

平成 20 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

Rho-associated kinase (ROCK) 阻害薬の緑内障治療薬としての可能性

本庄 恵

東京都健康長寿医療センター眼科

要 約

房水中の生理活性物質の一部は Rho を活性化することが知られており, その下流に続く Rho—ROCK (Rho-associated kinase) シグナル伝達は, アクチン細胞骨格の再編成を介して多くの細胞反応に寄与している. 以前, 我々は選択的 ROCK 阻害薬が房水流出を促進し, 有意な眼圧下降効果を示すことを報告した. ROCK 阻害薬は線維柱帯細胞の細胞骨格を修飾し, 細胞外マトリックスの発現などに影響を及ぼすことが明らかとなった. 今回, Rho 阻害が創傷治癒において血管新生・細胞遊走を抑制, 細胞外基質を制御することに注目し,

ROCK 阻害薬の癒痕形成への影響を検討した. ROCK 阻害薬は培養ヒトテノン囊線維芽細胞の筋線維芽細胞転化と癒痕形成を抑制し, 家兎眼実験的濾過手術において濾過胞維持に有効に作用する可能性を示した. この他, ROCK 阻害薬は神経保護効果も報告されており, 新しい治療薬として, 緑内障治療における臨床応用が期待されている. (日眼会誌 113 : 1071—1081, 2009)

キーワード : ROCK 阻害薬, 線維柱帯細胞, 細胞外マトリックス, 細胞骨格, 眼圧下降

A Review

The Possibility of Selective Rho-associated kinase (ROCK) Inhibitors as a Medical Treatment for Glaucoma

Megumi Honjo

Department of Ophthalmology, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital

Abstract

Some of the cytokines and growth factors in the aqueous humor activate Rho, and the Rho/ROCK signal transduction participates in signaling pathways via rearrangement of actin cytoskeleton that leads to various cellular reactions. In a previous study, we demonstrated that a selective ROCK inhibitor significantly reduced intraocular pressure, the mechanism of which was attributed to improved outflow. ROCK inhibitors induced the actomyosin assembly, cell adhesive interactions, and the expression of extracellular matrix (ECM) proteins in cultured TM cells. The inhibition of Rho also has been implicated in pathological wound healing by regulating neovascularization, migration, and ECM in scar tissue. In this study, we investigated the role of ROCK inhibitor in regulating human Tenon fibroblast (HTF) activity and postoperative scar formation in a rabbit sclerostomy model. ROCK inhibitor showed

decreased α SMA expression in HTF, and prevented enhanced contractility, assembly of actin stress fibers, and myofibroblastic transdifferentiation. *In vivo* sclerostomy studies showed that the bleb survival was significantly improved in ROCK inhibitor-treated eyes. In another study by us, ROCK inhibitor showed neuroprotective effects against rat retinal ischemia reperfusion injury. Collectively, ROCK inhibitors are thus a potential new strategy for developing medical therapy for glaucomatous disease.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 113 : 1071—1081, 2009)

Key words : ROCK inhibitor, Trabecular meshwork cells, Extracellular matrix, Cytoskeleton, Intraocular pressure lowering

別刷請求先 : 173-0015 東京都板橋区栄町 35—2 東京都健康長寿医療センター眼科 本庄 恵

(平成 21 年 4 月 13 日受付, 平成 21 年 6 月 30 日改訂受理) E-mail : m_honjo@kuhp.kyoto-u.ac.jp

Reprint requests to : Megumi Honjo, M.D. Department of Ophthalmology, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital. 35-2 Sakaemachi, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan

(Received April 13, 2009 and accepted in revised form June 30, 2009)

I はじめに

緑内障は現在、我が国の失明原因の上位に挙げられている疾患である。我が国で行われた大規模緑内障疫学調査の結果では、40歳以上の有病率は5%、70歳以上では7~8人に一人とされ¹⁾、今後、超高齢社会の進行に伴い、緑内障による失明者数は増加するおそれがある。近年、緑内障は緑内障性視神経症 (glaucomatous optic neuropathy : GON) を来す症候群として捉えられるようになってきている。すなわち、以前の定義では、緑内障は眼圧(高眼圧とは限らない)に起因する疾患とされていたが、新しい定義では眼圧因子は必要条件から外され、現在、日本緑内障学会が提示している緑内障診療ガイドラインでは「緑内障は、視神経と視野に特徴的变化を有し、通常、眼圧を十分に下降させることにより視神経障害を改善もしくは抑制しうる眼の機能的構造的異常を特徴とする疾患」と定義されている²⁾。眼圧下降治療だけで進行を抑えられない緑内障症例が多数存在することは事実である。しかし同時に、眼圧上昇は緑内障の主要な病態の一つであり、現在のところ、眼圧下降治療は、緑内障に対するエビデンスに基づいた、唯一確実に効果が認められている治療法である²⁾。眼圧下降治療は現実的には緑内障治療の大きな柱であることから、新しい眼圧下降薬物治療の発展は依然望まれる分野であり、さらなる新薬の開発が進められている。

眼科領域では、低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho の標的蛋白質である Rho-associated kinase (ROCK) の選択的阻害薬による眼圧下降効果について研究が進められ、臨床応用が期待されている。本稿では、緑内障における Rho—ROCK シグナル伝達の生理学的意義について解説

する。

II 房水流出路と房水動態

眼内を循環している房水は、眼球組織への栄養補給に欠かせない。房水は常に産生され続け、抵抗のある流出路を通過して眼外へ排出されるが、この循環バランスにより眼圧は一定に維持されている。房水は毛様体で作られ、後房、瞳孔、隅角線維柱帯を経て、眼外へ排出される。房水流出路として、シュレム管から排出される経シュレム管房水流出路とぶどう膜強膜房水流出路が知られており(図1)、ヒトでは経シュレム管房水流出路が全体の房水流出量の80~95%を占めるとされている。原発開放隅角緑内障では、隅角形態は正常(開放隅角)であるが、隅角線維柱帯の機能異常が存在し、経シュレム管房水流出路における流出抵抗の増大があると考えられている。現在臨床応用されている、もしくは臨床応用が期待されている薬物の主要な眼圧下降機序としては、毛様体における房水産生の抑制と房水流出路における房水流出促進がある。房水流出促進を機序とする眼圧下降としては、経シュレム管房水流出路とぶどう膜強膜房水流出路がターゲットとなる。後者については、プロスタグランジン関連薬が強い眼圧下降効果を示し、現在では緑内障治療薬として第一選択となっている。ぶどう膜強膜房水流出路においては、房水は隅角底から毛様体実質に入り、上毛様体腔を経て、強膜外へ流出するとされている。毛様体筋束の間隙の広さが房水流出に関与している可能性が指摘されているが、薬効機序を含め、ぶどう膜強膜房水流出路の生理学的機序について、未だ詳細は明らかではない。

