

## 平成 22 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

糖尿病性網膜微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

有田 量一

九州大学大学院医学研究院眼科学分野

## 要 約

糖尿病罹患率の増加とともにその眼合併症である糖尿病網膜症(以下, 網膜症)を有する患者も増加の一途を辿っている。しかしながら, その病態解明と治療法開発は未だ十分とはいえず, メカニズムに基づいた予防的治療法確立には至っていないのが現状である。本研究では糖尿病と関連した網膜微小血管障害における Rho/Rho-kinase (ROCK) 経路の関与と選択的 ROCK 阻害薬 fasudil による病態制御の可能性について検討を行った。糖尿病網膜症の発症早期の病態に白血球の網膜血管内皮細胞への接着とそれに伴う血管内皮細胞傷害が少なからず関与しているが, 本研究ではまず糖尿病ラットの網膜微小血管において Rho/ROCK 経路が活性化されていることを明らかにした。さらに, 選択的 ROCK 阻害薬である fasudil が糖尿病ラットで亢進している網膜血管への白血球接着を抑制するだけでなく, 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, 白血球接着による内皮細胞傷害

に対して保護的な作用をも有していることを明らかにした。網膜症患者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剤である L-NAME を用いてそのメカニズムについて検討を加えた結果, fasudil は内皮細胞において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。これらの結果から糖尿病性網膜微小血管障害の病態に Rho/ROCK 経路が重要な役割を果たしており, ROCK 阻害薬が糖尿病網膜症発症早期における新しい治療戦略となる可能性が示唆された。(日眼会誌 115: 985—997, 2011)

キーワード: 糖尿病網膜症, 糖尿病性微小血管障害, Rho-kinase 阻害薬, 内因性一酸化窒素合成酵素, Fas/Fas Ligand

## A Review

Mechanism of Diabetes-induced Microvascular Damage  
and Therapeutic Potential of ROCK Inhibition

Ryoichi Arita

Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

## Abstract

The rapid increase in diabetic retinopathy (DR), a common ocular complication of diabetes mellitus, necessitates the development of new therapeutic strategies for the amelioration and treatment of DR, especially in the earlier stages. In the present study, involvement of the Rho/Rho-kinase (ROCK) pathway in diabetic microvasculopathy and the therapeutic

potential of fasudil, a selective ROCK inhibitor, were investigated. Retinal microvascular damage secondary to increased leukocyte adhesion substantially contributes to DR in its early stages. Significant Rho/ROCK activation was observed in the retinal microvasculature of diabetic rats. The ROCK inhibitor, fasudil, protects the vascular endothelium by inhibit-

別刷請求先: 812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1 九州大学医学部臨床研究棟 A 棟 6 階眼科医局 九州大学病院眼科

有田 量一 E-mail: r-arita@med.kyushu-u.ac.jp

(平成 23 年 3 月 31 日受付, 平成 23 年 6 月 29 日改訂受理)

Reprint requests to: Ryoichi Arita, M. D., Ph. D. Department of Ophthalmology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

(Received March 31, 2011 and accepted in revised form June 29, 2011)

ing leukocyte adhesion and reducing leukocyte-induced endothelial injury mediated through the restoration of endothelial nitric oxide synthase activity, in the retinas of diabetic rats. In co-culture assay of DR leukocytes and microvascular endothelial cells, we investigated the protective mechanisms of fasudil on endothelial damage using L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase. Leukocytes from DR patients caused endothelial apoptosis via Fas/FasL interaction, which was significantly reduced by a ROCK inhibition dependent on nitric oxide. 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.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 115 : 985—997, 2011)

**Key words :** Diabetic retinopathy, Diabetic microvascular damage, Rho-kinase inhibitor, Endothelial nitric oxide synthase, Fas/Fas Ligand

## I はじめに

糖尿病網膜症(以下、網膜症)は視力低下に至る糖尿病の主要な合併症の一つである<sup>1)</sup>。網膜症発症早期の非増殖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、この段階では視力はまだ保たれていることが多い。しかし、進行期の増殖糖尿病網膜症(PDR)になると新生血管の破裂による硝子体出血や増殖膜の収縮による牽引性網膜剥離、増殖硝子体網膜症(PVR)によって著しい視力低下を来す。

進行期のPDRに対して行われる網膜硝子体手術は近年飛躍的な進歩を遂げたが、未だ満足のいく視力を得られていないのが現状である。また、たとえ定期的な眼科的検査によって発症早期の網膜症が発見されたとしても、眼科医がその進行を予防する手段はなく、血糖<sup>2)</sup>や血圧<sup>3)</sup>といった内科的な全身管理が唯一のエビデンスのある予防的手段である。それ故、網膜症の病態について理解を深め、メカニズムに基づいた予防的治療法の開発が望まれている。Rho/Rho kinase(ROCK)は、1990年代半ば、低分子量GTP結合蛋白質Rhoの標的蛋白質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ROCKが平滑筋細胞の収縮や各種細胞の形態制御・遊走などの生理機能ばかりでなく<sup>4)~5)</sup>、脳・冠動脈攣縮<sup>6)</sup>や高血圧<sup>7)</sup>、動脈硬化<sup>8)</sup>などの心血管病をはじめとした種々の病態形成に深く関与することも明らかになってきている。眼科領域においては緑内障を標的とした治療薬の開発が進行中である<sup>9)</sup>が、我々は糖尿病網膜症においてもROCK活性化の関与を推測しており、選択的ROCK阻害薬fasudilが糖尿病網膜症の予防的治療薬になり得ないか、多面的に検討を進めている。

## II 増殖糖尿病網膜症とROCK

進行期のPDRでは硝子体中にさまざまな生理活性物質の発現が亢進し、眼内に増殖膜が形成され、さらに進行して増殖膜が瘢痕収縮することにより牽引性網膜剥離、PVRを来し視力低下に至る。我々はまずこの増殖膜の瘢

痕収縮に硝子体中の生理活性物質の中で特に、形質転換増殖因子- $\beta$ 2(TGF- $\beta$ 2)がその中心的役割を担っていることを明らかにした<sup>10)</sup>。しかしながら、TGF- $\beta$ のように恒常性維持にも重要な役割を果たしているような単一のサイトカインを治療標的とすることは思わぬ副作用を引き起こす危険性をはらんでいることから、我々はTGF- $\beta$ の機能の一部であり、細胞収縮に關与するROCK経路を標的として考えた。一連の研究によってROCK阻害薬fasudilがmyosin light chain(MLC)のリン酸化を抑制することで(図1B)、PDR硝子体液による硝子体細胞包埋ゲルにおける収縮過程を抑制した(図1A)。また、家兎PVRモデルにおいてもfasudilは病態の進行を著明に抑制することができることを明らかにした<sup>11)</sup>(図1C~E)。これらの結果からROCK阻害薬のPDRに伴う増殖膜収縮に対する新しい治療戦略として可能性が期待される。

## III 糖尿病性網膜細小血管障害とROCK

次に我々は網膜症発症早期の病態について理解を深め、網膜症のPDRへの進行を制御・予防することに目を向けた。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<sup>12)~13)</sup>。その接着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)の相互作用を介しており<sup>14)</sup>、接着後の内皮細胞傷害のメカニズムに白血球側のFas Ligand(FasL)と内皮側のFasとの相互作用の関与が実験動物レベルで明らかにされている<sup>15)</sup>。しかしながらヒトでの糖尿病性細小血管傷害のメカニズムについては未だ十分に解明されていない。

