

ROCK 経路を標的とした糖尿病網膜症への治療戦略 —網膜細小血管障害の視点から—

ROCK Pathway as A Therapeutic Target of Diabetes-induced Microvascular Damage

有田 量一*

糖尿病網膜症（以下、網膜症）は糖尿病の主要な合併症の一つであり、その罹患率は増加の一途をたどっている。網膜症発症早期では、血管透過性亢進の原因となる網膜細小血管障害が特徴的であるが、進行期になると増殖膜の収縮による牽引性網膜剥離によって著しい視力低下をきたす。神経網膜は、いったん障害されると現在の最善の治療を施しても機能回復は困難であり、良好な視力を維持するためには網膜症発症早期からの予防対策が必要である。しかしながら、その病態解明と治療法の開発は未だ十分とはいえず、メカニズムに基づいた新しい治療戦略が必要とされている。Rho kinase (ROCK) は、1990年代半ば、低分子量 GTP 結合蛋白 Rho の標的蛋白として同定された細胞内セリンスレオニンリン酸化酵素であり、これまでの研究により各種細胞の収縮・形態制御・遊走などの生理機能ばかりでなく、脳・冠動脈攣縮などの心血管病をはじめとした種々の病態形成にも深く関与することが明らかになってきている。網膜症は、発症早期から進行期に至るまで実に多彩な病態を呈しているが、筆者らは ROCK の幅広い病態形成への関与について多面的に検討を進めている。これまで ROCK が進行期における増殖膜の膜収縮ステップに関与していることを報告してきたが、さらに本研究によって糖尿病性網膜細小血管障害への関与について検討を行った。本研究ではまず、糖尿病ラットの網膜微小血管系において ROCK が活性化されていることを明らかにした。網膜症の初期に起こる糖尿病性細小血管異常の病態に白血球接着亢進とそれに引き続く血管内皮細胞傷害が少なからず関与しているが、選択的 ROCK 阻害薬 fasudil は効果的に糖尿病網膜で亢進した ROCK 活性を抑制するとともに網膜血管への白血球接着を抑制した。さらに血管内皮傷害においても、fasudil 投与群では白血球がたとえ網膜血管に接着していてもそれに伴う内皮細胞傷害が効果的に抑制されており、傷害された内皮細胞数が著明に減少することが確認された。Fasudil は、糖尿病ラット網膜で低下している内因性一酸化窒素合成酵素活性をほぼ正常レベルまで回復させており、これが白血球接着による内皮細胞傷害に対して保護的に作用している可能性が考えられた。ヒトの白血球と血管内皮細胞との共培養系で、一酸化窒素合成酵素阻害薬である L-NAME を用いてそのメカニズムについて検討を加えたところ、fasudil は内皮細胞における一酸化窒素の合成を促進させることによって接着白血球表面の Fas Ligand と内皮細胞表面の Fas を介した内皮傷害メカニズムを阻害する効果があることを明らかにした。本稿では網膜症に対する新たな治療標的の一つとして注目される ROCK に焦点を当て、糖尿病性網膜細小血管障害のメカニズムと ROCK 阻害薬による病態制御の可能性について概説する。

Diabetic retinopathy (DR) is the common ocular complication of diabetes mellitus. Early non-proliferative stages of DR are characterized by retinal microvascular damage that leads to vascular hyperpermeability. While visual acuity is rarely affected in this early stage, progression of the disease can result in severe vision loss. New approaches to amelioration and treatment of DR, especially in the earlier stages, are needed. The small GTP-binding protein Rho and its target protein Rho-kinase (ROCK) are implicated in important physiological roles, such as cell adhesion and migration. The present study investigated involvement of the ROCK pathway in diabetic microvasculopathy and therapeutic potential of fasudil, a selective ROCK inhibitor. Significant Rho/ROCK activation was observed in retinal microvasculature of diabetic rats. Retinal microvascular damage secondary to increased leukocyte adhesion contributes substantially to DR in its early stages. Fasudil effectively suppressed ROCK activity in diabetic rat retinas. Moreover, it protected the vascular endothelium by inhibiting leukocyte adhesion and reducing leukocyte-induced endothelial injury in diabetic rat retinas. Fasudil treatment almost completely reversed the decreased endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity in diabetic rat retinas. In co-culture assay between

* Ryoichi Arita: 九州大学大学院医学研究院眼科学分野

〔別刷請求先〕 有田量一: 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1 九州大学大学院医学研究院眼科学分野

DR leukocytes and microvascular endothelial cells, we investigated fasudil's the protective mechanisms against endothelial damage using L-NAME, an inhibitor of nitric oxide (NO) synthase. Furthermore, the protective effect of fasudil on microvascular endothelial cells was significantly blocked by NO synthase inhibition with L-NAME, without apparent effect on leukocyte adhesion, *in vitro*. These findings suggest that fasudil has direct endothelial protective potential through induction of physiological levels of NO, synthesized by eNOS. The Rho/ROCK pathway plays a critical role in diabetic retinal microvasculopathy, and ROCK inhibition may become a new strategy in the amelioration and treatment of DR, especially in its early stages.

Key words : 糖尿病網膜症 (diabetic retinopathy), 糖尿病性細小血管障害 (diabetic microvascular damage), Rho-kinase 阻害薬 (Rho-kinase inhibitor), 内因性一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase), Fas/Fas-Ligand.

はじめに

糖尿病網膜症 (以下, 網膜症) は, 糖尿病の主要な合併症の一つであり, 眼科医が日常臨床において治療すべき重要な疾患である. 網膜症治療の近年における進歩はめざましく, 硝子体手術が普及したことによって完全失明する疾患ではなくなってきた. しかしながら, 未だ必ずしも良好な視機能を維持するには至らず, さらなる病態解明と新しい治療法の開発が必要とされている.

糖尿病網膜症は, 発症早期に生じる細小血管異常・血管透過性亢進～進行期に生じる網膜新生血管の破綻・硝子体出血・増殖膜の形成とそれに伴う牽引性網膜剥離など, 発症早期から進行期に至るまでさまざまな病態が複雑に絡み合っている. 筆者らは Rho/Rho kinase (ROCK) 経路に着目し, 選択的 ROCK 阻害薬を用いて ROCK 経路のこれら幅広い病態形成への関与について検討を行ってきた.

特に神経網膜はいったん障害されると現在の最善の治療を施しても機能回復は困難であり, 良好な視力を維持するためには網膜症発症早期からの予防対策が重要である. 本稿では ROCK 経路を標的とした糖尿病網膜症への治療戦略, 特に糖尿病性網膜細小血管障害のメカニズムと ROCK 阻害薬による病態制御の可能性について概説する.

I Rho/ROCK 経路と選択的 ROCK 阻害薬

Rho は Ras スーパーファミリーに属する低分子量 GTP 結合蛋白であり, 活性型である GTP 結合型と不活性型である GDP 結合型をサイクリングすることで細胞骨格や細胞接着における分子スイッチとして機能している^{1,2)}. さらにこれまでの研究で, Rho は各種細胞の形態制御・遊走・遺伝子発現制御, 平滑筋細胞の収縮に関与していることが明らかとなっている^{3,4)}. ROCK は

1990 年代半ば, Rho によって活性化される標的蛋白として同定された細胞内セリンスレオニンリン酸化酵素であり, 活性化された ROCK はミオシン軽鎖ホスファターゼ (MLCP) のミオシン結合サブユニット (myosin phosphatase targeting subunit 1 : MYPT1) をリン酸化することにより MLCP の活性を抑制する. MLCP 活性抑制によりカルシウム非依存性に収縮シグナル myosin light chain (MLC) のリン酸化レベルが上昇し, 平滑筋細胞を収縮させる^{5,6)}. このように Rho/ROCK 経路は各種細胞の生理機能に重要な経路であるが, 近年その過剰な活性化が脳冠動脈攣縮や高血圧, 狭心症などの心血管病における種々の病態形成に深く関与することが明らかになってきた⁷⁻⁹⁾.

ROCK 阻害薬 fasudil は, 他の経路に対して極微の効果しか示さない高い選択的阻害作用を有しており¹⁰⁾, 心血管病治療においてすでに臨床的にもその安全性, 有効性が認められている¹¹⁾. ROCK 阻害薬は, 循環器疾患以外にも泌尿器疾患¹²⁾ や神経変性疾患¹³⁾ においてもその有効性が報告されており, 眼科領域においては網膜血流改善効果¹⁴⁾ や神経保護効果^{15,16)} の報告がなされている.

