—Reviews—

Rho キナーゼ研究の進展と阻害剤の将来展望

田原俊介，下川宏明*

Progress of the Study of Rho-kinase and Future Perspective of the Inhibitor

Shunsuke TAWARA and Hiroaki SHIMOKAWA*
Department of Cardiovascular Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1–1 Seiryo-machi, Aoba-ku, Sendai 980–8574, Japan

(Received December 18, 2006)

Rho-kinase has been identified as one of the effectors of the small GTP-binding protein Rho. Accumulating evidence has demonstrated that the Rho/Rho-kinase pathway plays an important role in various cellular functions, not only in vascular smooth muscle cell (VSMC) contraction but also in VSMC proliferation, cell migration, and gene expression. Two isoforms of Rho-kinase encoded by two different genes have been identified: ROCK1 and ROCK2. These isoforms are ubiquitously expressed, but with preferential expression of ROCK2 in the brain and skeletal muscle. The expression of Rho-kinase itself is mediated by the protein kinase C/NF-κB pathway with an inhibitory and stimulatory modulation by estrogen and nicotine, respectively. At the cellular level, Rho-kinase mediates VSMC contraction, stimulates VSMC proliferation and migration, and enhances inflammatory cell motility. Rho-kinase also upregulates various molecules that accelerate inflammation/oxidative stress, thrombus formation, and fibrosis, while it downregulates endothelial nitric oxide synthase and inhibits insulin signaling. Rho-kinase activity regulates major morphogenetic events during embryonic development through cell migration, differentiation, and axis formation. In animal and clinical studies, Rho-kinase has been shown to be substantially involved in the pathogenesis of vasospasm, arteriosclerosis, hypertension, pulmonary hypertension, and ischemia/reperfusion injury. Fasudil, a selective Rho-kinase inhibitor developed in Japan, is effective for the treatment of a wide range of cardiovascular diseases, with reasonable safety. Thus Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. This review summarizes the recent progress in the study of Rho-kinase and addresses future perspectives of Rho-kinase inhibitors.

Key words——Rho-kinase; Rho-kinase inhibitor; fasudil; cardiovascular disease; signal transduction

1. はじめに

Rho キナーゼは，1990 年代半ばのほぼ同時期に，2 つの日本の研究グループと 1 つのシンガポールの研究グループから，低分子量 GTP 結合タンパク質 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る.[1—3] これまでの研究により，Rho キナーゼが平滑筋細胞の収縮のみならず，各種細胞の形態制御，遊走，遺伝子発現制御などの生理機能に関与していることが明らかとなっている.[4] さらに，近年の活発な研究により，心血管病の成因に Rho キナーゼが深く関与していることが示されており，Rho キナーゼ阻害薬の開発と臨床応用が期待されている.[4]

東北大学大学院医学系研究科循環器病態学（〒980–8574 仙台市青葉区星陵町 1–1）
*e-mail: shimo@cardio.med.tohoku.ac.jp

本稿では，Rho キナーゼが関与する生理機能や病態生理学的意義及び Rho キナーゼ阻害薬の将来展望について概説する.

2. Rho キナーゼの構造と発現

Rho キナーゼは，分子量約 160 kDa のセリンスレオニンリン酸化酵素であり，線虫やショウジョウバエなどの下等動物からマウス・ラットなどのげっ歯類，ヒトまで広く保存されている遺伝子である. Rho キナーゼには，Rho-kinase α/ROKα/ROCK2 と Rho-kinase β/ROKβ/ROCK1 という 2 つのアイソフォームがあり，ヒトの場合，それぞれ第 2 番染色体（2p24）及び第 18 番染色体（18q11.1）に存在する（以下特記した場合を除き，Rho キナーゼと総称する）.[4] Rho キナーゼの構造は，N 末端側から順に，kinase domain, Rho-binding domain（RBD）を含む coiled-coil domain, cysteine-rich domain

（CRD）を含む pleckstrin-homology（PH）domain があることが示されている（Fig. 1）．ROCK1 と ROCK2 は高い相同性を有しており，全体として 65％の同一性があり，特に，kinase domain においては 92％の同一性がある.[5]

ROCK1 及び ROCK2 は体内に広く発現しているが，ROCK2 は特に脳と骨格筋に強く発現している.[5] Rho キナーゼの発現は，アンジオテンシン II や IL-1β などの炎症性刺激により，プロテインキナーゼ C-NF-κB 依存性経路を介して促進的に制御されている.[6] また，アンジオテンシン II による Rho キナーゼの発現亢進は，生理的濃度のエストロゲンにより用量依存性に抑制され，ニコチン投与により約 100 倍に増加し，かつエストロゲンの抑制作用を消失させた.[7] さらに，われわれは，新規動脈硬化促進因子として注目されているレムナントリポ蛋白が，ヒト冠動脈由来血管平滑筋において，Rho キナーゼの発現や活性を著明に上昇させることも見出している.[8]

Rho キナーゼの細胞内局在に関しては，Rho キナーゼは主として細胞質に存在し，RhoA 活性化に伴って一部が細胞膜に移行することが明らかとなっている.[1,2] また，最近の報告では，ROCK2 の一部が核に局在し，p300 acetyltransferase をリン酸化し，その活性を制御している可能性が示唆されている.[9] しかし，Rho キナーゼの発現制御や細胞内局在の詳細な分子機構については不明な点が多く，今後の研究課題である.

3. Rho キナーゼの活性制御

前述のように，Rho キナーゼの kinase domain は N 末端側に存在する．C 末端側の一部を欠損した Rho キナーゼは dominant-active form になり，逆に C 末端側の一部を発現させると dominant-negative form として働くことから，Rho キナーゼの C 末端側が触媒ドメインとの相互作用を介して Rho キナーゼの活性を負に制御していることが示唆されている.[10,11] また，Rho キナーゼ同士の多量体形成が ATP に対する親和性を制御する機序によっても Rho キナーゼ活性が調節されている可能性も示唆されている.[12]

GTP が結合した活性型 RhoA の RBD への結合は，C 末端側の触媒ドメインとの相互作用の乖離を促進し，Rho キナーゼを活性化する．また，脂質メッセンジャーとして知られているアラキドン酸も RhoA とは独立した機序で Rho キナーゼを活性化することが報告されている.[13] その他にも，Rho キナーゼ活性を負に制御している C 末端側が切断されることでも Rho キナーゼが活性化することが明らかとなっている.[14,15] ROCK1 は，アポトーシスが起こる際，カスパーゼ 3 により C 末端側が切断される.[14] 一方，ROCK2 は，アポトーシス関連蛋白分解酵素である granzyme B によって C 末端側の分解を受ける.[15] 興味深いことに，ROCK1 は granzyme B により切断される部位を持たず，ROCK2 はカスパーゼ 3 による切断部位を持っていない.[14,15] これらの正の活性制御機構に加えて，負の活性制御機構も存在する．低分子量 G 蛋白の一種

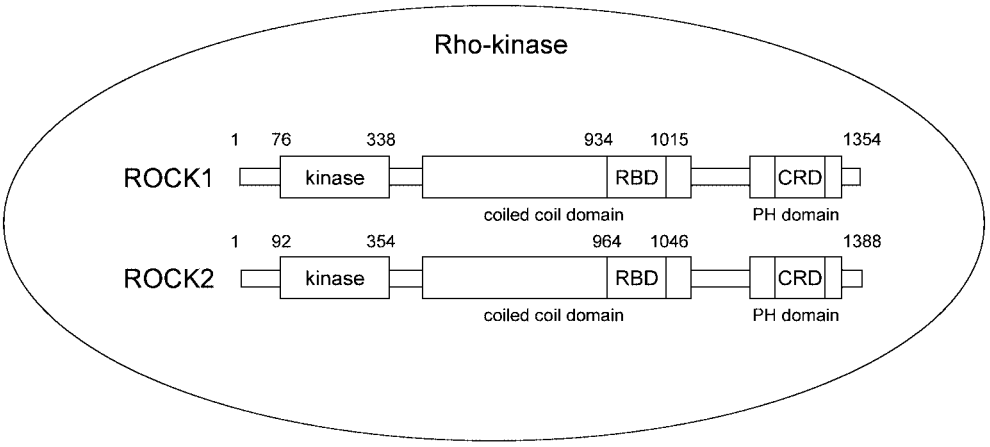

Fig. 1. A Schematic Diagram of Rho-kinase Structural Domains
RBD: Rho binding domain, CRD: cysteine-rich domain, PH: pleckstrin-homology.

である RhoE は，ROCK1 の N 末端側触媒ドメインに結合してその活性を阻害する.[16] この RhoE による負の制御は ROCK2 に対しては起こらない．これらのことは，Rho キナーゼの 2 つのアイソフォームの間で何らかの役割の違いが存在する可能性を示唆している.