ROCK活性化がICAM-1やインテグリンなどの接着分子の発現や機能に影響を与え、白血球の微小血管内皮細胞への接着を促進することから<sup>16)~17)</sup>、我々はROCKが白血球の過剰な接着による網膜症早期の細小血管障害の病態に關与しているのではないかと推察し、一連の研

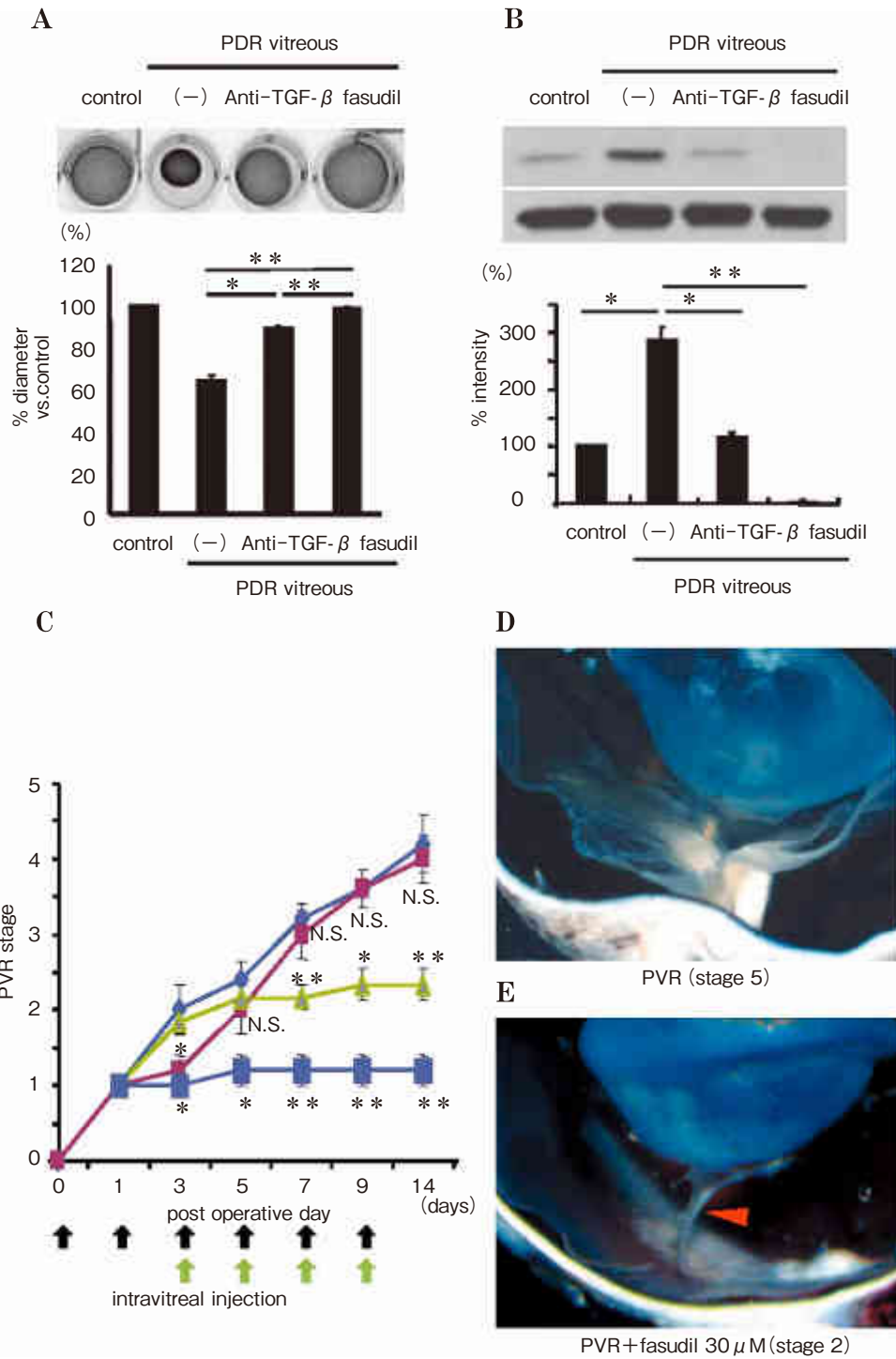


図 1 増殖糖尿病網膜症(PDR)硝子体液によって誘導される硝子体細胞を包埋したコラーゲンゲル収縮と家兎増殖硝子体網膜症(PVR)モデルに対する fasudil の抑制効果.

- A : PDR 硝子体液によって誘導される硝子体細胞を包埋したコラーゲンゲル収縮と fasudil による阻害作用. 硝子体手術の際に採取した硝子体液で 3 日間刺激後, ゲルの直径を測定し対照に対するパーセント比[% diameter vs. control(対照)]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, 各 n=3).
- B : Fasudil が myosin light chain(MLC)のリン酸化に与える影響. 硝子体液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)は対照に対するパーセント比で表した. 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, 各 n=3).
- C : Fasudil の家兎 PVR モデルに対する抑制効果. PVR モデルの stage 分類は, 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, 各 n=5). ◆ : control, ■ : fasudil 10 μM, ▲ : fasudil 30 μM (from stage 2), □ : fasudil 30 μM.
- D : 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癒痕・収縮によって網膜全剝離の状態になっている.
- E : 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.

(文献 11 の図 4, 図 5, 図 7 より許可を得て転載)