経シュレム管房水流出路では、解剖学的構造は詳細ま

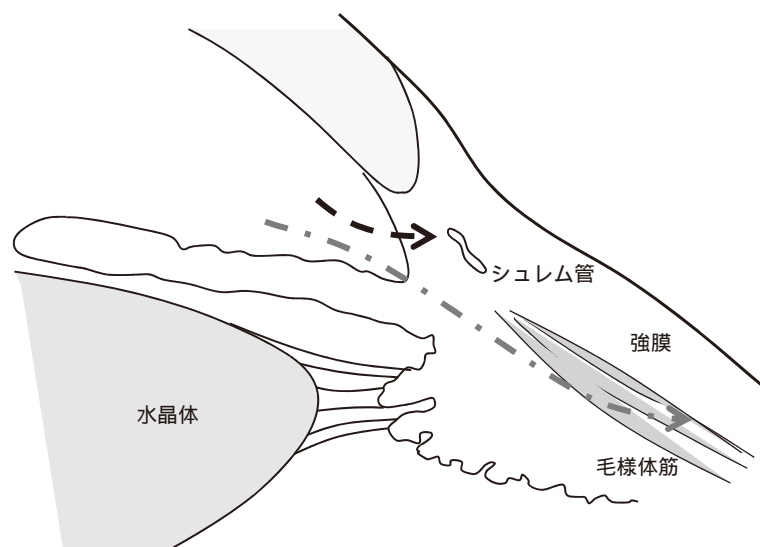


図1 房水循環動態。

房水は毛様体で作られ、後房、瞳孔、隅角線維柱帯を経て、①経シュレム管房水流出路と②ぶどう膜強膜房水流出路から眼外へ排出される。

で明らかにされている。シュレム管は角膜周辺部に扁平な管腔としてみられ、前房側に隅角線維柱帯が存在する。隅角線維柱帯は解剖学的に、①ぶどう膜網、②角強膜網、③傍シュレム管結合組織から構成されている。ぶどう膜網、角強膜網は網目、層状構造で房水が流れる孔があるが、傍シュレム管結合組織はさまざまな種類の細胞外マトリックスと線維芽細胞様の細胞突起を有する細胞から形成されており、房水が流れる孔はなく、房水は組織の細胞外マトリックスの間を通過する。正常眼における検討では、傍シュレム管結合組織に流出抵抗の大部分が存在すると考えられている。線維柱帯のビーム構造は、細胞外マトリックスとプロテオグリカンから構成され、その周囲を基底膜構成蛋白質が覆っている。さらにその基底膜を取り巻いて単層の線維柱帯細胞が連続して覆っており、細胞—細胞間、および細胞と線維柱帯ビームは種々の細胞接着因子で接着している。

線維柱帯細胞はさまざまな分解酵素あるいは抗分解酵素活性を有しており、貪食能が認められ、それ自体が細胞外マトリックス産生と再構成に関与していることが指摘されている。線維柱帯細胞そのものが房水流出抵抗の調節にどのように関与しているかについて、詳細は明らかではないが、緑内障において、これら酵素の発現の変化が細胞外マトリックスの代謝に影響を与えて、隅角線維柱帯での房水流出抵抗を増加させていると考えられている³⁾。正常眼では線維柱帯ビーム間には十分な間隙があるが、緑内障では線維柱帯細胞の病的な減少により、線維柱帯細胞に覆われない露出したビームが観察される。また、残された線維柱帯細胞は活性化し、異常な細胞外マトリックスを産生し、それに伴ういっそうの線維柱帯間隙の狭小化が観察され、結果として房水の流出抵抗が起こる可能性が示唆されている⁴⁾。

経シュレム管房水流出路については、上述したように、その解剖学的解明は進んでいるが、房水流出を調節している生理学的機序はまだ不明な点が多い。こういったなかで、近年、線維柱帯細胞自体の収縮や弛緩、活性の変化が線維柱帯経路の房水流出制御にかかわっていることが注目されている。詳細な機序はまだ明らかとなっていないが、Bill と Bárány らが、エピネフリンが線維柱帯の収縮力を制御して眼圧を下降させている可能性を示唆し、後にそれは cAMP を介していることが報告され⁵⁾⁶⁾、虹彩および毛様体筋は関与していないことが報告された⁷⁾⁸⁾。その後、細胞質分裂阻害薬であるサイトカラシン B が、毛様体筋に関与しない状態の摘出眼で房水流出を増加させること⁹⁾、培養線維柱帯細胞において、細胞形態の変化、アクチンフィラメントの再構成を来すことが報告された¹⁰⁾¹¹⁾。この他、マイクロフィラメント組織化の強力な阻害薬である latrunculin¹²⁾、ボツリヌス菌菌体外酵素 C 3¹³⁾ など、細胞骨格を再構成する化合物が房水流出を増加させることが報告された。このよ

うに、線維柱帯における細胞骨格の安定は房水流出を減少させ、細胞骨格が再編成されることにより房水流出が増大することが示唆されており¹⁴⁾、細胞骨格制御をターゲットとした眼圧下降が新しい眼圧下降機序として注目を集めている。この眼圧下降機序が、線維柱帯細胞そのものへの作用によるものなのか、細胞マトリックスとの相互作用への影響であるか、もしくは線維柱帯全体の収縮弛緩によるものであるのかはまだ明らかではない。

III ROCK の機能

低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho は 1985 年に同定されて以来、アクチン細胞骨格の再編成を介して、細胞運動・接着、細胞質分裂など多くの細胞反応に寄与していることが報告されている。現在までに複数の Rho の標的蛋白質が同定されているが¹⁵⁾、そのなかでも ROCK は最も解析が進んでいる標的分子であり、活性型 Rho に選択的に結合し、活性化されるセリン・スレオニンキナーゼである¹⁶⁾。哺乳類では ROCK-I、ROCK-II のアイソフォームの発現が認められており(以下 ROCK と総称する)、ROCK はリン酸化活性依存的にさまざまなアゴニスト刺激による細胞内情報伝達経路に介在することで、収縮、増殖、遊走など種々の細胞の生理機能の調節を行っている。ROCK のリン酸化基質としていくつかの分子が同定されているが、なかでも ROCK は、ミオシン軽鎖(myosin light chain: MLC)を直接リン酸化することで、もしくはミオシンホスファターゼのミオシン結合サブユニット(myosin binding subunit of phosphatase: MBS)をリン酸化し、ミオシンホスファターゼの活性を抑制することで、細胞内のリン酸化 MLC を増加させる。結果、Rho—ROCK シグナル伝達経路はアクトミオシン系を介する細胞の収縮力を調節している。最も顕著な表現型として、培養線維芽細胞や上皮系細胞などでは、Rho の活性化に伴ってアクチンストレス線維の増生が観察される。Y-27632 は薬効スクリーニングにより ROCK の選択的阻害薬であることが判明した化合物で¹⁷⁾、濃度依存的に ROCK-I/ROCK-II を阻害するが、protein kinase C、A-kinase および MLCK に対する阻害作用は ROCK と比較して 200 倍以上弱いことが知られている。Y-27632 は ROCK を阻害することにより平滑筋弛緩作用を示す他、多くの細胞において運動や形態変化に関与していることが判明しており、抗高血圧作用、癌転移抑制など、さまざまな病態について検討されている¹⁷⁾¹⁸⁾。

ROCK 阻害薬としては、既にくも膜下出血後の脳血管攣縮の寛解剤として臨床応用されているファスジル(HA-1077)や、ROCK 阻害作用がより強力である Wf-536(Y-27632 より 2~3 倍強力)、Y-39983(Y-27632 より約 30 倍強力)などがあるが、これらは ROCK-I/-II を同一濃度で阻害し、ROCK 選択性も Y-27632 と同程度

