高血圧性糸球体硬化進展における Rho/Rho-kinase 系の役割 — Rho-kinase 阻害薬の糸球体保護効果とその分子機序—

錦見 俊雄

要約：最近の研究は small GTP 結合タンパクの生理学的な重要性を示している。GTP 結合タンパクの中で Rho は種々の細胞機能の分子スイッチとして働くことが知られている。Rho のエフェクタータンパクの中で Rho-kinase がもっともよく研究され、その細胞内機能や細胞内情報伝達も広く研究されてきた。しかしながら *in vivo* の機能の情報については限られている。最近の Rho-kinase 特異的な阻害薬 Y-27632 や fasudil の開発によって *in vitro* と *in vivo* の両方における Rho/Rho-kinase 系の役割に対する理解は進歩をとげた。しかしながら、現時点において、腎疾患における Rho/Rho-kinase 系の役割を検討した研究は少ない。最近の研究では Rho-kinase 阻害薬が尿管結紮による腎間質の線維化を有意に弱めたことを示している。このように、Rho/Rho-kinase 系は腎間質の線維化の病因にある役割を果たしている。しかしながら高血圧性糸球体硬化における Rho/Rho-kinase 系の役割を検討した研究は非常に少ない。最近、我々ならびに他の研究者らはある種の高血圧モデルにおいて Rho/Rho-kinase 系が糸球体硬化の進展に一部関与していることを報告した。この総説において、我々はいくつかの高血圧モデルにおける腎糸球体硬化の進展における Rho/Rho-kinase 系の役割について述べる。これらの慢性の Rho-kinase 阻害は高血圧性糸球体硬化の新しい治療的アプローチになる可能性を示している。我々の結果はまた、Rho-kinase 阻害薬の腎保護効果の機序は細胞外マトリックス遺伝子、マクロファージ/単球の浸潤、酸化ストレスなどの抑制と、eNOS 遺伝子の亢進を一部介していることを示している。

1. 序論

RhoA をはじめとする Rho タンパクファミリーは、ストレスファイバーの産生、局所の接着、平滑筋の Ca 感受性の調節、細胞周期の調節、増殖、アポトーシス等広い範囲にわたって細胞機能を調節していることが知られている(1-4)。Rho は非活性の GDP 結合型から GTP 結合型になって活性型となり、下流のエフェクターを活性化していく。Rho エフェクターの中で、Rho-kinase が最もよく研究されてきた。Rho-kinase は RhoA のエフェクターだけでなく RhoB, RhoC にも結合する。Rho-kinase の発見以来、大変多くの研究が主に心血管系の分野でなされてきた。特にスタチンの心臓、血管の保護効果は Rho-kinase の抑制であることが示されて以来、この研究の分野はさらに加速された。Rho-kinase はさらに多くの下流の標的分子 (myosin light chain, myosin light chain phosphatase, ezrin-radixin-moesin proteins, adducin) をリン酸化する。そしてこれらの pathway は高血圧、肺高血圧、動脈硬化、血管攣縮、脳虚血、内膜増殖、心筋肥大、虚血再還流障害などの種々の心血管病の病因の一部に寄与していると考えられている(5,6)。現在 Rho-kinase の特異的な阻害薬として、Y-27632 や fasudil という合成した化合物が知られている。この化合物は ATP 依存性の kinase にドメインの結合することから、Rho-kinase α , Rho-kinase β の両方を抑制することが報告されている。これらの薬物は *in vivo* ならびに *in vitro* での Rho/Rho-kinase 系の役割を検討するのに非常に強力な手段となっている(7)。Rho は血管平滑筋のミオシンホスファターゼ活性を抑制して Ca 感受性を修飾することが知られているので、Rho

キーワード：高血圧、腎硬化症、Rho キナーゼ、細胞外マトリックス、酸化ストレス

獨協医科大学 循環器内科 (〒321-0293 栃木県壬生町)

e-mail: nishikim@dokkyomed.ac.jp 原稿受領日：2006 年 5 月 15 日、会誌編集委員会依頼原稿

Title: Role of the Rho/Rho-kinase pathway in the development of hypertensive glomerulosclerosis: renoprotective effect of Rho-kinase inhibitor in hypertensive glomerulosclerosis and its molecular mechanism. Author: Toshio Nishikimi