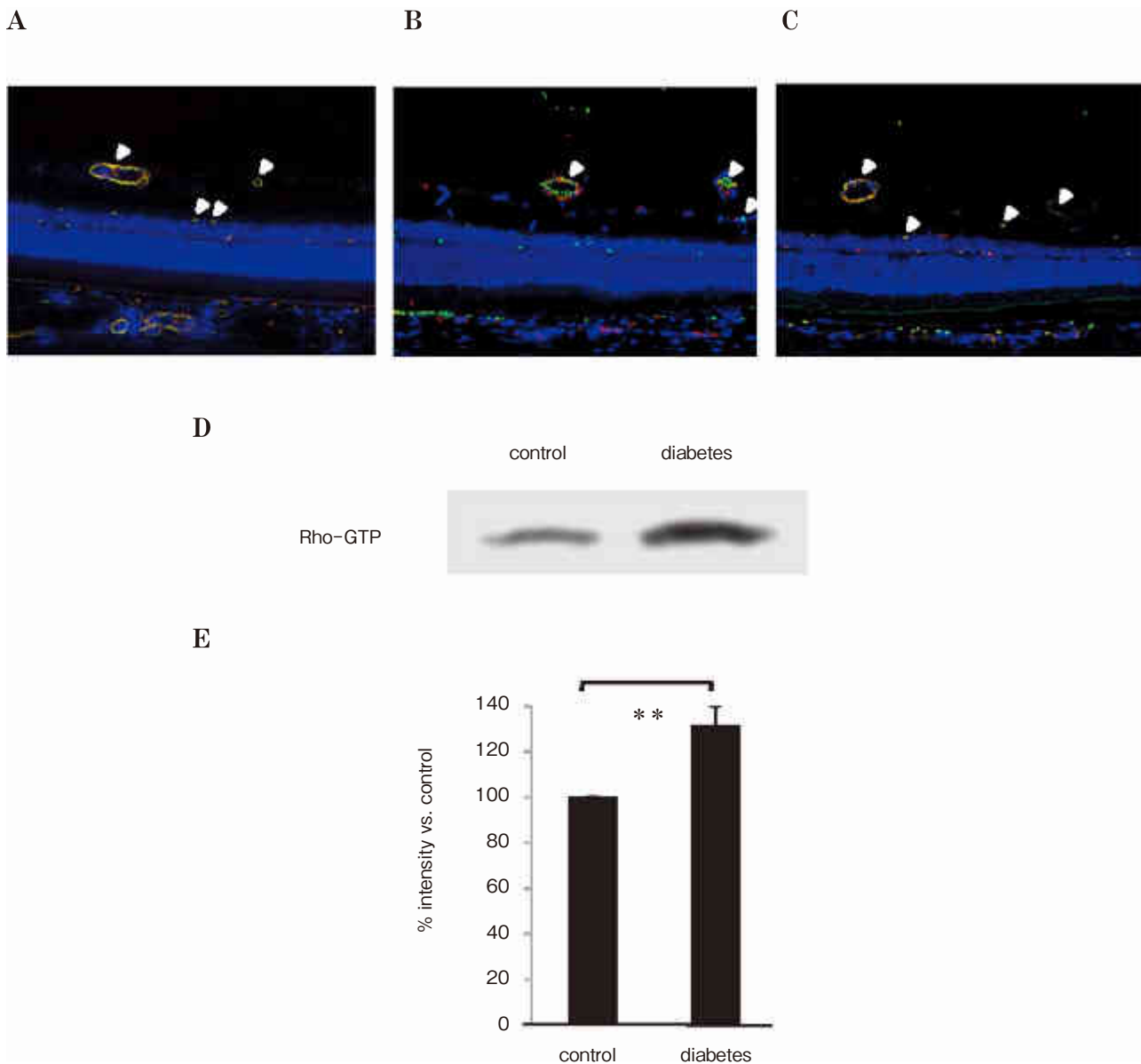


図 2 ラット網膜における RhoA, ROCK 1, ROCK 2 抗体に対する免疫組織化学的解析および Rho pull-down assay 法による Rho 活性の定量化.

A, B, C : パラフィン包埋した正常ラット網膜を RhoA (A), ROCK 1 (B), ROCK 2 (C) に対する抗体で免疫組織化学的に解析した. 血管内皮細胞は抗 CD 34 抗体 (赤) で染色, RhoA, ROCK 1, ROCK 2 は (緑) で染色, 黄色 (白色矢頭) が二重染色された血管.

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質である Rhotekin-アガロースに結合した Rho をウェスタンブロットティングで検出して Rho 活性を評価する方法) によって検出された正常対照 (control) およびストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット網膜 (diabetes) の Rho-GTP のレベルを示した典型的なプロット.

E : 平均信号強度 (% intensity) は正常対照 (control) に対するパーセント比で表した (\*\* :  $p < 0.01$ , 各  $n = 5$ ).

(文献 18 の図 1 より許可を得て転載)

究を行い, 以下の結果を得た<sup>18)</sup>.

まずこれまで明らかにされていない網膜における Rho/ROCK 関連蛋白質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, ROCK 1, ROCK 2 蛋白質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 2 A~C). さらに網膜における

Rho の活性を pull down assay 法で評価したところ, 対照ラットと比較してストレプトゾトシン (streptozotocin : 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 2 D, E). これらの所見は糖尿病の網膜血管系における ROCK 活性亢進を意味しており, ROCK 経路の糖尿病性細小血管異常への関与を示唆し



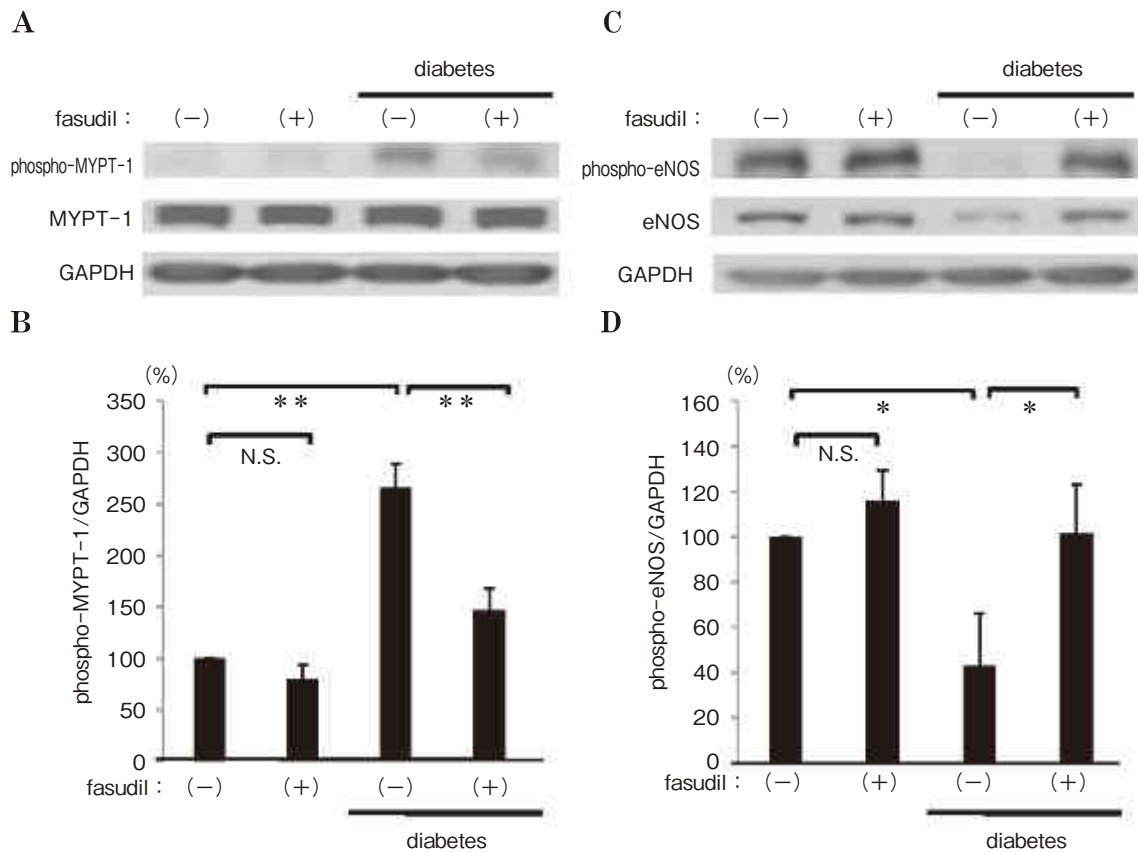


図 3 Fasudil の myosin phosphatase target protein-1 (MYPT-1) および内因性一酸化窒素合成酵素 (eNOS) リン酸化に与える影響。

正常およびストレプトゾトシン誘発糖尿病 (diabetes) ラット網膜における MYPT-1 (Thr 853) および eNOS (Ser 1177) リン酸化をウエスタンブロッティングで解析。レーンごとの蛋白質量の違いは 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。平均信号強度は対照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: 平均信号強度は対照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 18 の図 2 より許可を得て転載)

