

冠動脈攣縮および動脈硬化の分子機構における Rho-kinase の役割

下川 宏明*

はじめに

近年の分子生物学の進歩は、種々の細胞機能の制御における低分子量G蛋白 (Rho, Ras, Rab, Sar1/Arf, Ran family など) の重要性を明らかにした¹⁾。Rho family には、Rho (isoforms A-E, G) · Rac (isoforms 1, 2) · Cdc42 · TC10 など、少なくとも10のメンバーが存在することが知られている^{1, 2)}。RhoA · RhoB · RhoC (以下 Rho と総称する) の機能ドメインは同じアミノ酸配列を有し、類似した細胞内標的を有している²⁾。Rho は血管平滑筋の Ca 感受性を調節することが知られており、ミオシンホスファターゼの抑制を介して作用すると考えられていた^{1, 2)}。しかし、Rho の下流の細胞内情報伝達に関しては、長年不明であった。

1990年代の半ば、日本の2つのグループとシンガポールのグループが、全く独立して、Rho の標的の一つを同定し、これを Rho-kinase³⁾/ROK α ⁴⁾/ROCK2⁵⁾ と命名した。ROK β ⁴⁾/ROCK1⁵⁾ は Rho-kinase のアイソフォームである (本稿では、Rho-kinase/ROK α /ROCK2 と ROK β /ROCK1 を Rho-kinase と総称する)。その後、Rho-kinase に加えていくつかの蛋白が Rho の標的として同定された。これらの中には、protein kinase N (PKN) · rhotekin · citron · p140mDia · citron kinase などが含まれる^{6, 7)} (図1)。しかし、Rho-kinase 以外の Rho の標的蛋白の役割はまだ明らかではない。さらに、Rho-kinase の下流の標的蛋白として、ミオシンホスファターゼの myosin-binding subunit (MBS) · ERM (ezrin, radixin, moesin) ·

adducin · intermediate filament (vimentin) · Na⁺-H⁺-exchanger · LIM-kinase などが発見同定された²⁾。

その後、Rho-kinase がミオシンホスファターゼの MBS を介してミオシン軽鎖のリン酸化を調節することも明らかにされた^{8, 9)}。この Rho の標的としての Rho-kinase の発見以来、Rho/Rho-kinase 経路の役割について、特に循環器領域で多くの研究が行われた。本稿では、心血管病、特に冠動脈攣縮と動脈硬化の分子機構における Rho-kinase の役割について概説する。

Rho-kinase 研究の方法論

Rho-kinase の重要性を検討するためには、それを選択的に抑制する方法を開発する必要がある。このために dominant-negative Rho-kinase を遺伝子導入する方法と薬理的な Rho-kinase 阻害薬が開発された。図2に示すように、Rho-kinase はN末端にキナーゼドメインを、C末端にPHドメインを有し、その間に coiled-coil ドメインを有している。Rho-kinase の Rho 結合部位は coiled-coil ドメインのC末端に位置し³⁾、GTP型 Rho に結合することにより Rho-kinase 活性が亢進する。理論的には、キナーゼ活性を全く欠失させたものやC末端のフラグメントでキナーゼ活性を欠くものは、細胞内では dominant-negative Rho-kinase として働くはずである²⁾。したがって、点変異により Rho 結合活性を欠失させかつ PH ドメインを有する C 末端フラグメント [RB/PH(TT)] は、Rho-kinase に対する特異的な dominant-negative Rho-kinase として働く (図2)²⁾。Rho-kinase 阻害薬としては fasudil¹⁰⁾ と Y-27632¹¹⁾ がある。これらの薬剤は、ATP 拮抗阻害を介して Rho-kinase 活性を