4. Rho キナーゼが関与する生理機能

Rho キナーゼは，収縮，増殖，遊走，遺伝子発現誘導など細胞の生理機能に深く関与していることが明らかとなっている（Fig. 2）．このことは，様々なアゴニスト刺激が Rho キナーゼを介してその作用を発現していることを示唆する.[4] 今日までの研究により，アンジオテンシン II,[17] セロトニン,[18] トロンビン,[19] エンドセリン,[20] ノルエピネフリン,[21] 血小板由来増殖因子（PDGF）,[22] 一部の P2Y レセプターを介した細胞外ヌクレオチド,[23] ウロテンシン II[24] などが Rho キナーゼを介して作用を発現することが知られている．今後，様々なアゴニストによる細胞内シグナル伝達の研究が発展することにより，Rho キナーゼの関与する新たな生理機能が明らかになる可能性がある.

4-1. 血管平滑筋の収縮弛緩　血管平滑筋の主な生理機能である収縮弛緩は，交感神経や血管作動物質の刺激に応答して惹起される．この血管平滑筋の機能により生体は血管径を変化させることで血圧や臓器への血液の分配などの循環調節を行っている．血管平滑筋における収縮弛緩制御は，ミオシン軽鎖キナーゼ（MLCK）活性とミオシン軽鎖フォスファターゼ（MLCPh）活性のバランスにより決定されるミオシン軽鎖（MLC）のリン酸化が中心的役割を果たしている.[25,26]

血管平滑筋細胞は，アンジオテンシン II などの収縮性血管作動物質の刺激に応答して，細胞内の G 蛋白に共役したホスホリパーゼ C（PLC）の作用により，イノシトール 3 リン酸（IP_3）を生成する．IP_3 は細胞内の Ca^{2+} 貯蔵部位（筋小胞体）上の Ca^{2+} チャネルを開口することにより Ca^{2+} 放出を惹起し，細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させる．また，細胞膜にも Ca^{2+} チャネルが存在し，様々な刺激に応答してチャネルが開口し，細胞外からの Ca^{2+} 流入が引き起こされる．筋小胞体からの放出，及び細胞外からの流入により上昇した細胞内 Ca^{2+} は，カルモジュリンと結合して Ca^{2+}/カルモジュリン複合体を形成し，MLCK の触媒サブユニットに結合して MLCK を不活性型から活性型に変換する．活性型 MLCK が MLC をリン酸化すると，ミオシン頭部に存在する Mg^{2+}-ATPase のアクチンによる活性化が引き起こされ，血管平滑筋は収

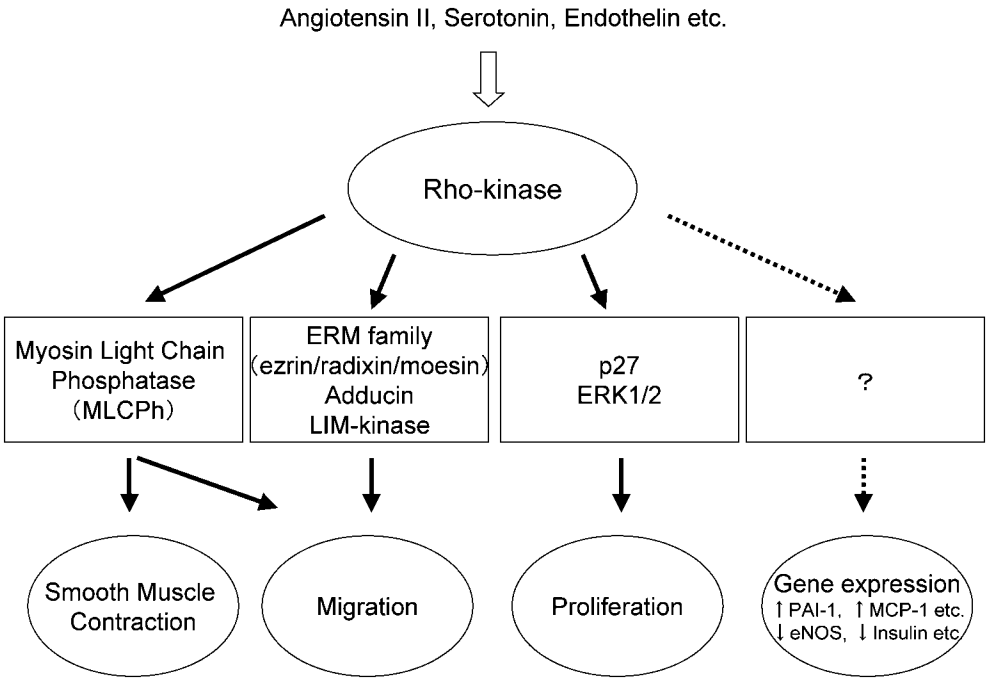

Fig. 2. Physiological Function of Rho-kinase

縮する．その後，細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下すると，Ca^{2+} はカルモジュリンから解離して MLCK は不活性化される．その結果，MLCPh が優位になり，MLC は脱リン酸化されて血管平滑筋は弛緩する．[25]

一方，Rho キナーゼは，細胞内 Ca^{2+} 濃度非依存的に血管平滑筋の収縮弛緩を制御することが知られている．すなわち，収縮性血管作動物質の刺激により，G 蛋白に共役した受容体を介して低分子量 G 蛋白質である Rho が活性化され，その標的蛋白の 1 つである Rho キナーゼが活性化される．活性化された Rho キナーゼは，MLCPh のミオシン結合サブユニット（MBS）をリン酸化することによりその活性を阻害する．その結果，MLCK/MLCPh 活性のバランスが崩れ，MLC のリン酸化が上昇することで血管平滑筋は収縮する（Fig. 3）．[27,28]

4-2. 血管平滑筋の増殖　通常の成体の動脈にみられる平滑筋細胞は前述の収縮弛緩が主な働きであるが，病態や血管傷害により増殖因子刺激を受けると平滑筋細胞は形質変換を起こし増殖が誘導される．Rho キナーゼは，トロンビン[24]やウロテンシン II，[29] PDGF-BB[30] 刺激による血管平滑筋細胞の増殖にも重要な役割を果たしていることが明らかとなっている．また，細胞増殖において，サイクリン依存性キナーゼを阻害する働きを持つ p27 がその制御に重要な役割を果たしていることが知られている．[31] Rho キナーゼは活性化すると p27 の発現を低下させ，細胞増殖を亢進させる．[32] 一方，Rho キナーゼ阻害はバルーン傷害による血管平滑筋細胞の増殖を抑制しないとの報告もあり，[33] 詳細な機序についてはいまだ明らかとはなっていない．

4-3. 細胞遊走　細胞遊走は，白血球や線維芽細胞，平滑筋細胞などの細胞が持つ生理機能であり，様々な生理的/病的環境で重要な役割を果たしている．細胞遊走には，遊走刺激によるアクチンフィラメントの重合–脱重合（再構築），アクチン–ミオシンによる収縮，微小管を介した細胞骨格蛋白質の輸送などが関与している．これら遊走に係わる細胞機構の制御に Rho/Rho キナーゼが重要な働きを果たすことが報告されている．[34] 例えば，血管平滑筋細胞において Rho キナーゼ阻害薬は PDGF やリソフォスファチジン酸によって誘発される遊走を抑制する．[32,35] その機序として，遊走刺激因子などにより活性化された Rho が Rho キナーゼを活性化し

