総説

Rho キナーゼ阻害薬

瀬戸 実¹⁾, 浅野 敏雄²⁾

要約: Rho キナーゼは1995~1996年に、低分子量GTP結合タンパク質Rhoの標的タンパク質として同定されたセリン・スレオニンタンパク質リン酸化酵素である。これまでの研究により、Rho キナーゼは収縮、増殖、遊走、遺伝子発現誘導など細胞の重要な生理機能に関与していることが明らかになっている。また各種病態動物モデルを使用した解析より、Rho キナーゼの活性亢進が数々の病態を引き起こす原因となっていることが示され、創薬のターゲットとして注目されている。Rho キナーゼにはROCK1とROCK2の2つのアイソフォームがあり高い相同性を有している。ROCK1とROCK2は体内に広く発現しているがROCK2は特に脳と骨格筋に強く発現している。現在製薬メーカーを中心に精力的にRho キナーゼ阻害薬の開発が行われている。本総説においては、ヒトに投与されたRho キナーゼ阻害薬の成績を中心に、その有用性について述べたい。

はじめに

タンパク質リン酸化酵素阻害薬として、世界で最初に承認上市されたのはRho キナーゼ阻害薬であるファスジルである。ファスジルは脳血管攣縮の治療薬として1995年に上市された。それ以降2000年代初頭にかけてヒトゲノム解析の急速な進展に伴い、さまざまな疾患の原因として、タンパク質リン酸化酵素の異常が次々と同定されてきた。これまでのゲノム情報から、タンパク質リン酸化酵素活性を有すると考えられるタンパク質はヒトで約500種類あると推定され、そのうち約200種類程度のタンパク質リン酸化酵素が疾患の発症に関係していると言われている(1)。創薬のターゲット分子として、タンパク質リン酸化酵素は最近ま

すますます注目されるようになり、特にがんを中心に精力的に治療薬の開発研究が行われている。日本発であり、その先鞭をつけたRho キナーゼ阻害薬について本総説では、ヒトでの効果を中心に、その治療薬としての可能性について述べたい。

1. Rho キナーゼについて

Rho キナーゼは分子量約160 kDaのセリンスレオニンリン酸化酵素であり、Rho kinase α /ROK α /ROCK2とRho kinase β /ROK β /ROCK1の2つのアイソフォームが存在する。ROCK1とROCK2は高い相同性を有しており、全体として65%の同一性があり、特に触媒部位であるkinase domainにおいては92%の同一性がある(2)。ROCK1とROCK2は体内に広く発現しているが、ROCK2は特に脳と骨格筋に強く発現している(2)。

Rho キナーゼはGTPが結合した活性型RhoAが分子内のRho binding domainに結合することにより活性化される。脂質メッセンジャーとして知られているアラキドン酸もRhoAとは独立した機序でRho キナーゼを活性化することが報告されている(3)。またC末端が切断されることによってもRho キナーゼが活性化されることが報告されている(4-6)。アポトーシスが起こる際、ROCK1はカスパーゼ3により(4,5)、ROCK2はgranzymeBによって(6)C末端が切断されることが報告されている。またROCK1遺伝子欠損マウスとROCK2遺伝子欠損マウスでは表現形が異なることが報告されている(7,8)。これらの報告は2つのアイソフォームの機能の違いを示唆している。

Rho キナーゼは、収縮、遊走、増殖、遺伝子発現誘導など細胞の重要な生理機能に関与している。Rho キ

キーワード: Rho キナーゼ阻害薬, 創薬, 臨床研究, ファスジル

¹⁾ 旭化成ファーマ(株) 医薬研究センター 探索薬理研究部 (〒410-2321 静岡県伊豆の国市三福 632-1)

²⁾ 旭化成ファーマ(株) (〒101-8101 東京都千代田区神田神保町 1-105)