*九州大学大学院医学研究院循環器内科学

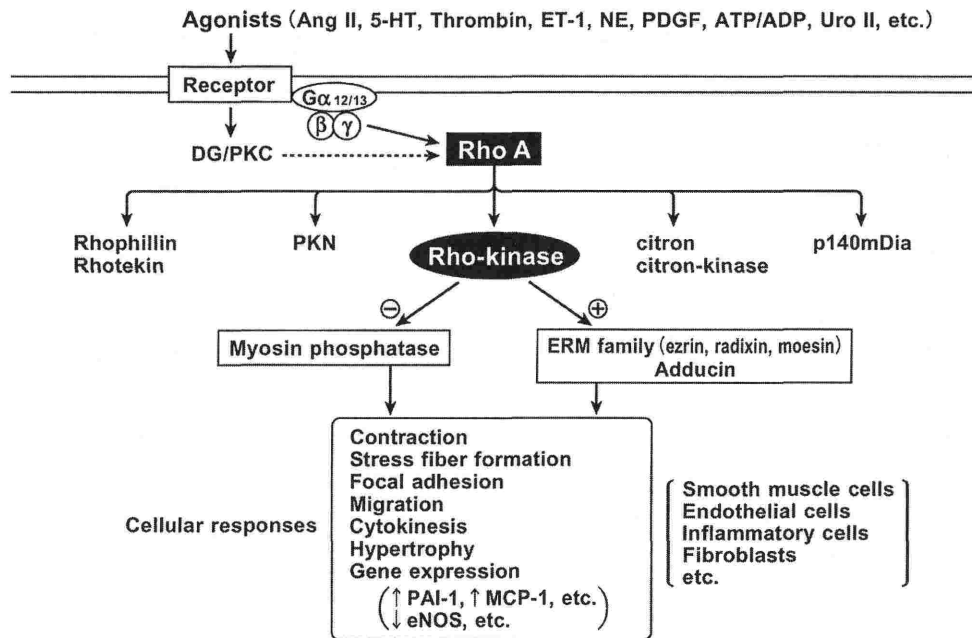


図1 心血管病の成因における Rho/Rho-kinase 経路の重要性

Rho/Rho-kinase 経路は、多くの重要な血管作動性物質の細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たしている。この中には、angiotensin II (Ang II)・serotonin, thrombin・endothelin-1 (ET-1)・norepinephrine (NE)・platelet-derived growth factor (PDGF), adenosine triphosphate (ATP)/adenosine diphosphate (ADP)および細胞外ヌクレオチド・urotensin II (Uro II)などが含まれる。Rho-kinaseは、標的蛋白の機能を調節することにより、血管平滑筋の収縮や動脈硬化の成因に深く関与している。DG, diacylglycerol; PKC, protein kinase C。実線、証明されている経路；破線、まだ証明されていない経路。

抑制する¹²⁾。最近、著者らは、fasudilが経口吸収後に代謝されて生成されるhydroxyfasudilがより選択的なRho-kinase阻害作用を有することを見出した¹³⁾。HydroxyfasudilおよびY-27632のKi値(μM)は、Rho-kinaseに対して0.17および0.14、protein kinase Cに対して18および26、ミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)に対して140および>250である^{11,13)}。

細胞内シグナル伝達における Rho-kinase 経路の重要性

Rho-kinaseが、多くの血管作動物質の細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たしていることが、最近の多くの研究により明らかにされた。すなわち、angiotensin II¹⁴⁻¹⁶⁾・serotonin¹⁷⁾・thrombin^{18,19)}・endothelin-1^{20,21)}、norepinephrine²²⁾・platelet-derived growth factor²³⁾・細胞外ヌクレオチド²⁴⁾・urotensin II²⁵⁾などの細胞内シグナル伝達にRho-kinaseは重要な役割を果たしている(図1)。例えば、

Rho-kinaseは、ラット大動脈由来培養血管平滑筋細胞において、angiotensin II誘発性のmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)¹⁵⁾やplasminogen activator inhibitor-1¹⁶⁾の発現の増強に重要な役割を果たしている。後述するように、Rho-kinaseのmRNA発現は炎症性/動脈硬化性病変部位で、動物モデル^{17,26)}でもヒト²⁷⁾でも亢進しており、血管の収縮性の亢進に関与している。ヒト冠動脈由来培養血管平滑筋細胞では、Rho-kinaseの発現は、angiotensin IIやinterleukin-1 β などの炎症性刺激により亢進し、エストロゲンにより抑制的に調節されている²⁸⁾。Rho-kinaseの発現には、PKCやNF- κ Bを介するシグナル伝達路が関与している²⁸⁾。最近、著者らは、低酸素による内皮型NO合成酵素(eNOS)の発現低下にRho-kinaseの発現・活性の増加が関与しており、hydroxyfasudilがそれを著明に改善させることを見出した²⁹⁾。現在臨床で広く用いられているHMG-還元酵素阻害薬(スタチン)は、部分的なRhoの阻害薬であり、し

