

蛋白リン酸化酵素阻害剤：塩酸ファスジルの開発と臨床応用

日高 弘義^{1, 2} 渋谷 正人^{3, 4}

はじめに

日本脈管学会の機関誌「脈管学」が第 50 巻を迎えられたことは、私も関係者の 1 人として、脈管学会 OB および現役の皆様方と同様心から嬉しく存じます。日本脈管学会は、内科や外科その他臨床医師・研究者ばかりでなく、基礎医学の研究者も数多く参加している学会であります。このような基礎と臨床を含む脈管学領域の研究を振興し、研究者の交流を図る場はまことに得難いものであり、今後とも大いに発展させていただきたいと心より願っております。

今から 30 年前の 1980 年、日本で新しい化合物が生まれました。分子薬理学的研究は三重大学で行われ¹⁾、合成は日高の構造デザインに沿って旭化成で行われ、顕著な効果のある新薬「塩酸ファスジル」として発売されました。この世界初の Rho-kinase 阻害剤がクモ膜下出血後の遅発性脳血管攣縮(スパズム)の治療薬として開発されるためには、名古屋大学の脳外科(当時渋谷助教授を中心とする)の総力を挙げての臨床研究が不可欠でありました。このように、日本の基礎医学研究者が発明し、日本の臨床研究者が臨床研究・試験を行い、日本の製薬会社が上市に成功したことは大変重要な事実といえましょう²⁾。

この化合物は、hexahydro-1-(5-isouquinolinesulfonyl)-1H-1,4-diazepine monohydrochloride hemihydrate の構造式を持ち、現在でも Rho-associated coiled-coil containing protein kinase(Rho キナーゼ)³⁾の特異的阻害剤⁴⁾のトップランナーとして注目されており(Table 1)、2005 年の Nature Reviews Drug Discovery⁵⁾の総説のトップを飾っていることや、今年(2010 年)の Drug Discovery Today⁶⁾に取り上げられていることから、その独創性が評価されている

ことがわかります。

ファスジル(FH)の薬理作用

ファスジルが特異的に阻害する Rho キナーゼ(ROCK)はミオシンの他、アデューシン、ERM ファミリーなど様々な蛋白質をリン酸化する。ROCK は遅発性脳血管攣縮(スパズム)、脳梗塞、心筋梗塞において血管平滑筋の異常収縮を来すなど、悪玉としての役割が明らかになってきた。ここでは脳血管障害、特にスパズムと脳梗塞を中心に話を進める。

血管平滑筋は KCl, NA, 5HT, ET 等の血管収縮物質により細胞内へ Ca²⁺ が流入し、カルモデュリン(CaM)が活性化され、MLCK によりミオシン軽鎖(MLC)がリン酸化されると、アクチンとミオシンが重合し、張力が発生する。FH の血管拡張作用は、主に Rho キナーゼ(ROCK)を阻害し、ROCK によって抑制されている脱リン酸化酵素 MLCP を活性化させることに依る。即ち、FH は ROCK 等リン酸化酵素と ATP を競合阻害することにより、収縮した血管のリン酸化 MLC(MLC-P)を脱リン酸化し血管を拡張させる⁷⁾。また、ウサギ大動脈片を KCl で刺激すると、MLC の N 末端から 19 番目の Ser がリン酸化されるが、病的収縮のモデルである PGF2 α による刺激では、これに加え 18 番目の Thr もリン酸化され、2 リン酸化体(MLC-P2)が生ずる。このとき、平滑筋張力と MLC のリン酸化は FH により用量依存的に抑制される。さらに FH は MLC-P2 の産生を MLC-P1 の産生より低濃度で抑制する⁸⁾。

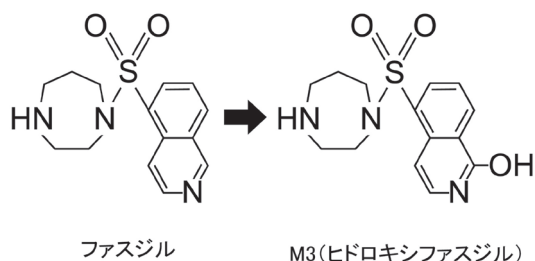
MLC-P2 は脱リン酸化酵素 MLCP の構成要素 myosin binding subunit(MBS)が ROCK によりリン酸化され、阻害されたときに生ずる⁹⁾。また、FH の代謝産物 M3(Fig. 1)も同様に、濃度依存的に Rho キナーゼによる MBS のリン酸化を阻害し、収縮した血管を拡張する¹⁰⁾。ファスジルの血管拡張、抗炎症作用は以下の実験より明らかになってきた。

¹元 三重大学・名古屋大学医学部教授²現 株式会社デ・ウエスタン・セラピテクス研究所最高科学責任者(CSO)兼開発研究所長³元 名古屋大学医学部脳神経外科助教授⁴現 社会保険中京病院院長

2010 年 11 月 4 日受付

Table 1 ファスジルおよび代謝産物 M3 の各種リン酸化酵素阻害作用⁴⁾

リン酸化酵素	Ki (μM)	
	ファスジル	M3
cAMP キナーゼ	1.6	
cGMP キナーゼ	1.6	
MLCK	36	140
C キナーゼ	3.3	18
Rho キナーゼ	0.36	0.17


