

高血圧性糸球体硬化におけるRho-kinase阻害薬の腎保護効果とその作用機序

錦見 俊雄 松岡 博昭

要 旨：最近の研究はsmall GTP結合蛋白の生理学的な重要性を示している。GTP結合蛋白の中で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のエフェクター蛋白の中で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遂げた。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、われわれ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することを報告した。この総説において、われわれ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。これらの慢性的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。われわれの結果はまた、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。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 667–673)

Key words: hypertension, nephrosclerosis, Rho-kinase, transforming growth factors, oxidative stress

序 論

最近の分子生物学の発達はRho蛋白ファミリーを含む低分子GTP-結合蛋白の生理学的に重要な役割を明らかにしてきた。少なくとも10種類のRho蛋白のメンバーが哺乳類で同定されている。Rho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、細胞周期の調節等、種々の細胞機能の分子スイッチとして働いていることが知られている^{1,2)}。Rhoエフェクターの中で、Rho-kinaseが最もよく研究されている。Rhoの細胞機能や細胞内伝達系は広く研究されてきたが、*in vivo*の機能に関する情報はいまだ限られ

ている。Uehataら³⁾はRho-kinaseの特異的阻害薬として、Y-27632という合成化合物を報告した。この薬物は*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である。Rhoは血管平滑筋のミオシンフォ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おり、Rhoの血管のトーンス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⁴⁾。

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少ない。最近、Y-27632が尿管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されている⁵⁾。この結果は他のRho-kinase阻害薬fasudil

獨協医科大学循環器内科

2006年1月30日受付 2006年5月9日受理

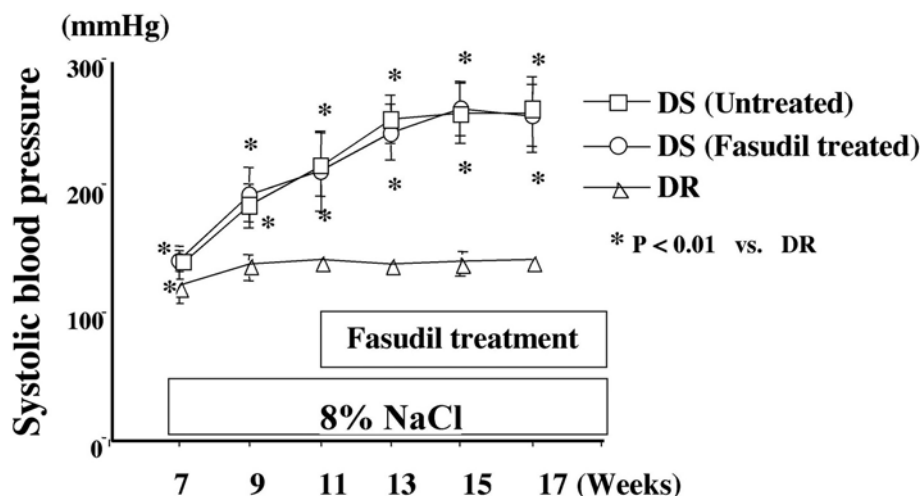


Figure 1 Course of systolic blood pressure measured by tail-cuff method.

でも確認されている⁶⁾。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もほとんどなされていない。最近、われわれと他の研究者達は、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^{7,8)}。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、その機序についてわれわれの研究結果を中心に考察してみることとする。

食塩感受性高血圧におけるRho-kinase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⁷⁾。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 (30mg/kg/day) 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 の蛋白レベルを測定した。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治療は血圧に全く影響を与えなかった (Fig. 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。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。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。

腎機能に関して、CCrはDSラットでDRラットより低下し、尿中蛋白量、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一部改善した。組織学的な所見ではDSラットでは輸入細動脈硬化所見、動脈周囲の炎症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。慢性的fasudil投与はこれらの組織学的な所見を一部改善した。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、慢性的fasudil治療はこれらの指標を有意に改善した。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RhoB、Rho-kinase α 、Rho-kinase β のmRNA発現が亢進していた。一方、RhoA、RhoCのmRNA発現は差がなかった。また、collagen I、collagen III mRNA、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改善した。western blot解析で