の血管のトーンにおける効果や動脈硬化の病因における Rho の役割も詳しく研究されてきた(5, 6)。

しかしながら腎疾患における Rho/Rho-kinase 系の役割に関する研究はいまだ少ない。Nagatoya らは、Y-27632 が尿間結紮ラットモデルに対する間質の線維化を抑制したと報告している(8)。この尿間結紮モデルによる間質の線維化は、他の Rho-kinase 阻害薬 fasudil でも確認されている(9)。これらの研究結果から、Rho/Rho-kinase 系は腎臓間質の線維化に重要な役割を果たしていることが示唆される。しかしながら高血圧性糸球体硬化における Rho/Rho-kinase 系の役割については研究は殆どなされていない。最近、我々を含めた研究者達は Rho-kinase 阻害薬がある種の高血圧モデルの糸球体硬化に対して腎保護効果を有することを報告した(10-12)。この総説において、高血圧ラットモデルにおける Rho-kinase の糸球体硬化の進行に対する役割と、その機序について我々の研究結果を中心に考察してみることにする。

2. Dahl食塩感受性高血圧における腎臓皮質内のRho/Rho-kinase系の意義

最初に Dahl 食塩感受性ラット (DS ラット) の糸球体硬化の進行における Rho-kinase 阻害薬, fasudil の効果について検討した成績を述べる(10)。DS ラット 6 週齢で高食塩食(8% NaCl)を開始し、11 週で無作為に 2 群、すなわち fasudil 投与群と未治療群、に分類した。約 7 週間の治療の後、尿中指標、血行動態指標、ホルモン値、組織学的所見、遺伝子発現と TGF- β のタンパクレベルを測定した。Dahl 食塩抵抗性ラット (DR ラット) をコントロールとした。Tail-cuff 法で測定した収縮期血圧は 7 週齢ですでに DS ラットで DR ラットより高く、13 週齢まで漸増した。fasudil 治療(30 mg/kg/day)は血圧に全く影響を与えなかった(図 1)。DR ラットで血圧の変化は経過を通じてみられなかった。生理学的所見では体重は DS ラットで DR ラットより低く、一方、腎重量/体重比は DS ラットで DR ラットより増加していた。これは腎臓での炎症や、浮腫を反映しているものと考えられた。fasudil 治療は DS ラットの体重を増加させ、腎重量/体重比を有意に低下させた。しかしながら、DR ラットとの間には有意な差を認めた。

腎機能に関して、CCr は DS ラットで DR ラットより低下し、尿中タンパク量、血清 Cre 値、BUN 値は DS ラットで DR ラットより増加していた。fasudil の長期投与はこれらの腎機能指標を部分的ではあるが有意に改善した。組織学的所見では DS ラットでは輸入

図1 Rho/Rho-kinase 系と心血管疾患との関係。Rho/Rho-kinase 系は腎硬化症にも関係する？（文献5より改変）

細動脈硬化所見、動脈周囲の炎細胞浸潤を伴う線維化所見、糸球体の一部ないしは全体の硬化所見、葉間動脈硬化所見、動脈周囲の線維化所見、尿細管の萎縮を伴う間質の線維化所見などが観察された。慢性の fasudil 投与はこれらの組織学的な所見を一部改善した。半定量的に測定した細動脈硬化指数 (AIS)、糸球体硬化指数 (GIS) は DR ラットに比べて DS ラットで著明に高く、慢性の fasudil 治療はこれらの指標を部分的に有意に改善した。特に被膜下皮質の GIS は傍髄部の GIS よりも改善度が強かった。腎皮質における遺伝子発現レベルでは、DR ラットに比べて DS ラットでは RhoB, Rho-kinase α , Rho-kinase β の mRNA 発現が有意に亢進していた。一方、RhoA, RhoC の mRNA 発現は差がなかった。また collagen I, collagen III, TGF- β の mRNA 発現においては、DR ラットに比べて DS ラットで著明に亢進し、fasudil 治療でその発現亢進が一部有意に改善した。Western blot 解析で TGF- β のタンパクレベルを測定すると、DR ラットに比べて DS ラットで著明に TGF- β レベルが亢進していた。慢性の fasudil 投与で有意に TGF- β レベルが低下した。