Figure 1 ファスジルの構造式

(1)細胞内 Ca⁺⁺ 拮抗作用

ファスジル(FH)が⁸⁾、一般 Ca⁺⁺ 拮抗剤と異なる、特異的な血管拡張作用を有することは次のような実験により明らかになった。即ち、摘出血管標本の Ca⁺⁺ イオノフォア A23187 による収縮は、一般の Ca⁺⁺ 拮抗剤では弛緩しないが、FH では弛緩する。さらに PGF2α は血管標本の浴槽液が Ca⁺⁺ フリーでも収縮させることから細胞内 Ca⁺⁺ を利用して収縮させていると考えられているが、FH は PGF2α による収縮をも抑える。これらの特徴から、FH は初期には“細胞内 Ca⁺⁺ 拮抗剤”と考えられた¹¹⁾。

(2)フリーラジカル産生抑制

FH の抗炎症作用はフリーラジカル産生抑制と好中球等炎症細胞遊走抑制よりなる。フリーラジカルは炎症時に白血球、単球等により産生され生体の防御機構として働いているが、虚血時には血管損傷、脳虚血後の神経細胞壊死等様々な細胞・組織障害を来す。FH は NADPH オキシダーゼを阻害することにより炎症細胞による活性酸素の産生を抑制する。ヒト白血球に C キナーゼの活性化剤 PMA を加えると、NADPH オキシダーゼを介して O₂⁻ を産生するが、FH、代謝産物のヒドロキシ FH(M3)とも O₂⁻ の産生を用量依存的に抑制する¹²⁾。

(3)白血球遊走抑制

白血球の遊走は自らの機能を発揮するために必須である。これは細菌侵入による感染症等の場合、生体にとって有用であるが、脳虚血などの場合はむしろ有害にもなる。ヒトの白血球を Boyden 槽の一方に入れ、穴径 3 μM のフィルターの反対側に化学遊走物質：FMLP、TNF、C5a、PAF 等を入ると白血球はそちら側に遊走するが、FH(1~100 μM)はこれらによる遊走を抑制する。実際にラットに脳虚血を起こし、好中球の指標である myeloperoxidase(MPO)を測定すると、梗塞側で MPO が増加する

が、FH(10 mg/kg, ip)はこの MPO の増加を抑制するとともに、梗塞の範囲を減少させ、マヒ等の症状発現を抑えた。また、FH は白血球の MLC のリン酸化を用量依存的に抑制した、即ち、FH は白血球においても MLCK を抑制することによりその遊走を抑えていると考えられる¹³⁾。

(4)血液粘度正常化作用

生体に手術・虚血等有害な刺激が加わると血液粘度が高まる。実験的にラットの中大脳動脈にナイロン糸を通し、一時間後に抜去し一過性脳虚血を起こす。24 時間後に腹部大動脈から採血し、cone-plate discometer(37.5 rpm)で測定する。ヘマトクリットの上昇分を補正した血液粘度は虚血により、平均 5.31 centipoise(cP)から 6.05 cP に上昇していた。FH(1~10 mg/kg, ip)はこの上昇した血液粘度を用量依存的に低下させた。この血液粘度正常化は FH によるアクチンの脱重合、tissue factor(TF)の産生抑制等によると考えられている^{14~16)}。

(5)NOS 活性化作用

肺高血圧症は治療困難な重症疾患であるが、低酸素による肺動脈収縮には血管内皮の eNOS の発現低下を伴っている。この eNOS 活性低下には Rho キナーゼ (ROCK)による内皮のアクチン細胞骨格の変化が関与していると考えられている。実際にヒトの血管内皮を低酸素下(3%)で培養すると ROCK 活性が上昇し、eNOS mRNA 発現・NOS 活性とも低下する。これらの現象は ROCK 阻害剤 FH の代謝産物 M3 および、Rho 阻害剤のボツリヌス菌 C3 transferase により抑制される^{17~19)}。FH による NOS 活性化は遅発性脳血管攣縮においても血管内皮保護に重要な役割を果たしていると考えられる²⁰⁾。

Table 2 クモ膜下出血患者に対するファスジルの効果, 第III相二重盲検試験の結果 (Shibuya M et al, 1992)

	プラセボ	ファスジル	
1) 血管収縮のスパズム (中高度)	61%	38%	P<0.01
2) 症候性スパズム	50%	35%	P<0.05
3) CT 上の脳梗塞 (中高度)	38%	16%	P<0.01
4) GOS 4 & 5 (原因スパズム)	26%	12%	P<0.05
(全原因)	40%	34%	N.S.

脳血管攣縮

(1) クモ膜下出血後の遅発性脳血管攣縮(スパズム)

脳動脈破裂によるクモ膜下出血はその70%が死亡するという重篤な疾患であるが、初期の出血を乗り越え、脳動脈瘤クリップあるいは血管内GDCコイルによる閉塞により、無事手術が終了しても遅発性脳血管攣縮(スパズム)という重篤な合併症が待ち受けている。スパズムは出血後4日目から出現し、7~8日目に発症のピークを迎え、3週間くらい患者が持ちこたえることができれば、血管は再び元の太さに拡張する。クモ膜下出血によりほぼ100%の患者で何らかの血管収縮を来すが、脳虚血により症状が出現するのは約30%で、その中、約半分は回復するが、残りの患者は脳梗塞による様々な症状が残り、重症な場合は脳腫脹により死亡する。未だに、スパズムは術後の患者の予後を悪くしている最大の原因であり、その治療はFHをはじめ様々な方法の開発によりかなり進んできたとはいえ、高次脳機能障害まで含めると解決とはほど遠い。スパズムの原因は、出血塊から溶出してくる様々な原因物質が複雑に関与し合っており、それらが総合的に血管収縮・炎症反応により、脳梗塞を引き起こしている²⁰⁾。