E-mail: seto.mb@om.asahi-kasei.co.jp 原稿受領日: 2011年5月20日, 依頼原稿

Title: Rho-kinase inhibitors. Author: Minoru Seto, Toshio Asano

ナーゼの担う多様な生理機能解析は血管平滑筋の研究よりはじまった。血管平滑筋の収縮弛緩反応は、ミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化によって主に制御されている (9, 10) (図 1)。このリン酸化量はミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) の活性とミオシン軽鎖フォスファターゼ (MLCPh) の活性のバランスにより決定される。血管平滑筋は各種収縮刺激に応答し細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させる。上昇した細胞内 Ca^{2+} はカルモジュリン (CaM) と結合して Ca^{2+} ・カルモジュリン複合体を形成し、MLCK の触媒サブユニットに結合し MLCK を活性型に変換する。活性型 MLCK が MLC をリン酸化するとミオシン頭部の ATPase 活性の上昇がおこりアクトミオシン系の活性化が引き起こされ、血管平滑筋は収縮する。細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下すると Ca^{2+} はカルモジュリンから解離して MLCK は不活性化される。その結果 MLCPh が優位となり MLC は脱リン酸化され、血管平滑筋は弛緩する。Rho キナーゼは MLCPh の活性を制御していることが明らかになった (11, 12)。収縮刺激により、G タンパク質に共役した受容体 (GPCR) を介して低分子 G タンパク質である Rho が活性化され、その標的タンパク質の 1 つである Rho キナーゼが活性化される。活性化された Rho キナーゼは、MLCPh のミオシン結合サブユニット (MBS) をリン酸化することによりその活性を阻害する。その結果、MLCK と MLCPh の活性のバランスが崩れ、MLC のリン酸化が上昇することで血管平滑筋は収縮する。Rho キナーゼによる血管平滑筋収縮の制御は細胞内の Ca^{2+} 濃度に依存しない。このことはそれまで不明であった血管平滑筋の Ca^{2+} 非依存性の収縮や

Ca^{2+} 感受性変化の機序を分子レベルで説明できうることを意味する。また Rho キナーゼは上述した MLC のリン酸化量の調整を介したアクトミオシン系の活性化により細胞遊走を制御している。Rho キナーゼは、アデューシン、ERM (ezrin, radixin, moesin)、LIM キナーゼなどのタンパク質をリン酸化しアクチンフィラメントの再構築を介し細胞の遊走を制御していることも報告されている (13)。Rho キナーゼは IL-6 などのサイトカインの遺伝子発現を促進的に、eNOS などの遺伝子発現を抑制的に制御することが知られている (14, 15)。また Rho キナーゼはトロンビンなどの刺激による血管平滑筋の増殖を制御することが知られている (16)。これらの生理機能は Rho キナーゼの有するアクトミオシン系の活性制御作用のみでは説明できない。今後 Rho キナーゼの基質を含めたシグナルの詳細な解明が待たれる。

Rho キナーゼと病態の関連は、Rho キナーゼの機能解析研究の比較的初期より示唆され、その後多くの知見が報告されている。これは Rho キナーゼの選択的阻害薬である Y27632: (R)-(+)-*trans*-N-(4-pyridyl)-4-(1-aminoethyl)-cyclohexanecarboxamide とファスジル (図 2) がツールとして優れており、各種病態モデルを使用しその効果の検証が進んだ為である。今日までに多種多様な病態モデルに対する、Rho キナーゼ阻害薬の有効性が多くの研究施設から報告されている。Rho キナーゼは、収縮、遊走、増殖、遺伝子発現誘導など多面的に細胞の重要な生理機能を制御している。このことが Rho キナーゼ阻害薬が広範囲な薬効プロファイルを示す一因となっている。

図1 Rho キナーゼによる細胞の収縮・遊走制御機序

Rho キナーゼはミオシン軽鎖フォスファターゼ (MLCPh) をリン酸化しその活性を低下させる。その結果ミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化量が上昇しアクトミオシン系が活性化する。また Rho キナーゼは adducin, ERM, LIM キナーゼをリン酸化しアクチンフィラメントの再構築を誘導する。これらを介し Rho キナーゼは細胞の収縮と遊走を制御している。