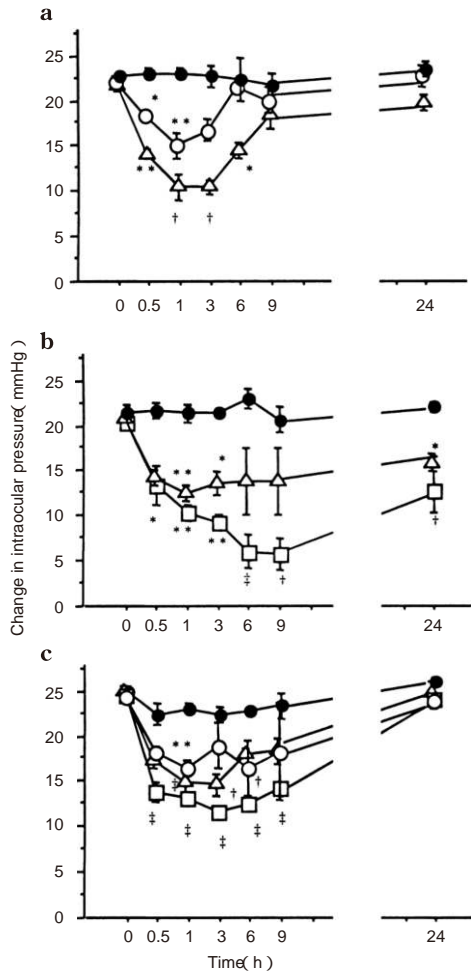


図 2 Y-27632 の眼圧下降効果.

家兎眼における Y-27632 の眼圧下降効果. 点眼 (a), 硝子体投与 (b), 前房内投与 (c) により, 濃度依存的に有意な眼圧下降効果を認めた. a : ● 対照, ○ 10 μ M, △ 100 μ M. b, c : ● 対照, ○ 1 μ M, △ 10 μ M, □ 100 μ M. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, † : $p < 0.005$, ‡ : $p < 0.001$.

(文献 20 より許可を得て転載, 一部改変)

であることが知られている.

IV ROCK 阻害薬の眼圧下降効果

房水中には, 血清蛋白質を含めてさまざまな生理活性物質が含有されており, 房水流出路は恒常的にその影響下にあり, 線維柱帯細胞はこれらの成分に対して細胞外マトリックスの産生や分解, 生物活性などに関与していると考えられる. 緑内障の房水中では種々の増殖因子, サイトカインの増加, もしくは減少が報告されている¹⁹. それら生理活性物質のなかでも, transforming growth factor- β (TGF- β), リゾリン脂質であるリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid : LPA), スフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate : S1P) などは Rho を活性化することが知られている. Rho は上述のとおり収縮, 増殖, 遊走など細胞のさまざまな生理機能に

表 1 Y-27632 の房水動態への影響

	房水流出率 (μ l/min/mmHg)	ぶどう膜強膜流出量 (μ l/min)
Y-27632	0.24 ± 0.02	0.60 ± 0.05
対照	0.12 ± 0.01	0.46 ± 0.04
有意差	$p < 0.001$	有意差なし

房水流出率は主に経シュレム管房水流出量を表すと考えられており, Y-27632 点眼により房水流出率の有意な増加を認めた. ぶどう膜強膜流出量は有意な変化を認めなかった.

(文献 20 より許可を得て転載, 一部改変)

深く関与していることが明らかとなっており, 房水流出路において, 細胞の収縮力を調節し, 房水流出に影響を及ぼす可能性が考えられた. その下流である Rho—ROCK シグナル伝達は, 房水流出路において, 眼圧調節機構に重要な役割を果たしていると考えられる.

そこで我々は, 研究開始時点で最も選択性が高く, 強力な阻害効果を有していた ROCK の選択的阻害薬 Y-27632 を家兎眼に投与したところ, 眼内投与のみでなく点眼でも有意な眼圧下降効果をもつことを明らかにした²⁰ (図 2). この眼圧下降効果は濃度依存的であった. 房水動態を調べたところ, 経シュレム管房水流出路の房水流出が有意に増加していたため (表 1), 次に線維柱帯細胞に対する Y-27632 の影響を検討した. 培養ヒト線維柱帯細胞を用いた *in vitro* の検討では, Y-27632 は細胞骨格や接着斑の分布, 細胞形態, 遊走能, 細胞収縮, 細胞外マトリックスとの相互関係²¹などの多様な機能に影響を与えていることを明らかにした (図 3). これらについては, Rho キナーゼ阻害薬 HA1077, ミオシン軽鎖キナーゼ阻害薬 ML-9 についても同様の結果を認めた^{22,23}. 他の研究グループからも ROCK 阻害薬の眼圧下降効果が報告され²⁴, その後の研究により, サル眼においても有意な眼圧下降が報告された²⁵. また, 家兎眼では毛様筋の弛緩効果もみられたことから, ぶどう膜強膜房水流出路への関与も考えられたが, ヒトにおいては ROCK 阻害薬の作用点は経シュレム管房水流出路が主なものと考えられている²⁶.

また, アゴニストである LPA や S1P により Rho を活性化すると房水流出は低下することが報告されており²⁷, Rho 活性のコントロールにより房水流出が制御できる可能性が示唆されている.

ROCK 阻害薬の眼圧下降効果については, ヒトへの臨床応用に向けて臨床治験が進められている. 従来の Y-27632 と同等の選択性を持ち, 約 30 倍の ROCK 阻害効果を有することから²⁵, 臨床治験においては, 新たに合成された Y-39983 が用いられた. 現在のところ健常眼において, 単回試験および複数回点眼試験において,