II 糖尿病網膜症と Rho/ROCK 経路

糖尿病網膜症は発症早期～進行期に至るまでさまざまな病態を呈するが, これまで筆者らは進行期における増殖膜の癒痕収縮ステップの病態について以下の結果を得ることができた^{17,18)}. 網膜症の硝子体中にはさまざまな生理活性物質の発現が亢進しその病態に関与しているが, なかでも形質転換増殖因子- $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) が進行した糖尿病網膜症の硝子体中において高濃度に存在しており, 増殖膜の構成成分の一つである硝子体細胞 (ヒアロサイト) を形質転換させることで牽引性網膜剥離の病態

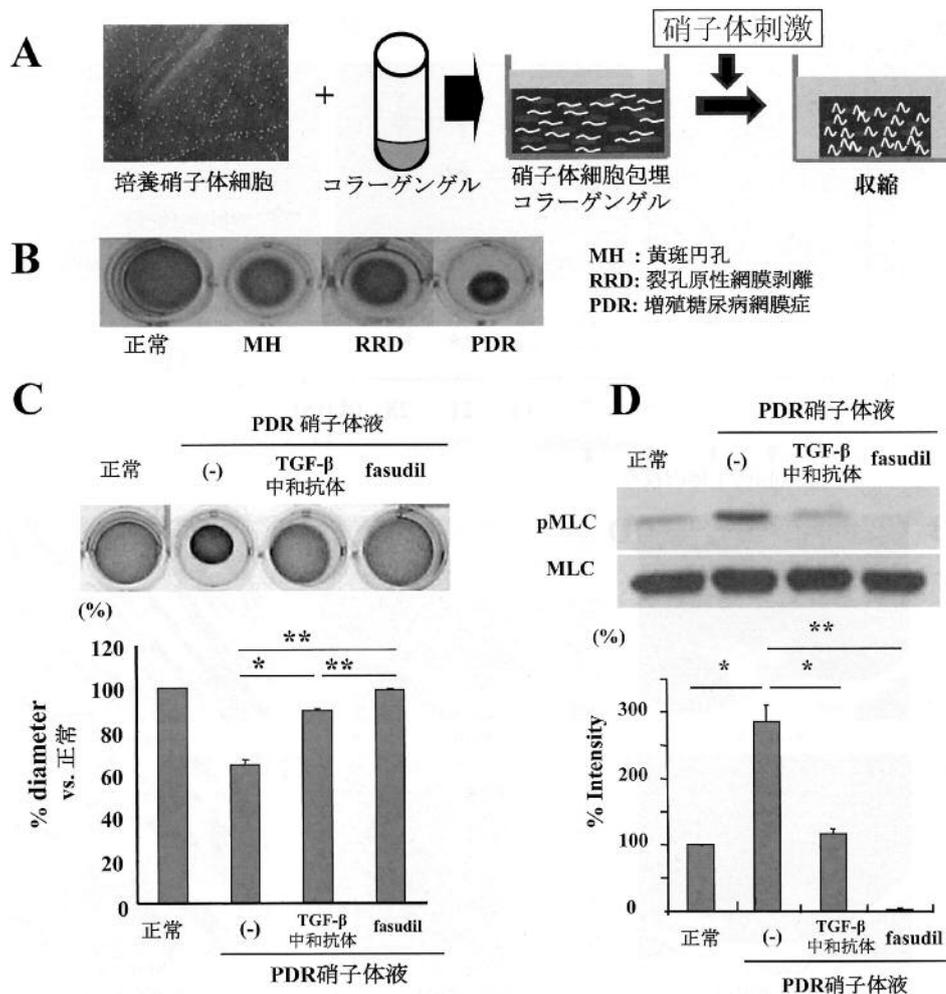


図1 硝子体液によって誘導される硝子体細胞包埋コラーゲンゲル収縮と fasudil の抑制効果

A: 硝子体細胞を包埋したコラーゲンゲル収縮アッセイ。ウシ硝子体より単離した培養硝子体細胞をI型コラーゲンに包埋した硝子体細胞包埋コラーゲンゲルを作製。硝子体手術の際に採取した硝子体サンプルで3日間刺激を加えることで収縮した細胞にコラーゲンゲルが牽引されてコラーゲンゲルが収縮する。この収縮したゲルの直径を測定することで収縮の程度を評価する。B: ゲルに硝子体液で刺激を加えると他の眼疾患 (MH: 黄斑円孔, RRD: 裂孔原性網膜剥離) の硝子体液ではほとんど収縮を起こさず、増殖糖尿病網膜症 (PDR) の硝子体液では著明にゲル収縮を認めた。C: PDR硝子体液によって誘導されるコラーゲンゲル収縮と fasudil による阻害作用。ゲルの直径を測定しコントロールに対するパーセント比 (% diameter vs. control) で表した。Fasudil は硝子体液によるゲル収縮をほぼ完全に抑制した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, N.S.: 有意差なし, $n = 3$ each)。D: Fasudil が myosin light chain (MLC) のリン酸化に与える影響。硝子体液による刺激後のゲルにおける MLC リン酸化レベルを示した典型的なプロットと平均信号強度 (% Intensity は control に対するパーセント比)。Fasudil は硝子体液による MLC リン酸化をほぼ完全に抑制した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, N.S.: 有意差なし, $n = 3$ each)。(文献 18, 図 2, 図 3, 図 5 より転載)

において中心的な役割を担っていることがわかった¹⁷⁾。

ROCK は細胞収縮に関する TGF- β の機能を担っており、増殖膜の癒傷収縮ステップの標的となると考えられた。進行した増殖糖尿病網膜症 (PDR) に伴う牽引性網膜剥離の *in vitro* モデルとして増殖膜の構成成分の一つである硝子体細胞とコラーゲンゲルを一緒に包埋したコ

ラーゲンゲル Assay (図 1A) を用いて検討を行った¹⁸⁾。ゲルを硝子体液で刺激すると他の眼疾患の硝子体液ではほとんど収縮を起こさず、PDR 硝子体液によって著明にゲル収縮を認めた (図 1B)。さらにこの収縮は ROCK 阻害薬 fasudil を加えておくことでほぼ完全に抑制することができ (図 1C)、このゲルにおける収縮シグナル