図2 ファスジルの化学構造と Rho キナーゼ阻害定数
ファスジルは ROCK1 と ROCK2 を同程度に阻害するアイソフォーム非特異的な阻害薬である。

本総説においては、ヒトに投与された Rho キナーゼ阻害薬の成績を中心に、その有効性と安全性について述べたい。

2. 遅発性脳血管攣縮

くも膜下出血は 40 代以降の中高年の男性に多く認められ、日本では年間約 1 万 8000 人の患者が発生している。このうち約 4~5 割は、発生直後に死亡するか手術困難な重症例である。手術が可能であった患者においては高い頻度で遅発性脳血管攣縮が発生することが知られている。遅発性脳血管攣縮とは、くも膜下出血後 4~16 日に発症する脳動脈の異常な収縮で、発症のピークは 7 日目とされている。重篤な脳血管攣縮が起こると、失語症、麻痺、半身不随などの後遺症が残る、さらには死に至ることも少なくない。脳血管攣縮はくも膜下出血に伴う重大な合併症である。

ファスジルは 1995 年にくも膜下出血後の脳血管攣縮治療薬として日本で承認・上市された。ファスジルはタンパク質リン酸化酵素である Rho キナーゼの選択的阻害薬である。ファスジルの構造と Rho キナーゼの 2 つのアイソフォームである ROCK1 と ROCK2 に対する阻害定数 (K_i 値) を図 2 に示した。ファスジルは ROCK1 と ROCK2 に対するアイソフォーム非選択的阻害薬であり、その構造式からも推察されるように阻害様式は基質である ATP に対する競合阻害である。

ファスジルのくも膜下出血患者を対象に実施された二重盲検臨床試験の成績について紹介する (17)。くも膜下出血の発症 3 日目までに手術の終了した患者で、CT 上くも膜下出血量の多い Fisher Group3 の患者がエントリーされ、267 名のデータ (ファスジル投与群: 131 名, プラセボ投与群: 136 名) が集計された。ファスジルは 30 mg を 1 日に 3 回計 90 mg を 14 日間点滴静注した。血管写上の攣縮の程度、症候性攣縮の発生、CT 上の攣縮による LDA (low density area: 脳梗塞エリア) の程度、1 ヶ月後の機能予後をファスジル投与群およびプラセボ群で比較した。その結果を表 1 に示した。全ての項目においてファスジル投与群はプ

表 1 ファスジルのくも膜下出血患者を対象に実施された二重盲検臨床試験の成績

	プラセボ群	ファスジル投与群	P value
血管写上の攣縮 中等度以上の割合	61%	38%	<0.01
症候性攣縮 ありの割合	50%	35%	<0.05
CT 上の LDA 中等度以上の割合	38%	16%	<0.01
機能予後 Good recovery の割合	74%	88%	<0.05

ファスジル投与群 (30 mg×3 回/1 日を 14 日間点滴静注) はプラセボ群に比較し、4 つのすべての評価項目で有意に良好な成績を示した。

ラセボ群に比較し、有意に良好な成績を示した。ファスジル投与による全身血圧の低下が懸念されたが、点滴開始 15 分後に平均 2 mmHg とわずかな血圧低下作用が観察されたのみであった。このことは、ファスジルが正常な血管より、攣縮を起こした血管により選択的に作用することを示唆している。その他、明らかにファスジルによる副作用と考えられるものではなく、術後の頭蓋内出血もファスジル投与群 7 例、プラセボ群 8 例、血液の臨床検査値異常もそれぞれ 9 例、14 例と両群の間に差は見られなかった。

脳血管攣縮の動物モデルとしてイヌの two-hemorrhage model がよく使用される (18)。イヌの大槽内に自家血を 2 回注入すると、遅発的に脳底動脈の攣縮が起こる。血管攣縮を起こしたイヌ脳底動脈内において Rho キナーゼの含量の上昇と Rho キナーゼの基質のリン酸化の亢進が報告されている (19)。おそらくヒトにおいても脳血管攣縮の誘発に Rho キナーゼの異常な活性亢進が関与しており、ファスジルはこの亢進した部分に作用し、選択的に攣縮血管を弛緩させると考えられる。