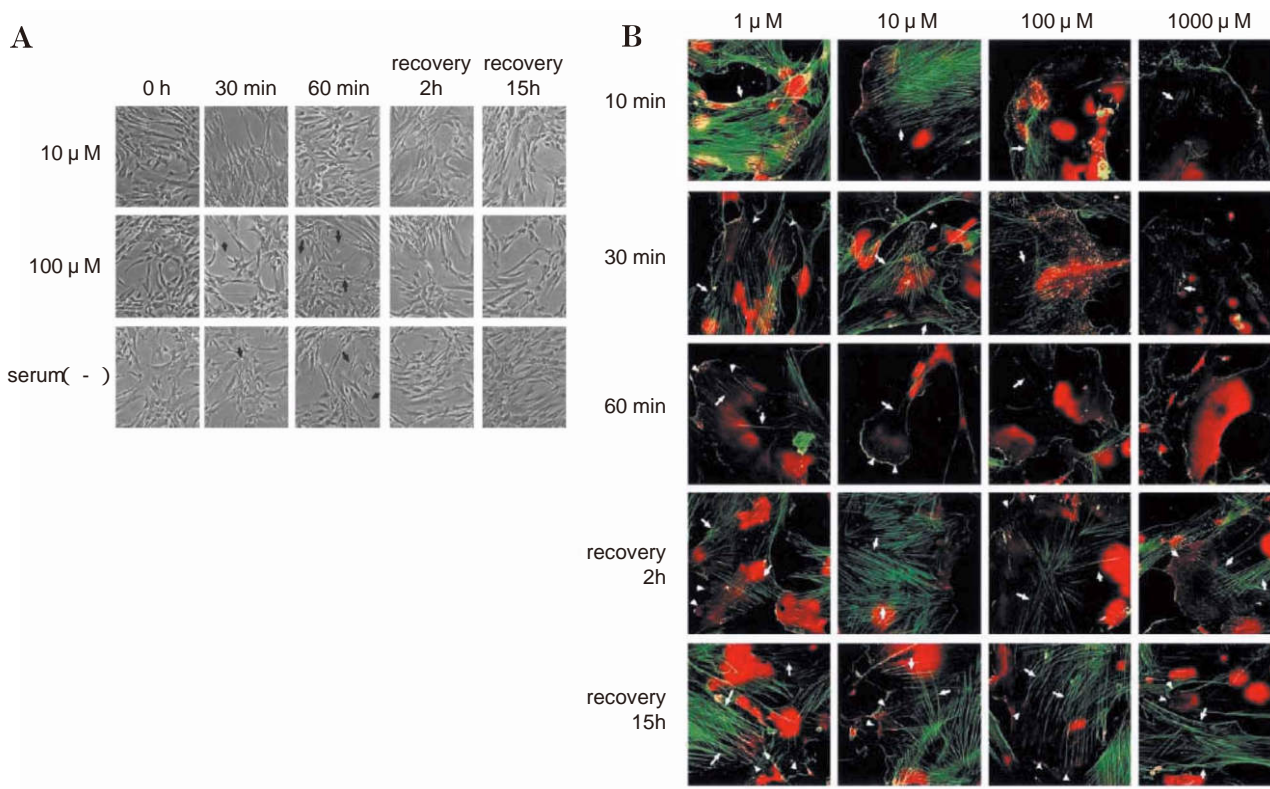


図 3 培養線維柱帯細胞における Y-27632 による細胞形態変化と細胞骨格の再構成。

A : 培養ヒト線維柱帯細胞に Y-27632 を添加したところ、細胞形態の変化がみられた。この変化は薬物除去(recovery)により可逆性であった(倍率×60)。

B : 培養ヒト線維柱帯細胞における細胞骨格の分布。Y-27632 添加によりアクチンストレスファイバー(F-actin/緑)と細胞接着斑(vinculin/赤)の分布の再構成がみられた。この変化は薬物除去(recovery)により可逆性の変化であることが確認された。Bar : 10 μm 。

(文献 20 より許可を得て転載、一部改変)

有意な眼圧下降効果が示されている²⁸⁾。動物実験では高濃度頻回点眼において軽度の結膜充血と点状出血を認めしたが、臨床治験においては、単回点眼試験および複数回投与試験において、点眼後に軽度球結膜充血を認めたが、点状出血は現在のところまったく認めていない。また、角膜、前房、硝子体・網膜においても有意な副作用はなく、全身的な副作用も観察されなかった。Rho は幅広い薬理学的特性をもつことから副作用が懸念される場所だが、眼科領域では局所投与が可能であるため、必要以上の副作用は回避できると考えられる。Rho 阻害により有意な眼圧下降効果が得られることは、緑内障治療の新たな治療標的となりうるということが示唆される。

V 濾過胞創傷治癒機転の生理

薬物療法で十分な眼圧下降を得られない場合に手術療法が必要となる。線維柱帯切除術は確実な眼圧下降を得られる術式として、広く行われている緑内障手術である。その奏功機序は房水を眼外に導き、適切な結膜濾過胞を得ることにあり、濾過胞の創傷治癒機転の制御は手術成績に非常に重要である。濾過胞癒着化においては、さまざまなサイトカインや細胞が関与するが、そのなか

でも癒着形成・組織収縮に深くかかわる線維芽細胞の消長を薬理的に制御する目的でフルオロウラシル(5-fluorouracil : 5-FU)、マイトマイシン C などの線維芽細胞増殖抑制薬が導入され、手術成績は飛躍的に改善されたが、結果得られる虚血性の濾過胞のため、晩期濾過胞漏出や濾過胞感染などの合併症のリスクも同時に高まった²⁹⁾。

術中、術直後に強膜弁周囲や結膜創周囲には血管から漏出する末梢血成分が存在し、組織は種々の炎症細胞や線維芽細胞が産生分泌するサイトカインや成長因子の影響下におかれることになる³⁰⁾。血清成分に含まれる血小板や活性化された補体は凝血に働く他、前者は TGF- α や β , S1P や血小板由来成長因子(platelet derived growth factor : PDGF)などを中心とする生理活性物質を放出し、後者はアラキドン酸代謝を活性化することが知られている。これらの反応により、好中球や単球などの炎症細胞の組織への遊走が惹起され、後者が活性化したマクロファージは線維芽細胞やその他の炎症細胞の遊走を惹起、活性化する。また、少し遅れてリンパ球、なかでも T 細胞が遊走し、活性化 T 細胞は種々のサイトカインを放出して、マクロファージ同様、線維芽細胞の

遊走や増殖を制御する。活性化された線維芽細胞はコラーゲンなどの細胞外マトリックスを産生分泌して線維化に働くのみならず、種々のサイトカインを分泌し、さらに創傷治癒機転を制御する。また、Rho のアゴニストである LPA は細胞の増殖、遊走などにかかわる強力な生理活性脂質であるが、房水中に存在する他²⁶⁾、血清中に大量に存在するため、術中、術直後には強膜弁周囲や結膜創周囲は LPA の影響下にあると考えられる。

活性化した線維芽細胞が産生分泌する細胞外マトリックスは線維化および組織収縮に働くが、細胞外マトリックス分解酵素はテノン線維芽細胞の収縮・コラーゲン分泌を抑制することが報告されている³¹⁾。ROCK 阻害薬は線維芽細胞において細胞外マトリックス分解酵素の発現を抑制すること、細胞外マトリックスの分泌を低下させることが報告されている³²⁾。

また、線維芽細胞が種々の刺激で筋細胞系に形質転換し、組織癒痕化や癒痕組織収縮の際に発現される蛋白質として α -smooth muscle actin (α SMA) があり、これは筋線維芽細胞のマーカーとして用いられる。TGF- β は多くの細胞の分化や増殖を制御する他、細胞外マトリックスの産生などに関与していることが知られているが、結膜線維芽細胞において TGF- β の標的蛋白質である Smad の経路が α SMA の発現制御に関与していることが報告されている³³⁾。TGF- β シグナルが活性化すると Smad が細胞質から核へ移行し、他のさまざまな転写因子と複合体を形成することにより標的遺伝子の転写を活性化している。また、LPA, S1P などのアゴニスト刺激による Rho の活性化により、結膜線維芽細胞において α SMA 発現が惹起されることが報告されている³⁴⁾³⁵⁾。

これまでのところ、いくつかの阻害薬などの癒痕抑制効果が報告されているが、そのなかでも、細胞・動物実験を経て、臨床応用に向けての取り組みが行われているものとして、抗 TGF- β 2 モノクローナル抗体の癒痕形成抑制効果が報告されている³⁶⁾。術後の濾過胞癒痕化を創傷治癒機転の観点から制御しようとする試みは、シグナル伝達を解明していくことにより有望な可能性をもっていると考えられる。