(2) クモ膜下出血の動物モデルにおけるファスジルの効果

イヌの大槽内に自家血約4 mlをday 0とday 2の2回注入すると、7日目に脳底動脈径は血管収縮上約60%に収縮する²¹⁾。この実験的クモ膜下出血による遅発性脳血管攣縮(スパズム)に対し、一般のCa⁺⁺拮抗剤は髄腔内投与ではある程度、攣縮血管を拡張させるが、全身投与は血圧が先に下がってしまい、攣縮血管を拡張するまでに至らない²²⁾。一方、このイヌに対するFH 1~10 mg/kg/30 minの点滴静注は、用量依存的に有意に攣縮血管を拡張させる。この際全身血圧の低下はわずかである²³⁾。なお、FHの髄腔内投与は勿論有効であるが、しばしば全身け

いれんを起こしてしまい、臨床的には禁忌である。

(3) スパズム時のRho キナーゼの活性化

Miyagi らはラットのクモ膜下出血モデルで脳底動脈のRhoA および ROCK の mRNA が増加していることを見つけている²⁴⁾。また、Sato らはイヌのクモ膜下出血モデルで脳底動脈が収縮するとともに、血管壁の ROCK 活性が上昇し、MBS のリン酸化が亢進し、これらの変化が ROCK 阻害剤 Y-27632 で抑制されることを発表している²⁵⁾。

ファスジルの臨床応用：クモ膜下出血患者

(1) クモ膜下出血患者に対するファスジル用量設定試験

クモ膜下出血患者で出血後1~3日に脳動脈瘤クリッピングを行った人にFH(10 mg×2, ~60 mg×3/30 min, iv / 日×14日間)を投与し、その間10~14日目に脳血管写を行い、血管攣縮の有無・程度を調べた結果、FHは用量依存的に血管攣縮を抑制した²⁶⁾。

この結果を踏まえ、第三相二重盲検試験に用いる量として、効果があり、しかもより安全な30 mg×3×14日間が選ばれた。

(2) クモ膜下出血患者に対する第三相二重盲検試験

実際のクモ膜下出血患者にプラセボを対象としたFHの二重盲検試験は名大、信大、東大、京大の関連病院において実施された。プラセボ対象なので、できるだけ少数例で効果の判定ができるように、スパズムを来しやすいことが知られている、出血量の多いFisher分類3度を中心に1群約130名の患者がエントリーされた。

結果：FH 30 mg×3, 14日間投与は、スパズムの症状の発現、脳血管収縮のスパズム、攣縮によるCT上の脳梗塞の程度、スパズムによる機能障害の程度のいずれの項目においても統計上有意に有効であることが認められた。また、プラセボ群に比し、出血を含め特に問題となる副作用も認められなかった(Table 2)²⁷⁾。

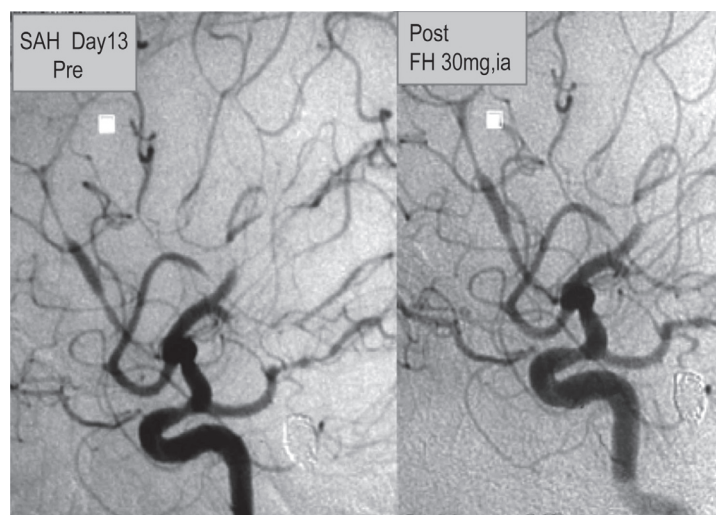


Figure 2 クモ膜下出血患者に対するファスジル(動注)の攣縮血管拡張作用

(3)日本におけるクモ膜下出血患者に対するファスジルの使用状況

FHは1995年クモ膜下出血患者の遅発性脳血管攣縮予防・治療薬として保険適応されて以来、現在日本においては、90%以上(年間約1万人)の患者に使用されている。FHは開頭術によるクリッピング後の患者ばかりでなく、GDCコイルによる動脈瘤閉塞術後の患者にもスパズムは起こり、同様に使われている。残念なことに、日本以外で使用が認可されているのは中国だけで²⁸⁾、世界的には Ca^{++} 拮抗剤のニモジピンが主に使われている。ニモジピンに関しては初期には有効との報告があったが²⁹⁾、作用機序の点からも、その効果には疑問を持たざるを得ない。即ち、 Ca^{++} 拮抗剤ニモジピンは異常収縮を来している攣縮血管より正常血管の方をよりよく開くため、全身投与では低血圧を来してしまう。一方、FHはROCKが関与する異常収縮(スパズムの本態)を特異的に開く。実際にスパズムを起こしている患者で脳血流を測定すると、FHは攣縮部位の血流を特異的に増加している³⁰⁾。これに対し Ca^{++} 拮抗剤は正常部分の血流は増やすが、攣縮部分の脳血流はますます減少させ、いわゆる steal 現象を来すという決定的な違いがある。