Rho キナーゼは全身に分布し、収縮、増殖、遊走、遺伝子発現誘導など細胞の重要な生理機能に関与している。よって Rho キナーゼ阻害薬を全身に投与すると副作用が発現することが懸念される。しかしながらファスジルは上市以降、すでに 10 万人以上のくも膜下出血患者に投与されその有効性と安全性が証明されている。このことは、Rho キナーゼ阻害薬は他の疾患においても十分な安全域を担保できる可能性を示唆している。

3. 肺高血圧症

肺高血圧症は、肺微小血管の増殖や血管リモデリングを特徴とし、病態が進行すると肺動脈の血管抵抗が亢進し、最終的には右心不全から死にいたる極めて予後不良の疾患である。肺高血圧症の基本的な病態とし

て、肺動脈の炎症性・増殖性変化による肺血管の過収縮（攣縮）および血管平滑筋の増殖・肥大化が知られている。

肺高血圧症患者に対するファスジルの効果が検討されている。重度の肺高血圧症患者を対象とした試験で、ファスジルの静脈内持続投与によって、肺血管抵抗の有意な低下が認められている（図3）（20）。この時、全身血圧の低下等の副作用は認められておらず、脳血管攣縮に対する作用と同様に、ファスジルは肺高血圧症の病変血管に選択的に作用すると考えられた。肺高血圧症の動物モデルとして、モノクロタリンモデルが汎用されている。モノクロタリンをラットに投与すると、肺細動脈の内皮障害、中膜肥厚、肺動脈圧の上昇、右心肥大など肺高血圧症の典型的な症状を示し、最終的には死に至る。モノクロタリンモデルラットから摘出された肺血管ではRho キナーゼの基質のリン酸化が亢進しており、肺血管の過収縮（攣縮）および血管平滑筋の増殖・肥大化にRho キナーゼの活性亢進の関与が示唆されている（21）。ヒト肺高血圧症の病変血管においてもRho キナーゼの活性亢進が起こっており、ファスジルはこの亢進した部分に作用し、選択的に病変血管に作用すると考えられる。

ファスジルをモノクロタリン投与と同時に投与する予防的投与、および病態が完成した後に投与を開始する治療的投与の効果が検討されている。ファスジルは予防的投与のときだけでなく、治療的投与においても、モノクロタリン誘発の肺動脈圧の上昇、肺血管抵抗の上昇、中膜肥厚を改善し、さらには致死率を抑制することが報告されている（21）。モノクロタリンモデルでは血管平滑筋の増殖による中膜肥厚が生じているが、ファスジルは増殖した平滑筋細胞のアポトーシスを誘

導することが示されており、これが治療的投与でも中膜肥厚を改善する理由と推察されている（21）。また、肺高血圧症患者の白血球中のRho キナーゼ活性が亢進していることが報告されている（22）。活性化された白血球の肺動脈への浸潤は炎症の最初のステップであり、肺高血圧症の病態を考える上で興味深い知見である。基礎と臨床研究の成績はRho キナーゼの活性亢進が肺高血圧症の主な病因の1つであることを示唆しており、Rho キナーゼ阻害薬が有用な治療薬となることが期待されている。

4. 冠動脈疾患

代表的な冠動脈疾患として狭心症が知られている。狭心症とは、心筋に酸素を供給している冠動脈に動脈硬化や血管攣縮が生じ、一過性の虚血が生じ、胸痛や胸部圧迫感が生じる病気であり、虚血の症状が重いと、心筋が壊死する心筋梗塞となる。