これまで臨床で使用されてきた緑内障治療薬については、長期の使用により、防腐剤もしくは製剤そのものの影響から結膜や結膜下組織に慢性的な炎症が惹起され、濾過手術の効果を減弱させることが知られている³⁷⁾。ROCK 阻害薬が眼圧下降薬として臨床応用可能になれば、緑内障患者において長期使用することになり、その結膜や結膜下組織への影響は重要な検討課題となる。また、角膜その他の組織で創傷刺激により Rho の活性化が報告されており³⁸⁾、上述したように Rho の活性化は線維芽細胞の筋線維芽細胞への形質転換に関与している他、ROCK 阻害薬は細胞外マトリックス分解酵素を抑

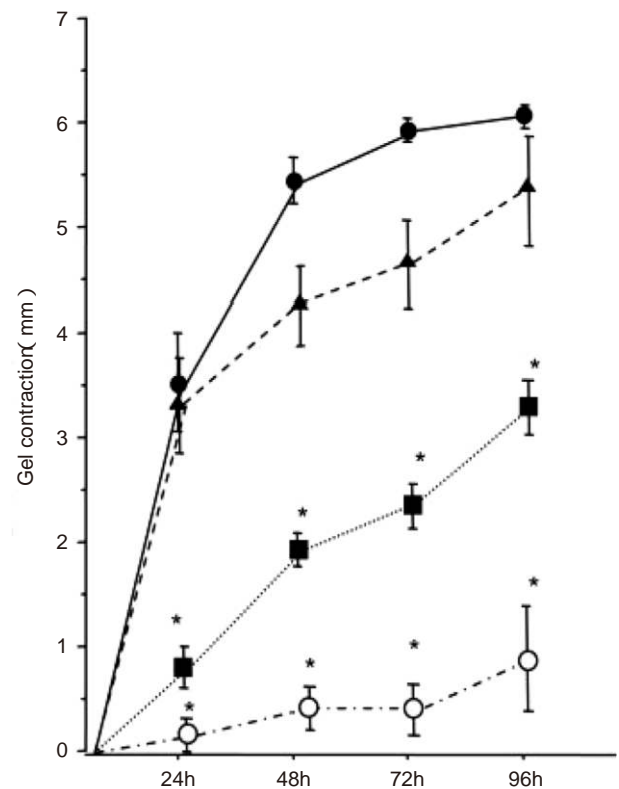


図 4 Y-27632 添加によるコラーゲンゲルの収縮への影響。

培養ヒトテノン囊線維芽細胞をコラーゲンゲル包埋培養したところ、Y-27632 添加により、濃度依存的にコラーゲンゲル収縮抑制がみられた。

● : 対照, ▲ : 1 μ M, ■ : 10 μ M, ○ : 100 μ M

* : $p < 0.001$ (一元配置分散分析法)

(文献 39 より許可を得て転載、一部改変)

制することから、癒痕形成に影響を及ぼす可能性が高いと考えられた。そこで我々は、ROCK 阻害薬が結膜癒痕形成にどのような影響を及ぼすかについて検討を行った。

VI ROCK 阻害薬による濾過胞癒痕抑制³⁹⁾

まず *in vitro* における、ROCK 阻害薬 Y-27632 のヒトテノン囊線維芽細胞への影響を検討した。ヒトテノン囊線維芽細胞 (human Tenon fibroblast : HTF) は白内障手術時に患者の同意のもと採取し、初代培養を行い、3~6 継代のものを使用した。

トリパンプルー細胞毒性試験、および MTT 細胞増殖能テストでは Y-27632 の有意な毒性および増殖能への影響は認めなかった。次に、Y-27632 添加による HTF の細胞外マトリックスへの接着能に対する影響を検討した。コラーゲン I とフィブロネクチンについて検討したところ、若干の接着能亢進を認めたが、濃度によっては有意なものではなかった。さらに、HTF をコラーゲンゲル中に培養し、Y-27632 添加によるコラーゲンゲルの収縮への影響を検討したところ、濃度依存的に、有意な

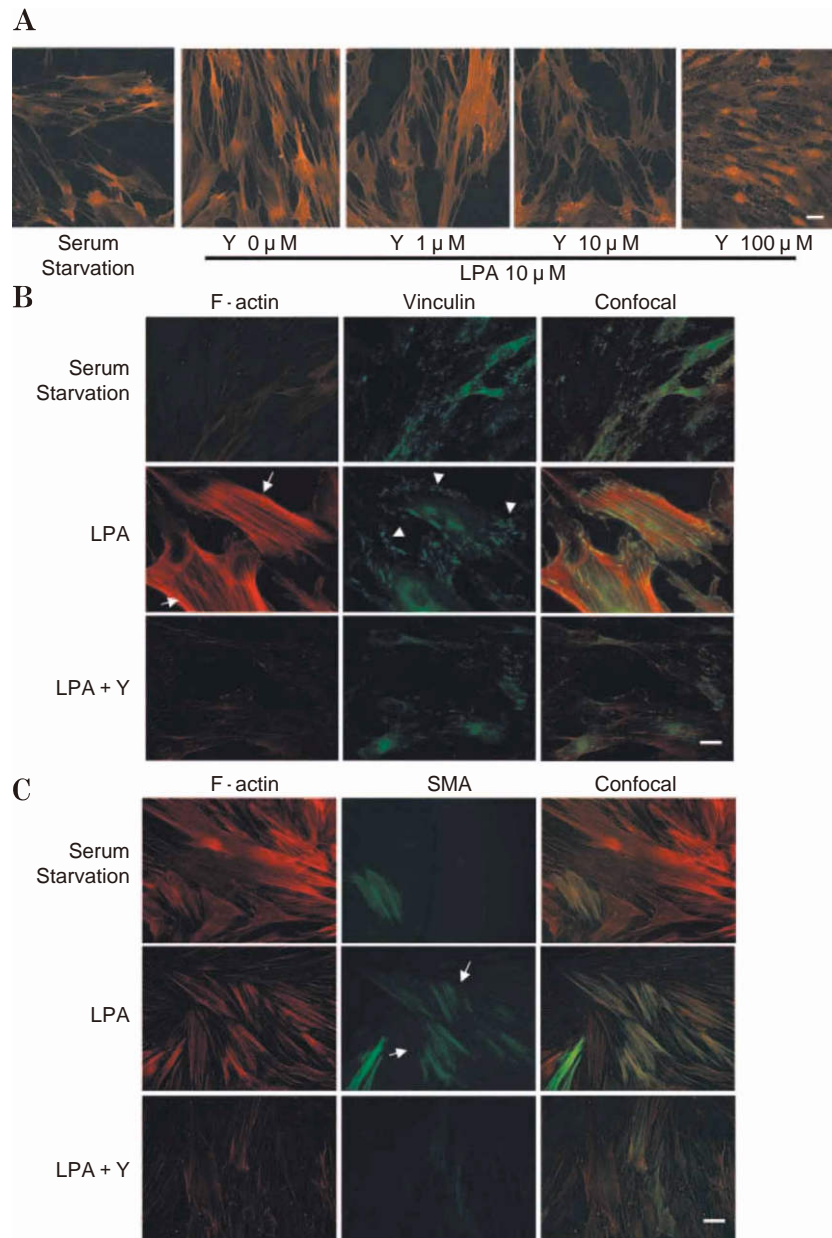


図 5 培養ヒトテノン嚢細胞における Y-27632 による細胞骨格の再構成。

- A : 培養ヒトテノン嚢線維芽細胞における phalloidin 染色. 血清除去した培地で培養した培養ヒトテノン嚢線維芽細胞に, アゴニストであるリゾホスファチジン酸(LPA)を添加し, Y-27632 添加したところ, アクチンストレスファイバーの再構成を伴う細胞形態の変化がみられた.
- B : 培養ヒトテノン嚢線維芽細胞における細胞骨格の分布. Y-27632 添加によりアクチンストレスファイバー(F-actin/赤)と細胞接着斑(vinculin/緑)の分布の再構成がみられた.
- C : 培養ヒトテノン嚢線維芽細胞における α -smooth muscle actin(α SMA)の発現変化. 血清除去した培地で培養した培養ヒトテノン嚢線維芽細胞に, アゴニストである LPA を添加したところ, α SMA 発現が惹起されたが, Y-27632 添加により α SMA 発現の抑制がみられた.