現在、日本の保険で認められたFH使用量は比較的安全な、1日30 mg×3であるが、この量ではスパズムによる病態の1/2程度しか抑えていない²⁷⁾。われわれはスパ

ズムの症状が発生したときは直ちにFHの使用量を血圧に注意しながら、倍の60 mg/60 min×3に増量している。通常これによりスパズムを乗り切ることができるが、施設によっては脳血管写を行いカテーテルからFHを直接動注することがある。FHの動注は従来使用されてきた塩酸パパペリンの動注よりは副作用が少なく、安全で効果も優れている。動注の最中にマヒが回復したり、意識が戻ったりすることがしばしば観察される。但し、欠点が二つある。一つは作用時間が短いこと、時には全身痙攣を誘発することがあることである。後者に対しては、十分時間をかけて注入すること、万が一痙攣が起こっても抗痙攣剤ジアゼパムの静注で抑えることができる(Fig. 2)^{31, 32)}。

(4)スパズムに対するファスジルの作用機序

クモ膜下出血後の遅発性脳血管攣縮(スパズム)によって引き起こされる様々な病態の説明として、血管収縮説と炎症説がある。前者はSHT, ET, オキシヘモグロビン等様々な刺激により、平滑筋内への Ca^{++} 流入によって引き起こされる、CaM, MLCKの活性化によるMLCのリン酸化：アクチンとミオシンの重合に加え、Rhoキナーゼ(ROCK)が活性化され、脱リン酸化酵素MLCPが抑制されることにより、異常収縮が持続するというものである。FHがMLCKよりはるかに低い濃度でROCKを抑えることから、この異常収縮の本態はROCKの活性化であると考えられるようになってきた。さらに、攣縮血管では

Ca⁺⁺ 濃度が変化していないことから、攣縮時には Ca⁺⁺ 感受性が高まっていると説明されてきたが、ROCK の活性化による脱リン酸化酵素 MLCP の抑制がその本態であると考えられるようになった。また、炎症説の説明として、FH の臨床上、血管拡張作用より、脳保護作用即ち脳梗塞を防ぐ作用の方が強いことが明らかになってきた²⁷⁾。先に述べたように FH は脳内への好中球の遊走・浸潤、フリーラジカルの産生を抑え、NOS を活性化し、血液粘度を正常化させることがわかっており、これらが総合的に働いて効果をもたらしていると考えられている。

脳 梗 塞

(1) 実験的脳梗塞に対するファスジルの効果

脳梗塞に対する FH の効果は以下に示す様々な実験により確かめられている。

- 1) スナネズミの両側頸動脈を5分間クランプし、その後血流再開。7日目に脳を取り出し、鏡検上、海馬 CA1 の神経細胞数を数えると、正常群では平均 213 個/mm があるが、無治療群では 18 個(8%)に減少する。一方、FH 群(再開通後 30 mg/kg, ip, 1日2回×7日間)では 101 個(47%)と細胞死が抑制されていた³³⁾。
- 2) ラットの一侧頸動脈に微小ポリマー(50 μ m × 4,000 個)を注入し、24時間後に脳を取り出し、固定後染色し、冠状断切片より梗塞面積を測定すると、無治療群では半球断面の 44%に梗塞が見られるが、FH (10 mg/kg, ip) 群では 22%と有意に改善が見られた。注入 24 時間後のマヒの程度(stroke index scale)においても FH 群に有意に改善が見られた³³⁾。
- 3) ラットの両側頸動脈を結紮し、7日目に C¹⁴-iodoantipyrine を用いて局所脳血流を測定すると、正常群 177 ml/100 g/min(100%)に対し、生食投与群では 68%に低下していたが、FH(3 mg/kg, ip)群では 89%と有意な改善を示した。また、同じモデルでグルコース代謝を測定した結果、正常群の大脳皮質平均 106 μ mol/100 g/min(100%)に対し、結紮群では 78%に低下したが、FH 群では 95%と有意な改善を示した³⁴⁾。

(2) 脳梗塞と Rho キナーゼ

ラットの一侧脳梗塞モデルにおいて、虚血部位において MLC フォスファターゼの myosin binding subunit(MBS)の Thr⁶⁹⁶ のリン酸化によって測定される ROCK 活性は脳実質および血管において上昇していた³⁵⁾。また、マウスの

一過性中大脳動脈閉塞モデルにおいても ROCK 活性は 2 倍以上に上昇するが、この上昇は FH(1~10 mg/kg, ip)により 55%以下に抑制された。また、虚血により eNOS 蛋白は 41%に減少するが、FHはこの減少を正常値まで回復させた²⁰⁾。

Adducin は ROCK の良好な標的蛋白であるが、ラットの中大脳動脈永久結紮モデルにおいて adducin のリン酸化を組織学的に調べると 1 日目の梗塞巣において P-adducin は神経細胞では減少しているが、グリア細胞・血管内皮では増加しているのが認められた。この増加は閉塞 5 分後の FH(10 mg/kg, ip)投与により抑制された³⁶⁾。実際に脳梗塞で死亡した患者の剖検脳においても RhoA, RhoB が上昇しており³⁷⁾、患者の抹消血中白血球の ROCK 活性が発症 48 時間目をピークに上昇していることが報告されている³⁸⁾。

(3) 脳梗塞患者に対するファスジルの効果

急性期脳梗塞患者に対しては血栓溶解剤(rTPA, ウロキナーゼ)、抗浮腫剤(グリセロール)、抗凝固剤(アルガトロバン、ヘパリン)、抗血小板剤(アスピリン、オザゲレル)、フリーラジカルスキャベンジャー(エダラボン)、血流改善剤(低分子デキストラン)ならびに低体温療法が用いられているが、その効果はいずれも十分とはいえない。