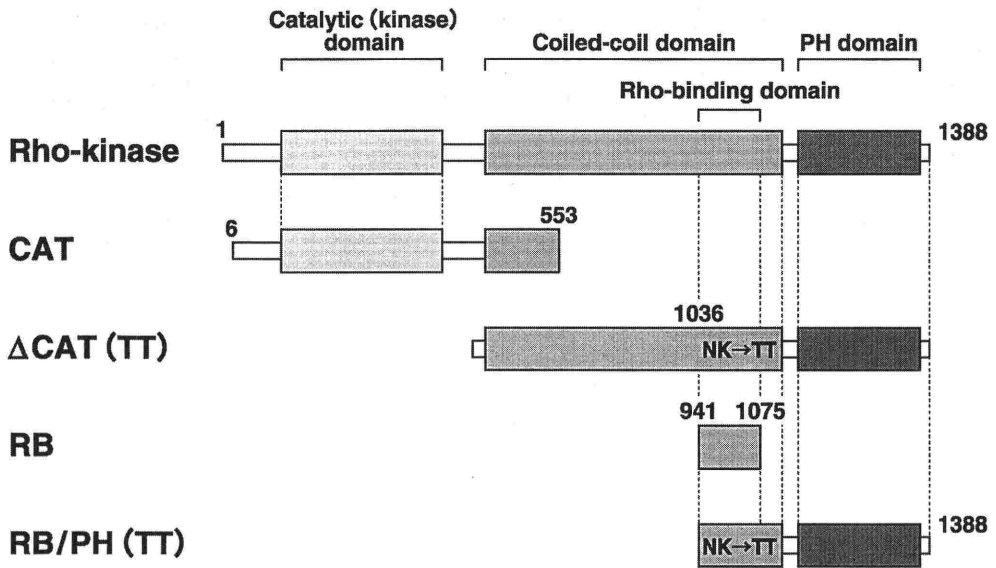


図2 Rho-kinase の分子構造とその変異体

Rho-kinase は大きく3つのドメインから成っており、リン酸化酵素活性はキナーゼドメインに、Rho 結合部位(RB)はcoiled-coil ドメインのC末端に位置する。Rho-kinase のC末端を欠く構造 (PHまたはPHとcoiled-coil ドメイン)は dominant-active Rho-kinase となり、酵素活性を欠く構造やキナーゼドメインを欠くC末端フラグメントは dominant-negative Rho-kinase として働く。特に、RB/PH(TT)は、Rho-kinase を特異的に抑制する dominant-negative Rho-kinase として働く。

たがって部分的な Rho-kinase の阻害薬と見なすことができる。

冠動脈攣縮

冠動脈攣縮は、異型狭心症だけではなく、他のタイプの狭心症や心筋梗塞、突然死などにも深く関与していることが知られている¹⁷⁾。この冠動脈攣縮の分子機構に Rho-kinase が深く関与していることが明らかになった。実際、著者らの炎症性冠動脈硬化病変における冠攣縮モデル (ブタ)³¹⁾において、fasudil³⁰⁾や hydroxyfasudil¹³⁾の冠動脈内投与は冠攣縮の発生を著明に抑制する。また、fasudil/hydroxyfasudil による Rho-kinase の抑制により、冠攣縮部位で亢進したミオシン軽鎖のリン酸化 (一リン酸化も二リン酸化も) 抑制された^{13,30)}。さらに、冠攣縮部位では Rho-kinase の発現や活性が亢進しており、ミオシンホスファターゼをその MBS をリン酸化することにより抑制し、結果的にミオシン軽鎖のリン酸化を亢進させ冠攣縮を惹起していることを明らかにした^{17,26)} (図3)。また、同様の機構がヒト動脈硬化血管に

においても働いていることも認められた²⁷⁾。Fasudil の抗心筋虚血作用は、endothelin-1 誘発性の心筋虚血モデル (ウサギ)³²⁾や頻拍ペーシング誘発性の心筋虚血モデル (イヌ)³³⁾でも確認された。