Bar : 50 μ m.

(文献 39 より許可を得て転載, 一部改変)

収縮抑制効果がみられた(図 4). また, HTF の細胞骨格, および α SMA 発現への Y-27632 の影響を検討するため, 免疫染色を行った. アゴニストとして LPA を添加したところ, HTF では α SMA の発現が惹起されたが, Y-27632 添加により発現は抑制された. また, アクチン線維(F-アクチン)を染色する phalloidin, 細胞接着

斑を染色する抗 vinculin 抗体を用いて細胞骨格の F-アクチン, 細胞接着斑の変化を検討したところ, Y-27632 添加により細胞骨格・細胞接着斑の再構成がみられた(図 5).

次に *in vivo* での Y-27632 の癒痕形成への影響について, 検討を行った. 家兎眼において, 実験的濾過手術と

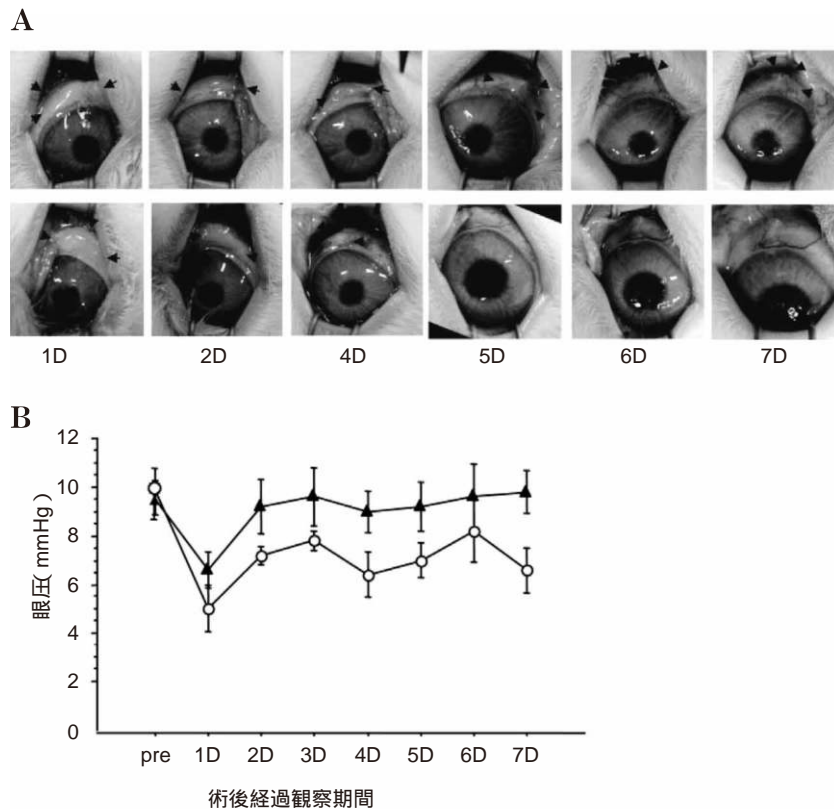


図 6 家兎眼濾過手術モデルにおける Y-27632 点眼による濾過胞と眼圧への影響。

A : 家兎眼濾過手術モデルの前眼部写真. 上パネル : Y-27632 投与群, 下パネル : 対照 (PBS 群). Y-27632 投与群で有意な濾過胞形状の保持を認めた.

B : 家兎眼濾過手術モデルの眼圧経過. 7 日間の経過観察期間を通じて, Y-27632 投与群で有意な眼圧下降を認めた ($p < 0.05$; 反復測定二元配置分散分析).

▲ : 対照 (PBS 群), ○ : Y-27632 投与群.

(文献 39 より許可を得て転載, 一部改変)

して強膜切除術 (sclerostomy) を行い, 7 日間 Y-27632 の点眼を行って, 対照群 (PBS 群) と比較した. 結果, Y-27632 点眼群で有意に濾過胞形状は保たれ, 瘢痕化の抑制がみられ, 経過観察期間中, 有意な眼圧下降が得られた (図 6). 前眼部炎症に有意差は認めなかった. 術後 7 日目の組織を観察したところ, 対照群ではコラーゲン沈着を伴う広範な瘢痕組織が結膜下に観察されたのに対し, Y-27632 点眼群では膠原線維 (コラーゲン) 沈着が抑制され, 瘢痕組織も比較的小さいものであった. また, 免疫染色において, 対照群では Y-27632 点眼群と比較して, 濾過胞部位, 結膜下組織で α SMA の染色性が亢進していることが観察された (図 7).

今回の検討はきわめて短期間の検討であり, 濾過胞に関しても機能面で有効なものを保つことができるかどうかの検討ができていない. 臨床的に有用な瘢痕抑制が可能であるかどうかについては今後の検討が必要と考えられるが, 本報告により ROCK 阻害薬が濾過手術術後瘢痕形成に対して有用である可能性が示唆された.

VII ROCK 阻害薬による神経保護治療・その他の眼治療の可能性

現在では眼圧上昇は病態の一つにすぎず, 緑内障は緑内障性視神経症を来す症候群として捉えられるようになっている. 眼圧は正常でも視野障害が進行する正常 (低) 眼圧緑内障では, 眼圧以外に, 視神経における循環障害や視神経乳頭の脆弱性, 神経毒, 自己免疫など多因子が関与していると考えられている. 緑内障性視神経症は多因子による網膜神経節細胞のアポトーシスに起因することで現在のところコンセンサスが得られており, 神経保護治療は眼圧非依存性の緑内障のみならず, 眼圧依存性の緑内障に対しても治療効果が期待できると考えられている. 今日までの動物モデルやヒトにおける検討により, Rho は緑内障・角膜・硝子体疾患などさまざまな眼組織で疾患の病態に関与しており⁴⁰⁾⁴¹⁾, ROCK 阻害薬がそれらの疾患の治療に有用である可能性が示唆されている. ROCK 阻害薬による緑内障における神経保護の可能性については, ROCK 阻害薬の局所投与により, 眼血流の改善⁴²⁾, 網膜虚血再灌流後の網膜神経節細胞死