われわれは FH の開発の初期から血管拡張作用に加え、虚血に対する脳保護作用が強いことに注目し³⁴⁾、遅発性脳血管攣縮に対する臨床効果が広くみとめられ、しかも副作用が少ないことに意を強くし、様々な動物実験^{33, 34, 39)}の後、実際の急性期脳梗塞患者に FH を使用した。FH は脳虚血そのものに対しては血管拡張により、側副血行を改善し、梗塞周辺部の penumbra(半影部)を救う作用もあるが、虚血後に起こる細胞内への Ca⁺⁺ 流入、グルタミン酸放出、フリーラジカル産生、サイトカインの産生等により活性化された Rho キナーゼが関与していることが知られており、ヒトの脳梗塞急性期においても ROCK 阻害剤の FH がこれら様々な局面で効果を発揮することが期待された。

急性期脳梗塞に対する FH の有効性・有効量・安全性を調べるため、マヒがあり、意識障害 JCS: 0~3 で発症後 72 時間以内の患者を対象に、1 群約 20 名、3 群の患者にそれぞれ、10, 30, 60 mg/60 min, ×2/14 日間投与を行った。1 カ月後の神経症状、日常生活動作の判定で 60 mg×2/日 が最も結果がよく、しかも副作用がないことが確かめられた⁴⁰⁾。

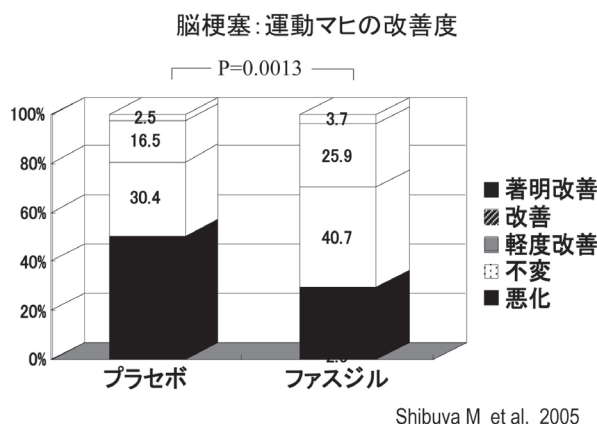


Figure 3 急性期脳梗塞患者に対するファスジルの第 III 相二重盲検試験の結果⁴¹⁾

(4)二重盲検試験の結果

次に、プラセボを対象に FH 60 mg/60 min×2 / 日×14 日間投与の二重盲検試験が行われた。今回は発症 48 時間までの患者を対象とした。この際、プラセボを対象とすることが当局より課せられた。但し、抗血小板剤のアスピリン、抗浮腫・血流改善剤のグリセロールの使用は認められた。

一群約 80 名の患者がエントリーされ、FH 14 日間投与の後、発症 1 カ月後に結果が判定された。FH 群はマヒの改善、日常生活動作障害の改善のいずれにおいても $p \leq 0.0015$ という高い有意差をもって有効性が認められた。一方、副作用として問題となるものはなかった (Fig. 3)⁴¹⁾。

但し、この結果をもってしては FH の急性期脳梗塞に対する保険適応症の拡大には至らなかった。理由は症例数が少ないこと、結果判定が発症 1 カ月のみで、3 カ月後の結果を見ていないこと。世界的に有効とされているアスピリンを使用した患者が少ないことが問題とされた。脳梗塞に対するファスジルの効果に関しては全ての実験的、臨床的データを総合してもその有用性には疑いの余地がなく、保険適応を目指し、引き続き検討中である。

ファスジル：その他の疾患への応用

(1)狭心症・心筋梗塞

冠動脈攣縮のモデルである、ブタにインターロイキン-1[®] を注射すると冠動脈の攣縮とともに Rho キナーゼ活性が上昇し、ROCK 阻害剤の FH が攣縮を寛解する⁴²⁾。Shimokawa らは動作性狭心症患者に対し FH (15~40

mg×3, po)による多施設共同の二重盲検試験を行い、用量相関をもって FH が発症までの運動時間ならびに ST が 1 mm 低下するまでの時間を有意に延長し、経口 FH が動作性狭心症に有効であることを示している⁴³⁾。なお、経口投与された FH は 95%以上が吸収され、そのほとんどがヒドロキシ FH (M3) に代謝され効果を発揮する。さらに同氏らは FH が SHR の血圧は下げるが正常ラットの血圧は下げない、即ち高血圧における血管張力の上昇に ROCK が関与している可能性を報告している⁴⁴⁾。また、Sato らはバズプレッシン、エンドセリン注射によるウサギの狭心症モデルにおいても FH が有効であったことを報告している⁴⁵⁾。Shimokawa らは動脈硬化性病変の形成にも ROCK が関与し FH の治療薬としての可能性を述べている⁴⁶⁾。

(2)肺高血圧症

肺動脈において、血液の低酸素は血管収縮を起こし、これが長時間続くと肺高血圧症を来し致命的となる。現在は PGI₂ 等特殊な薬剤しかなく、治療費が膨大となることが知られている。肺高血圧症では、血管内皮の eNOS mRNA の発現が低下しており、eNOS 活性の低下には Rho キナーゼの活性化による内皮のアクチン細胞骨格の変化が関与していると考えられている。即ち、肺高血圧症においては低酸素によって引き起こされる ROCK の活性化が eNOS を抑制していると考えられ、実際に、ROCK 阻害剤 FH の治療薬としての効果が示されている⁴⁷⁾。