ている。

#### IV 糖尿病性網膜血管障害における ROCK 阻害薬の効果

糖尿病モデル動物を用いた実験で糖尿病の網膜血管系における ROCK 活性が亢進していたことから、網膜血管系において ROCK 経路を阻害することで糖尿病による網膜微小血管障害の進行を予防もしくは改善できるのではないかと考えた。Fasudil は MLC キナーゼやプロテインキナーゼ C などの他の経路に対して極微の効果しか示さない選択性の高い ROCK 阻害薬であり<sup>19)</sup>、心血管病治療において既に臨床的にもその安全性、有効性が認められている<sup>20)</sup>。

全身投与で硝子体中に期待した有効濃度を得ることは

難しく、対照および STZ 誘発糖尿病ラットに対して fasudil の眼内最終濃度が  $30 \mu\text{M}$  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。正常 (fasudil -/+), 糖尿病 (fasudil -/+ ) の 4 群に分け、投与開始 2 週後に網膜から蛋白質を抽出し、ROCK の下流シグナルである myosin phosphatase target protein-1 (MYPT-1) および内因性一酸化窒素合成酵素 (eNOS) リン酸化をウエスタンブロッティングで評価したところ、ROCK によってリン酸化される標的蛋白質 MYPT-1 は糖尿病でリン酸化が著明に亢進しており、fasudil 投与によって有意に低下した (図 3 A, B)。また ROCK によって脱リン化される 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 3 C, D)、これらの

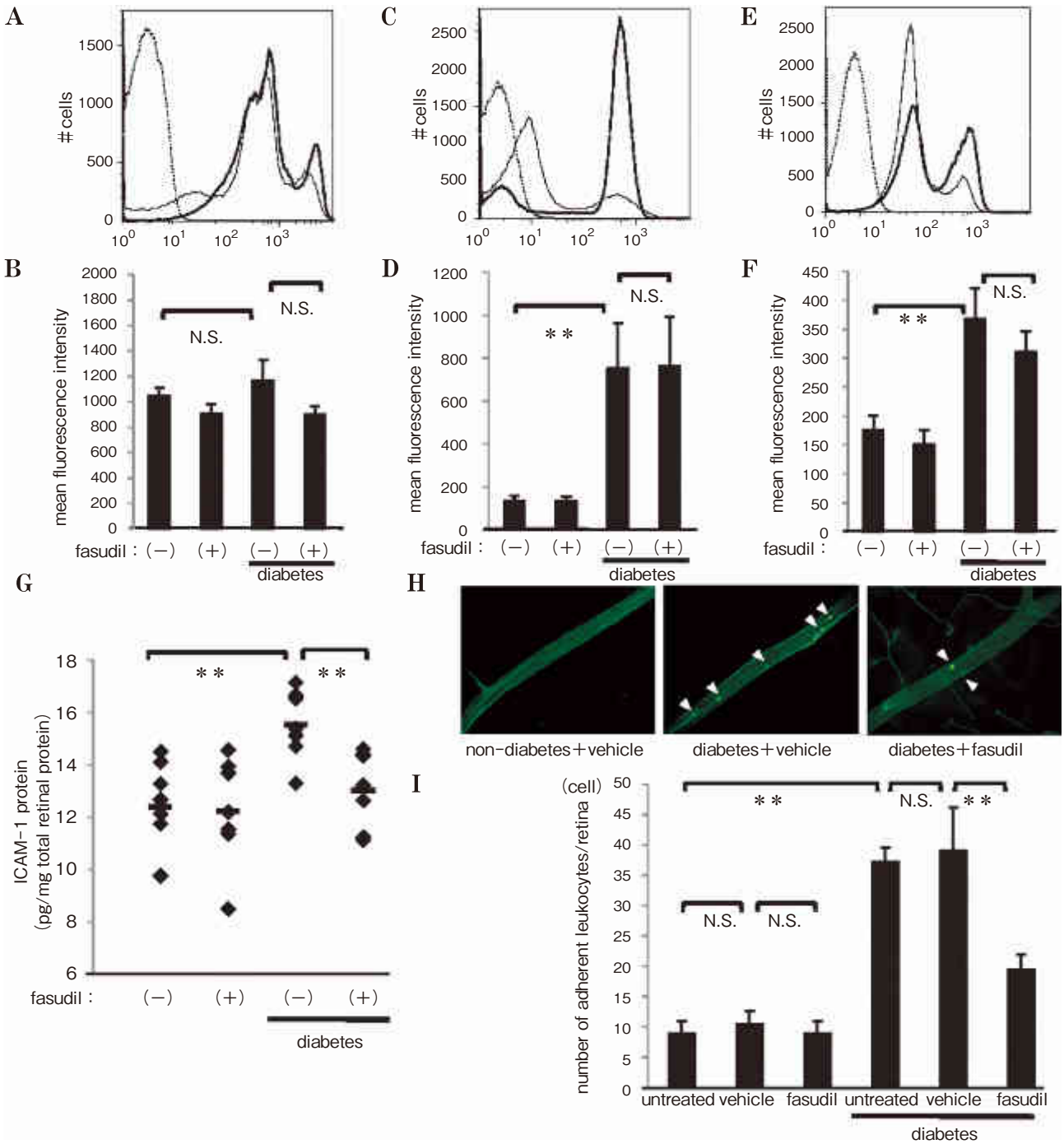


図 4 接着分子発現と白血球接着に対する fasudil の影響.

A, C, E : 正常ラット好中球(細線 : control)と糖尿病ラット好中球(太線 : diabetes)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対照).

B, D, F : 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 intercellular adhesion molecule-1 (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 18 の図 3 より許可を得て転載)