以上の結果から Rho-kinase 阻害薬である fasudil は血圧非依存的に食塩感受性高血圧ラットの糸球体硬化、動脈硬化、腎間質の線維化を改善し、その機序として、一部 TGF- β , collagen I, collagen III などの細胞外マトリックス遺伝子発現の抑制を介して働いていることが示唆された。

以前の報告では TGF- β シグナルは一部 Rho によって調節されていることが示されている(13)。TGF- β は糸球体硬化、細動脈硬化、間質の線維化などに重要

図2 高血圧性糸球体硬化症に対する Rho-kinase の分子機序 1. TGF- β /collagen 系の抑制が関係する。

な役割を演じている多くの証拠が蓄積してきている(14)。DS ラットでも腎皮質の TGF- β /collagen 系は亢進しており、fasudil 投与によって腎機能の改善とともに、この亢進は低下した。したがって fasudil の腎保護効果は一部 TGF- β /collagen 系の抑制を介していると考えられる。このように Rho/Rho-kinase 系は食塩感受性高血圧ラットの糸球体硬化、動脈硬化、間質の線維化などに一部関与しており、fasudil 長期投与による腎保護作用は TGF- β /collagen 系の抑制を一部介している可能性が考えられた(図2)。Rho-kinase 阻害薬の他の高血圧モデルでの効果や腎保護効果の分子機序については今後のさらなる検討が必要と考えられた。

3. 悪性高血圧における Rho/Rho-kinase 系の意義と Rho-kinase 阻害薬の腎保護効果

我々は上述したようにまず食塩感受性高血圧ラットにおける Rho-kinase 阻害薬の腎保護効果を示した(10)。最近、腎臓を垂全摘した高血圧ラットモデルでの Rho-kinase 阻害薬の腎保護効果も報告されている(11)。しかしながら Rho/Rho-kinase 系が悪性高血圧における糸球体硬化の病因に関係しているか否かの報告はない。そこで次に悪性高血圧において Rho/Rho-kinase 系が糸球体硬化の進展に関係するとの仮説をたて、この仮説の検証を行った(12)。第2の目的としては Rho/Rho-kinase 系の阻害がどのような機序で腎保護効果を有するのかを検討した。Rho は細胞の遊走や、酸化ストレスに関係していることが報告されている(15,16)。また Rho/Rho-kinase 系が eNOS の遺伝子発現にも関係しているという所見も最近報告されている(17)。そこで、Rho-kinase 阻害薬の機序に

も焦点をあてて検討をおこなった。

悪性高血圧は deoxycorticosterone acetate-salt spontaneously hypertensive rats (DOCA-salt SHR) (100 mg/kg/week + 1% NaCl 水) を用いた。DOCA-salt SHR は無作為に3群に分けた。すなわち低用量 fasudil (30 mg/kg/day)、高用量 fasudil (100 mg/kg/day)、と未治療群である。3週間の治療の後、血行動態、腎機能、腎臓の組織学的所見、ホルモン値、単球/マクロファージの遊走、尿中 8-isoprostane 排泄量、ならびに種々の遺伝子発現について検討した。Wistar Kyoto (WKY) ラットをコントロールとした。

収縮期血圧は9週齢 DOCA-salt SHR で WKY より治療前から高く、その後徐々に血圧は増加した。長期の高用量 fasudil 投与は tail cuff 法で測定した収縮期血圧に影響を与えなかった。また屠殺前に測定した直接法での血圧値にも影響を与えなかった。さらに telemetry 法でも血圧値について検討を行った。12-13週齢の DOCA-salt SHR は1日の日内変動がない、いわゆる nondipper type の血圧パターンを示した。fasudil 投与は1日の血圧値に若干揺れを生じさせたが、平均の血圧値には影響を与えなかった。また fasudil を経口で 10 mg, 20 mg を1回投与すると、血圧の明らかな低下が認められたが 1 mg の投与ではその効果は明らかではなかった。すなわち飲水による fasudil 投与では血圧を有意に低下させないことが示唆された。