(3)脊髄損傷

損傷された中枢神経が再生しない理由としてミエリン

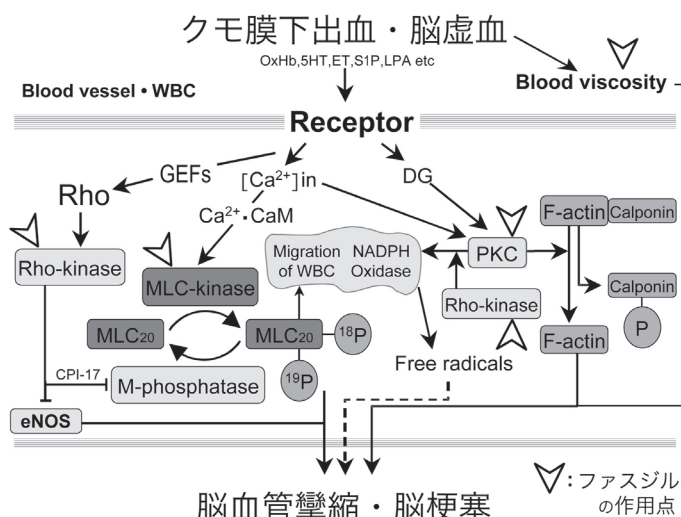


Figure 4 遅発性脳血管攣縮・脳梗塞におけるファスジルの効果の作業仮説
CPI-17: C-kinase-potentiated inhibitory protein of myosin phosphatase, GEFs: guanine exchange factors, LPA: lysophosphatidic acid, S1P: sphingosin-1-phosphatase

由来再生阻害因子があり、その中に中枢性ミエリンに対する抗体 IN-1 がある。この IN-1 抗体が認識する蛋白の一つ Nogo は強力な軸索突起伸展阻害作用を有する。その他の阻害因子として myelin-associated glycoprotein (MAG), oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) があるが、これらはいずれも Nogo 受容体に結合することがわかっている。この受容体は GPI アンカー型蛋白質であり、細胞内ドメインを持っていないため、細胞内にシグナルを伝達することができない。実際には p75 受容体が Nogo 受容体と共受容体を形成し、MAG, Nogo, OMgp 等の再生阻害因子ばかりでなく、NGF, BDNF, NT3 等ニューロトロフィンの受容体として働き、神経再生の要であることがわかってきた。p75 は Rho の活性を促進・抑制の両方向に制御しており、活性型(Rho-GTP)は突起伸展抑制に働いており、不活性型(Rho-GDP)は突起伸展に働いている。この際、p75 より Rho と Rho の活性化阻害蛋白質である Rho GDI が解離することで、Rho が活性化することが明らかになった⁴⁸⁾。

実際に Hara らは脊髄損傷モデルラットを用い、FH(10 mg/kg, ip)が有意に運動機能を回復し、好中球の指標である myeloperoxidase 活性を低下させ、組織学的にも神経突起の再生を認め、脊髄損傷の治療薬として FH の可能性を示した⁴⁹⁾。

ファスジルの作用機序

1980 年血管拡張物質の探索の結果、日高らによって発見された塩酸ファスジル(FH)は最初名大脳外科と旭化成の研究グループにより脳動脈瘤破裂によるクモ膜下出血後の遅発性脳血管攣縮(スパズム)の治療薬として開発され、1995 年に保険適応された。スパズムの原因には多くの化学物質が関わっており、その本態はまだ完全に解明されたとは言いが、FH によって少なくとも患者の生命を救えるようになったことに疑問の余地はない。大変幸運だったのは FH が蛋白リン酸化酵素の中、1996 年貝淵らによって発見された Rho キナーゼを特異的に阻害することにより、血管の異常収縮、炎症反応、神経再生等様々な病態を改善することがわかってきたことである。FH は脳血管攣縮にしても狭心症にしても血管の異常収縮を特異的に解除し、しかも、全身の正常血管への影響は比較的少ないので、血圧を下げることなく病態を改善することができる、まさに夢のような薬ともいえる。現在我々の考えている遅発性脳血管攣縮・脳梗塞に対する FH の作業仮説を Fig. 4 に示す。

現時点では FH はクモ膜下出血後の遅発性脳血管攣縮にしか保険適応が認められていないが、脳梗塞、心筋梗塞、高血圧症、肺高血圧症等の血管障害、炎症反応、

脊髄損傷等 Rho キナーゼ亢進が関与している様々な疾患に効くという実験的あるいは臨床的データは揃っており、日本発の薬としてその用途が拡大され、現在の確な治療薬がなくて困っておられる患者さんに、一刻も早く使用可能となる時期がくることを切望して止まない。

おわりに

創薬とはもちろん発明であり、発見であります。しかしこの発明・発見をするには、多くの人の存在があってこそ可能であります。この多くの人々は、各々不思議な縁で出会うのであります。この縁がイソキノリンスルフォナミド化合物であります。

言い換えれば、このようなイソキノリンスルフォナミド化合物が治療薬として登場するまでに、実質的な鍵となるべき発明者または研究協力者は十人以上数え、彼らの誰一人が欠けても成功は覚つかなかったと考えられます。この治療薬が生まれるのには、大きく分けて二つの重要な発見がありました。一つは作用機序を含む血管平滑筋に対する分子薬理学的研究であり、もう一つはこれを臨床的な研究で治療効果を証明したことであります。特にこの臨床効果の発見には名古屋大学医学部脳外科医の協力なしには語れません。分子薬理学的研究については、三重大学医学部薬理学教室(1985～1990年)の沢山の若い研究者の献身的努力なしには語ることができません。