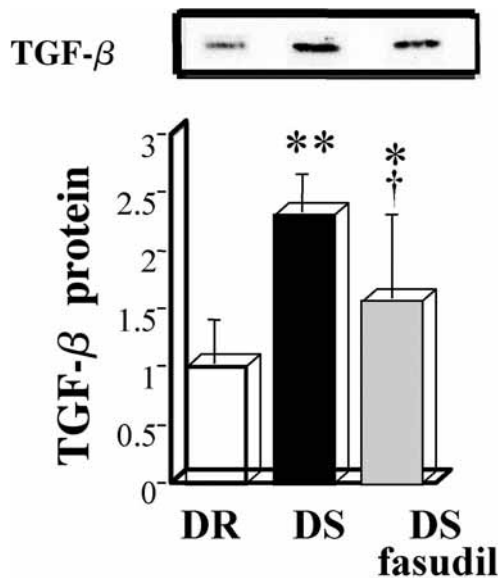


Figure 2 TGF- β protein level.
*: $p < 0.05$ vs DR, **: $p < 0.01$ vs DR, †: $p < 0.05$ vs DS

TGF- β の蛋白レベルを測定したところ、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 (Fig. 2)。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⁹⁾。TGF- β は糸球体硬化、細動脈硬化、間質の線維化などに重要な役割を演じているという多くの証拠が蓄積してきている¹⁰⁾。このようにTGF- β /collagen系は糸球体硬化、細動脈硬化、間質の線維化の進展に中心的な役割を果たしている。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。またDSラットの腎皮質においてRhoBのmRNAが亢進していた。尿管結紮モデルでもRhoBの亢進が報告されている。さらに後述するDOCA-salt SHRでもRhoBの遺伝子発現が亢進し、SHR-SPでも同様であった。以上のことからRhoBの活性化は腎障害に共通した機序である可能性が高いが、その局在については現時点ではよくわかっていない。後述するようにRho-kinase阻害薬は種々の細胞や機能の改善をきたすので、糸球体毛細血管、輸出・輸入細動脈、炎症細胞、線維芽細胞などがその局在として想定されるが、詳細については今後の検討が必要である。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。

悪性高血圧におけるRho-kinase阻害薬の効果

上述したように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われわれは示したが⁷⁾、最近他の研究者も腎臓を亜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を報告している⁸⁾。しかしながらRho/Rho-kinase系が悪性高血圧において糸球体硬化の病因に関係しているか否かの報告はない。そこでわれわれは、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立て、この仮説の検証を行った¹¹⁾。悪性高血圧はdeoxycorticosterone acetate-salt spontaneously hypertensive rat (DOCA-salt SHR)を用いた。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^{12,13)}。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証拠も最近報告されている¹⁴⁾。そこで、Rho-kinase阻害薬の腎保護効果の分子機序にも焦点をあてて検討を行った。

悪性高血圧モデルとしてDOCA-salt SHR (100mg/kg/week)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 (30mg/kg/day)、高用量fasudil (100mg/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投与は血圧に影響を与えなかった。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させた。腎機能の指標では、CCrはDOCA-salt SHRでWKYより低下し、尿中蛋白排泄量、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。組織学的な所見では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組織学的な所見を一部改善した。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を有意に低下させた。単球/マクロファージの遊走を示すED-1陽性細胞は糸球体と間質に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subunit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。

この研究は悪性高血圧モデルであるDOCA-salt SHRにおいて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 subunit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, 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 subunit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, collagen II)、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¹⁰⁾。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, 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。したがって、長期の高用量fasudil投与の腎保護作用の一つの機序として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一つと考えられる。またTGF- β の局在を検討すると、線維芽細胞、近位・遠位・集合管の尿細管細胞の細胞質に存在し、硬化した糸球体にも発現しており、fasudil治療でその免疫活性は減少した。

Rho/Rho-kinaseには細胞の運動に関係している多くの証拠が存在する^{12, 15)}。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¹⁰⁾。したがって、単球/マクロファージの遊走を抑制したこともfasudilの腎保護効果の一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¹⁶⁾。DOCA-salt SHRにおいてもNADPH oxidaseのsubunit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が示されている¹⁷⁾。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¹³⁾。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一つとして、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-isoprostane¹⁸⁾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