腎重量/体重比は DOCA-salt SHR で WKY より有意に高く、長期の高用量 fasudil 投与はこれを有意に低下した。腎機能の指標では、CCr は DOCA-salt SHR で WKY より低下し、尿中タンパク排泄量、血清 Cre 値は DOCA-salt SHR で WKY より増加していた。長期の高用量 fasudil 投与はこれらの腎機能指標を一部改善した。組織学的所見では DOCA-salt SHR では糸球体周囲の炎症細胞浸潤を伴う糸球体硬化所見を認めたが、長期の高用量 fasudil 投与はこれらの炎症を伴う糸球体硬化所見を一部改善した。組織学的所見を半定量的に測定した糸球体硬化指数 (GIS) は DOCA-salt SHR で著明に高値を示し、長期の高用量 fasudil 投与は GIS を部分的ではあるが有意に低下した。単球/マクロファージの遊走を示す ED-1 陽性細胞数は糸球体と間質に DOCA-salt SHR で WKY より多くみられた。長期の高用量 fasudil 投与はこの ED-1 陽性細胞の浸潤を有意に抑制した。collagen I, collagen III, TGF- β の遺伝子発現も DOCA-salt SHR で WKY より有意に増加しており、長期の高用量 fasudil 投与にて有意に低下した。酸化ストレスの指標である尿中の 8-isoprostane 排泄量も DOCA-salt SHR で WKY よ

り有意に増加しており、長期の高用量 fasudil 投与にて有意に低下した。腎皮質の NADPH oxidase のサブユニットである p40phox, p47phox, p67phox の遺伝子発現も DOCA-salt SHR で WKY より有意に増加しており、長期の高用量 fasudil 投与にて p40phox, p47phox の遺伝子発現は有意に低下したが p67phox に変化はなかった。一方, p22phox, gp91phox に関しては DOCA-salt SHR と WKY の間に有意な差はなかった。eNOS の遺伝子発現は DOCA-salt SHR で WKY より有意に低下しており、長期の高用量 fasudil 投与にて有意に増加した。また腎皮質内では RhoB ならびに ROCK- α の遺伝子発現が DOCA-salt SHR で WKY より有意に亢進していた。

この研究は悪性高血圧モデルである DOCA-salt SHR において腎皮質内における Rho/Rho-kinase 系の亢進とともに、腎機能の低下と腎組織所見の悪化、NADPH サブユニット遺伝子発現の亢進 (p40phox, p47phox, p67phox), 細胞外マトリックス遺伝子発現 (TGF- β , collagen I, and collagen III), 単球/マクロファージの遊走の増加, 8-isoprostane 尿中排泄量の増加を認めた。本研究において長期の高用量 fasudil 治療は、腎機能の低下と腎組織所見の悪化を一部改善し、NADPH サブユニット遺伝子発現の亢進 (p40phox, p47phox, p67phox), 細胞外マトリックス遺伝子発現 (TGF- β , collagen I, and collagen III), 単球/マクロファージの遊走の増加, 8-isoprostane 尿中排泄量の増加の改善を伴っていた。以上の高用量 fasudil の改善効果はいずれも部分的であり、多くの指標で WKY との間に有意な差が認められた。また低用量 fasudil 投与は高用量 fasudil 投与に比べてその効果は弱かった。

前述したように TGF- β /collagen 系は糸球体硬化において中心的な役割を演じている (14)。DOCA-salt SHR においても細胞外マトリックス遺伝子発現 (TGF- β , collagen I, and collagen III) 発現は亢進しており、長期の高用量 fasudil 投与において改善が認められた。従って、長期の高用量 fasudil 投与の腎保護作用の 1 つの機序として TGF- β 発現の亢進とそれに続く collagen 遺伝子発現を抑制することが fasudil の腎保護効果の機序の 1 つと考えられる。

