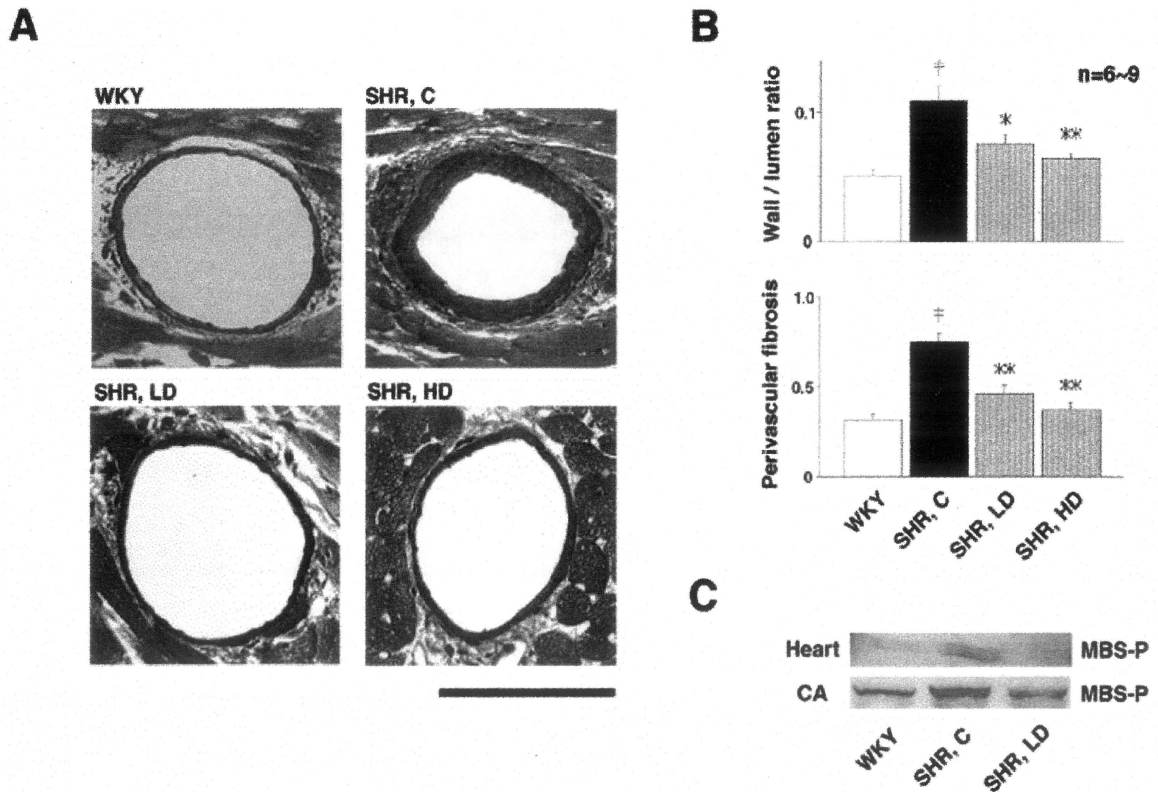


図2 Fasudil 長期投与による SHR の血管病変 (冠動脈) の抑制効果
 (A) 冠動脈の組織所見 (Masson-trichrome 染色). WKY, 無治療 SHR (SHR, C), 低用量 fasudil (SHR, LD) および高用量 fasudil (SHR, HD) にて治療した SHR につきそれぞれ表示. バーは 100 μ m を示す.
 (B) 中膜肥厚 (壁厚と血管内径の比, Wall to lumen ratio, 上段) および血管周囲線維化 (血管周囲の線維成分の面積と血管面積の比, Perivascular fibrosis, 下段) の定量評価. [†] P < 0.05, [‡] P < 0.01 vs. WKY. ^{*} P < 0.05, ^{**} P < 0.01 vs. SHR, C
 (C) fasudil 経口投与による組織における Rho-kinase 活性の抑制を示すウエスタンブロット. リン酸 MBS (MBS-P) は fasudil 投与群の心臓, 総頸動脈 (CA) で減少していた.

期投与により, Rho-kinase の活性が抑制されていることは, ウエスタンブロットにおいて, 心臓および総頸動脈における MBS のリン酸化が抑制されていることで確認した (図2 C).

考 察

本研究の新たな知見は, (a) Rho-kinase の発現および活性が SHR の血管において亢進しており, MLCPh の抑制を介して血管収縮能亢進に関与していること, (b) Rho-kinase の機能亢進は高血圧を発症する前よりすでに認められること, (c) Rho-kinase が SHR において高血圧性血管病変の形成に重要な関与をしていること, である. 我々の知る限り, 本研究は高血圧性血管病の病態生理

における Rho-kinase の役割を明らかにした初めての研究である.

今回の検討で, Rho-kinase 阻害薬 (hydroxyfasudil) は SHR の複数の血管床においてアゴニスト収縮を選択的に抑制したことから, Rho-kinase が高血圧血管の収縮能亢進に深く関与していることが示唆された. 高血圧において, 末梢血管抵抗の増大が関与していることはよく知られているが, この末梢血管抵抗には, 微小血管の構築および機能の変化の関与が重要である. 今回の検討では, 腸間膜動脈微小血管においても, Rho-kinase 阻害薬の抑制効果は SHR においてのみ顕著であり, Rho-kinase の機能亢進が SHR の抵抗血管にも存在することが示唆された. すなわち,