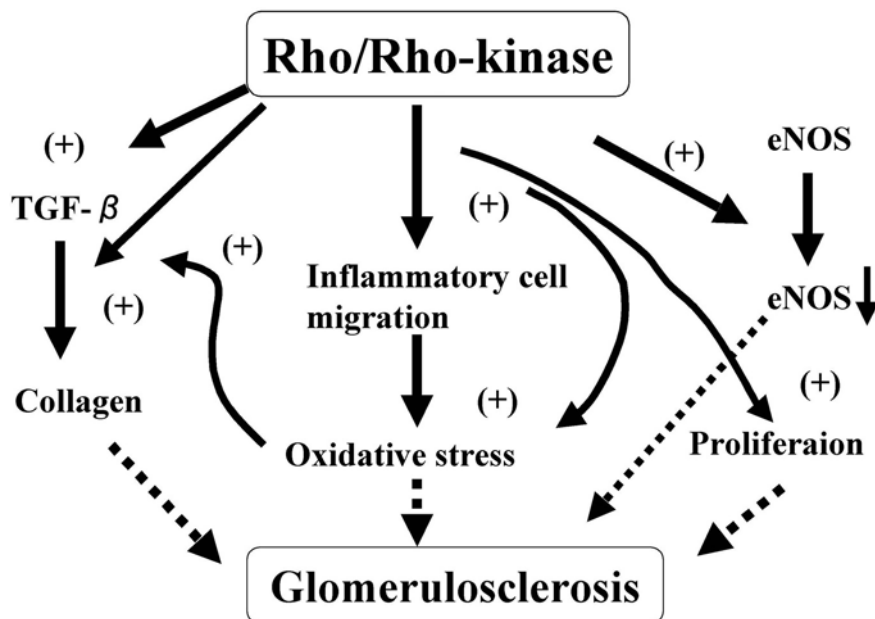


Figure 3 Possible mechanism of beneficial effects of Rho-kinase inhibitor on hypertensive glomerulosclerosis.

キドン酸の過酸化によって非酵素的に産生されることが判明している。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¹⁴⁾。多くの研究では腎疾患でNO合成が低下しており¹⁹⁾、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一つとして、eNOSの発現の増加が考えられた。またRho-kinase阻害薬は糸球体の輸出・輸入細動脈の収縮に対して強い拡張作用を有することが最近報告されている²⁰⁾。水腎症モデルでの検討では輸出・輸入細動脈をRho-kinase阻害薬はほぼ同等に拡張する。したがって腎細動脈の強い収縮が起こっているDOCA-salt SHRなどのRho-kinase阻害薬による腎機能改善には、腎糸球体の血行動態改善作用も一部介していることが示

唆される。

以上のことから、fasudilの腎保護効果の機序には多くの因子が関与していることが示唆された(Fig. 3)。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。

最後に

Rho-kinase阻害薬の腎保護効果とその機序についてわれわれの成績を中心に概説した。誌面の都合で他のモデル(SHR-SP)や腎垂全摘モデルについては詳述できないのが残念である。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される。すでにでき上がった腎疾患にも有効であるか否かということについては現在検討中である。またすでに効果の定まった薬剤との併用効果なども検討されるべきであろう。

わ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あり、Rho-kinase阻害薬を含めた今後のこの分野での発展が期待される。

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、18690787、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。