Rho/Rho kinase は細胞の運動に関係している多くの証拠が存在する (15, 18)。DOCA-salt SHR においても ED-1 陽性細胞は WKY に比べて多く認められ、Rho-kinase 阻害薬の長期投与によって減少した。また単球/マクロファージは TGF- β を含むたくさんのサイトカイン、成長因子を分泌している (19)。従って、

単球/マクロファージの遊走を抑制したことも fasudil の腎保護効果の 1 つの機序と考えられる。

また最近の研究では、高血圧性糸球体硬化に酸化ストレスの亢進が関係しており、これが TGF- β /collagen 系を引き続いて亢進させるという報告もある (20)。DOCA-salt SHR においても of NADPH oxidase のサブユニットである p47phox, p40phox, p67phox の遺伝子発現は腎皮質にて亢進していた。最近の研究では SHR の腎臓で p47phox と p67phox の遺伝子発現は亢進していることを示している (21)。またアンジオテンシン II は NADPH oxidase を亢進し、血管平滑筋における p22phox と p67phox 遺伝子発現を増加させる (16)。このように Rho-kinase 阻害薬の長期投与の腎保護効果の機序の 1 つとして、fasudil による血圧非依存的な細胞内シグナルの抑制機序が考えられる。

これに加えて、DOCA-salt SHR では全身の酸化ストレスの指標である 8-isoprostane (22) も亢進していた。最近の研究では 8-isoprostane は細胞膜や LDL におけるアラキドン酸の過酸化によって非酵素的に産生される。本研究では長期の高用量 fasudil 投与によって 8-isoprostane は有意に減少した。このように全身の酸化ストレスも Rho-kinase 抑制薬によって低下した。

最近の研究では eNOS の遺伝子発現は Rho/Rho-kinase 系によって調節されていることが示されている。Fasudil の活性体である hydroxy-fasudil は培養内皮細胞において eNOS の遺伝子発現を増加させる (17)。多くの研究は腎疾患で NO 合成が低下しており (23)、腎での NO の利用効率の低下が腎病変の進行と密接に関係していることが示されている。DOCA-salt SHR でも eNOS 発現は WKY に比べて低下しており、Rho-kinase 阻害薬の長期投与によって増加した。このことは fasudil の腎保護効果の機序の 1 つとして、eNOS の発現の増加が考えられた。

以上をまとめると、Rho-kinase 阻害薬の腎保護効果の機序として、図 3 に示したように多彩な経路が関係していることが示唆される。さらに腎垂全摘モデルでは p27kip1 遺伝子を介するサイクリン依存性の細胞増殖調節機序に Rho-kinase 系が関係することが示されている。

4. 重症高血圧ラットモデル SHR-SP における検討

上述したように食塩感受性高血圧である Dahl 食塩感受性ラットや悪性高血圧ラットモデルである DOCA-salt SHR において、腎皮質での Rho/Rho-kinase 系が亢進しており、Rho-kinase 阻害薬である fa-

図3 高血圧性糸球体硬化症に対する Rho-kinase の分子機序 2

高血圧性糸球体硬化における Rho-kinase を介する推定される分子機序を示した。多彩な系が Rho-kinase を介した腎硬化症の病因に関係している、と考えられる。

fasudil が腎保護効果を有することを示した。我々はさらに Rho-kinase 阻害薬の腎保護効果が高血圧性糸球体硬化に対して普遍的なものかどうかを検討するために、他のモデルである食塩負荷 SHR-SP についても検討を行い、生命予後改善効果を有するの否かも検討した(24)。SHR は高齢になるまで腎臓の障害を起こしにくいといわれているが、SHR-SP は SHR よりも脳卒中を起こしやすく、心臓、腎臓の組織障害も高度であることが示されてきた(25)。そこで本研究では SHR-SP の 8 週齢から 8% の高食塩食を開始し、16 週齢まで投与を続けた。SHR-SP は無作為に 3 群に分けた。すなわち低用量 fasudil (15 mg/kg/day)、高用量 fasudil (30 mg/kg/day)、と未治療群である。8 週間の治療の後、血行動態、腎機能、腎臓の組織学的所見、ホルモン値、単球 / マクロファージの遊走、ならびに種々の遺伝子発現について検討した。同様に食塩負荷を行なった WKY をコントロールとした。また別の群で生命予後についても検討を行った。