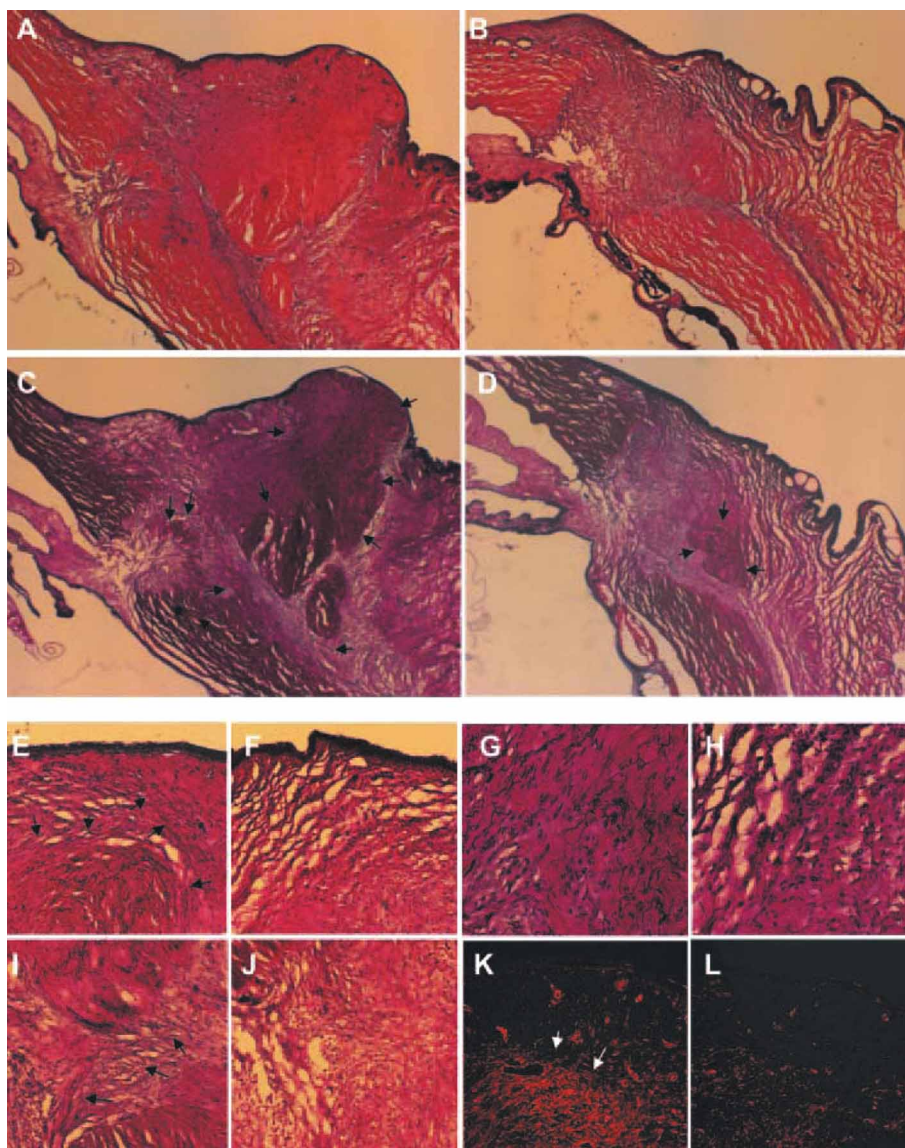


図 7 家兎眼濾過手術モデルにおける Y-27632 点眼による濾過胞組織への影響。

ヘマトキシリン・エオジン染色において、対照 (PBS 群) で結膜下に広範な癒痕組織を認めたが (A), Y-27632 投与群では結膜下癒痕組織は小さかった (B)。エラスチカワンギーソン染色では対照 (PBS 群) で結膜下癒痕組織に多量の膠原線維 (コラーゲン) の沈着を認めたが (C, 黒矢印), Y-27632 投与群では膠原線維の沈着は抑制されていた (D, 黒矢印)。対照 (PBS 群) で結膜下癒痕組織に膠原線維の沈着と線維芽細胞を認めたのに対し (E, 黒矢印), Y-27632 投与群では結膜下組織は比較的粗で (F), 対照 (PBS 群) で強膜窓が膠原線維でブロックされていたのに対し (I, 黒矢印), Y-27632 投与群では強膜窓部分も粗な組織がしめていた (J)。対照 (PBS 群) の濾過胞内 (G) には, Y-27632 投与群 (H) と比較して, 多量の膠原線維が沈着していた。Y-27632 投与群 (L) と比較して, 対照 (PBS 群) の濾過胞は α SMA 発現が亢進していた (K, 白矢印)。

倍率は A~D : 25 倍, E, F, K, I : 100 倍, G~J : 200 倍。

(文献 39 より許可を得て転載, 一部改変)

の抑制⁴³⁾, NMDA 網膜障害に対する神経保護効果⁴⁴⁾などが報告されており, 今後の研究の発展が期待される。

VIII おわりに

以上, 房水流出路の生理機能・創傷治癒機転と Rho—ROCK シグナル伝達の関与について, 我々がこれまでに得た知見を中心に概説した。房水流出・創傷治癒機転とも, 制御している分子機構は複雑であり, 詳細はまだ

不明な点が多い。Rho—ROCK シグナル伝達の関与についても, まだまだ明らかにしなければならない点が多い。しかし, 確実な眼圧下降効果をはじめとする幅広い薬理学的特性から, 眼科領域において, ROCK 阻害薬が有用な効果を発揮することは明らかと考えられる。今後さらなる検討が行われ, ROCK 阻害薬の眼科領域における臨床応用が可能となることを期待したい。