臨床においても、冠攣縮性狭心症患者におけるアセチルコリン誘発性冠攣縮を fasudil の冠動脈内投与が著明に抑制するところから、ヒトにおける冠攣縮の分子機構に Rho-kinase が深く関与していることが示唆される³⁴⁾。また、微小血管狭心症の成因にも Rho-kinase が関与している可能性を示す結果を得た³⁵⁾。最近国内で実施された安定労作狭心症を対象とした臨床治験において、fasudil の経口投与は抗狭心作用を有し、かつ副作用も少ないことが確認された³⁶⁾。この治験において、fasudil は運動負荷テスト中の心拍数・血圧を観察期間中と比して変化させることなく、抗狭心作用を惹起した。また、その作用は、側副血路の有無には関係がなかった。これらの結果は、労作中の冠動脈収縮を Rho-kinase 阻害薬が抑制している可能性を示唆する³⁶⁾ (図4)。Rho-kinase 阻害薬の不安定狭心症や心筋梗塞における有用性に

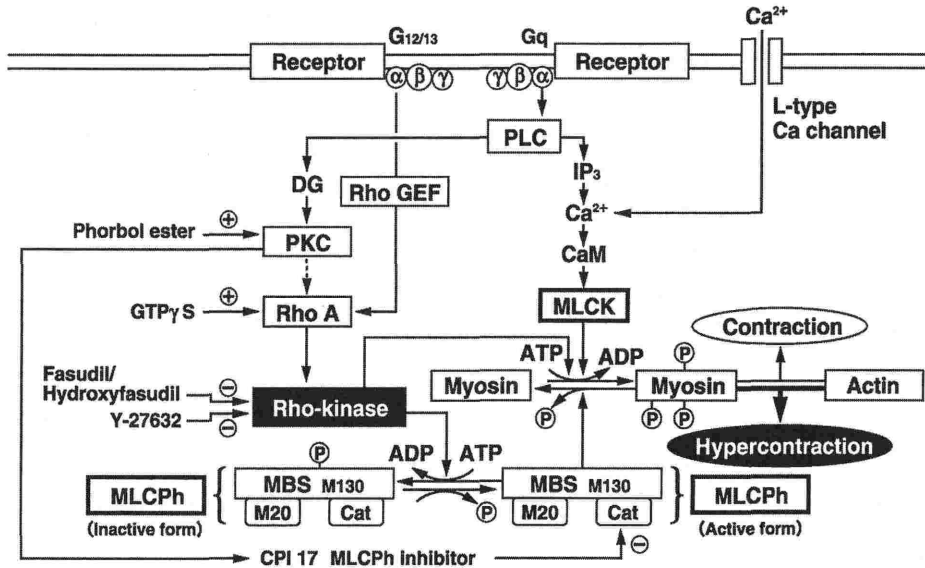


図3 冠動脈攣縮の分子機構

種々のアゴニストの刺激により Rho/Rho-kinase 経路は活性化され、ミオシンホスファターゼの抑制（MBS のリン酸化を介する）を通じてミオシン軽鎖のリン酸化が生じ、血管平滑筋の過収縮が生じる。これに対して、細胞内貯蔵部位からの Ca 放出の関与は小さい。Rho/Rho-kinase 経路においては、種々の機序に変化が生じうる。すなわち、Rho/Rho-kinase の発現の亢進、Rho-kinase 活性の亢進、ミオシンホスファターゼ活性の抑制などが生じ、これらの変化は全てミオシン軽鎖のリン酸化の亢進につながる。

PLC, phospholipase C; DG, diacylglycerol; PKC, protein kinase C; GEF, guanosine nucleotide exchange factor; GTP, guanosine triphosphate; IP₃, inositol-1,4,5-triphosphate; CaM, calmodulin; MLC, myosin light chain; MLCK, myosin light chain kinase; Cat, catalytic unit; M20, 20kDa subunit; CPI-17, C-kinase-potentiated inhibitory protein of myosin phosphatase. +, 刺激; -, 抑制。実線, 証明された経路; 破線, まだ証明されていない経路。