狭心症患者を対象にしたファスジルの多施設無作為化二重盲検試験が米国で実施された。ファスジルの投与は、20 mg の1日3回で開始し、2週間ごとに増量し、最終的には80 mg の1日3回で、計8週間投与された。84名の結果（ファスジル投与群：41名、プラセボ群：43名）が解析され、ファスジル投与群の運動耐容時間は、プラセボ群に比べ有意に延長していることが示された（23）。ファスジルおよびプラセボ投与群の間に血圧、心拍変化にほとんど差は無く、良好な忍容性が示されている。また冠動脈バイパス手術後に冠攣縮が発生するケースが知られている。ファスジルは一酸化窒素供与薬およびCa拮抗薬に耐性を示したバイパス手術後の冠攣縮に対して有効であったとの報告がある（24）。Rho キナーゼ阻害薬が難治性冠攣縮に有効である可能性が示唆された。

ブタ冠動脈局所へIL-1 β を慢性的に作用させることにより誘発した冠動脈硬化モデルにおいて、同部に冠攣縮反応が誘発されることが報告されている。この冠攣縮反応はRho キナーゼ阻害薬であるヒドロキシファスジル（25）およびY-27632（26）の投与によって抑制されることが示されている。その冠動脈攣縮部でRho キナーゼの基質のリン酸化亢進が報告されている（26）。Rho キナーゼの活性亢進が冠動脈攣縮の原因であり、Rho キナーゼ阻害薬がその活性化亢進を抑制することによって有用性を発揮すると推察された。

5. 緑内障

緑内障は、主に眼圧の上昇が原因となって、視神経が障害され視野などの視機能に異常をきたす進行性の

図3 重度の肺高血圧症患者に対するファスジルの作用
ファスジルの静脈内持続投与（30 mg の点滴静注）によって有意な肺血管抵抗の改善が認められた。* $P < 0.05$ v.s. 0 min, ** $P < 0.01$ v.s. 0 min, $n = 9$, Values are Mean $\pm$ SE.

表2 Rho キナーゼ阻害薬の臨床開発状況

薬物名	開発メーカー	適応症	ステージ	国名
ファスジル	旭化成ファーマ	脳血管攣縮 肺高血圧症	上市 Phase II	日本, 中国 日本
K-115	興和	緑内障, 高眼圧症	Phase II	日本
SNJ-1656	千寿製薬・Novartis	緑内障, 高眼圧症 緑内障 高眼圧症	Phase II Phase II Phase II	日本 スイス アメリカ
AR-12286	Aerie Pharmaceuticals	緑内障	Phase I	アメリカ
INS-117548	Inspire Pharmaceuticals	緑内障, 高眼圧症	Phase I	アメリカ
SLX-2119	Surface Logix	肥満症	Phase I	アメリカ

慢性疾患であり, 世界的に失明原因の上位を占めている。近年では, 正常眼圧でも緑内障を発症する患者がいることが分かっており, その原因として視神経乳頭部の血流障害や網膜神経節細胞のアポトーシスなどが考えられている。

現在, 新規 Rho キナーゼ阻害薬 SNJ-1656 が臨床開発中である。健常男子を対象にした第 I 相試験では, SNJ-1656 の 0.05% 点眼液 1 日 1 回, 0.1% 点眼液 1 日 1 回, 0.05% 点眼液 1 日 2 回, 0.1% 点眼液 1 日 2 回の 1 週間点眼後の最大眼圧下降効果は, それぞれ -2.78 mmHg, -4.12 mmHg, -3.45 mmHg, -2.94 mmHg でありその作用は強力であった (27)。また試験期間中, 重篤な合併症は認められなかったが, 高濃度点眼後は, 眼瞼結膜と球結膜で高頻度に, 微細血管の持続的弛緩によると考えられる充血が認められた。眼圧は, 毛様体から産生される房水の産生量と, 排出量により規定されている。房水の循環異常は眼圧上昇を招き, 視神経の障害, さらに緑内障発症へ結びつく。Rho キナーゼ阻害薬は, 主に平滑筋様作用をもつ線維柱帯を弛緩させ, 房水排出を促進し, 眼圧を強力に下降させる (27)。また Rho キナーゼ阻害薬は, 視神経乳頭血流増加作用 (28) および視神経再生作用 (29) を持つことが明らかにされており, 多面的な効果を持つ緑内障治療薬になる可能性が示唆されている。