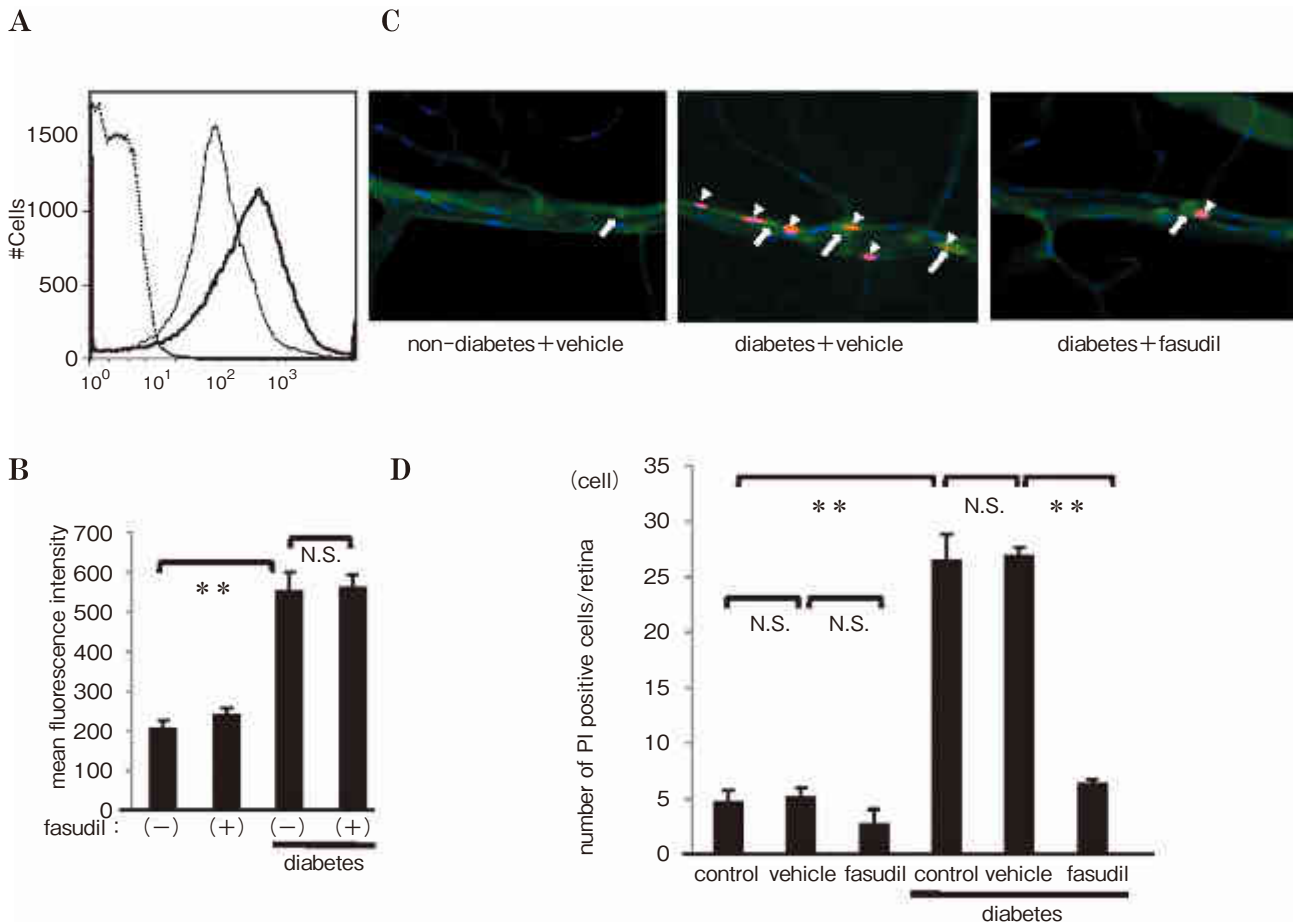


図 5 Fas Ligand (FasL) 発現と白血球接着による血管内皮傷害への fasudil の影響。

- A: 末梢血から単離した正常ラット好中球(細線: control)と糖尿病ラット好中球(太線: diabetes)表面の FasL 発現をフローサイトメトリーで解析(点線: マウスアイソタイプ対照)。
- 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〔赤: propidium iodide(矢頭)〕を同定した代表的な図。傷害された内皮細胞は概ね白血球接着部位(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 18 の図 4 より許可を得て転載)

結果から糖尿病網膜で亢進した ROCK 活性に対する fasudil の阻害効果が確認された。

糖尿病でインテグリン CD11b/18(図 4 A~F)および ICAM-1(図 4 G)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た。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(図 4 H, I), 傷害された血管内皮細胞数も著明に増加していた(図 5 C, D)。Fasudil の硝子体内投与で循環血中の白血球の接着分子の発現に影響を与えることはなかったが(図 4 A~F), 糖尿病により亢進した ICAM-1 の発現は fasudil 投与により有意に低下し(図 4 G), 網膜血管にトラップされる白血球数は有意に減少した(図 4 H, I)。また糖尿病で白血球の FasL 発現が亢進していたが, fasudil によってその発現に影響を受けることはなかった

(図 5 A, B)。さらに血管内皮の傷害についても評価すると fasudil 投与によ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が, 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いた(図 5 C, 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をも有している可能性を示唆する。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<sup>21)~22)</sup>, 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 の関与が推察された。

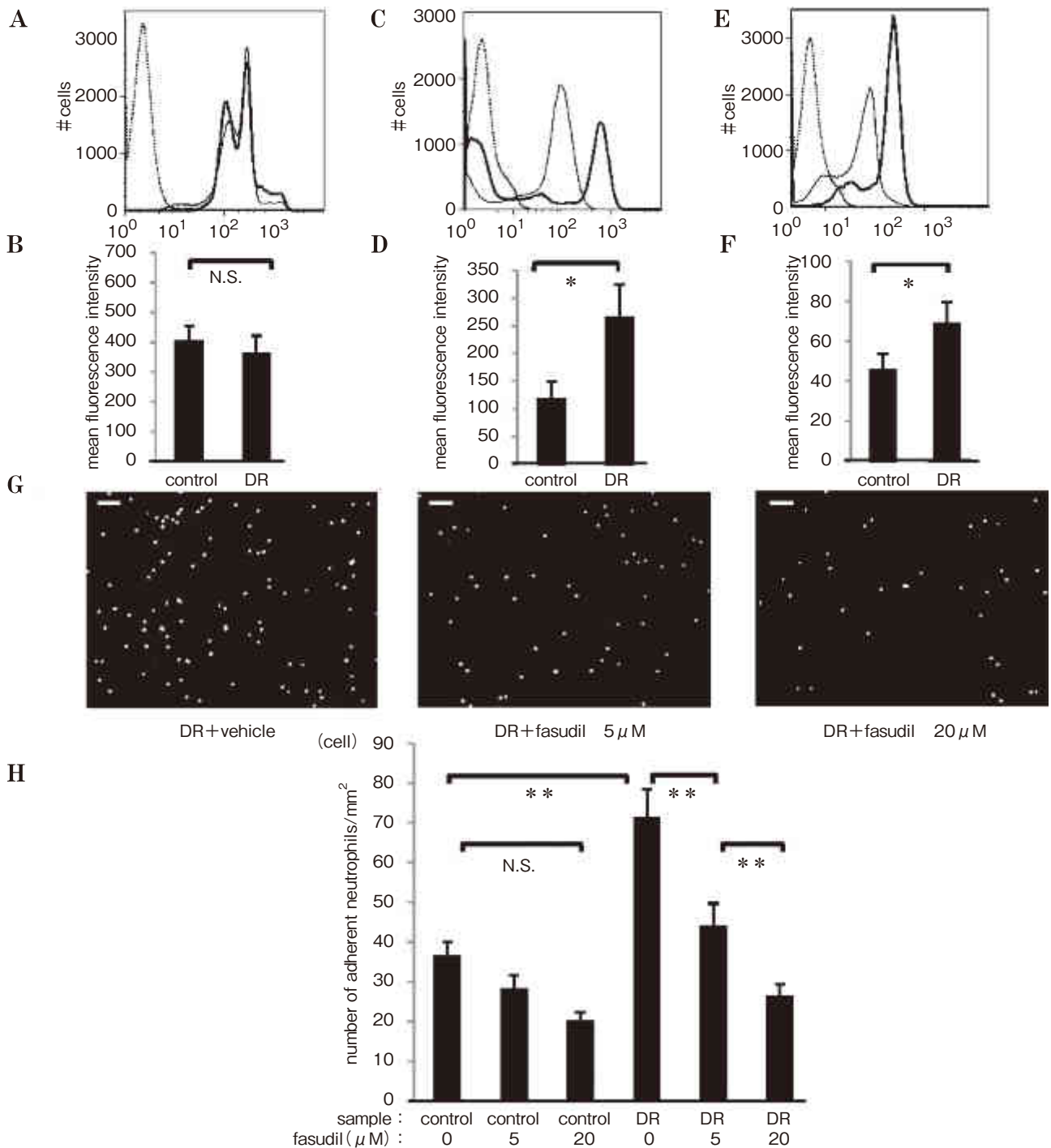


図 6 糖尿病網膜症好中球の接着分子解析と血管内皮接着への fasudil の抑制効果.