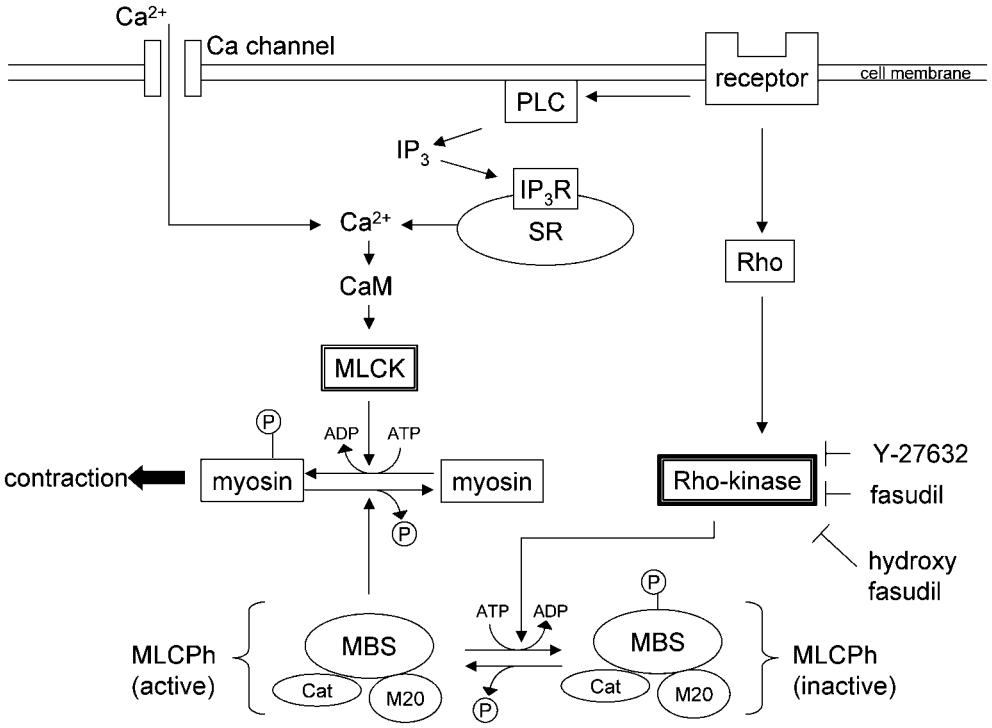

Fig. 3. Contraction Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells

PLC: phospholipase C, IP_3: inositol 1,4,5-trisphosphate, SR: sarcoplasmic reticulum, CaM: calmodulin, MLCK: myosin light chain kinase, MLCPh: myosin light chain phosphatase, MBS: myosin binding subunit.

てMLCPhを阻害し，MLCのリン酸化を促進して細胞の収縮性を高め，細胞遊走に関与することが考えられている.[34] また，Rhoキナーゼは，アクチンフィラメントの再構築に関与するアデューシン，ERM(ezrin/radixin/moesin)，LIMキナーゼなどの蛋白質をリン酸化することから，これらの蛋白質を介した細胞遊走の制御も考えられている.[36]

4-4. 遺伝子発現制御 Rhoキナーゼは，遺伝子発現の制御にも深く関与することが明らかとなっている．Rhoキナーゼの活性化は，インターロイキン-6（IL-6）[37]や単球走化性因子-1（MCP-1），[17] インターフェロン-γ（IFN-γ）[38]などのサイトカインや血栓形成に係わる血小板活性化因子-1（PAI-1）[18]や組織因子，[39] さらには線維化に関与する形質転換増殖因子-β（TGF-β）[17]やBcl-2[39] などの遺伝子発現を促進的に制御する．一方，内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）[40]やインスリン[41]を抑制的に制御することも知られている.

4-5. 発生・形態形成 Rhoキナーゼは，細胞遊走，分化，軸の形成を介して，胚の形態形成にも重要な役割を果たしている.[42] これに伴い，Rhoキナーゼ阻害剤の催奇性についても報告されている.[42] また，Rhoキナーゼのアイソフォームそれぞれの遺伝子欠損マウスの検討においても，Rhoキナーゼが個体発生に重要な役割を果たしていることが示唆されている．すなわち，ROCK2遺伝子欠損マウスは，約90％が血栓形成，胎盤機能不全，子宮内発育遅延による胎生致死であった.[43] また，ROCK1遺伝子欠損マウスでは，出生率が低下し，出生しても閉眼異常や臍輪（さいりん）の欠失が認められたという報告がある.[44,45] 一方で，他の研究グループからは，ROCK1遺伝子欠損マウスでは，出生率の低下がみられるものの，生まれてきた個体に異常は認められないとの報告もされているため，[46] 今後のさらなる詳細な検討が必要である.

5. Rhoキナーゼと心血管病

今日までの動物モデルやヒトにおける検討により，Rhoキナーゼが心血管系疾患を中心とした様々な疾患の病態に深く関与しており，Rhoキナーゼ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（Fig. 4）.[4]

5-1. 冠動脈攣縮 冠動脈攣縮は，異型狭心症の原因に留まらず，その他の型の狭心症や急性心筋梗塞，突然死などの虚血性心疾患全般の病態に深く関与している.[47] 冠動脈攣縮は冠動脈局所の収縮能の亢進が原因であり，主な成因として血管平滑筋の収縮能の亢進と血管内皮機能の低下が考えられている．われわれは，一連の基礎的・臨床的研究により冠動脈攣縮の本体は血管平滑筋の過収縮であると考え，その分子機構におけるRhoキナーゼの関与について検討を進めてきた.

われわれは，代表的炎症性サイトカインであるIL-1βを冠動脈局所に慢性に作用させることにより誘発した炎症性ブタ冠動脈硬化モデルにおいて，同

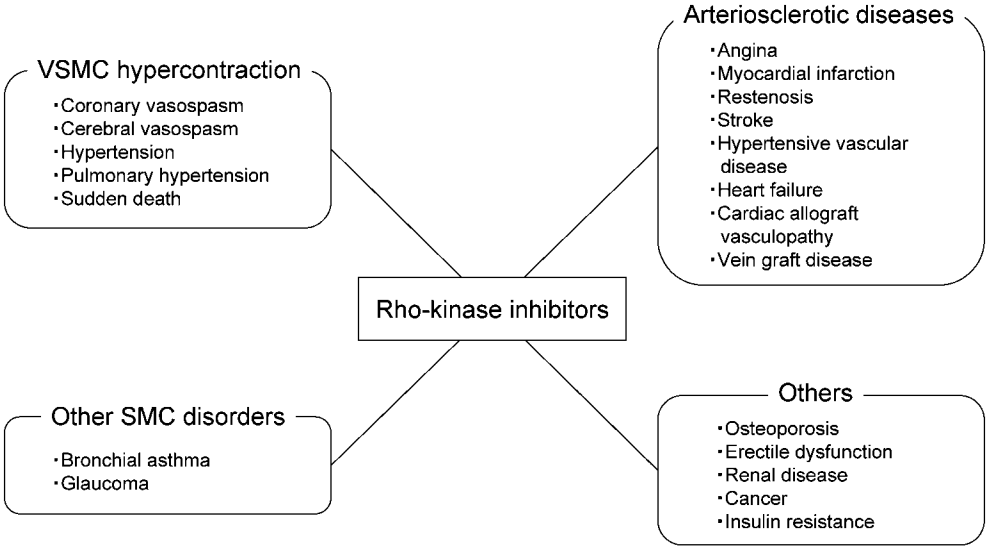

Fig. 4. Therapeutic Targets of Rho-kinase Inhibitors[4]

部に冠攣縮反応が誘発されることを明らかにした.[48] このモデルでは，*in vivo* の冠攣縮反応は Rho キナーゼ阻害薬であるヒドロキシファスジル[49] や Y-27632[50] により用量依存性に抑制され（Fig. 5），摘出冠動脈を用いた *in vitro* での検討でも冠動脈過収縮と MLC リン酸化亢進が Rho キナーゼ阻害薬により用量依存性に抑制されることを明らかにした.[49] 冠動脈攣縮部位では Rho キナーゼの mRNA 発現や Rho キナーゼ活性（MBS リン酸化）が亢進し，この活性亢進が Rho キナーゼ阻害薬の前投与により抑制されることも明らかにした（Fig. 6）.[50]

次に，われわれは心臓性突然死（いわゆるポックリ病）の成因にも冠動脈攣縮や Rho キナーゼの活性化が関与していないか，検討した．ポックリ病患者から単離したレムナントリポ蛋白分画をブタ冠動脈に外膜側から慢性投与すると，収縮性が亢進し，セロトニン冠注により冠動脈攣縮が誘発された．その分子機構について検討したところ，本モデルにおいても同様に，冠動脈攣縮部位の Rho キナーゼ活性亢進が認められ，ヒドロキシファスジルにより *in vivo* におけるセロトニン誘発性冠動脈攣縮，及び *in vitro* におけるセロトニン誘発性の冠動脈過収縮と同部位の Rho キナーゼ活性が抑制された.[8] また，最近のわれわれの知見では，ストレスホルモンの 1 種であるコルチゾールの血中持続高値が，ブタにおいて Rho キナーゼの活性化を介して冠動脈攣縮を誘発することも見出している.[51] これらの事実は，冠動脈攣縮部位の血管平滑筋において Rho キナーゼ活性が亢進していること，その結果として MLCPh 活性が抑制され，過収縮を生じている可能性を示唆している.[8,49—51]

われわれは，さらに，冠攣縮性狭心症患者における検討を行った．すなわち，冠攣縮性狭心症患者において，冠動脈内に選択的 Rho キナーゼ阻害薬であるファスジルを投与すると，アセチルコリン負荷による冠動脈攣縮，虚血性心電図変化及び胸痛がすべて抑制されることを示した.[52] また，冠動脈造影ではアセチルコリン負荷による冠動脈攣縮が認められないにもかかわらず，冠静脈洞において心筋虚血の指標である乳酸産生が増加している症例が存在する（微小血管狭心症）.[53,54] われわれは，これら微小血管狭心症患者においてもファスジルの抑制効果を検討したところ，アセチルコリン負荷による乳酸産生，虚血性心電図変化及び胸痛が有意に抑制された.[55] また，冠動脈バイパス手術直後に生じた最大