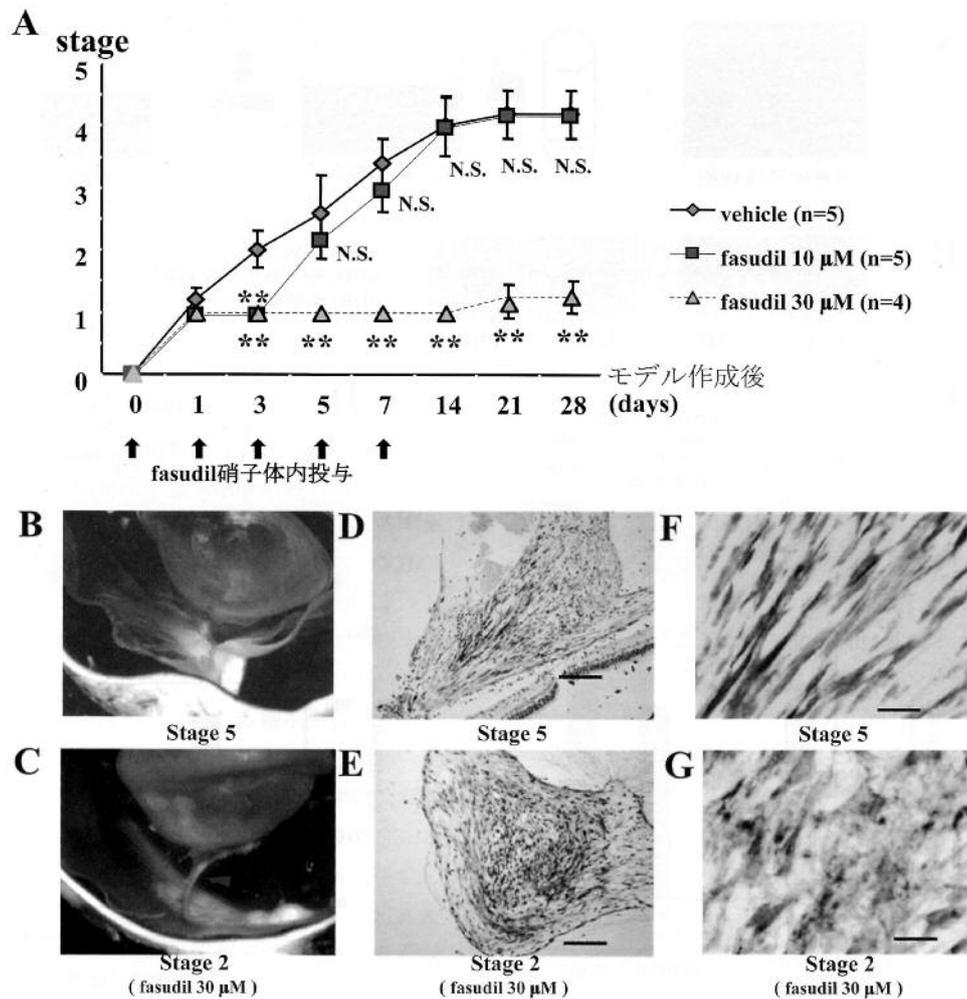


図2 実験的牽引性網膜剝離モデル家兎に対する fasudil の抑制効果

A: Fasudil の家兎 PVR モデルに対する抑制効果. PVR モデルの Stage 分類 (Stage 1: 硝子体内に増殖膜を認める. Stage 2: 増殖膜による局所的な網膜牽引. Stage 3: 髄翼の局所的な剝離. Stage 4: 乳頭周囲, 全髄質の著しい牽引. Stage 5: 全網膜剝離). Fasudil (30 μM) は病態の進行を抑制した (*p < 0.05, **p < 0.01, N.S.: not significant vs. control, n=5 each). B: 自然経過で進行した Stage 5 の代表的な実体顕微鏡写真. 網膜面上に形成された増殖膜の瘢痕・収縮によって網膜全剝離の状態になっている. C: Fasudil (30 μM) を投与した Stage 2 の代表的な実体顕微鏡写真. 網膜に付着した増殖膜 (矢頭) は認めるが, それによる牽引性網膜剝離は認めなかった. D, F: 増殖膜における αSMA 発現を免疫組織化学的に検討. 自然に進行した Stage 5 でみられる増殖膜では αSMA の分布も規則的であり, 網膜を牽引している. Fasudil を作用させた増殖膜では αSMA の発現は保たれているものの, その規則的な分布が阻害されており, 増殖膜による網膜の牽引は観察されない (D, E: Scale bar=200 μm F, G: Scale bar=10 μm).

(文献 18, 図 6 より転載)

MLC は ROCK 阻害薬によって著明に抑制されていた (図 1D).

進行した PDR に伴う牽引性網膜剝離の *in vivo* モデルとして牽引性網膜剝離モデル家兎を用いて検討を行った. 家兎の線維芽細胞を分離増殖させてから硝子体内に注入すると眼内に増殖膜が形成され, やがてその増殖膜は瘢痕収縮し牽引性網膜剝離を生じることがわかってい

る¹⁹⁾. このモデル家兎の進行度分類では, Stage 1 は増殖膜を認めるだけでステージが進むにつれて増殖膜の収縮による網膜剝離が進行するというものである. このモデルを作製した日を 0 日目とし, 隔日投与で 0, 1, 3, 5, 7 日目にそれぞれ vehicle と fasudil を眼内に注射し, fasudil の眼内濃度が 10 μM および 30 μM になる群・vehicle 投与群の 3 群に分け 28 日目まで病態を観察し

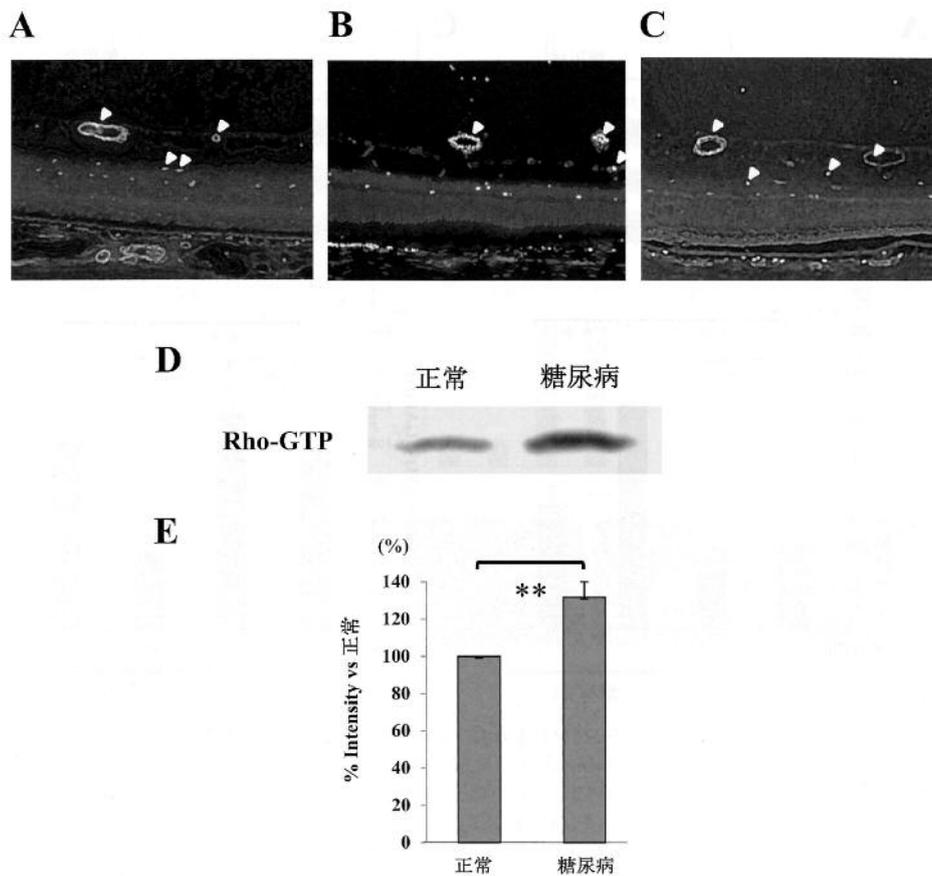


図3 網膜におけるROCK関連蛋白の免疫組織化学的解析およびRho活性の定量化

ラット網膜におけるRhoA (A), ROCK1 (B), ROCK2 (C) の免疫組織化学的検討。血管内皮細胞：抗CD34抗体, RhoA, ROCK1, ROCK2抗体, 二重染色された網膜血管(白色矢頭, 拡大: ×400)。D: Rho pull-down assay (Rho-GTP: 活性型Rhoに特異的に結合するエフェクター蛋白であるRhotekin-アガロースに結合したRhoをWestern blottingで検出してRho活性を評価する方法)によって検出された正常およびストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット網膜の代表的なプロット(両レーンの蛋白量は同じになるように調整)。E: 平均信号強度(% Intensity)はcontrolに対するパーセント比で表した (** $p < 0.01$, $n = 5$ each)。

(文献20, 図1より転載)

た。Vehicle群ではStage 5の全網膜剥離まで進行するのに対して(図2A, B), fasudil群(30 μ M)ではStage 1の膜形成までは進むものの, その後の膜収縮ステップへの進行をほぼ完全に抑制することができた(図2A, C)。持続的収縮型細胞への形質転換を示す分子である α SMAのこの増殖膜中における発現を免疫組織化学的に検討してみると, 自然に進行したStage 5でみられる増殖膜では α SMAが強く発現しており, その分布も規則的であり, 増殖膜が網膜を牽引している像が観察された(図2D, F)。一方でfasudilを作用させた増殖膜では α SMAの発現は保たれているものの, その規則的な分布が阻害されており, 増殖膜自体も収縮力を失い, 増殖

膜による網膜の牽引は観察されなかった(図2E, G)。これらの結果からROCK阻害薬が進行した網膜症に伴う増殖膜収縮に対する新しい治療戦略になると期待される。

神経網膜はいったん障害されると現在の最善の治療を施しても機能回復は困難であり, 良好な視力を維持するためには網膜症発症早期からの予防対策が必要となる。そこで筆者らは網膜症発症早期の微小血管傷害の病態へのROCKの関与について検討を行い, 以下の結果を得た²⁰⁾。