A, C, E : 健常人 (control : 細線) および糖尿病網膜症患者 (DR : 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 : マウスアイソタイプ対照).

B, D, F : CD11a (B), CD11b (D), CD18 (F) の平均蛍光強度 (\* :  $p < 0.05$ , N.S. : 有意差なし, 各  $n = 20$ ). CD11b/CD18 発現が DR 群で亢進していた.

G : Fasudil (0, 5, 20  $\mu\text{M}$ ) で 1 時間, 前処置した培養微小血管内皮細胞と 1 mM Calcein-AM で標識した好中球 (1 穴あたり  $2 \times 10^5$  cells/ml, 500  $\mu\text{l}$ ) 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  $\mu\text{m}$ ).

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  $n = 15$ ). DR 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 18 の図 5 より許可を得て転載)



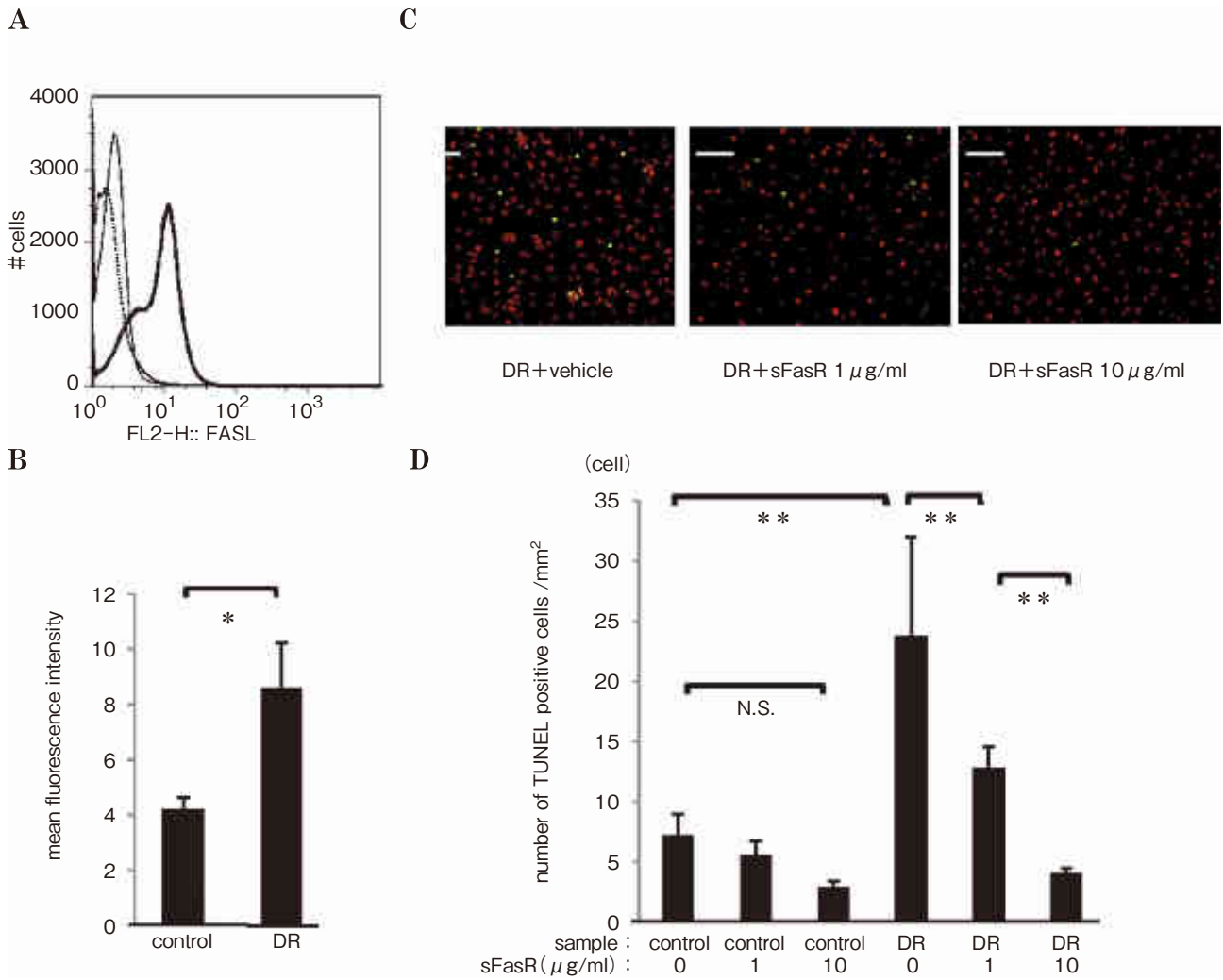


図 7 糖尿病網膜症好中球の FasL 発現解析と接着好中球による内皮細胞傷害への Fas/FasL 経路の関与。  
 A: 健常人(control: 細線)および糖尿病網膜症患者(DR: 太線)から単離した好中球表面の FasL 発現をフローサイトメトリーで解析(点線: マウスアイソタイプ対照)。  
 B: FasL 平均蛍光強度(\*: p < 0.05, 各 n = 17)。DR 群の好中球で FasL 発現が亢進していた。  
 C: 可溶性 Fas 受容体(sFasR: 0, 1, 10 μg/ml)で 1 時間、前処置した標識していない好中球(5 × 10<sup>5</sup> cells/ml)と Hoechst 33342(1 mM, 赤色蛍光)で標識した培養微血管内皮細胞(HMVEC)との共培養(37°C, 1 時間)後の TUNEL 陽性 HMVEC(黄色)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)。DR 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 18 の図 6 より許可を得て転載)

## V ROCK 阻害薬による内皮保護メカニズム

次にヒトの白血球と血管内皮細胞の共培養の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 阻害薬の効果について検討を加えた。白血球については、九州大学倫理審査専門委員会の承認を得、文書による同意の得られた網膜症を有する 2 型糖尿病患者および健常ボランティアから末梢血を採取し、two-step gradient technique にて好中球を抽出した。血管内皮細胞にはヒト皮膚微血管内皮細胞(Cambrex, East Rutherford, NJ)を用いた。まず好中球の接着分子につ

いてみると、CD11a は健常対照群(control)と網膜症(DR)群で有意差はなく、CD11b/CD18 発現が DR 群で亢進していた(図 6 A~F)。血管内皮との共培養で接着能をみると、DR 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(図 6 G, H)。しかしながら、正常群の好中球は fasudil を加えてもその接着能に変化を認めなかった。

対照群と比較して DR 群の好中球は FasL 発現が亢進していた(図 7 A, B)。血管内皮との共培養で接着による内皮傷害をみると、DR 群の好中球で有意に内皮細胞