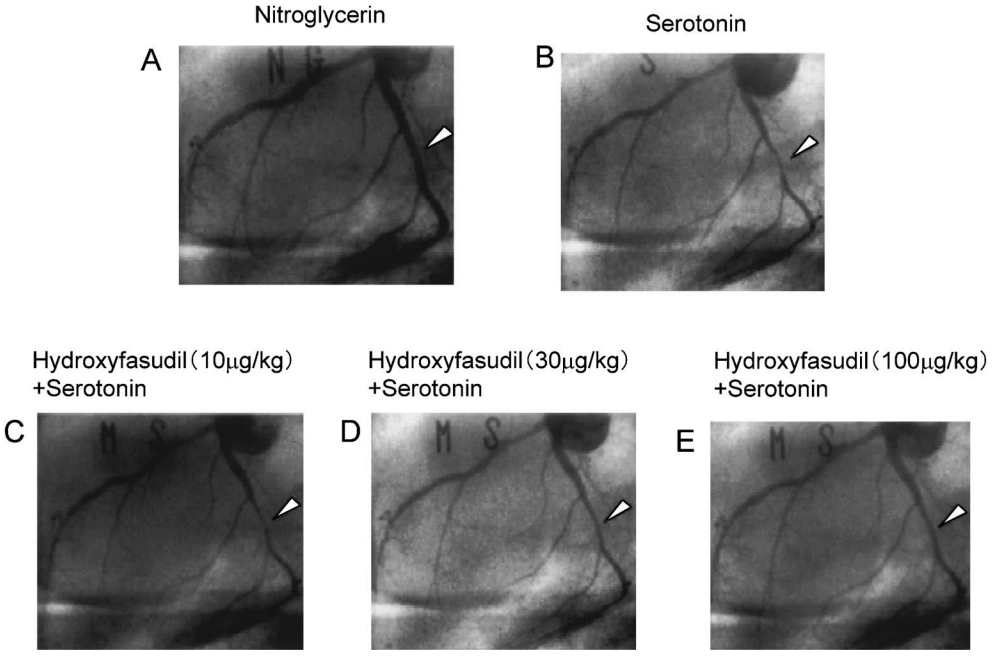

Fig. 5. Coronary Angiograms 2 Weeks after Chronic Treatment with IL-1β[49]

After intracoronary nitroglycerin (10 μg/kg), mild stenotic lesion was noted at the IL-1β-treated site (arrow) (A), where intracoronary serotonin (10 μg/kg) repeatedly induced coronary hyperconstriction (B). This serotonin-induced coronary hyperconstriction was dose-dependently inhibited by pretreatment with intracoronary hydroxyfasudil (10, 30, and 100 μg/kg) (C—E).

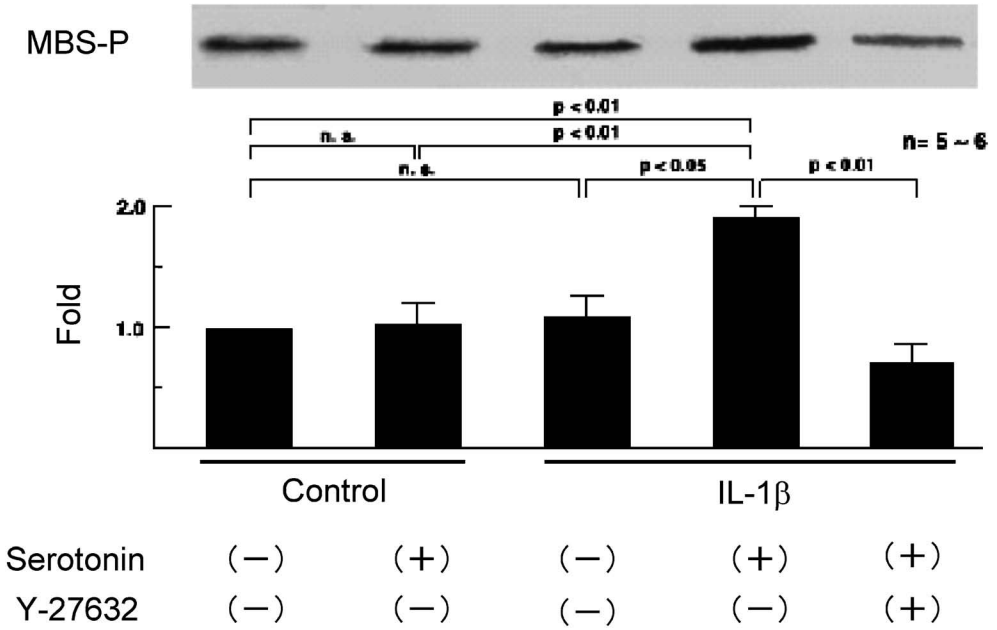

Fig. 6. Western Blot Analysis for MBS Phosphorylation of Porcine Coronary Artery with or without Serotonin[50]

MBS phosphorylation was significantly increased in response to serotonin in IL-1β-treated segment compared with control segment. Y-27632 significantly suppressed MBS phosphorylation in response to serotonin in IL-1β-treated segment.

の血管拡張薬治療に反応しない難治性の冠動脈攣縮に対してもファスジルの効果を検討したところ，著明な改善効果が認められた.[56] これらの結果は，ヒトにおける冠動脈攣縮の分子機構にも Rho キナーゼがその成因に深く関与していることを示すとともに，選択的 Rho キナーゼ阻害薬が冠動脈攣縮の有望な治療薬となり得る可能性を示すものである.

5-2. 動脈硬化，再狭窄 動脈硬化は動脈の 3 層（内膜，中膜，外膜）すべてで，様々な変化が複合的かつ同時並行的に起こる病態である.[57,58] 内膜では，内皮機能不全，炎症細胞の内皮への接着・浸潤，MMP など蛋白分解酵素の発現が生じ，中膜では血管平滑筋の過収縮・増殖・遊走・形質変化などがみられ，外膜では vasa vasorum の増加，炎症細胞の浸潤，線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化がみられる．これらの変化が相まって，動脈硬化での共通現象である血管リモデリング，血管の過収縮，血栓形成，血管新生，血管壁の脆弱化が起こる.[4] われわれはこれらの動脈硬化のプロセスすべてに Rho キナーゼが深く関係していると考え，検討を重ねてきた.

われわれは，ブタの大腿動脈バルーン傷害モデルにおける新生内膜肥厚が，dominant-negative Rho キナーゼを発現させることにより抑制されることを

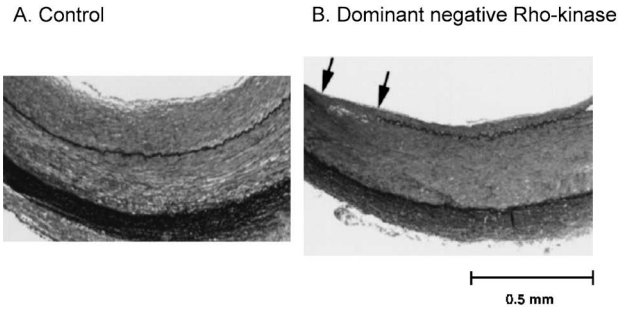

Fig. 7. Histology of Porcine Femoral Arteries Transfected with either AdLacZ (A) or AdDNRhoK (B) after Balloon Injury[59]

Note that neointimal formation is suppressed at AdDNRhoK site despite disruption of internal elastic lamina (shown by arrows).