世界で初めて日高により理論的な考えに基づいて構造がデザインされ、旭化成の研究者(佐々木氏、曾根氏、杉原氏)により合成されたこれらの化合物が、プロテインキナーゼの特異的阻害剤であることが三重大学薬理学教室の研究者により世界で初めて¹⁾明らかにされた訳であります。この発明は世界中に大きな影響を与えました。同教室からこれらの関連で出された論文は、*Nature* の2報を含む30報に及ぶもので、最も多く引用された論文は現時点で2900回以上の引用数に及びます。この化合物関連の研究によって、三重大学や名古屋大学医学部から多くの超一流研究者(鈴木善男、高安正和、田中利男、伊藤正明、西川政勝、稲垣昌樹、萩原正敏、渡辺泰男、他)が輩出したことは特記すべきことであります。

文 献

- 1) Hidaka H, Inagaki M, Kawamoto S et al: Isoquinoline-sulfonamide, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide

dependent protein kinases and protein kinase C. *Biochemistry*, 1984, **23**: 5036–5041.

- 2) Hidaka H, Shibuya M, Suzuki Y et al: Isoquinolinesulfonamide: A specific inhibitor of Rho-kinase and the clinical aspect of anti-Rho-kinase therapy. *HEP*, 2005, **167**: 411–432.
- 3) Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M: Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPase in mammalian cells. *Ann Rev Biochem*, 1999, **68**: 459–486.
- 4) Davies SP, Reddy H, Caviano M et al: Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, 2000, **351**: 95–105.
- 5) Mueller BK, Mack H, Teusch N: Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, **4**: 387–398.
- 6) Dong M, Yan BP, Lam YY et al: Rho-kinase inhibition: a novel therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases. *Drug Discov Today*, 2010, **15–16**: 622–629.
- 7) Sakurada S, Ikuhara M, Seto M et al: An antibody for phosphorylated myosin light chain of smooth muscle: Application to a biochemical study. *J Biochem*, 1994, **115**: 18–21.
- 8) Seto M, Sasaki Y, Sasaki Y et al: Effect of HA1077, a protein kinase inhibitor, on myosin phosphorylation and tension in smooth muscle. *Eur J Pharmacol*, 1991, **195**: 267–272.
- 9) Kimura K, Ito M, Amano M et al: Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho kinase). *Science*, 1996, **273**: 245–248.
- 10) Feng J, Ito M, Ichikawa K et al: Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 37385–37390.
- 11) Asano T, Ikegaki I, Satoh S et al: Mechanism of action of a novel antivasospasm drug, HA1077. *J Pharmacol Exp Ther*, 1987, **241**: 1033–1040.
- 12) Arai M, Sasaki Y, Nozawa S et al: Inhibition by the protein kinase inhibitor HA1077 on the activation of NADPH oxidase in human neutrophils. *Biochem Pharmacol*, 1993, **46**: 1487–1490.
- 13) Satoh S, Ikegaki I, Hitomi A et al: Inhibition of neutrophil migration by a protein kinase inhibitor for the treatment of ischemic brain infarction. *Jpn J Pharmacol*, 1999, **80**: 41–48.
- 14) Hitomi A, Satoh S, Ikegaki I et al: Hemorheological abnormalities in experimental cerebral ischemia and effects of protein kinase inhibitor on blood fluidity. *Life Sci*, 2000, **67**: 1929–1939.
- 15) Liu XS, Zhang ZG, Zhang L et al: Atrovastatin downregulates tissue plasminogen activator aggravated genes mediating coagulation and vascular permeability in single cerebral endothelial cells captured laser microdissection. *J Cerebr Blood Flow Metabol*, 2006 **26**: 787–796.