収縮期血圧は 8 週齢 SHR-SP で WKY より治療前から高く、その後徐々に血圧は増加した。長期の fasudil 投与は tail cuff 法で測定した収縮期血圧に影響を与えなかった。また 8 週間の治療後に測定した直接法での血圧値にも影響を与えなかった。telemetry 法でも 24 時間の血圧値について検討を行ったところ、fasudil 投与は血圧値には影響を与えなかった。

腎重量 / 体重比は SHR-SP で WKY より有意に高く、長期の高用量 fasudil 投与はこれを有意に低下した。腎機能の指標では、CCr は SHR-SP で WKY より低下し、尿中タンパク排泄量、血清 Cre 値、BUN 値は

SHR-SP で WKY より増加していた。長期の高用量 fasudil 投与はこれらの腎機能指標を一部改善した。組織学的所見では SHR-SP では糸球体周囲の炎症細胞浸潤を伴う糸球体硬化所見を認めたが、長期の高用量 fasudil 投与はこれらの炎症を伴う糸球体硬化所見を一部改善した。糸球体硬化所見を半定量的に測定した糸球体硬化指数 (GIS) は SHR-SP で著明に高値を示し、長期の高用量 fasudil 投与は GIS を部分的ではあるが有意に低下した。さらに間質の線維化、細動脈の硬化所見も改善し、定量的に測定した Fibrous area、細動脈硬化指数も長期の高用量 fasudil 投与は有意に低下した。

単球 / マクロファージの遊走を示す ED-1 陽性細胞数も糸球体と間質に SHR-SP で WKY より多くみられた。長期の高用量 fasudil 投与はこの ED-1 陽性細胞の浸潤を有意に抑制した。単球 / マクロファージの遊走に関係する ICAM-1 の発現も SHR-SP で WKY より強く発現し、長期の高用量 fasudil 投与で有意な低下を示した。extracellular matrix の指標である collagen I, collagen III, TGF-β, PAI-1 の遺伝子発現も SHR-SP で WKY より強く発現し、長期の高用量 fasudil 投与で各々が有意な低下を示した。

腎皮質の NADPH oxidase のサブユニットである p40phox, p47phox, p67phox, gp91phox の遺伝子発現も、有意な SHR-SP で WKY より強く発現し、長期の高用量 fasudil 投与は p40phox, p47phox の遺伝子発現を有意に低下させたが、p67phox, gp91phox には有意な低下は認められなかった。一方、p22phox に関しては SHR-SP と WKY の間に有意な差はなかった。

さらに腎皮質の RhoA, RhoB の遺伝子発現の増加が SHR-SP で WKY より強く発現していた。

生命予後に関しては未治療の SHR-SP では 8%NaCl 食開始後 17 週以内に全例が死亡したが, fasudil 投与群では低用量, 高用量と用量依存性に生命予後を有意に改善した。

本研究の結果も我々の以前の結果とほぼ一致するものであった。SHR-SP は重症の高血圧ラットモデルであり, 腎障害も組織学的に認められ, タンパク尿も伴い, さらに腎機能も低下する。このモデルに血圧低下作用を来さない程度の Rho-kinase 阻害薬を投与すると腎機能, タンパク尿, 組織学的な改善が認められ, さらに生存率も改善した。この改善効果には種々の機序, (1) extracellular matrix 関連遺伝子の発現抑制, (2) macrophage/monocyte の発現抑制, (3) NADPH oxidase サブユニットの遺伝子発現抑制機序, などが関係していることが示唆された。