見出した（Fig. 7）.[59] また，ブタ冠動脈外膜に酸化 LDL と MCP-1 を同時に慢性投与すると，同部におけるマクロファージの内膜及び中膜への遊走と新生内膜肥厚が生じ，これらの病的反応が Rho キナーゼ阻害薬であるファスジルの慢性投与により抑制されることを確認している.[60] さらに，ブタ冠動脈ステント留置後の再狭窄に対しても，ファスジルの慢性経口投与によりその形成が抑制された.[39] 特筆すべきことに，IL-1β 誘発モデルにおいては，いったん形成された動脈硬化病変に対しても，ファスジル慢性投与により病変が退縮した（Fig. 8）.[61] こ

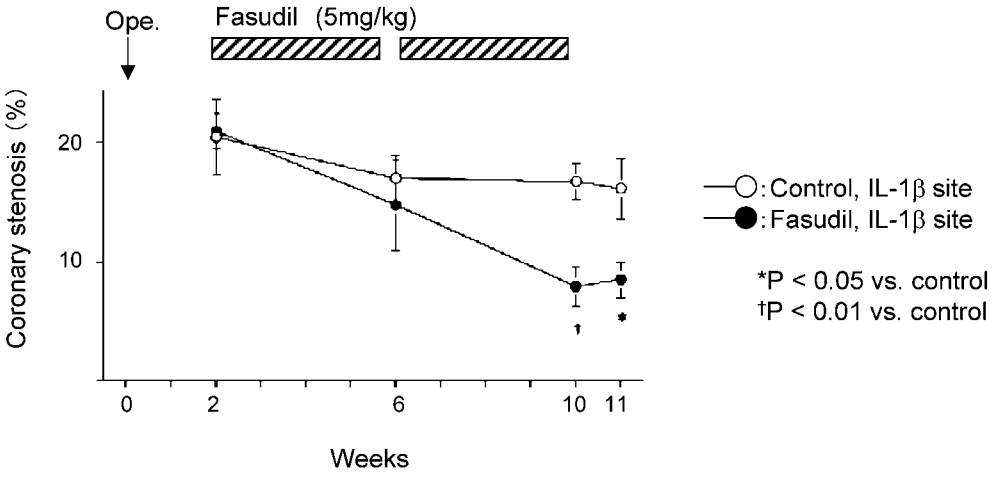

Fig. 8. Time Course of Coronary Stenosis (Evaluated after Intracoronary Nitroglycerin, 10 μg/kg)[61]

Coronary stenotic lesions persisted at the IL-1β-treated coronary segments in the control group, whereas they were significantly reduced in the fasudil group after the 8-week treatment with fasudil followed by a 1-week washout period.

れらのすべての冠動脈硬化モデルで Rho キナーゼ活性が亢進していた．以上の結果から，Rho キナーゼを抑制することが動脈硬化，さらには心筋梗塞や不安定狭心症などの急性冠症候群に対する新たな治療標的となり得ることが示唆される.[4]

5-3. 高血圧症 高血圧症では，血管平滑筋への過剰な刺激や収縮弛緩機能の異常が高血圧状態の持続に深く関与していることが示唆されているが，詳細な機序についてはいまだ不明な点が多い．Uehata らは，Y-27632 を種々の高血圧モデルラットに経口投与し，著明な降圧が認められることを報告した.[62] 興味深いことに，この降圧作用は正常ラットではほとんど認められなかった.[62] また，われわれは高血圧自然発症ラット（SHR）の動脈平滑筋において，Rho キナーゼの発現及びその活性（MBS のリン酸化）が亢進していることを示している (Fig. 9).[63] さらに，高血圧患者にファスジルを投与したところ，健常人と比較してより大きい前腕部の血管抵抗の低下と血流増加が認められた (Fig. 10).[64] これらの結果から，高血圧症の血圧上昇に Rho キナーゼを介した血管平滑筋の収縮が大きな役割を果す可能性が示唆された.

また，SHR では高血圧状態の持続により血管平滑筋の形質変換が生じ，冠動脈病変（血管中膜の肥厚，血管周辺部線維化）が形成される．SHR にファスジルを慢性経口投与することにより，血圧を低下させない用量で冠動脈病変の形成が抑制された.[63] さらに，アンジオテンシン II 持続投与誘発性高血圧ラットにおける冠動脈病変形成及び心筋細胞の肥大に対しても，ファスジル慢性投与により血圧非依存的に抑制作用が確認された.[65] これらの結果は，高血圧に伴う血管病変形成や心肥大の分子機構にも Rho キナーゼが関与していることを示唆し

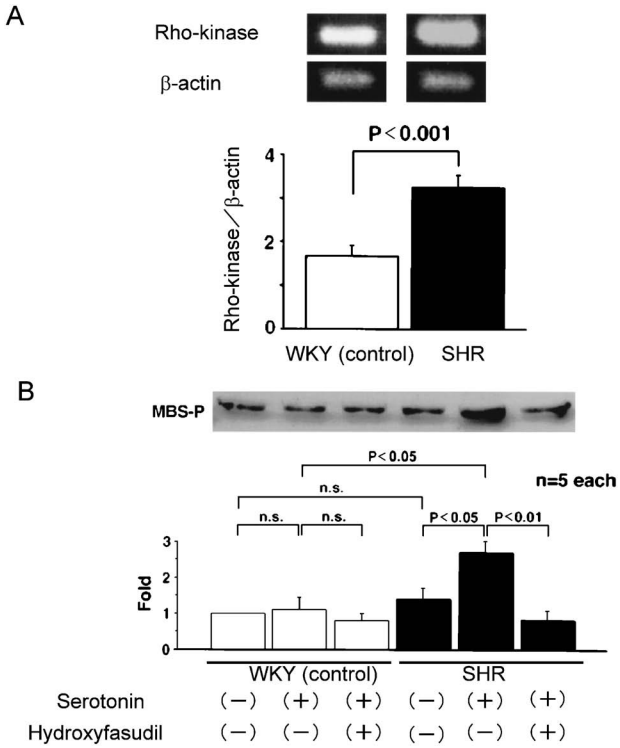

Fig. 9. Expression and Function of Rho-kinase in Blood Vessels from WKY and SHR[63]

RT-PCR analysis for Rho-kinase mRNA expression (A) and Western blot analysis for MBS phosphorylations (MBS-P) (B) in isolated carotid arteries.

ている．

5-4. 肺高血圧症　肺高血圧症は，肺動脈圧及び肺血管抵抗が進行性に上昇する極めて予後不良の疾患である．病態として，肺動脈における内皮細胞障害，中膜肥厚，線維性内膜肥厚などの病理所見が認められる．近年，これらの肺動脈病変に加え，肺動脈の持続的収縮も肺動脈圧及び肺血管抵抗の上昇に関与している可能性が示唆されている．[66] 現在，プロスタサイクリンの経口薬や静注薬，エンドセリン拮抗薬が臨床応用されているが，かならずしも十分な効果は得られていない．

われわれは，モノクロタリン誘発性ラット肺高血圧モデル（MCT モデル）において，モノクロタリン投与時にファスジルの経口投与を開始すると（予防プロトコール），生存率が著明に改善することを明らかにした．さらに，臨床の実態に即して，肺高血圧発症後にファスジル投与を開始しても（治療プロトコール），生存率は有意に改善した（Fig. 11）．[67] MCT モデルの肺動脈では Rho キナーゼの活性が亢進しており，内皮機能の低下，血管平滑筋の過収縮がみられることも示した．[67] また，組織学的解析では MCT モデルで認められる肺動脈の中膜肥厚，微小肺動脈の筋性化がいずれもファスジル投与により抑制された．[67] 最近，われわれは，低酸素誘発性肺高血圧症モデルにおいてもファスジル経口投与が有効であることも見出している．[68] さらに，種々の肺高血圧モデルにおいて，ファスジル又は Y-27632 を急性的に吸入投与することにより，肺動脈圧が低下することも報告されている．[69] 重症肺高血圧症患者に対するファスジル静脈内持続投与では，NO や Ca 拮抗薬には抵抗性を示したにも係わらず，肺血管抵抗の有意な低下が認められた（Fig. 12）．[70] これらの結果から，肺高血圧症の成因（内皮細胞障害，肺動脈病変形成，肺動脈の持続的収縮など）に Rho キナーゼが深く関与している可

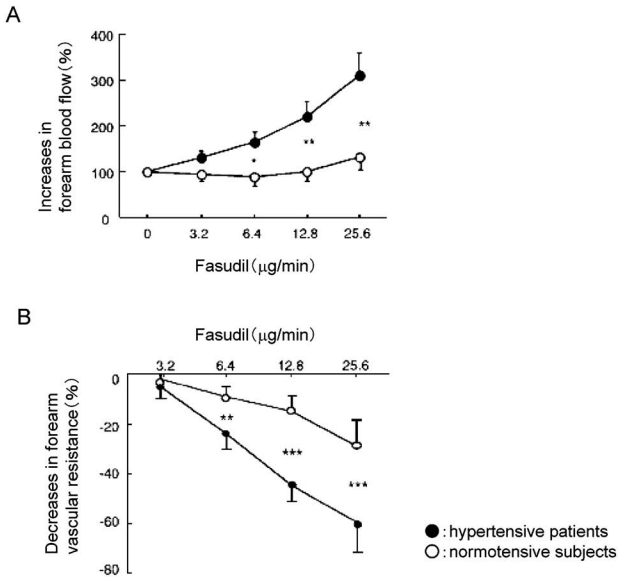

Fig. 10. Acute Responses in Hypertensive Patients by Fasudil Treatment[64]

Percent changes in forearm blood flow (A), Percent changes in forearm vascular resistance (B).