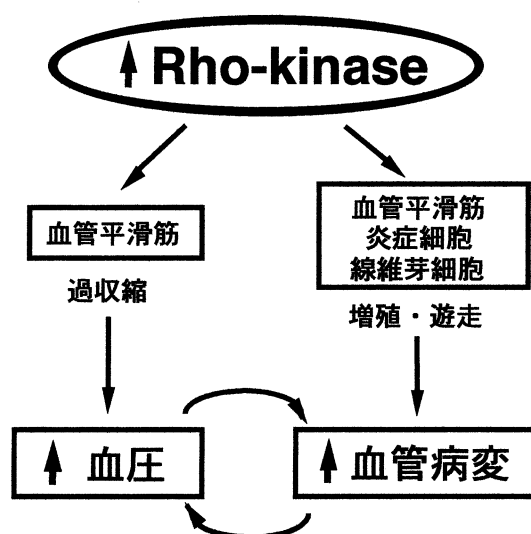


図 3 高血圧性血管病の病態生理における Rho-kinase の役割

Rho-kinase が末梢血管抵抗の増大、つまり血圧の上昇に関与していることが示唆される。

本研究ではさらに、膜透過標本において、アゴニストによる Ca^{2+} 感受性調節における Rho-kinase の関与についても検討した。その結果、Rho-kinase 阻害薬により、SHR における $\text{GTP}\gamma\text{S}$ による Ca^{2+} 感受性の増強効果が WKY のレベルまで抑制され、SHR における Ca^{2+} 感受性の亢進のほとんどが Rho-kinase により生じていることが示された。

生化学的検討では、Rho-kinase の発現および Rho-kinase の基質である MBS のアゴニスト刺激時におけるリン酸化の程度が、SHR 血管にて有意に亢進していることを示した。これらの結果は、張力測定の結果と合致するものである。総合すると、Rho-kinase の機能亢進により MBS のリン酸化を介して MLCPh の機能が抑制され、その結果 MLC のリン酸化が亢進し、SHR の血管の収縮能亢進が生じていると考えられる。

また、Rho-kinase の機能亢進は、若年齢の SHR においても有意に認められ、さらに若年齢 SHR における hydroxyfasudil の抑制効果は、成熟期の SHR よりもむしろ大きい傾向があった。これらの知見は、Rho-kinase の機能亢進が高血圧の発症に先行していることを意味し、Rho-kinase の機能亢進が高血圧の結果として生じているのではなく、高血圧の発症そのものに関与している可能性を示すものである。

In-vivo における Rho-kinase 阻害薬 (Fasudil) 長期投与の結果より、Rho-kinase が高血圧性血管病変の形成 (中膜肥厚や血管周囲線維化) に重要な関与をしていることが示唆された。Rho-kinase 阻害薬の効果は血圧を低下させない用量でも有意に認められ、これらの血管病変が高血圧の結果としてのみ生じているわけではないことが示唆される。Rho-kinase が関与する細胞機能は多岐にわたるので、長期間の Rho-kinase 阻害薬投与による血管病変形成の抑制の機序は、複雑であると考えられる。これまでの知見とも考え合わせると、血管病変の形成におけるいくつかの重要な段階、例えば血管平滑筋や線維芽細胞の増殖や遊走、血管内からのマクロファージなどの炎症細胞の動員および集簇などを Rho-kinase 阻害薬が抑制した可能性が高い。また、HMG-CoA reductase 阻害薬 (statin) が Rho の抑制を介して内皮一酸化窒素合成酵素を増加させるという報告もあり、今回 Rho の主要な標的蛋白である Rho-kinase を慢性的に阻害した結果、血管における NO の産生増加が生じ、病変抑制に貢献した可能性も考えられる。

総括すると、本研究の結果は、高血圧性血管病の病態生理における Rho-kinase の重要性を示す知見であり、この分子が高血圧における新たな治療標的となりうる可能性が示された (図 3)。高血圧の血管において、どのような機序で Rho-kinase の発現と機能が亢進するのかは、今後の検

討が必要である。また、高血圧のみならず、Rho-kinase が広く血管病の病態に関与するという知見が現在集積されつつある。したがって、Rho-kinase が関与するシグナル伝達の障害が、広く血管病、動脈硬化の予防や治療の手段として有効である可能性も示唆される。

謝 辞

最後に、本研究を評価して頂きました福岡医学会と、福岡医学会幹事の諸先生方に心より感謝申し上げます。また、研究を進めるに当たってご指導を賜りました九州大学大学院医学研究院循環器内科学の竹下彰教授、下川宏明助教授、ならびに諸先生方に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Folcow B: Physiological aspects of primary

hypertension. *Physiol Rev.* 62: 347-504, 1982.

- 2) Kaibuchi K, Kuroda S and Amano M: Regulation of cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem.* 68: 459-486, 1999.
- 3) Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Kandabashi T, Satoh S, Kaibuchi K and Takeshita A: Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease. —A novel therapeutic target in hypertension— *FASEB J.* 15: 1062-1064, 2001. *FASEB J (online).* 10: 1096/fj.00-0735fje, 2001.
- 4) Shimokawa H: Rho-kinase as a novel therapeutic target in treatment of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 39: 319-327, 2002.

著者プロフィール

向 井 靖 (むかい やすし)

広島赤十字・原爆病院 循環器科

- ◇略歴 平成8年3月 九州大学医学部卒業
 平成8年4月 九州大学医学部附属病院
 循環器内科 医員 (研修医)
 平成10年4月 九州大学大学院医学研究院入学
 循環器内科学専攻
 平成13年9月 同上修了, 学位取得
 平成13年10月 広島赤十字・原爆病院 循環器科
 以上, 現在に至る
- ◇研究テーマ 血管機能の調節機構, 病態生理
- ◇趣味 ウインドサーフィン