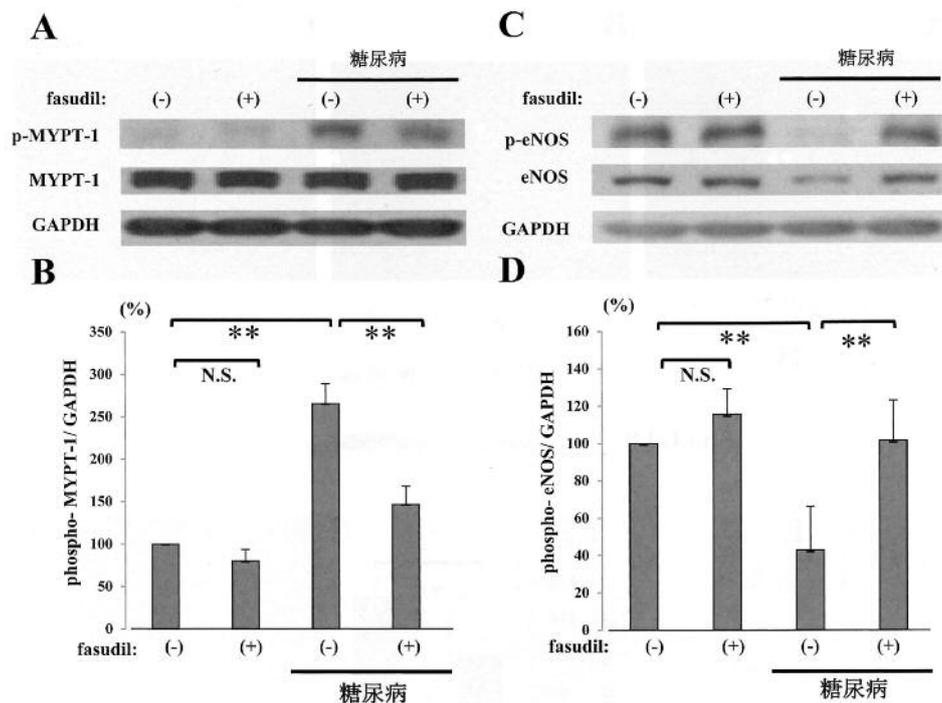


図4 FasudilのMYPT-1およびeNOSリン酸化に与える影響

正常およびストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット網膜におけるMYPT-1 (Thr 853) およびeNOS (Ser 1177) リン酸化をWestern blottingで解析。レーンごとの蛋白量の違いはGAPDHでリプロットして標準化した。A:ラット網膜におけるリン酸化MYPT-1 (phospho-MYPT-1) とGAPDHの代表的なプロット。B:ROCK活性はphospho-MYPT-1/GAPDHで表されている。平均信号強度はコントロールに対するパーセント比で表した。Fasudil投与により糖尿病で増加したMYPT-1リン酸化が抑制された (** $p < 0.01$, N.S.:有意差なし, 各 $n=6$)。C:eNOS, phospho-eNOS, GAPDHの代表的なプロット。D:平均信号強度はコントロールに対するパーセント比で表した。Fasudil投与により糖尿病で減少したeNOS発現およびリン酸化がほぼ完全に回復した (* $p < 0.05$, N.S.:有意差なし, 各 $n=6$)。 (文献20, 図2より転載)

III 糖尿病網膜血管におけるROCK活性

2002年にAdamisが網膜症発症早期の病態における慢性炎症の関与を報告して以来²¹⁾, 網膜症の初期に起こる網膜血管透過性亢進や血管閉塞などの臨床的にみられる糖尿病性細小血管異常の病態に, 白血球接着亢進とそれに引き続く血管内皮細胞傷害が少なからず関与していることが明らかとなった^{22,23)}。白血球の血管内皮細胞への接着には接着分子が関与しているが, 網膜症においては内皮細胞に発現しているintercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) や白血球に発現している $\beta 2$ インテグリン (CD11b/CD18) を介した相互作用が重要であり²⁴⁾, 糖尿病モデル動物を用いた実験でもこれらの接着分子を阻害することで網膜血管内皮傷害が抑制されることが報告されている²⁵⁾。In vitroの実験でROCKを活性

化することで, ICAM-1発現亢進²⁶⁾や細胞内にpoolされているインテグリンの細胞表面へのtranslocationが生じる²⁷⁾など, ROCKは接着分子の発現や機能に影響を与えている。そこで筆者らはROCK経路が白血球の過剰な接着を呈する網膜症早期の病態にも関与している可能性を推察した。

網膜におけるRho/ROCK関連蛋白の局在をラット網膜組織で免疫組織化学的に検討したところ, RhoA, ROCK1, ROCK2蛋白は主に網膜血管内皮細胞, 血管平滑筋などの網膜血管系に局在していた(図3A~C)。ストレプトゾトシン(streptozotocin: STZ)誘発糖尿病ラット網膜における活性型Rhoをpull down assay法を用いて定量化したところ, コントロールラットよりもSTZ誘発糖尿病ラット網膜でRhoの活性が有意に亢進していた(図3D, E)。これらの糖尿病網膜血管系にお

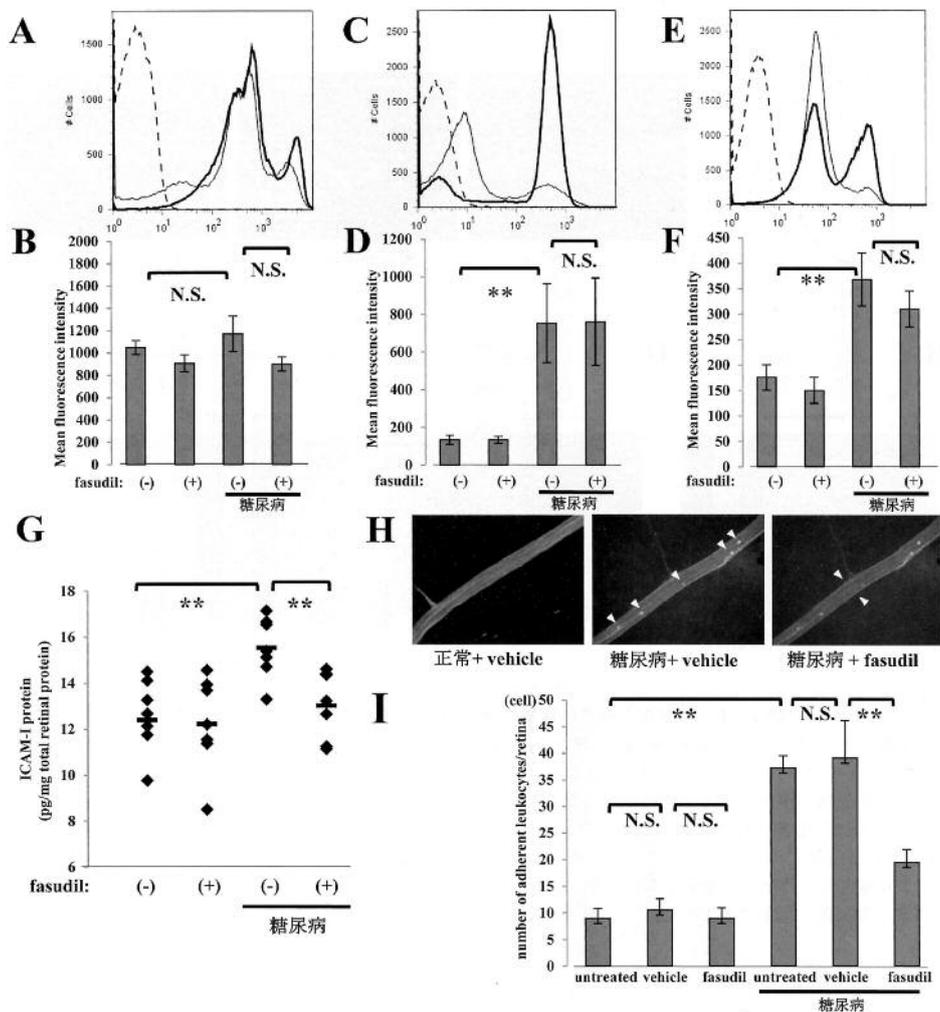


図5 接着分子発現と白血球接着に対する fasudil の影響

正常ラット好中球 (細線) と糖尿病ラット好中球 (太線) 表面における CD11a (A), CD11b (C), CD18 (E) の発現をフローサイトメトリーで解析した (点線: マウスアイソタイプコントロール, CD11a (B), CD11b (D), CD18 (F) の平均蛍光強度。糖尿病ラット好中球表面の CD11b (753 ± 209) および CD18 (369 ± 52) の平均蛍光強度は、正常ラット (CD11b: 135 ± 24 , CD18: 176 ± 25) より有意に増加していたが、fasudil 投与でその発現に変化は認めなかった (** $p < 0.01$, N.S.: 有意差なし, 各 $n = 8$)。G: ELISA で測定した正常ラットおよび糖尿病ラット網膜における ICAM-1 濃度。糖尿病網膜で増加した ICAM-1 発現が、fasudil 投与で有意に抑制された (** $p < 0.01$, 各 $n = 7$)。H: 正常および糖尿病ラットの網膜フラットマウントにおいて ConA 染色で同定された接着白血球の代表的な図。白色矢頭: 接着白血球。I: 正常および糖尿病ラットにおける接着白血球数の定量解析。網膜血管にトラップされる白血球数は糖尿病で増加しており、fasudil 投与によって抑制された (** $p < 0.01$, N.S.: 有意差なし, 各 $n = 7$)。 (文献 20, 図 3 より転載)