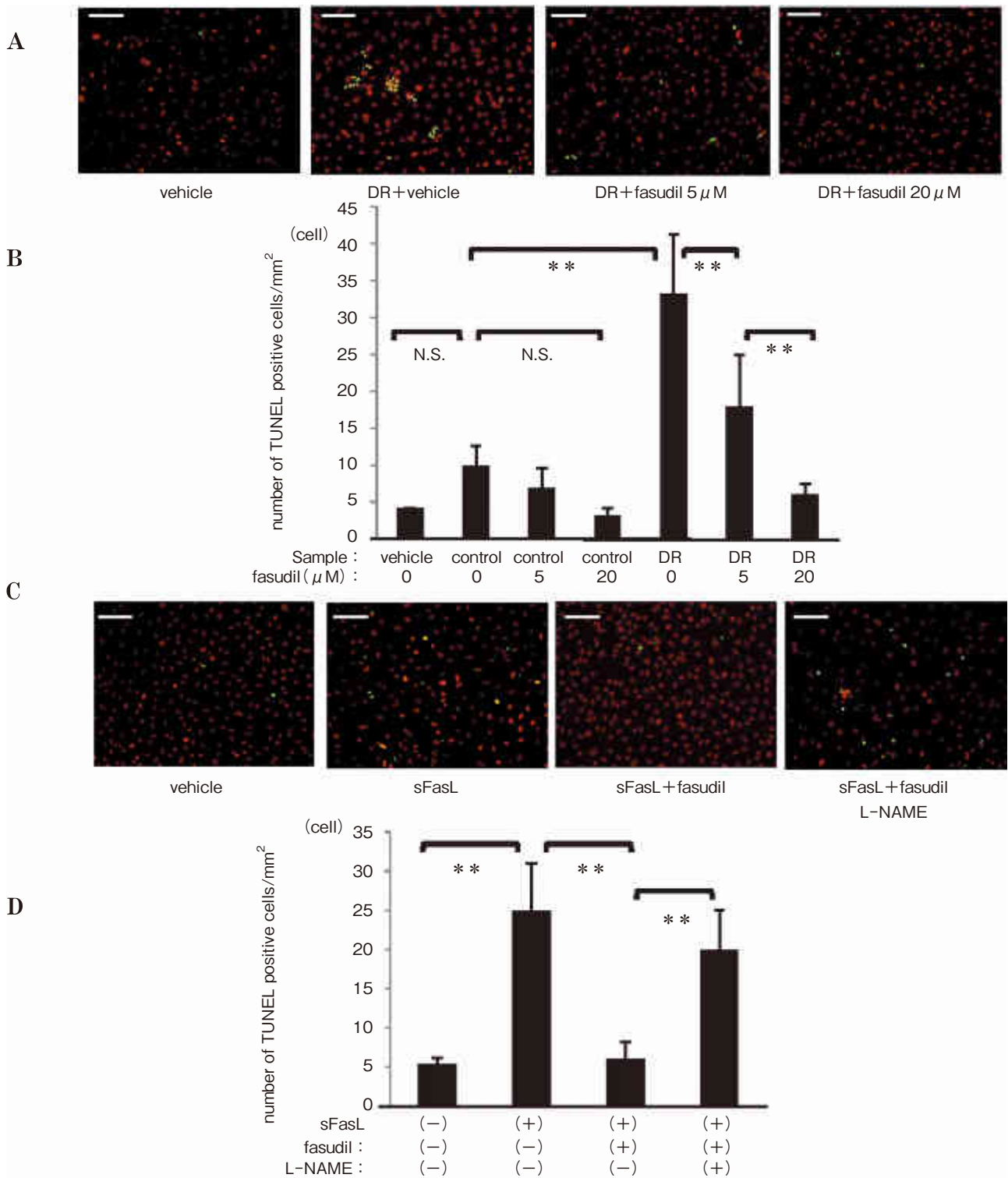


図 8 Fasudil の好中球依存性および FasL 依存性内皮傷害に対する保護作用と L-NAME の影響。  
 A : 標識していない好中球 ( $5 \times 10^5$  cells/ml) を fasudil (0, 5, 20  $\mu$ M) で前処置 (1 時間) 後に, Hoechst 33342 (1 mM, 赤色蛍光) 標識した培養微小血管内皮細胞 (HMVEC) との共培養 (37 $^{\circ}$ C, 1 時間) 後の TUNEL 陽性 HMVEC (黄色) の代表的な図 (scale bar = 100  $\mu$ m).  
 B : 1 穴あたり異なる 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  $n = 15$ ). 糖尿病網膜症 (DR) 群では対照 (control) 群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, 1 mM), fasudil (0, 20  $\mu$ M) で前処置 (1 時間) し, 標識した (赤色蛍光) 培養微小血管内皮細胞 (HMVEC) を可溶性 FasL (sFasL) で刺激後の代表的な図 (scale bar = 100  $\mu$ m). TUNEL 陽性 HMVEC (黄色蛍光).  
 D : 1 穴あたりの異なる 4 領域における TUNEL 陽性細胞数 (黄色蛍光) 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剤である L-NAME によって消失した。  
 (文献 18 の図 7 より許可を得て転載)

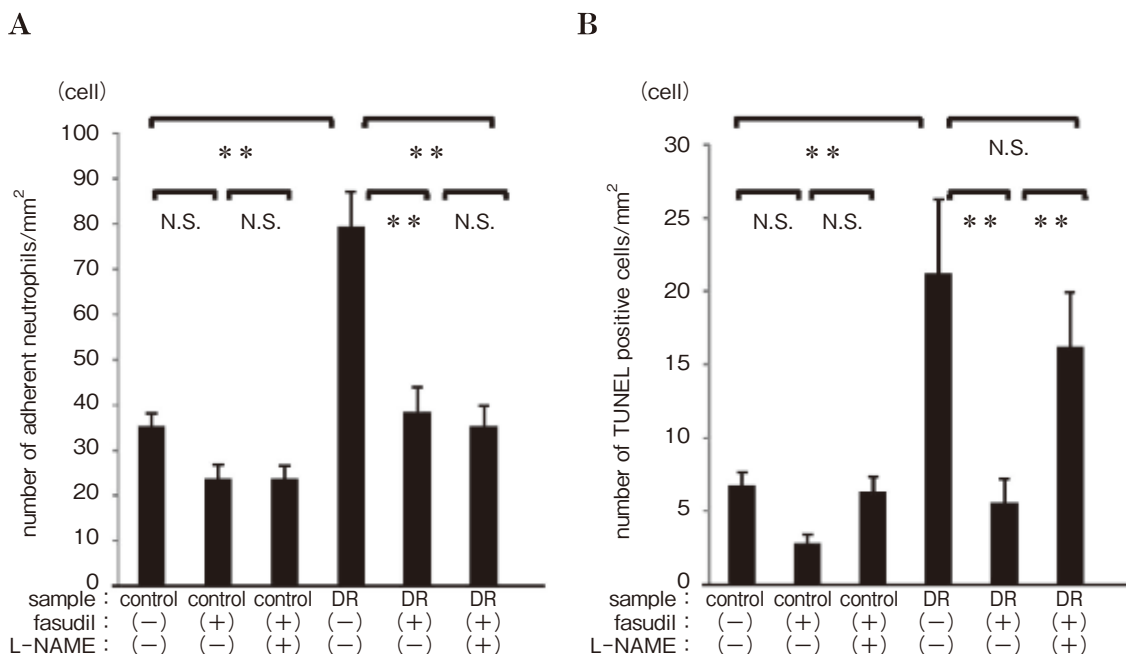


図 9 Fasudil の好中球接着抑制および内皮保護作用への L-NAME の影響。

L-NAME (0, 1 mM), fasudil (0, 20  $\mu$ M) で前処置 (1 時間) し, 血管内皮細胞 (HMVEC) と好中球 ( $5 \times 10^5$  cells/ml) との共培養 (37°C, 1 時間) 後に 1 穴あたり異なる 4 つの領域における接着好中球数 (A) および TUNEL 陽性 HMVEC (B) 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 (DR) 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 18 の図 8 より許可を得て転載)