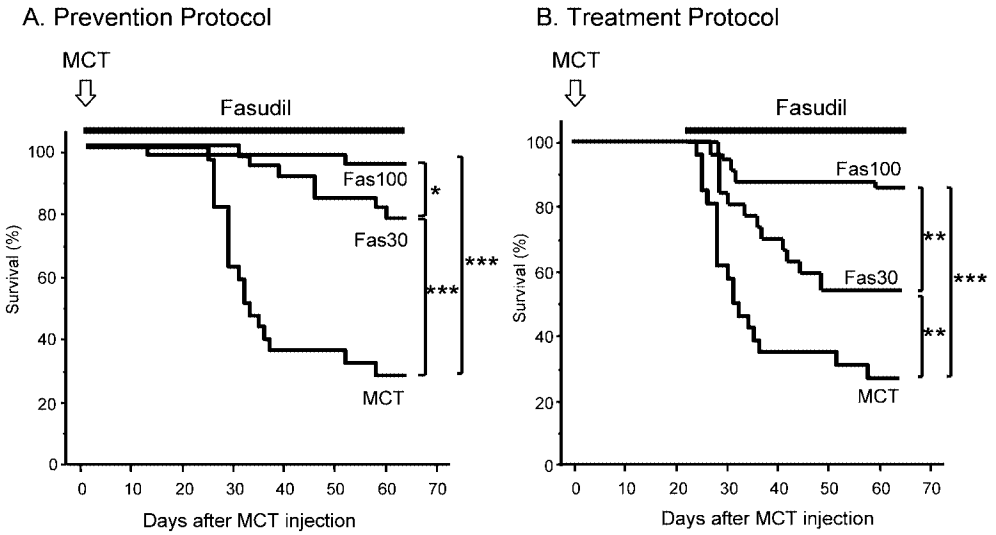

Fig. 11. Fasudil Improves Survival of Rats with Monocrotaline (MCT)-induced Pulmonary Hypertension[67]

Prevention protocol (A), Treatment protocol (B), Fas 30 and 100: fasudil 30 and 100 mg/kg per day, orally, respectively.

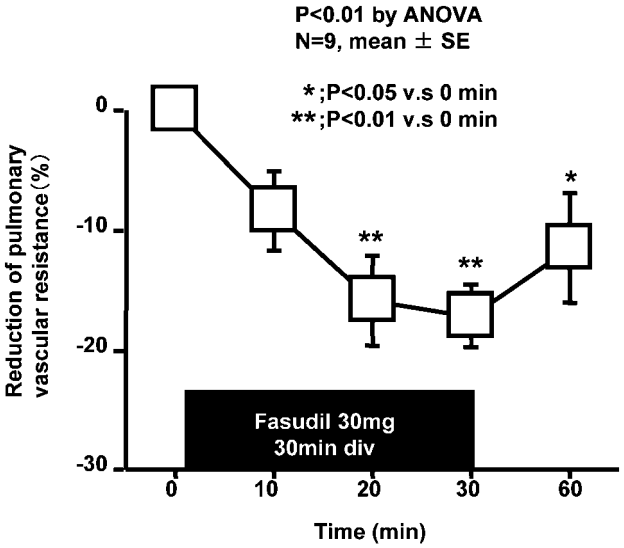

Fig. 12. Intravenous Administration of Fasudil Significantly Reduced Pulmonary Vascular Resistance[70]

能性が示唆された.

5-5. 虚血・再灌流障害 血栓の形成などにより特定の組織が一定時間以上虚血にさらされたのち，血流が回復する（再灌流）と組織に障害が生じることが知られている(虚血・再灌流障害). 虚血・再灌流障害には，内皮細胞傷害，血管攣縮，活性酸素，炎症性細胞の浸潤など複数の機序が関与することが報告されている.[71]

われわれは，イヌの冠動脈虚血・再灌流障害モデルの冠動脈では Rho キナーゼの活性が亢進しており，セロトニンに対する過収縮及びアセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応の低下が起こることを確認した.[72] これらはいずれもヒドロキシファスジルの前投与により抑制された. また，虚血・再灌流部位の内皮細胞における eNOS 発現低下もハイドロキシファスジル投与により改善された. さらに，虚血・再灌流による心筋梗塞の発生もハイドロキシファスジルの前投与により有意に抑制された.[72] これらの結果から，虚血・再灌流による内皮細胞障害，血管攣縮の分子機構には Rho キナーゼが重要な役割を果たしている可能性が示唆された. なお，Rho キナーゼは，好中球における遊走[73]や活性酸素産生[74]にも関与していることが報告されているおり，これらの作用を介した Rho キナーゼの病態への関与も考えられる.

5-6. その他の疾患 Rho キナーゼは，前述の心血管系疾患のみならず，その他の疾患の成因にも関与することが報告されている. イヌにおけるクモ膜下出血後の脳血管攣縮モデルでは，攣縮部位における Rho キナーゼ活性が亢進しており，Y-27632 により脳血管攣縮が抑制されたという報告がある.[75] 現在，ファスジルはクモ膜下出血後の脳血管攣縮抑制薬として臨床応用されている. 平滑筋の異常収縮が原因とされるその他の疾患では，気管支喘息[76]や緑内障[77]などにおいて Rho キナーゼの関与が示唆されている. また，脳梗塞モデルにおいてもファスジル及びヒドロキシファスジルが有効であることが報告されている.[73,78] Rho キナーゼは，骨形成促進因子で知られる bone morphogenic protein-1 (BMP-1) やオステオカルシンの発現を抑制的に調節することから，Rho キナーゼ阻害薬が骨粗鬆症に対しても有効である可能性が示唆されている.[79] また，Rho キナーゼがインスリンレセプターの下流に存在する insulin receptor substrate (IRS)-1 をリン酸化することによりインスリンシグナル伝達を阻害することも明らかとなっており,[80] ファスジルの長期投与はインスリン抵抗性モデルラットに対して有意な改善作用を示した.[81] さらに，Rho キナーゼ阻害薬を用いた海綿体平滑筋弛緩による勃起不全の改善[82]や，がん細胞の浸潤抑制[83]などについても報告がある.

6. Rho キナーゼ阻害剤の将来展望

今日までの多くの研究成果から，Rho キナーゼが様々な疾患に対する新たな治療標的として重要であり，Rho キナーゼ阻害薬がこれらの疾患の治療に有望である可能性が高い. 今後は，Rho キナーゼ阻害薬が有効な疾患の特色を明確にして，大規模臨床試験でエビデンスを確立することが重要であると考えられる. また，現在臨床の場で使用できる Rho キナーゼ阻害薬は静注薬が脳血管攣縮抑制の保険適応を持つファスジルのみであるが，現在，国内外で約 15 社が選択的 Rho キナーゼの開発を進めており，その多くが，心血管病の適応を目指している.[84] ファスジルも含め，現在開発中の Rho キナーゼ阻害薬の多くが，Rho キナーゼの kinase domain に対する拮抗阻害であるが，最近，ファスジルの kinase domain に対する三次元の結合様式が明らかにされたことから，創薬にさらに拍車がかかるものと思われる.[85] 実際，より強い阻害活性を持

つ新たな Rho キナーゼ阻害薬の開発が最近報告されており,[86] 今後，臨床使用可能な新しい特徴を持つ Rho キナーゼ阻害薬が開発されることを期待したい.

最近の分子生物学的又は遺伝学的アプローチにより，ROCK1 と ROCK2 の役割の違いについても多くの研究がなされてきている．これに伴い，従来の Rho キナーゼ阻害薬が持たないアイソフォーム別の選択性を持つ阻害薬が特定の疾患に対してより有効である可能性も考えられる．事実，先日開催された 2006 年のアメリカ心臓病学会では，新しい ROCK2 選択的阻害薬が動脈硬化を抑制したとの発表がなされた.[87] しかし，現段階では，アイソフォーム非選択的 Rho キナーゼ阻害薬とアイソフォーム特異的な阻害薬のどちらが有用かつ安全であるかについては不明であり，今後の詳細な比較検討が必要である.

Rho キナーゼ阻害薬を臨床応用する上で注意しなければならないことは，当然のことながらその副作用である．前述のように，Rho キナーゼは個体発生に重要な役割を果たしていることから，Rho キナーゼ阻害薬の妊婦への投与は禁忌である．また，すでに臨床使用されているファスジルも，それを経口投与した場合，ヒトにおける年単位の長期的な安全性についてはいまだ確認されていない．適応とする疾患により長期的に使用する場合もあることから，慎重に検討を重ねる必要がある．緑内障や気管支喘息を適応症とした場合は，副作用を回避する手段として，点眼や吸入などの局所投与も有効であるかもしれない.