ける ROCK 活性亢進は、ROCK 経路の糖尿病性細小血管異常への関与を示唆しているのではないかと推察した。

IV 糖尿病性網膜血管異常と ROCK 阻害薬

つぎに STZ 誘発糖尿病モデル動物を用いて ROCK 阻

害薬 fasudil が網膜血管系における ROCK 活性亢進を阻害することができるかどうかを検討し、糖尿病網膜血管への白血球接着、糖尿病網膜血管傷害への影響を評価した。Fasudil の投与方法として全身投与で硝子体内に期待した有効濃度を得ることは難しく、コントロールおよび STZ 誘発糖尿病ラットに対し正常 (fasudil -/+),

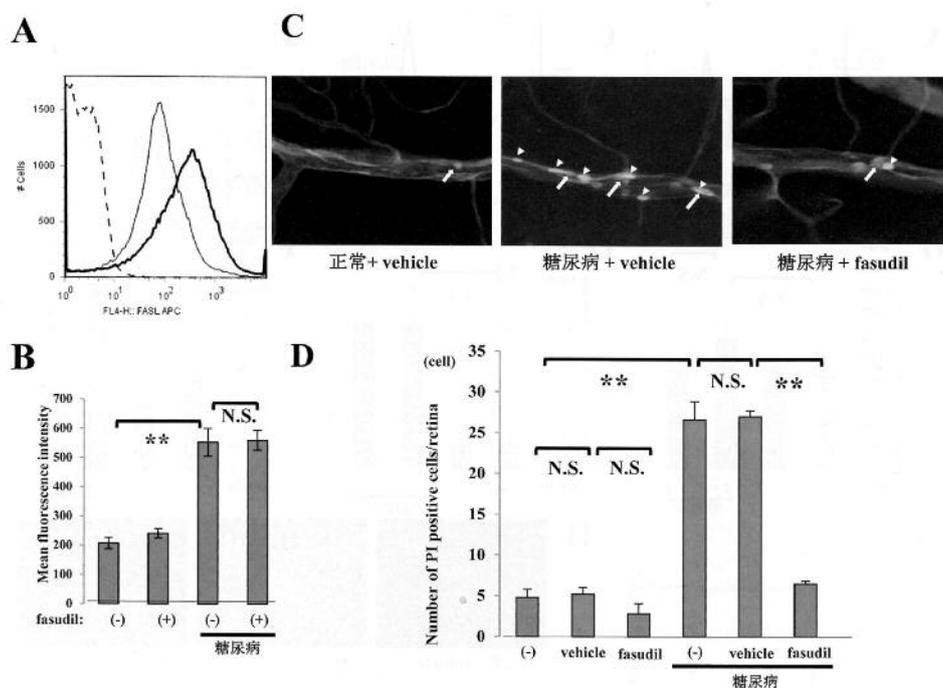


図 6 FasL 発現と白血球接着に伴う血管内皮傷害への fasudil の影響

A: 末梢血から単離した正常ラット好中球 (細線) と糖尿病ラット好中球 (太線) 表面の FasL 発現をフローサイトメトリーで解析 (点線: マウスアインタイプコントロール)。B: 正常および糖尿病ラット好中球表面の FasL 平均蛍光強度 (** $p < 0.01$, N.S.: 有意差なし, 各 $n = 8$)。糖尿病で白血球の FasL 発現が亢進していたが, fasudil はその発現に影響を与えることはなかった。C: 網膜フラットマウントにおける傷害された内皮細胞染色 (propidium iodide: 矢頭) を同定した代表的な図。傷害された内皮細胞はおおむね白血球接着部位 (白色矢印) と一致していた。D: 正常および糖尿病ラットにおける傷害された内皮細胞数の定量解析。Fasudil 投与により傷害された血管内皮細胞数は著明に抑制されており, fasudil 投与群では白血球がたとえ網膜血管に接着していても内皮細胞傷害が効果的に抑制されていた (** $p < 0.01$, N.S.: 有意差なし)。(文献 20, 図 4 より転載)

糖尿病 (fasudil-/+) の 4 群に分け, fasudil の眼内終濃度が $30 \mu\text{M}$ となるように糖尿病発症後 3 日ごとに 2 週間, 硝子体内へ局所投与を行った。投与開始 2 週間後に網膜から蛋白質を抽出し, ROCK の下流にある標的蛋白 MYPT-1 および内因性一酸化窒素合成酵素 (eNOS) リン酸化を Western blotting で評価した。

1. 糖尿病性網膜血管に対する ROCK 阻害効果

ROCK によって MYPT-1 はリン酸化⁵⁾, eNOS は脱リン酸化されるが²⁸⁾, ROCK 活性化によってリン酸化される MYPT-1 は糖尿病で著明に亢進しており, fasudil 投与によって有意に抑制されることがわかった (図 4A, B)。また, ROCK によって脱リン酸化される eNOS は糖尿病で蛋白量・リン酸化ともに低下しているのに対して, fasudil 投与でそれらがほぼ完全に回復しており (図 4C, D), これらの結果から糖尿病網膜で亢

進した ROCK 活性に対する fasudil の阻害効果を確認することができた。

2. 糖尿病性網膜血管に対する白血球接着への影響

つぎに糖尿病網膜血管に対する ROCK 阻害薬 fasudil の白血球接着への影響について検討を進めた。糖尿病モデル動物から抽出した白血球と網膜血管ではインテグリン CD11b/18 (図 5A~F) および ICAM-1 (図 5G) の発現が亢進しており, 白血球が血管内皮細胞に接着しやすい状態となっていることがわかった。網膜血管への白血球接着状況をフラットマウントで評価してみても, 網膜血管にトラップされている白血球数は糖尿病で有意に増加していた (図 5H, I)。

Fasudil 硝子体内投与で循環血中の白血球接着分子の発現に影響することなく (図 5A~F), 糖尿病により亢進した ICAM-1 発現が fasudil 投与により低下し (図