6. 今後の展望

Rho キナーゼ阻害薬の臨床開発状況を表 2 に示した。緑内障を中心に臨床開発が実施されているが, 非臨床試験では循環器領域疾患, 神経変性疾患, 泌尿器疾患およびがん等の多くの疾患に対する有効性が示唆されている。今後, ROCK1 または ROCK2 の組織特異的ノックアウトマウス等を用いた研究, および ROCK1 または ROCK2 選択的な阻害薬の出現などによって, ROCK1 と ROCK2 の機能の違いが次第に明らかになってくると予想される。将来, Rho キナーゼ阻害薬は, 疾患または重症度ごとに, ROCK1/2 デュアル阻害薬,

ROCK1 選択的阻害薬, または ROCK2 選択的阻害薬の使い分けが可能になるであろう。さらなる研究の進歩に期待したい。

おわりに

本総説では, ヒトに投与された Rho キナーゼ阻害薬の成績を中心にその有用性について述べてきた。Rho キナーゼは細胞の生理機能に多面的に関与している。このことが Rho キナーゼ阻害薬が幅広い薬効プロファイルを示す一因となっている。現在精力的に, 幅広い疾患領域において Rho キナーゼの機能解析が進められている。今後, 有用性が高い Rho キナーゼ阻害薬が, 数々の疾患領域で上市され, 臨床現場で活用されることを期待している。

文 献

- 1) Manning G, et al. Science. 2002;298:1912-1934.
- 2) Nakagawa O, et al. FEBS Lett. 1996;392:189-193.
- 3) Feng J, et al. J Biol Chem. 1999;274:3744-3752.
- 4) Sebbagh M, et al. Nat Cell Biol. 2001;3:346-352.
- 5) Coleman ML, et al. Nat Cell Biol. 2001;3:339-345.
- 6) Sebbagh M, et al. J Exp Med. 2005;201:465-471.
- 7) Thumkeo D, et al. Mol Cell Biol. 2003;23:5043-5055.
- 8) Shimizu Y, et al. J Cell Biol. 2005;168:941-953.
- 9) Horowitz A, et al. Physiol Rev. 1997;76:967-1003.
- 10) Somlyo AP, et al. Nature. 1994;372:231-236.
- 11) Kureishi Y, et al. J Biol Chem. 1997;272:12257-12260.
- 12) Kimura K, et al. Science. 1996;273:245-248.
- 13) Kaibuchi K, et al. Annu Rev Biochem. 1999;68:459-486.
- 14) Radeff JM, et al. J Bone Miner Res. 2004;19:1882-1891.
- 15) Takemoto M, et al. Circulation. 2002;106:57-62.
- 16) Sauzeau V, et al. Circ Res. 2001;88:1102-1104.
- 17) 渋谷正人, 他. 脳神経. 1993;45:819-824.
- 18) 生垣一郎, 他. 薬理と治療. 1992;20 Suppl 6:1515-1519.
- 19) Sato M, et al. Circ Res. 2000;87:195-200.
- 20) Fukumoto Y, et al. Heart. 2005;91:391-392.
- 21) Abe K, et al. Circ Res. 2004;94:385-393.
- 22) Do e Z, et al. Circ J. 2009;73:1731-1739.
- 23) Vicari RM, et al. J Am Coll Cardiol. 2005;46:1803-1811.
- 24) Inokuchi K, et al. J Cardiovasc Pharmacol. 2004;44:275-277.
- 25) Shimokawa H, et al. Cardiovasc Res. 1999;43:1029-1039.
- 26) Kandabashi T, et al. Circulation. 2000;101:1319-1323.
- 27) Tanihara H, et al. Arch Ophthalmol. 2008;126:309-315.
- 28) Sugiyama T, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52:64-69.
- 29) Segawa H, et al. Exp Neurol. 2007;205:230-240.