食塩感受性高血圧ラット, 悪性高血圧ラットモデルにおいても extracellular matrix, なかでも TGF- β /collagen 系は糸球体硬化において中心的な役割を演じていることを示したが, SHR-SP においても TGF- β , collagen I, collagen III は亢進しており, 長期の高用量 fasudil 投与において遺伝子発現の低下が認められた。さらに本研究では PAI-1 遺伝子発現についても検討を行ったところ, SHR-SP において WKY よりもその遺伝子発現は亢進しており, 長期の高用量 fasudil 投与において遺伝子発現の低下が認められた。最近の研究ではプラスミンと matrix metalloproteinase (MMP) が extracellular matrix の分解に重要な役割を演じているが示されている (26)。PAI-1 はプラスミンの産生を阻害すること, ならびにプラスミン産生阻害による MMP の活性化を抑制することにより, extracellular matrix の蓄積に関係するキー分子である。PAI-1 は TGF- β によって活性化することも知られている。従って今回認められた糸球体硬化改善の一因に TGF- β /collagen ならびに TGF- β /PAI-1 系の抑制機序が関係することが示唆された (26, 27)。

Rho/Rho kinase は細胞の運動に関係している (18)。以前の報告では Rho kinase 阻害薬は尿細管結紮ラットモデルの腎臓間質の線維化を抑制したが, この機序の 1 つに Rho kinase の抑制薬が単球/マクロファージの遊走を抑制したと報告されている。また悪性高血圧ラットモデルである DOCA-salt SHR においても ED-1 陽性細胞は WKY に比べて多く認められ, Rho-kinase 阻害薬の長期投与によって減少した。このような炎症細胞は内皮に発現する ICAM-1 などの接着因

子を介して血中から組織に遊走してくる。本研究では ICAM-1 遺伝子の発現もみたところ, SHR-SP において WKY よりもその遺伝子発現は亢進しており, 長期の高用量 fasudil 投与において遺伝子発現の低下が認められた。また単球/マクロファージ系は TGF- β を含むたくさんのサイトカイン, 成長因子を分泌し, 糸球体硬化や間質の線維化の病因に関係していると考えられている (28)。従って, 本研究で観察された ICAM-1 遺伝子発現の低下に基づく単球/マクロファージの遊走を抑制したことも fasudil の腎保護効果の機序の 1 つと考えられた。ICAM-1 の遺伝子発現は NF- κ B などの転写因子によって誘導される。一方, 酸化ストレスも NF- κ B を誘導することが知られている。従って, 酸化ストレス/NF- κ B/ICAM-1/炎症細胞の遊走/酸化ストレスという悪循環を生じ, 病態の悪化に寄与していることが示唆される。

NADPH oxidase は酸化ストレス産生に重要な役割を演じている。また最近の研究では高血圧の病因にも酸化ストレスが関係していることが示されている。事実, NADPH oxidase のサブユニットである p47phox と p67phox の遺伝子発現は SHR で亢進していることが示されている (21)。さらに糸球体硬化にも酸化ストレスが関係している成績が増えてきている。以前の研究で我々も DOCA-salt SHR において, NADPH oxidase のサブユニットである p47phox, p40phox, p67phox の遺伝子発現は腎皮質にて亢進し, fasudil 投与にて糸球体硬化の改善とともに低下したことを示した (12)。本研究でも SHR-SP の腎皮質の p40phox, p47phox, p67phox, gp91phox の遺伝子発現も SHR-SP で WKY より強く発現し, 長期の高用量 fasudil 投与は p40phox, p47phox の遺伝子発現を糸球体硬化の改善とともに有意に低下させた。高血圧性糸球体硬化に酸化ストレスの亢進が関係し, これが TGF- β /collagen 系を亢進させるという報告もあり, Rho-kinase 阻害薬の腎保護効果の機序の 1 つとして, 酸化ストレス抑制を介した細胞内シグナルの抑制機序が考えられる。我々の data から Rho-kinase 阻害薬の腎保護効果の機序の仮説を示す (図 3)。このように種々の機序の総和として, Rho-kinase 阻害薬の腎保護効果がみられるものと, 現時点では推察される。