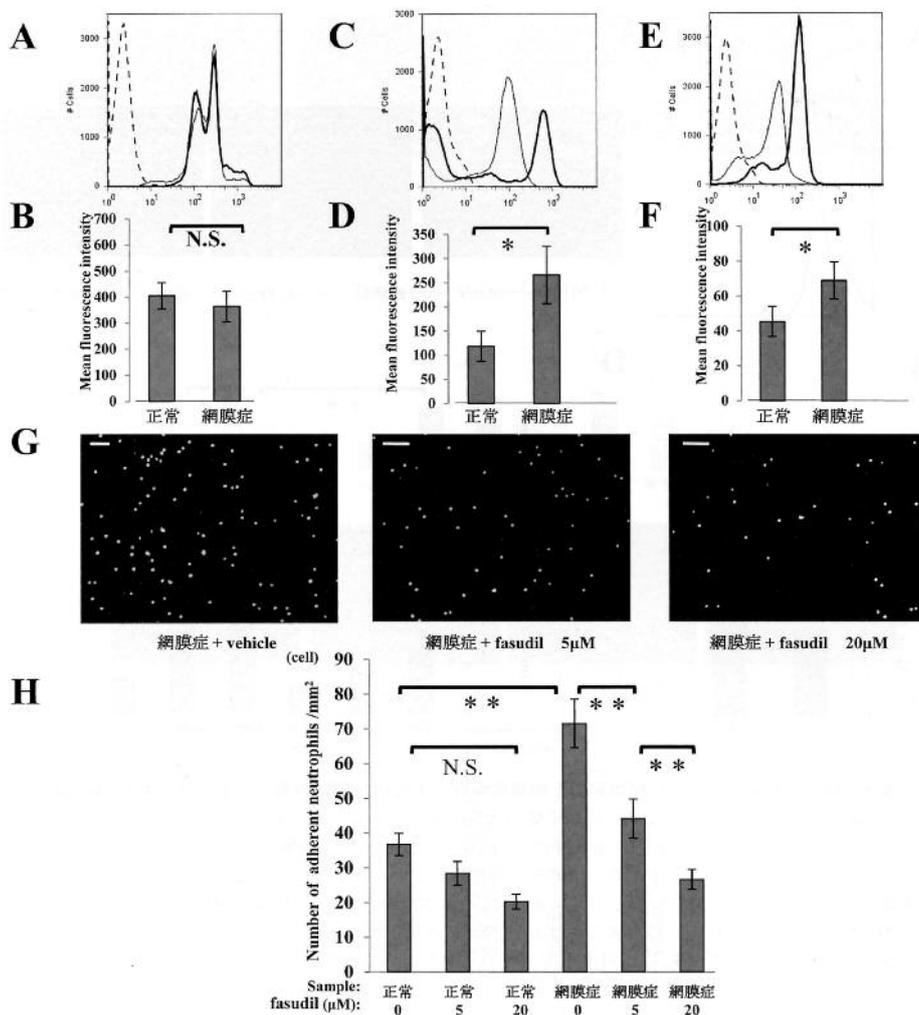


図7 網膜症好中球の接着分子解析と血管内皮接着への fasudil の抑制効果

正常健常人 (細線) および網膜症患者 (太線) から単離した好中球表面の CD11a (A), CD11b (C), CD18 (E) 発現をフローサイトメトリーで解析 (点線: マウスアイトタイプコントロール). CD11a (B), CD11b (D), CD18 (F) の平均蛍光強度 (* $p < 0.05$, N.S.: 有意差なし, 各 $n = 20$, 点線: マウスアイトタイプコントロール). CD11b/CD18 発現が網膜症群で亢進していた. G: Fasudil (0, 5, 20 μM) で1時間, 前処置した培養微小血管内皮細胞と 1mM Calcein-AM で標識した好中球 (2×10^5 cells/ml, 500 μl per well) との共培養 (37°C 1時間) 後の接着白血球の代表的な図 (Scale bar = 100 μm). H: 1穴あたり異なる4つの領域における接着細胞数を計測し平均化 (** $p < 0.01$, N.S.: 有意差なし, 各 $n = 15$). 網膜症群の好中球は内皮との接着能が有意に亢進しており, その接着能は fasudil を加えておくことで濃度依存性に阻害された. (文献 20, 図5より転載)

5G), 網膜血管にトラップされる白血球数も有意に減少していた (図 5H, I).

3. 糖尿病性網膜血管に対する内皮傷害への影響

つぎに ROCK 阻害薬 fasudil の網膜血管内皮細胞傷害への影響について検討した. 2003年に Jousseaume らによって接着後の内皮細胞傷害のメカニズムに白血球側の FasL と内皮側の Fas との Fas/Fas Ligand (FasL) 経路

を介した death signal の関与が示唆された²⁹⁾. 今回用いた糖尿病モデル動物より抽出した好中球の FasL 発現をフローサイトメトリーで, 接着白血球による網膜血管傷害をフラットマウントで評価したところ, 糖尿病好中球では FasL 発現が亢進していたが, その発現は fasudil によって影響を受けることはなかった (図 6A, B). 一方, 糖尿病で認めた網膜血管内皮傷害は fasudil によって白血球接着阻害効果以上に減少しており, 白血球がた

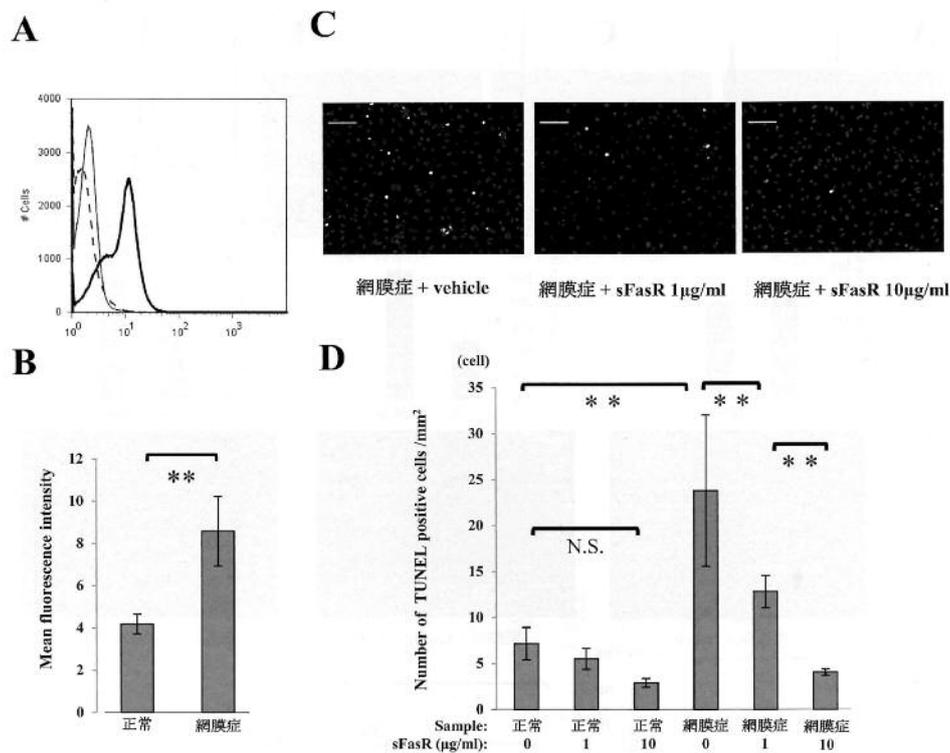


図8 網膜症好中球のFasL発現解析と接着好中球による内皮細胞傷害へのFas/FasL経路の関与

A: 正常健常人(細線)および網膜症患者(太線)から単離した好中球表面のFasL発現をフローサイトメトリーで解析(点線:マウスアイトイプコントロール)。B: FasL平均蛍光強度(* $p < 0.05$, 各 $n = 17$)。網膜症群の好中球でFasL発現が亢進。C: 可溶性Fas受容体(sFasR: 0, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$)で1時間、前処置した標識していない好中球(5×10^5 cells/ml)とHoechst 33342 (1 mM)で標識した培養微小血管内皮細胞(HMVEC)との共培養(37°C 1時間)後のTUNEL陽性HMVEC(白色)の代表的な図(Scale bar=100 μm)。D: 1穴あたり異なる4つの領域におけるTUNEL陽性細胞数を計測し平均化(** $p < 0.01$, N.S.:有意差なし, 各 $n = 15$)。網膜症群の好中球で有意に内皮細胞に対する傷害性の亢進を認め、その傷害性はsFasRを添加しておくことにより濃度依存性に抑制された。(文献20, 図6より転載)

とえ網膜血管に接着していてもそれに伴う内皮細胞傷害が効果的に抑制されていた(図6C, D)。これはfasudilが単に網膜血管への白血球接着を減少させるだけでなく、白血球接着を介した内皮細胞傷害に対して直接的な保護作用も有していることによるものであると推察された。eNOSから産生される一酸化窒素は血管拡張作用や抗アポトーシス作用を有することが知られており^{30,31)}、fasudilが糖尿病で低下していたeNOS活性をほぼ完全に回復させていることから、このfasudilによる内皮保護のメカニズムにeNOSの関与が考えられた。

V ROCK阻害薬と内皮保護メカニズム

Fasudilの糖尿病性細小血管傷害における保護メカニズムについては未だ十分に解明されていない。そこで網

膜症患者白血球と培養血管内皮細胞との共培養系を用いて血管内皮細胞の傷害メカニズムを明らかにするとともに、ROCK阻害薬の保護効果について検討を加えた。血管内皮細胞にはヒト微小血管内皮細胞(Cambrex, East Rutherford, NJ)を用い、白血球は九州大学倫理審査専門委員会の承認を経て文書による同意を得た網膜症を有する2型糖尿病患者および正常健常ボランティアの末梢血からtwo-step gradient techniqueにて抽出した。好中球接着分子CD11aは正常健常人と網膜症群で有意差はなく、CD11b/CD18発現が網膜症群で亢進していた(図7A~F)。血管内皮との共培養で接着能をみると、網膜症群の好中球は内皮との接着能が有意に亢進しており、その接着はfasudilを加えておくことで濃度依存性に阻害された(図7G, H)。一方、正常健常人の好中球