7. おわりに

本稿では，Rho キナーゼの基礎的知見（構造，発現，活性，病態への関与）と Rho キナーゼ阻害薬の特徴と将来性について，われわれがこれまでに得た知見を中心に概説した．各心血管系疾患の詳細な分子機構は複雑であり，Rho キナーゼの関与についても，まだ明らかにすべき点は多い．しかし，Rho キナーゼが広範囲に渡る心血管系疾患の病因に大きく関与すること，Rho キナーゼ阻害薬がそれらの心血管系疾患の治療において幅広い薬理学的特性により有用性を発揮することは明らかであると思われる．今後さらなる詳細な検討が行われ，Rho キナーゼ阻害薬が臨床現場で活用されるようになることを期待したい.

謝辞　本稿で述べた筆者らの研究の一部は，文部科学省の科学研究補助金，科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業（CREST），及び医薬基盤研究所の基礎研究推進事業により実施した．筆者らの一連の研究に参加した九州大学大学院循環器内科・東北大学大学院循環器病態学の共同研究者諸氏に感謝する．また，共同研究者の名古屋大学医学部大学院細胞薬理学科の貝淵弘三教授・天野睦紀博士，旭化成ファーマの共同研究者諸氏のご協力に感謝する.

REFERENCES

1) Matsui T., Amano M., Yamamoto T., Chihara K., Nakafuku M., Ito M., Nakano T., Okawa K., Iwamatsu A., Kaibuchi K., *EMBO J.*, **15**, 2208–2216 (1996).
2) Leung T., Manser E., Tan L., Lim L., *J. Biol. Chem.*, **270**, 29051–29054 (1995).
3) Ishizaki T., Maekawa M., Fujisawa K., Okawa K., Iwamatsu A., Fujita A., Watanabe N., Saito Y., Kakizuka A., Morii N., Narumiya S., *EMBO J.*, **15**, 1885–1893 (1996).
4) Shimokawa H., Takeshita A., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 1767–1775 (2005).
5) Nakagawa O., Fujisawa K., Ishizaki T., Saito Y., Nakao K., Narumiya S., *FEBS Lett.*, **392**, 189–193 (1996).
6) Hiroki J., Shimokawa H., Higashi M., Morikawa K., Kandabashi T., Kawamura N., Kubota T., Ichiki T., Amano M., Kaibuchi K., Takeshita A., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **37**, 537–546 (2004).
7) Hiroki J., Shimokawa H., Mukai Y., Ichiki T., Takeshita A., *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **326**, 154–159 (2005).
8) Oi K., Shimokawa H., Hiroki J., Uwatoku T., Abe K., Matsumoto Y., Nakajima Y., Nakajima K., Takeichi S., Takeshita A., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 918–922 (2004).
9) Tanaka T., Nishimura D., Wu R. C., Amano M., Iso T., Kedes L., Nishida H., Kaibuchi K., Hamamori Y., *J. Biol. Chem.*, **281**, 15320–15329 (2006).
10) Amano M., Chihara K., Nakamura N., Kaneko T., Matsuura Y., Kaibuchi K., *J. Biol.*

Chem., **274**, 32418–32424 (1999).
11) Amano M., Fukata Y., Kaibuchi K., *Exp. Cell Res.*, **261**, 44–51 (2000).
12) Doran J. D., Liu X., Taslimi P., Saadat A., Fox T., *Biochem. J.*, **384**, 255–262 (2004).
13) Feng J., Ito M., Kureishi Y., Ichikawa K., Amano M., Isaka N., Okawa K., Iwamatsu A., Kaibuchi K., Hartshorne D. J., Nakano T., *J. Biol. Chem.*, **274**, 3744–3752 (1999).
14) Sebbagh M., Renvoize C., Hamelin J., Riche N., Bertoglio J., Breard J., *Nat. Cell. Biol.*, **3**, 346–352 (2001).
15) Sebbagh M., Hamelin J., Bertoglio J., Solary E., Breard J., *J. Exp. Med.*, **201**, 465–471 (2005).
16) Riento K., Guasch R. M., Garg R., Jin B., Ridley A. J., *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 4219–4229 (2003).
17) Funakoshi Y., Ichiki T., Shimokawa H., Egashira K., Takeda K., Kaibuchi K., Takeya M., Yoshimura T., Takeshita A., *Hypertension*, **38**, 100–104 (2001).
18) Takeda K., Ichiki T., Tokunou T., Iino N., Fujii S., Kitabatake A., Shimokawa H., Takeshita A., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 868–873 (2001).
19) van Nieuw Amerongen G. P., van Delft S., Vermeer M. A., Collard J. G., van Hinsbergh V. W., *Circ. Res.*, **87**, 335–340 (2000).
20) Yamamoto Y., Ikegaki I., Sasaki Y., Uchida T., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **35**, 203–211 (2000).
21) Martínez M. C., Randriamboavonjy V., Ohlmann P., Komas N., Duarte J., Schneider F., Stoclet J.-C., Andriantsitohaina R., *Am. J. Physiol.*, **279**, H1228–H1238 (2000).
22) Kishi H., Bao J., Kohama K., *J. Biochem.*, **128**, 719–722 (2000).
23) Sauzeau V., Jeune H., Cario–Toumaniantz C., Vaillant N., Gadeau A.-P., Desgranges C., Scalbert E., Chardin P., Pacaud P., Loirand G., *Am. J. Physiol.*, **278**, H1751–H1761 (2000).
24) Sauzeau V., Le Mellionnec E., Bertoglio J., Scalbert E., Pacaud P., Loirand G., *Circ. Res.*, **88**, 1102–1104 (2001).
25) Horowitz A., Menice C. B., Laporte R., Morgan K. G., *Physiol. Rev.*, **76**, 967–1003 (1997).
26) Somlyo A. P., Somlyo A. V., *Nature*, **372**, 231–236 (1994).
27) Amano M., Ito M., Kimura K., Fukata Y., Chihara K., Nakano T., Matsuura Y., Kaibuchi K., *J. Biol. Chem.*, **271**, 20246–20249 (1996).
28) Kimura K., Ito M., Amano M., Chihara K., Fukata Y., Nakafuku M., Yamamori B., Feng J., Nakano T., Okawa K., Iwamatsu A., Kaibuchi K., *Science*, **273**, 245–248 (1996).
29) Seasholtz T. M., Majumdar M., Kaplan D. D., Brown J. H., *Circ. Res.*, **84**, 1186–1193 (1999).
30) Kamiyama M., Utsunomiya K., Taniguchi K., Yokota T., Kurata H., Tajima N., Kondo K., *J. Atheroscler. Thromb.*, **10**, 117–123 (2003).
31) Polyak K., Lee M. H., Erdjument-Bromage H., Koff A., Roberts J. M., Tempst P., Massague J., *Cell*, **78**, 59–66 (1994).
32) Sawada N., Itoh H., Ueyama K., Yamashita J., Doi K., Chun T. H., Inoue M., Masatsugu K., Saito T., Fukunaga Y., Sakaguchi S., Arai H., Ohno N., Komeda M., Nakao K., *Circulation*, **101**, 2030–2033 (2000).
33) Shibata R., Kai H., Seki Y., Kato S., Morimatsu M., Kaibuchi K., Imaizumi T., *Circulation*, **103**, 284–289 (2001).
34) Horwitz A. R., Parsons J. T., *Science*, **286**, 1102–1103 (1999).
35) Ai S., Kuzuya M., Koike T., Asai T., Kanda S., Maeda K., Shibata T., Iguchi A., *Atherosclerosis*, **155**, 321–327 (2001).
36) Kaibuchi K., Kuroda S., Amano M., *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 459–486 (1999).
37) Radeff J. M., Nagy Z., Stern P. H., *J. Bone Miner. Res.*, **19**, 1882–1891 (2004).
38) Hattori T., Shimokawa H., Higashi M., Hiroki J., Mukai Y., Kaibuchi K., Takeshita A., *Circ. Res.*, **94**, 46–52 (2004).
39) Matsumoto Y., Uwatoku T., Abe K., Oi K., Hattori T., Morishige K., Eto Y., Fukumoto Y., Nakamura K., Shibata Y., Matsuda T., Takeshita A., Shimokawa H., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 181–186 (2004).
40) Takemoto M., Sun J., Hiroki J., Shimokawa H., Liao J. K., *Circulation*, **106**, 57–62 (2002).
41) Nakamura Y., Kaneto H., Miyatsuka T., Matsuoka T. A., Matsuhisa M., Node K., Hori

M., Yamasaki Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, 68–73 (2006).