最後に

Rho-kinase 阻害薬の腎保護効果とその機序について我々の成績を中心に概説した。これらのモデルにおける Rho-kinase 阻害薬の効果はいずれも部分的なものであるが, 機序として新しい経路を有しており注目

図4 薬理ゲノミクスからみた高血圧，糸球体硬化，Rho-kinase に関与する分子の関係。

される。すでに出来上がった腎疾患にも有効であるか，などについても現在検討中である。またすでに効果の定まった薬剤との併用効果なども今後検討する価値があると思われる。

機序については田中から提示のあった薬理ゲノミクスからみた高血圧，糸球体硬化，Rho-kinase との関係が興味深い（図4）。この図から糸球体硬化，Rho-kinase のつながりのある分子は6つ提示されているが，我々も興味をもって取り組んだものばかりであった。このようなデータベースの構築は既存の知識を簡便に確認でき，重要な分子を押さえるのに有用な情報を提供してくれ，新しい研究に取り組む際に大変便利なものとなろう。

我が国も高齢化社会を迎えており，循環器疾患，腎疾患は増加の一途をたどっている。現状での薬剤には限界も多く，Rho-kinase 阻害薬を含めた今後のこの分野での発展と，腎保護機序のさらなる解明が期待される。

謝辞：本研究の一部は，厚生労働省班研究費 17 指 -1 〈ゲノム・プロテオームネットワークに基づく循環器疾患の診断〉，文部科学省科学研究費 14570692，日本私立学校振興・共済事業団学術振興資金，関湊賞などの研究助成により行われた。本研究に際し，技術的協力を得た石川恵子，野村美香，湊雅子，坂田町子，田部井恭子，間々田恭子，町田賀章，平田久人，秋元一三の各氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Takai Y, et al. *Physiol Rev*. 2001;8:153-208.
- 2) Fukata Y, et al. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22:32-39.
- 3) Hall A. *Science*. 1998;279:509-514.
- 4) Etienne-Manneville, et al. *Nature*. 2002;420:629-635.
- 5) Noma K, et al. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290:C661-C668.
- 6) Shimokawa H, et al. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;40:751-761.
- 7) Uehata T, et al. *Nature*. 1997;389:990-994.
- 8) Nagatoya K, et al. *Kidney Int*. 2002;61:1684-1695.
- 9) Satoh S, et al. *Eur J Pharmacol*. 2002;455:169-174.
- 10) Nishikimi T, et al. *J Hypertens*. 2004;22:1787-1796.
- 11) Kanda T, et al. *Kidney Int*. 2003;64:2009-2019.
- 12) Ishikawa Y, et al. *Hypertension*. 2006;47:1075-1083.
- 13) Adnane J, et al. *J Biol Chem*. 2002;277:8500-8507.
- 14) Border WA, et al. *Am J Kidney Dis*. 1993;22:105-113.
- 15) Riento K, et al. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:446-456.
- 16) Higashi M, et al. *Circ Res*. 2003;93:767-775.
- 17) Wolfrum S, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1842-1847.
- 18) Horwitz AR, et al. *Science*. 1999;286:1102-1103.
- 19) Border WA, et al. *Am J Kidney Dis*. 1993;22:105-113.
- 20) Iglesias-De La Cruz MC, et al. *Kidney Int*. 2001;59:87-95.
- 21) Chabrashvili T, et al. *Hypertension*. 2002;39:269-274.
- 22) Mezzetti A, et al. *Cardiovasc Res*. 2000;47:475-488.
- 23) Klahr S. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16 Suppl 1:60-62.
- 24) Nishikimi T, et al. *Circulation*. 2005;112:S178.
- 25) Wang X, et al. *J Hypertens*. 2003;21:1171-1181.
- 26) Krag S, et al. *Kidney Int*. 2005;68:2651-2656.
- 27) Baricos WH, et al. *Kidney Int*. 1995;47:1039-1047.
- 28) Border WA, et al. *Am J Kidney Dis*. 1993;22:105-113.

著者プロフィールは，152 頁をご参照下さい。