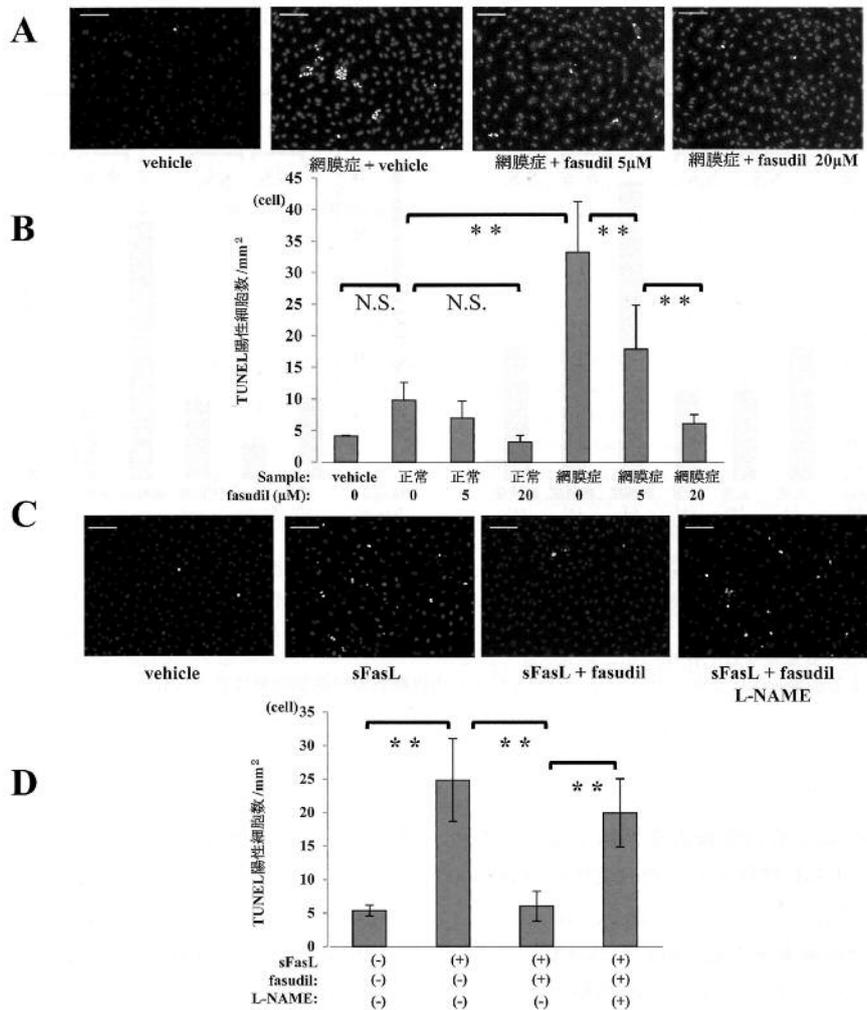


図9 Fasudilの好中球依存性およびFasL依存性内皮傷害に対する保護作用とL-NAMEの影響

A: 標識していない好中球 (5×10^5 cells/ml) を fasudil (0, 5, 20 μ M) で前処置 (1時間) 後に, Hoechst 33342 (1mM) 標識した培養微小血管内皮細胞 (HMVEC) との共培養 (37°C 1時間) 後の TUNEL 陽性 HMVEC (白色) の代表的な図 (Scale bar=100 μ m). B: 1穴あたり異なる4つの領域における TUNEL 陽性細胞数を計測し平均化 (**p<0.01, N.S.: 有意差なし, 各 n=15). 網膜症群では正常健康人と比較して好中球による血管内皮細胞の傷害を亢進させるが, その作用は fasudil によって濃度依存性に阻害された. C: L-NAME (0, 1mM), fasudil (0, 20 μ M) で前処置 (1時間) し, 培養微小血管内皮細胞 (HMVEC) を可溶性 FasL で刺激後の代表的な図 (Scale bar=100 μ m). TUNEL 陽性 HMVEC (白色). D: 1穴あたりの異なる4領域における TUNEL 陽性細胞数を計測した (**p<0.01, N.S.: 有意差なし, 各 n=4). sFasL は内皮細胞傷害を誘導するが, その作用は fasudil によって阻害され, その阻害効果は一酸化窒素合成酵素阻害薬である L-NAME によって消失した. (文献 20, 図 7 より転載)

は fasudil を加えてもその接着能に変化を認めなかった. 正常群と比較して網膜症群の好中球は FasL 発現が亢進しており, 糖尿病モデル動物と同様に内皮細胞に対して高い傷害性を有していた (図 8A, B). 血管内皮との共培養で接着による内皮傷害をみると, 網膜症群の好中球で内皮細胞に対する傷害性の亢進を認め, その傷害性は可溶性 Fas 受容体 (sFasR) を添加しておくことによ

り濃度依存性に抑制された (図 8C, D). 網膜症患者の白血球を用いたこの共培養系においても, 好中球が接着分子を介して内皮と接着した後の内皮傷害メカニズムに Fas/FasL 経路が重要であることが確認できた. さらに, fasudil によっても白血球接着による内皮傷害が濃度依存性に阻害された (図 9A, B). 可溶性 FasL で培養血管内皮細胞を刺激することで内皮傷害が生じるが, fasudil

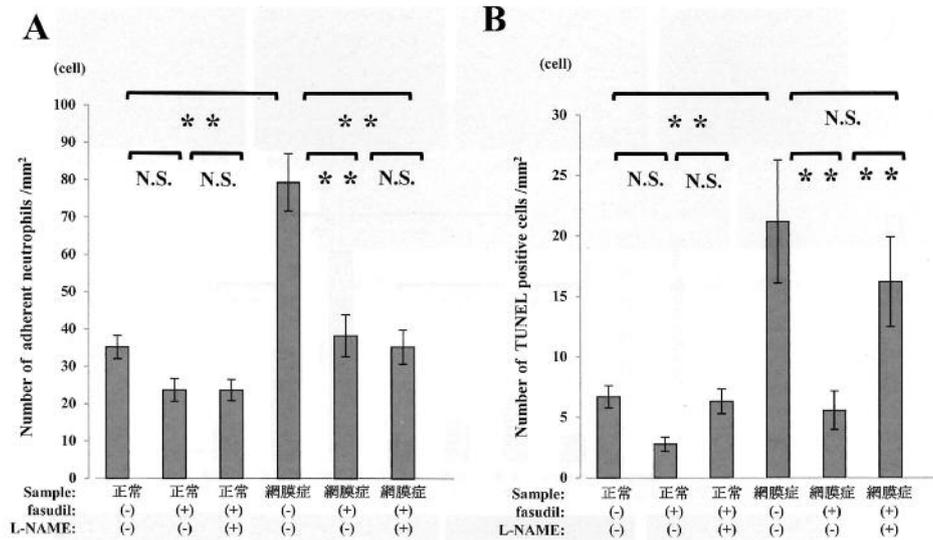


図10 Fasudilの好中球接着抑制および内皮保護作用へのL-NAMEの影響

L-NAME (0.1mM), fasudil (0.20 μM) で前処置 (1時間) し, 血管内皮細胞 (HMVEC) と好中球 (5×10⁵ cells/ml) との共培養 (37°C 1時間) 後に1穴あたり異なる4つの領域における (A) 接着好中球数および (B) TUNEL陽性HMVECとを計測し平均化した (**p<0.01, N.S.:有意差なし, 各n=10). 網膜症群で亢進している好中球の内皮細胞への接着能はfasudilで阻害されるものの, L-NAMEによる影響を受けなかった. 一方, fasudilによる内皮細胞傷害抑制効果はL-NAMEにより有意に消失した.

(文献20, 図8より転載)

がこの可溶性FasLによる内皮傷害を抑制することから, fasudilはFas/FasL経路を介した内皮傷害経路を阻害する作用を有すると考えられた (図9C, D). その作用は一酸化窒素合成酵素阻害薬であるL-NAMEによって消失することから (図9C, D), 内皮細胞において一酸化窒素の産生を亢進させることがfasudilの内皮保護作用のメカニズムであると考えられた. L-NAME自体の接着能・傷害能への影響についてみたところ, L-NAMEはfasudilによる白血球接着阻害作用には影響を示すことなく (図10A), fasudilの内皮保護作用を消失させることが確認された (図10B). これらの結果から *in vivo* においてfasudilが強い内皮傷害阻害作用を示したが, これはfasudilが単に好中球の内皮細胞への接着を阻害したばかりでなく, 内皮細胞におけるeNOSを介した一酸化窒素合成を促進することによって好中球がたとえ接着したとしても, それによる内皮傷害メカニズムを阻害する二重の効果があるためと考えられた.