- 16) Nagata K, Ishibashi T, Sakamoto T et al: Rho/Rho-kinase is involved in the synthesis of tissue factor in human monocytes. *Atherosclerosis*, 2002, **163**: 39–47.
- 17) Takemoto M, Sun J, Hiroki H et al: Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 2002, **106**: 57–62.
- 18) Rikitake Y, Kim HH, Huang Z et al: Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. *Stroke*, 2005, **36**: 2251–2257.
- 19) Laufs U, Enders M, Stagliano N et al: Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton. *J Clin Invest*, 2000, **106**: 15–23.
- 20) Satoh S, Yamamoto Y, Toshima Y et al: Fasudil, a protein kinase inhibitor, prevents the development of endothelial injury and neutrophil infiltration in a two-haemorrhage canine subarachnoid model. *J Clin Neurosci*, 1999 **6**: 394–399.
- 21) Varsos VG, Liszczak TM, Han DH et al: Delayed cerebral vasospasm is not reversible by aminophyllin, nifedipine or papaverine in a “two-hemorrhage” canine model. *J Neurosurg*, 1983, **58**: 11–17.
- 22) Espinosa F, Weir B, Overton W et al: A randomized placebo controlled double blind trial on nimodipine after SAH in monkeys. Part 1. Clinical and radiological findings. *J Neurosurg*, 1984, **70**: 1167–1175.
- 23) Takayasu M, Suzuki Y, Shibuya M et al: The effect of HA compound calcium antagonist HA1077 on delayed cerebral vasospasm in dogs. *J Neurosurg*, 1986 **65**: 80–85.
- 24) Miyagi Y, Carpenter RC, Meguro T et al: Upregulation of Rho A and Rho kinase RNAs in the basilar artery of a rat model of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 2000, **93**: 471–476.
- 25) Sato M, Tani E, Fujikawa H et al: Involvement of Rho-kinase mediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm. *Circ Res*, 2000, **87**: 195–200.
- 26) Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K et al: Dose escalation trial of a novel calcium antagonist, AT877, in patients with aneurismal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir*, 1990, **107**: 11–15.
- 27) Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K et al: Effect of AT877 on cerebral vasospasm after aneurismal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 1992, **76**: 571–577.
- 28) Zhao J, Zhou D, Guo J et al: Effect of fasudil hydrochloride, a protein kinase inhibitor, on cerebral vasospasm and a delayed cerebral ischemic symptoms after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Results of a randomized trial of fasudil hydrochloride versus nimodipine. *Neurol Med Chir*, 2006 **46**: 421–428.
- 29) Allen GS, Ahn HS, Preziosi TJ et al: Cerebral arterial spasm—a controlled trial of nimodipine in patients with subarachnoid hemorrhage. *N Engl J Med*, 1983, **308**: 619–624.
- 30) 小野健一郎, 城谷寿樹, 弓場孝治 他: ファスジル静注による脳循環動態の変化. *脳神経*, 2005, **57**: 779–783.
- 31) Tachibana E, Harada T, Shibuya M et al: Intra-arterial infusion of fasudil hydrochloride for treating vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir*, 1999, **141**: 13–19.
- 32) Enomoto Y, Yoshimura S, Yamada K et al: Convulsion during intra-arterial infusion of fasudil hydrochloride for the treatment of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *Neurol Med Chir*, 2010, **50**: 7–11.
- 33) Satoh S, Ikegaki I, Suzuki Y et al: Neuroprotective properties of a protein kinase inhibitor against ischaemia-induced neuronal damage in rats and gerbils. *Br J Pharmacol*, 1996, **118**: 1592–1596.
- 34) Tsuchiya M, Sako K, Yonemasu Y et al: The effect of HA1077, a novel protein kinase inhibitor, on reductions of cerebral blood flow and glucose metabolism following acute and/or chronic bilateral carotid artery ligation in Wistar rats. *Exp Brain Res*, 1993, **97**: 233–238.
- 35) Yano K, Kawasaki T, Hattori S et al: Demonstration of elevation and localization of Rho-kinase activity in the brain of a rat model of cerebral infarction. *Eur J Pharmacol*, 2008, **594**: 77–83.
- 36) Yagita Y, Kitagawa K, Sasaki T et al: Rho kinase activation in endothelial cells contributes to expansion of infarction after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res*, 2007, **85**: 2460–2469.
- 37) Brabeck C, Mittelbronn M, Bekure K et al: Effect of focal cerebral infarctions on lesional RhoA and RhoB expression. *Arch Neurol*, 2003, **60**: 1245–1249.
- 38) Feske SK, Sorondo FA, Henderson GV et al: Increased leukocyte ROCK activity in patients after acute ischemic stroke. *Brain Res*, 2009, **1257**: 89–93.
- 39) Ohtaki M, Tranmer B: Pretreatment of transient focal cerebral ischemia in rats with the calcium antagonist AT877. *Stroke*, 1994, **25**: 1234–1240.
- 40) 渋谷正人: 脳梗塞急性期(72時間以内)に対するファスジルの有用性. *新薬と臨床*, 2004, **53**: 222–232.
- 41) Shibuya M, Hirai S, Seto S et al: Effects of fasudil in acute ischemic stroke: Results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *J Neurol Sci*, 2005, **238**: 31–39.
- 42) Shimokawa H, Seto M, Katsunuma M et al: Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm. *Cardiovasc Res*, 1999, **43**: 1029–1039.

- 43) 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.
- 44) Matsumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H et al: Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension*, 2001, **38**: 1307–1310.
- 45) Satoh S, Ikegaki I, Asano T et al: Antiischemic properties of fasudil in experimental models of vesospastic angina. *Jpn J Pharmacol*, 2001, **87**: 34–40.
- 46) Eto Y, Shimokawa H, Kandabashi T et al: Rho-kinase is involved in macrophage-mediated formation of coronary vascular lesions in pigs in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 2351–2358.
- 47) Fukumoto Y, Matoba T, Ito A et al: Acute vasodilator effect of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart*, 2005, **91**: 391–392.
- 48) 山下俊英, 藤谷昌司, 羽田克彦: ミエリン由来因子による軸索再生阻害機構. *細胞工学*, 2004, **23**: 1052–1054.
- 49) Hara M, Takayasu M, Watanabe K et al: Protein kinase inhibition by fasudil hydrochloride promotes neurological recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurosurg (Spine I)*, 2000, **93**: 94–101.

[略語]

BDNF: brain-derived neurotrophic factor
 CaM: calmodulin
 ET: endothelin
 FH: fasudil hydrochloride
 FMLP: N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
 GDC: Guglielmi detachable coil
 GDI: guaninenucleotide dissociation inhibitor
 GPI: glycosylphosphatidylinositol
 JCS: Japan Coma Scale
 MBS: myosin binding subunit
 MLC: myosin light chain
 MLCK: myosin light chain kinase
 MLCP: myosin light chain phosphatase
 MLC-P: phosphorylated myosin light chain
 MRA: magnetic resonance angiography
 MRI: magnetic resonance imaging
 NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 NGF: nerve growth factor
 NOS: NO syntase
 PAF: platelet activating factor
 PMA: phorbol myristate acetate
 SAH: subarachnoid hemorrhage
 TF: tissue factor
 TNF: tumor necrosis factor