文 献

- 1) Takai Y, Sasaki T, Matozaki T: Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, 2001, **81**: 153–208.
- 2) Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K: Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*, 2001, **22**: 32–39.
- 3) Uehata T, Ishizaki T, Satoh H et al: Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, 1997, **389**: 990–994.
- 4) Shimokawa H, Hiramori K, Iinuma H et al: Anti-anginal effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina: a multicenter study. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, **40**: 751–761.
- 5) Nagatoya K, Moriyama T, Kawada N et al: Y-27632 prevents tubulointerstitial fibrosis in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int*, 2002, **61**: 1684–1695.
- 6) Satoh S, Yamaguchi T, Hitomi A et al: Fasudil attenuates interstitial fibrosis in rat kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Eur J Pharmacol*, 2002, **455**: 169–174.
- 7) Nishikimi T, Akimoto K, Wang X et al: Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, attenuates glomerulosclerosis in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens*, 2004, **22**: 1787–1796.
- 8) Kanda T, Wakino S, Hayashi K et al: Effect of fasudil on Rho-kinase and nephropathy in subtotaly nephrectomized spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int*, 2003, **64**: 2009–2019.
- 9) Adnane J, Seijo E, Chen Z et al: RhoB, not RhoA, represses the transcription of the transforming growth factor β type II receptor by a mechanism involving activator protein 1. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 8500–8507.
- 10) Border WA, Noble NA: Cytokines in kidney disease: the role of transforming growth factor- β . *Am J Kidney Dis*, 1993, **22**: 105–113.
- 11) Ishikawa Y, Nishikimi T, Akimoto K et al: Long-term administration of Rho-kinase inhibitor ameliorates renal damage in malignant hypertensive rats. *Hypertension*, 2006, **47**: 1075–1083.
- 12) Riento K, Ridley AJ: Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **4**: 446–456.
- 13) Higashi M, Shimokawa H, Hattori T et al: Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats *in vivo*: effect on endothelial NAD (P) H oxidase system. *Circ Res*, 2003, **93**: 767–775.
- 14) Wolfrum S, Dendorfer A, Rikitake Y et al: Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**: 1842–1847.
- 15) Horwitz AR, Parsons JT: Cell migration - moving on. *Science*, 1999, **286**: 1102–1103.
- 16) Iglesias-De La Cruz MC, Ruiz-Torres P, Alami J et al: Hydrogen peroxide increases extracellular matrix mRNA through TGF- β in human mesangial cells. *Kidney Int*, 2001, **59**: 87–95.
- 17) Chabashvili T, Tojo A, Onozato ML et al: Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension*, 2002, **39**: 269–274.
- 18) Mezzetti A, Cipollone F, Cuccurullo F: Oxidative stress and cardiovascular complications in diabetes: isoprostanol as new markers on an old paradigm. *Cardiovasc Res*, 2000, **47**: 475–488.
- 19) Klahr S: The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression. *Nephrol Dial Transplant*, 2001, **16** (Suppl 1): 60–62.
- 20) Cavarape A, Endlich N, Assaloni R et al: Rho-kinase inhibition blunts renal vasoconstriction induced by distinct signaling pathways *in vivo*. *J Am Soc Nephrol*, 2003, **14**: 37–45.

Renoprotective Effect of Rho-kinase Inhibitor in Hypertensive Glomerulosclerosis and Its Mechanism

Toshio Nishikimi and Hiroaki Matsuoka

Department of Hypertension and Cardiorenal Medicine, Dokkyo Medical University, Tochigi, Japan

Key words: hypertension, nephrosclerosis, Rho-kinase, transforming growth factors, oxidative stress

Among GTP-binding proteins, Rho is known to function as a molecular switch in various cellular functions. While, the cellular function and signal transduction of Rho-kinase in the Rho effectors have been extensively studied information about its *in vivo* functions remains limited. With the recent development of a specific Rho-kinase inhibitor such as Y-27632 and fasudil, increased understanding of the role of the Rho/Rho-kinase pathway *in vitro* and *in vivo* has been obtained. Although, to date, there has been little research conducted on the role of Rho-kinase in renal disease, recent studies have shown that Rho-kinase inhibitor significantly attenuated the tubulointerstitial fibrosis in kidney induced by unilateral ureteral obstruction. Moreover, there have been few studies investigating the role of the Rho/Rho-kinase pathway in hypertensive glomerular sclerosis. In this review, we describe the role of the Rho/Rho-kinase pathway in the progression of renal glomerulosclerosis in several forms of hypertensive rats. Our results suggest that chronic inhibition of Rho-kinase pathway may be a new therapeutic approach for the hypertensive glomerulosclerosis. Additionally, our results suggest that the mechanism of renoprotective effect of Rho-kinase inhibitor is partly mediated via inhibition of extracellular matrix gene expression, monocytes/macrophages infiltration, and oxidative stress, and upregulation of eNOS gene expression.

(J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 667–673)