42) Wei L., Roberts W., Wang L., Yamada M., Zhang S., Zhao Z., Rivkees S. A., Schwartz R. J., Imanaka-Yoshida K., *Development*, **128**, 2953–2962 (2001).

43) Thumkeo D., Keel J., Ishizaki T., Hirose M., Nonomura K., Oshima H., Oshima M., Taketo M. M., Narumiya S., *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 5043–5055 (2003).

44) Shimizu Y., Thumkeo D., Keel J., Ishizaki T., Oshima H., Oshima M., Noda Y., Matsumura F., Taketo M. M., Narumiya S., *J. Cell Biol.*, **168**, 941–953 (2005).

45) Rikitake Y., Oyama N., Wang C. Y., Noma K., Satoh M., Kim H. H., Liao J. K., *Circulation*, **112**, 2959–2965 (2005).

46) Zhang Y. M., Bo J., Taffet G. E., Chang J., Shi J., Reddy A. K., Michael L. H., Schneider M. D., Entman M. L., Schwartz R. J., Wei L., *FASEB J.*, **20**, 916–925 (2006).

47) Fuster V., Badimon L., Badimon J. J., Chesebro J. H., *N. Engl. J. Med.*, **326**, 310–318 (1992).

48) Shimokawa H., Ito A., Fukumoto Y., Kadokami T., Nakaike R., Sakata M., Takayanagi T., Egashira K., Takeshita A., *J. Clin. Invest.*, **97**, 769–776 (1996).

49) Shimokawa H., Seto M., Katsumata N., Amano M., Kozai T., Yamawaki T., Kuwata K., Egashira K., Ikegaki I., Asano T., Kaibuchi K., Takeshita A., *Cardiovasc. Res.*, **43**, 1029–1039 (1999).

50) Kandabashi T., Shimokawa H., Miyata K., Kunihiro I., Kawano Y., Fukata Y., Higo T., Egashira K., Takahashi S., Kaibuchi K., Takeshita A., *Circulation*, **101**, 1319–1323 (2000).

51) Hizume T., Morikawa K., Takaki A., Abe K., Sunagawa K., Amano M., Kaibuchi K., Kubo C., Shimokawa H., *Circ. Res.*, **99**, 767–775 (2006).

52) Masumoto A., Mohri M., Shimokawa H., Urakami L., Usui M., Takeshita A., *Circulation*, **105**, 1545–1547 (2002).

53) Kaski J. C., Rosano G. M., Collins P., Nihoyannopoulos P., Maseri A., Poole-Wilson P. A., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **25**, 807–814 (1995).

54) Mohri M., Koyanagi M., Egashira K., Tagawa H., Ichiki T., Shimokawa H., Takeshita A., *Lancet*, **351**, 1165–1169 (1998).

55) Mohri M., Shimokawa H., Hirakawa Y., Masumoto A., Takeshita A., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **41**, 15–19 (2003).

56) Inokuchi K., Ito A., Fukumoto Y., Matoba T., Shiose A., Nishida T., Masuda M., Morita S., Shimokawa H., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **44**, 275–277 (2004).

57) Ross R., *N. Engl. J. Med.*, **340**, 115–126 (1999).

58) Libby P., *Nature*, **420**, 868–874 (2002).

59) Eto Y., Shimokawa H., Hiroki J., Morishige K., Kandabashi T., Matsumoto Y., Amano M., Hoshijima M., Kaibuchi K., Takeshita A., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **278**, H1744–H1750 (2000).

60) Morishige K., Shimokawa H., Eto Y., Kandabashi T., Miyata K., Matsumoto Y., Kaibuchi K., Takeshita A., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 548–554 (2001).

61) Shimokawa H., Morishige K., Miyata K., Kandabashi T., Eto Y., Ikegaki I., Asano T., Kaibuchi K., Takeshita A., *Cardiovasc. Res.*, **51**, 169–177 (2001).

62) Uehata M., Ishizaki T., Satoh H., Ono T., Kawahara T., Morishita T., Tamakawa H., Yamagami K., Inui J., Maekawa M., Narumiya S., *Nature*, **389**, 990–994 (1997).

63) Mukai Y., Shimokawa H., Matoba T., Kandabashi T., Satoh S., Kaibuchi K., Takeshita A., *FASEB J.*, **15**, 1062–1064 (2001).

64) Masumoto A., Hirooka Y., Shimokawa H., Hironaga K., Setoguchi S., Takeshita A., *Hypertension*, **38**, 1307–1310 (2001).

65) Higashi M., Shimokawa H., Hattori T., Hiroki J., Mukai Y., Morikawa K., Ichiki T., Takahashi S., Takeshita A., *Circ. Res.*, **93**, 767–775 (2003).

66) Stenmark K. R., McMurtry I. F., *Circ. Res.*, **97**, 95–98 (2005).

67) Abe K., Shimokawa H., Morikawa K., Uwatoku T., Oi K., Matsumoto Y., Hattori T., Nakashima Y., Kaibuchi K., Sueishi K., Takeshita A., *Circ. Res.*, **94**, 385–393 (2004).

68) Abe K., Tawara S., Oi K., Hizume T., Uwatoku T., Fukumoto Y., Kaibuchi K., Shimokawa H., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*,

(in press).
69) Nagaoka T., Fagan K. A., Gebb S. A., Morris K. G., Suzuki T., Shimokawa H., McMurtry I. F., Oka M., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **171**, 494–499 (2005).
70) Fukumoto Y., Matoba T., Ito A., Tanaka H., Kishi T., Hayashidani S., Abe K., Takeshita A., Shimokawa H., *Heart*, **91**, 391–392 (2005).
71) Korthuis R. J., Granger D. N., Townsley M. I., Taylor A. E., *Circ. Res.*, **57**, 599–609 (1985).
72) Yada T., Shimokawa H., Hiramatsu O., Kajiya T., Shigeto F., Tanaka E., Shinozaki Y., Mori H., Kiyooka T., Katsura M., Ohkuma S., Goto M., Ogasawara Y., Kajiya F., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **45**, 599–607 (2005).
73) Satoh S., Utsunomiya T., Tsurui K., Kobayashi T., Ikegaki I., Sasaki Y., Asano T., *Life Sci.*, **69**, 1441–1453 (2001).
74) Arai M., Sasaki Y., Nozawa R., *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 1487–1490 (1993).
75) Sato M., Tani E., Fujikawa H., Kaibuchi K., *Circ. Res.*, **87**, 195–200 (2000).
76) Iizuka K., Shimizu Y., Tsukagoshi H., Yoshii A., Harada T., Dobashi K., Murozono T., Nakazawa T., Mori M., *Eur. J. Pharmacol.*, **406**, 273–279 (2000).
77) Honjo M., Inatani M., Kido N., Sawamura T., Yue B. Y., Honda Y., Tanihara H., *Arch. Ophthalmol.*, **119**, 1171–1178 (2001).
78) Toshima Y., Satoh S., Ikegaki I., Asano T., *Stroke*, **31**, 2245–2250 (2000).
79) Ohnaka K., Shimoda S., Nawata H., Shimokawa H., Kaibuchi K., Iwamoto Y., Takayanagi R., *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, **287**, 337–342 (2001).
80) Begum N., Sandu O. A., Ito M., Lohmann S. M., Smolenski A., *J. Biol. Chem.*, **277**, 6214–6222 (2002).
81) Kanda T., Wakino S., Homma K., Yoshioka K., Tatematsu S., Hasegawa K., Takamatsu I., Sugano N., Hayashi K., Saruta T., *FASEB. J.*, **20**, 169–171 (2006).
82) Chitaley K., Wingard C. J., Clinton Webb R., Branam H., Stopper V. S., Lewis R. W., Mills T. M., *Nat. Med.*, **7**, 119–122 (2001).
83) Ito K., Yoshioka K., Akedo H., Uehata M., Ishizaki T., Narumiya S., *Nat. Med.*, **5**, 221–225 (1999).
84) Shimokawa H., Rashid M., *Trend. Pharmacol. Sci.*, (2007) (in press).
85) Yamaguchi H., Kasa M., Amano M., Kaibuchi K., Hakoshima T., *Structure*, **14**, 589–600 (2006).
86) Doe C., Bentley R., Behm D. J., Lafferty R., Stavenger R., Jung D., Bamford M., Panchal T., Grygielko E., Wright L. L., Smith G. K., Chen Z., Webb C., Khandekar S., Yi T., Kirkpatrick R., Dul E., Jolivette L., Marino Jr. J. P., Willette R., Lee D., Hu E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **3**, (2006) (Epub ahead of print).
87) Schueller O., Tong W., Ferkany J. W., Sweetnam P., *Circulation*, **114** (Suppl II), II–228 (Abstract) (2006).