文 献

- 1) **Iwase A, Suzuki Y, Araie M, Yamamoto T, Abe H, Shirato S, et al : Tajimi Study Group, Japan Glaucoma Society** : The prevalence of primary open-angle glaucoma in Japanese : the Tajimi Study. *Ophthalmology* 111 : 1641—1648, 2004.
- 2) 日本緑内障学会緑内障診療ガイドライン作成委員会 : 緑内障ガイドライン(第2版). *日眼会誌* 110 : 777—814, 2006.
- 3) **Sawaguchi S, Yue BY, Kawa JE, Chang IL, Twining SS, Meberg B** : Lysosomal enzyme and inhibitor levels in the human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 : 251—261, 1994.
- 4) **Alvarado JA, Yun AJ, Murphy CG** : Juxtacanalicular tissue in primary open angle glaucoma and in nonglaucomatous normals. *Arch Ophthalmol* 104 : 1517—1528, 1986.
- 5) **Neufeld AH, Jampol LM, Sears ML** : Cyclic-AMP in the aqueous humor : the effects of adrenergic agonists. *Exp Eye Res* 14 : 242—250, 1972.
- 6) **Neufeld AH, Sears ML** : Adenosine 3',5'-monophosphate analogue increases the outflow facility of the primate eye. *Invest Ophthalmol* 14 : 688—689, 1975.
- 7) **Kaufman PL, Bárány EH** : Adrenergic drug effects on aqueous outflow facility following ciliary muscle retrodisplacement in the cynomolgus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20 : 644—651, 1981.
- 8) **Kaufman PL, Rentzhog L** : Effect of total iridectomy on outflow facility responses to adrenergic drugs in cynomolgus monkeys. *Exp Eye Res* 33 : 65—74, 1981.
- 9) **Kaufman PL, Bárány EH** : Cytochalasin B reversibly increases outflow facility in the eye of the cynomolgus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16 : 47—53, 1977.
- 10) **Weinreb RN, Ryder MI, Polansky JR** : The cytoskeleton of the cynomolgus monkey trabecular cell II. Influence of cytoskeleton-active drugs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27 : 1312—1317, 1986.
- 11) **Ryder MI, Weinreb RN, Alvarado J, Polansky J** : The cytoskeleton of the cultured human trabecular cell. Characterization and drug responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29 : 251—260, 1988.
- 12) **Peterson JA, Tian B, Geiger B, Kaufman PL** : Effect of latrunculin-B on outflow facility in monkeys. *Exp Eye Res* 70 : 307—313, 2000.
- 13) **Liu X, Hu Y, Filla MS, Gabelt BT, Peters DM, Brandt CR, et al** : The effects of C3 transgene expression on actin and cellular adhesions in cultured human trabecular meshwork cells and on outflow facility in organ cultured monkey eyes. *Mol Vis* 11 : 1112—1121, 2005.
- 14) **Tian B, Geiger B, Epstein DL, Kaufman PL** : Cytoskeletal involvement in the regulation of aqueous humor outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 619—623, 2000.
- 15) **Narumiya S** : The small GTPase Rho : Cellular functions and signal transduction. *J Biochem* 120 : 215—228, 1996.
- 16) **Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, et al** : The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J* 15 : 1885—1893, 1996.
- 17) **Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, et al** : Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389 : 990—994, 1997.
- 18) **Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T, Narumiya S** : An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med* 5 : 221—225, 1999.
- 19) **Tamm ER, Fuchshofer R** : What increases outflow resistance in primary open-angle glaucoma? *Surv Ophthalmol* 52 : S 101—S 104, 2007.
- 20) **Honjo M, Tanihara H, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue BY, et al** : Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 : 137—144, 2001.
- 21) **Koga T, Koga T, Awai M, Tsutsui J, Yue BY, Tanihara H** : Rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, induces alterations in adhesion, contraction and motility in cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 82 : 362—370, 2006.
- 22) **Honjo M, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue BY, Honda Y, et al** : Effects of protein kinase inhibitor, HA1077, on intraocular pressure and outflow facility in rabbit eyes. *Arch Ophthalmol* 119 : 1171—1178, 2001.
- 23) **Honjo M, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue BY, Honda Y, et al** : A myosin light chain kinase inhibitor, ML-9, lowers the intraocular pressure in rabbit eyes. *Exp Eye Res* 75 : 135—142, 2002.
- 24) **Waki M, Yoshida Y, Oka T, Azuma M** : Reduction of intraocular pressure by topical administration of an inhibitor of the Rho-associated protein kinase. *Curr Eye Res* 22 : 470—474, 2001.
- 25) **Tokushige H, Inatani M, Nemoto S, Sakaki H, Katayama K, Uehata M, et al** : Effects of topical administration of y-39983, a selective rho-associated protein kinase inhibitor, on ocular tissues in rabbits and monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 3216—3222, 2007.
- 26) **Nakajima E, Nakajima T, Minagawa Y, Shearer TR, Azuma M** : Contribution of ROCK in contraction of trabecular meshwork : proposed mechanism for regulating aqueous outflow in monkey and human eyes. *J Pharm Sci* 94 : 701—708, 2005.
- 27) **Mettu PS, Deng PF, Misra UK, Gawdi G, Epstein DL, Rao PV** : Role of lysophospholipid growth factors in the modulation of aqueous humor outflow

- facility. Invest Ophthalmol Vis. Sci 45 : 2263—2271, 2004.
- 28) **Tanihara H, Inatani M, Honjo M, Tokushige H, Azuma J, Araie M** : Intraocular pressure-lowering effects and safety of topical administration of a selective ROCK inhibitor, SNJ-1656, in healthy volunteers. Arch Ophthalmol 126 : 309—315, 2008.
- 29) **Georgoulas S, Dahlmann-Noor A, Brocchini S, Khaw PT** : Modulation of wound healing during and after glaucoma surgery. Prog Brain Res 173 : 237—254, 2008.
- 30) **Chang L, Crowston JG, Cordeiro MF, Akbar AN, Khaw PT** : The role of the immune system in conjunctival wound healing after glaucoma surgery. Surv Ophthalmol 45 : 49—68, 2000.
- 31) **Daniels JT, Cambrey AD, Occleston NL, Garrett Q, Tarnuzzer RW, Schultz GS, et al** : Matrix metalloproteinase inhibition modulates fibroblast-mediated matrix contraction and collagen production *in vitro*. Invest Ophthalmol Vis Sci 44 : 1104—1110, 2003.
- 32) **Akhmetshina A, Dees C, Pileckyte M, Szucs G, Spriewald BM, Zwerina J, et al** : Rho-associated kinases are crucial for myofibroblast differentiation and production of extracellular matrix in scleroderma fibroblasts. Arthritis Rheum 58 : 2553—2564, 2008.
- 33) **Vardouli L, Vasilaki E, Papadimitriou E, Kardasis D, Stournaras C** : A novel mechanism of TGF β -induced actin reorganization mediated by Smad proteins and Rho GTPases. FEBS J 275 : 4074—4087, 2008.
- 34) **Yin Z, Tong Y, Zhu H, Watsky MA** : CIC-3 is required for LPA-activated Cl-current activity and fibroblast-to-myofibroblast differentiation. Am J Physiol Cell Physiol 294 : C 535—542, 2008.
- 35) **Swaney JS, Moreno KM, Gentile AM, Sabbadini RA, Stoller GL** : Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a novel fibrotic mediator in the eye. Exp Eye Res 87 : 367—375, 2008.
- 36) **Cordeiro MF, Gay JA, Khaw PT** : Human anti-transforming growth factor- β 2 antibody : a new glaucoma anti-scarring agent. Invest Ophthalmol Vis Sci 40 : 2225—2234, 1999.
- 37) **Broadway D, Grierson I, Hitchings R** : Adverse effects of topical antiglaucomatous medications on the conjunctiva. Br J Ophthalmol 77 : 590—596, 1993.
- 38) **Yin J, Lu J, Yu FS** : Role of small GTPase Rho in regulating corneal epithelial wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci 49 : 900—909, 2008.
- 39) **Honjo M, Tanihara H, Kameda T, Kawaji T, Yoshimura N, Araie M** : Potential role of Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 in glaucoma filtration surgery. Invest Ophthalmol Vis Sci 48 : 5549—5557, 2007.
- 40) **Yin J, Yu FS** : Rho kinases regulate corneal epithelial wound healing. Am J Physiol Cell Physiol 295 : C 378—387, 2008.
- 41) **Kita T, Hata Y, Arita R, Kawahara S, Miura M, Nakao S, 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.
- 42) **Rao VP, Epstein DL** : Rho GTPase/Rho kinase inhibition as a novel target for the treatment of glaucoma. BioDrugs 21 : 167—177, 2007.
- 43) **Hirata A, Inatani M, Inomata Y, Yonemura N, Kawaji T, Honjo M, 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.
- 44) **Kitaoka Y, Kitaoka Y, Kumai T, Lam TT, Kuribayashi K, Isenoumi K, et al** : Involvement of RhoA and possible neuroprotective effect of fasudil, a Rho kinase inhibitor, in NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. Brain Res 1018 : 111—118, 2004.
-