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 7 C, D). つまり, 好中球が接着分子を介して内皮と接着した後, 実際の内皮傷害には好中球側の FasL と内皮側の Fas の相互作用が重要であることが明らかになった. さらに, fasudil によっても好中球による内皮傷害が濃度依存性に阻害された (図 8 A, B), fasudil は FasL による内皮傷害阻害作用を有しており (図 8 C, D), その作用は一酸化窒素合成酵素阻害剤である L-NAME によって消失することから (図 8 C, D), fasudil は内皮細胞において一酸化窒素の産生を亢進させることによって FasL による内皮傷害経路を阻害していることが明らかになった. 最後に好中球の接着能・傷害能への L-NAME の影響についてみたところ, L-NAME は fasudil による接着阻害作用には有意な影響を示さず (図 9 A), fasudil の内皮傷害に対する保護作用を消失させることが確認された (図 9 B). *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, 内皮細胞における一酸化窒素の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.

## VI おわりに

現在, 糖尿病罹患率は増加の一步を辿っており, この病気の合併症であり著明な視力低下を来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.

今回用いた fasudil の濃度についてであるが, Shimokawa らの報告にあるように 10~30  $\mu$ M の濃度の fasudil は ROCK にほぼ選択的に作用する濃度であり<sup>19)</sup>, fasudil 投与によって ROCK 活性が選択的に阻害されていることを意味する. 我々の最近の実験におけるウサギ眼への fasudil 硝子体内反復投与 (眼内最終濃度 30  $\mu$ M) およびラット眼への fasudil 単回硝子体内投与 (100  $\mu$ 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<sup>11)</sup>.

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, 動物実験を用いた研究から ROCK 経路が網膜症早期の微小血管異常~後期の増殖膜収縮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 (図 10). 糖尿病ラットにおける網膜変化の経過はヒトと異なる可能性があるため, 網膜症患者における fasudil の治療効果や安全性に関し

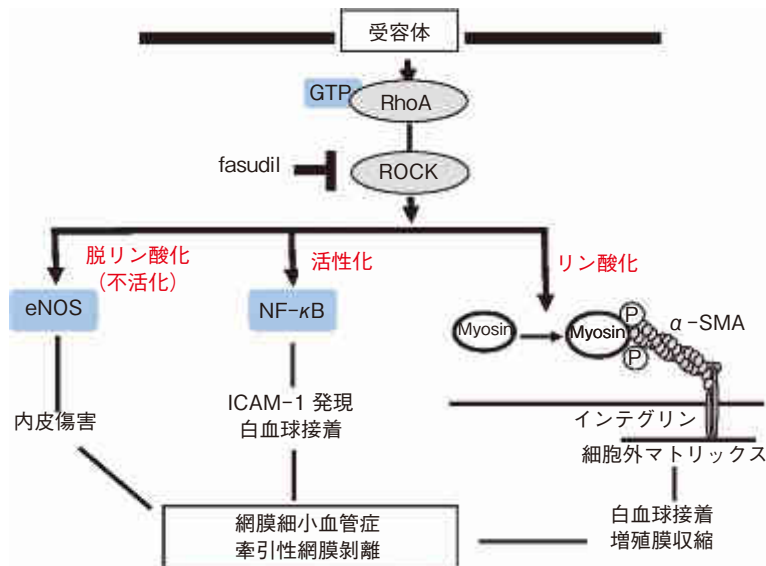


図 10 ROCK の糖尿病網膜症の種々の病態への関与.

糖尿病網膜症は早期では網膜細血管異常が特徴的であり，進行期では増殖膜収縮による牽引性網膜剥離に至る．Rho/ROCK 活性化は NF- $\kappa$ B を介した 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．さらに ROCK は単に接着だけでなく，内皮保護作用を有する内因性一酸化窒素合成酵素 (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て細血管異常の病態に関与する．また増殖期においても MLC リン酸化を介して増殖膜収縮のステップを促進させて牽引性網膜剥離の病態に関与しており，ROCK は網膜症の早期～後期に至るまでの幅広い病態形成に関与している．

てさらなる検討が必要であるが，ROCK 阻害薬は糖尿病網膜症に伴う幅広い病態を制御する新たな治療戦略となることが大いに期待される．

利益相反：利益相反公表基準に該当なし

## 文 献

- 1) Pastor JC, de la Rúa ER, Martin F : Proliferative vitreoretinopathy : risk factors and pathobiology. *Prog Retin Eye Res* 21 : 127—144, 2002.
- 2) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group : Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352 : 837—853, 1998.
- 3) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group : Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes (UKPDS 39). *BMJ* 317 : 713—720, 1998.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Masumoto A, Mohri M, Shimokawa H, Urakami L, Usui M, Takeshita A : Suppression of coronary artery spasm by the Rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina. *Circulation* 105 : 1545—1547, 2002.
- 7) Okamura N, Saito M, Mori A, Sakamoto K, Kametaka S, Nakahara T, 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.
- 8) Miyata K, Shimokawa H, Kandabashi T, Higo T, Morishige K, Eto Y, 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.
- 9) 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.
- 10) Hirayama K, Hata Y, Noda Y, Miura M, Yamanaka I, Shimokawa H, 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.



- 11) **Kita T, Hata Y, Arita R, Kawahara S, Miura M, Nakao S**, et al : Role of TGF- $\beta$  in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 : 17504—17509, 2008.
  - 12) **Joussen AM, Murata T, Tsujikawa A, Kirchhof B, Bursell SE, Adamis AP** : Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *Am J Pathol* 158 : 147—152, 2001.
  - 13) **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.
  - 14) **Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC** : 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.
  - 15) **Joussen AM, Poulaki V, Mitsiades N, Cai WY, Suzuma I, Pak J**, 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.
  - 16) **Lee H, Lin CI, Liao JJ, Lee YW, Yang HY, Lee CY**, et al : Lysophospholipids increase ICAM-1 expression in HUVEC through a Gi-and NF- $\kappa$ B-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 287 : C 1657—1666, 2004.
  - 17) **Giagulli C, Scarpini E, Ottoboni L** : RhoA and  $\zeta$  PKC control distinct modalities of LFA-1 activation by chemokines : critical role of LFA-1 affinity triggering in lymphocyte *in vivo* homing. *Immunity* 20 : 25—35, 2004.
  - 18) **Arita R, Hata Y, Nakao S, Kita T, Miura M, Kawahara S**, et al : Rho kinase inhibition by fasudil ameliorates diabetes-induced microvascular damage. *Diabetes* 58 : 215—226, 2009.
  - 19) **Shimokawa H, Seto M, Katsumata N, Amano M, Kozai T, Yamawaki T**, 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.
  - 20) **Shimokawa H, Rashid M** : Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends Pharmacol Sci* 28 : 296—302, 2007.
  - 21) **Rossig L, Haendeler J, Hermann C, Malchow P, Urbich C, Zeiher AM**, et al : Nitric oxide down-regulates MKP-3 mRNA levels : involvement in endothelial cell protection from apoptosis. *J Biol Chem* 275 : 25502—25507, 2000.
  - 22) **Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mulsch A**, et al : Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation *in vivo*. *J Biol Chem* 274 : 6823—6826, 1999.
-