おわりに

現在, 糖尿病罹患率は増加の一步をたどっており, この疾患の合併症であり著明な視力低下をきたす糖尿病網

膜症の新しい治療戦略が必要とされている. 神経網膜はいったん障害されると現在の最善の治療を施しても機能回復は困難であり, 良好な視力を維持するためには網膜症発症早期からの予防対策が必要である. 糖尿病網膜症は, 非増殖期の段階から増殖性病変に至るまで実に多彩な病態を呈しているが, これらの一連の研究によりROCK経路が網膜症早期~進行期に至るまでの幅広い病態形成に関与していることが明らかとなった.

ROCK経路にはROCK1とROCK2の2つのアイソフォームが存在し, fasudilはこの両方のアイソフォームを阻害する. 近年アイソフォーム別の選択性を持つ阻害薬も考案されつつあるが, どちらが有効かつ安全かについては未だ不明である. Fasudilは内科的に臨床応用されているとはいえ, ヒトにおける長期的な安全性に関して未だ確認されておらず, 網膜症患者へのfasudil投与に関しても慎重に検討する必要がある. また, ROCK経路は新生児器官形成に重要な役割を果たしており, 臨床応用するにあたり幼児や妊婦への投与は禁忌である. 糖尿病ラットにおける網膜変化の経過もヒトと異なる可能性があり, 治療効果や安全性に関してもさらなる検討が必要である.

Fasudilの毒性についての筆者らの検討では、今回用いたfasudil濃度(眼内最終濃度30 μ M)ではROCKにほぼ選択的に作用する濃度であり¹⁰⁾、ウサギ眼へのfasudil硝子体反復投与(眼内最終濃度30 μ M)およびラット眼へのfasudil単回硝子体投与(100 μ M)で、非投与眼と比較して明らかな電気生理学的変化や網膜組織の形態変化、炎症細胞浸潤は認められなかった¹⁸⁾。

Rho/ROCK活性化はICAM-1発現亢進やMLCリン酸化を介した接着分子の機能亢進によって白血球の血管内皮細胞への接着を促進する²⁶⁾。さらに本研究によってROCKは単に接着だけでなく、内皮保護作用を有するeNOSを不活化して白血球接着を介した内皮細胞傷害に対する保護メカニズムも低下させ、糖尿病性網膜細小血管異常の病態に関与することを明らかにした。ROCK経路は、それ以外にも網膜血管収縮³²⁾やVEGF(vascular endothelial growth factor)による血管新生³³⁾などの、白血球接着以外の微小血管異常の病態に関与していることがわかっている。ROCK阻害薬fasudilはROCKに対して高い選択性を有しており、これら幅広い薬理作用によって糖尿病性網膜細小血管障害に対する病態制御の新たな治療戦略となる可能性が期待される。

文 献

- 1) Barreiro O, Yanez-Mo M, Serrador J et al : Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol* **157** : 1233-1245, 2002
- 2) Mackay DJ, Esch F, Furthmayr H et al : Rho- and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts : an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins. *J Cell Biol* **138** : 927-938, 1997
- 3) Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K : Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* **22** : 32-39, 2001
- 4) Seasholtz TM, Majumdar M, Kaplan DD : Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res* **84** : 1186-1193, 1999
- 5) Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K : Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* **22** : 32-39, 2001
- 6) Seasholtz TM, Majumdar M, Kaplan DD : Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res* **84** : 1186-1193, 1999
- 7) Masumoto A, Mohri M, Shimokawa H et al : Suppression of coronary artery spasm by the Rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina. *Circulation* **105** : 1545-1547, 2002
- 8) Okamura N, Saito M, Mori A et al : Vasodilator effects of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on retinal arterioles in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Ocul Pharmacol Ther* **23** : 207-212, 2007
- 9) Miyata K, 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* **20** : 2351-2358, 2000
- 10) Shimokawa H, Seto M, Katsumata N et al : Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm. *Cardiovasc Res* **43** : 1029-1039, 1999
- 11) Shimokawa H, Rashid M : Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends Pharmacol Sci* **28** : 296-302, 2007
- 12) Kolavennu V, Zeng L, Peng H et al : Targeting of RhoA/ROCK signaling ameliorates progression of diabetic nephropathy independent of glucose control. *Diabetes* **57** : 714-723, 2008
- 13) Mueller BK, Mack H, Teusch N : Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov* **4** : 387-398, 2005
- 14) Okamura N, Saito M, Mori A et al : Vasodilator effects of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on retinal arterioles in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Ocul Pharmacol Ther* **23** : 207-212, 2007
- 15) Lingor P, Teusch N, Schwarz K et al : Inhibition of Rho kinase (ROCK) increases neurite outgrowth on chondroitin sulphate proteoglycan in vitro and axonal regeneration in the adult optic nerve in vivo. *J Neurochem* **103** : 181-189, 2007
- 16) Hirata A, Inatani M, Inomata Y et al : Y-27632, a Rho-associated protein kinase inhibitor, attenuates neuronal cell death after transient retinal ischemia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **246** : 51-59, 2008
- 17) Hirayama K, Hata Y, Noda Y et al : The involvement of the rho-kinase pathway and its regulation in cytokine-induced collagen gel contraction by hyalocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45** : 3896-3903, 2004
- 18) Kita T, Hata Y, Arita R et al : Role of TGF- β in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci USA* **105** : 17504-17509, 2008
- 19) Dong X, Chen N, Xie L et al : Prevention of experimental proliferative vitreoretinopathy with a biodegradable intravitreal drug delivery system of all-trans retinoic acid. *Retina* **26** : 210-213, 2006
- 20) Arita R, Hata Y, Nakao S et al : Rho kinase inhibition by fasudil ameliorates diabetes-induced microvascular damage. *Diabetes* **58** : 215-226, 2009
- 21) Adamis A : Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? *Br J Ophthalmol* **86** : 363-365, 2002
- 22) Joussen AM, Murata T, Tsujikawa A et al : Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic

- retina. *Am J Pathol* **158** : 147-152, 2001
- 23) Schroder S, Palinski W, Schmid-Schonbein GW : Activated monocytes and granulocytes, capillary nonperfusion, and neovascularization in diabetic retinopathy. *Am J Pathol* **139** : 81-100, 1991
- 24) Smith CW, Marlin SD, Rothlein R et al : Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* **83** : 2008-2017, 1989
- 25) Barouch FC, Miyamoto K, Allport JR et al : Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41** : 1153-1158, 2000
- 26) Lee H, Lin CI, Liao JJ et al : Lysophospholipids increase ICAM-1 expression in HUVEC through a Gi- and NF-kappaB-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* **287** : 1657-1666, 2004
- 27) Idzko M, Laut M, Panther E et al : Lysophosphatidic acid induces chemotaxis, oxygen radical production, CD11b up-regulation, Ca²⁺ mobilization, and actin reorganization in human eosinophils via pertussis toxin-sensitive G proteins. *J Immunol* **172** : 4480-4485, 2004
- 28) Ming XF, Viswambharan H, Barandier C et al : Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol* **22** : 8467-8477, 2002
- 29) Joussen AM, Poulaki V, Mitsiades N et al : Suppression of Fas-FasL-induced endothelial cell apoptosis prevents diabetic blood-retinal barrier breakdown in a model of streptozotocin-induced diabetes. *FASEB J* **17** : 76-78, 2003
- 30) Rossig L, Haendeler J, Hermann C et al : Nitric oxide down-regulates MKP-3 mRNA levels : involvement in endothelial cell protection from apoptosis. *J Biol Chem* **275** : 25502-25507, 2000
- 31) Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K et al : Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem* **274** : 6823-6826, 1999
- 32) Arita R, Hata Y, Ishibashi T : ROCK as a therapeutic target of diabetic retinopathy. *J Ophthalmol* **21** : 1-9, 2010
- 33) Hata Y, Miura M, Nakao S : Angiogenic properties of fasudil, a potent Rho-kinase inhibitor. *Jpn J Ophthalmol* **52** : 16-23, 2008