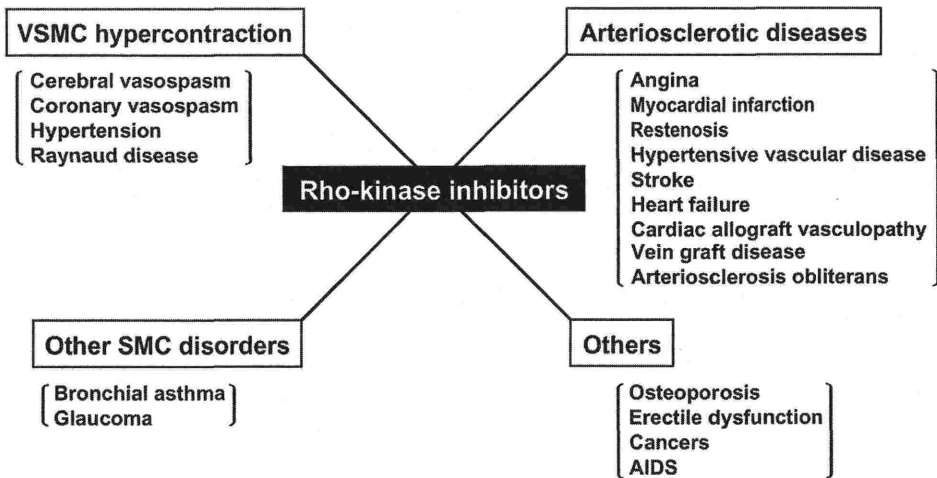


図4. Rho-kinase 阻害薬の幅広い臨床応用の可能性

Rho-kinase 阻害薬は、血管平滑筋の過収縮が原因で生じる攣縮性疾患（脳血管攣縮、冠動脈攣縮、高血圧症）の治療には明らかに有効である。Rho-kinase 阻害薬は、動脈硬化性疾患全般（狭心症、心筋梗塞、高血圧性血管病、脳卒中、心不全、閉塞性動脈硬化症など）の治療に有用であることが期待される。また、Rho-kinase 阻害薬は、その他の平滑筋の過収縮性疾患（気管支喘息、緑内障など）にも有効である可能性がある。さらに、最近の研究によると、骨粗鬆症・勃起不全・悪性腫瘍・AIDS の治療に有効である可能性が示されているが、これらの点は、今後さらに検討する必要がある。

については、今後の検討課題である。

動脈硬化

Rho-kinase は、血管平滑筋の収縮^{1, 17, 26, 27)}だけではなく、アクチン細胞骨格の構築^{6, 37, 38)}、細胞の接着・遊走³⁹⁾、細胞分裂⁴⁰⁾、遺伝子発現^{15, 16, 41)}など、動脈硬化の発症・進展に関与すると考えられる多くの細胞機能に深く関与している。さらに、Rho-kinase は血管内皮を収縮させ血管透過性を亢進させることにより動脈硬化を促進させる^{18, 42)}。したがって、Rho-kinase の発現・活性の亢進は動脈硬化の発生・進展につながり、Rho-kinase の長期間の阻害は動脈硬化の進展を抑制することが期待される(図4)。

ブタ大腿動脈において、バルーン傷害後の血管病変の形成は、dominant-negative Rho-kinase の生体内での遺伝子導入により著明に抑制された⁴³⁾。また、同様の結果が、ラット頸動脈バルーン傷害モデルにおいて、Y-27632 を用いた検討によっても確認された^{44, 45)}。しかし、その機序として、Rho-kinase 阻害により血管平滑筋の増殖が抑制されることが主因なのか、血管平滑筋のアポトーシスが亢進することが主因なのかは、見解の一致を見ない。MCP-1 と酸化 LDL を慢性にブタ冠動脈に投与すると、内膜肥厚と収縮性血管リモデリングを特徴とする冠動脈病変が惹起される⁴⁶⁾。このモデルにおいて、fasudil の長期経口投与は、血管病変の形成を著明に抑制し、その機序の一つとして血管壁内におけるマクロファージの遊走阻害が関与していることが考えられた⁴⁶⁾。ブタ冠動脈硬化モデルにおける収縮性リモデリング³¹⁾は、また、冠動脈インターベンション後の再狭窄の重要な機序でもある⁴⁷⁾。興味深いことに、hydroxyfasudil⁴⁸⁾の長期投与や生体内での dominant-negative Rho-kinase⁴⁹⁾の遺伝子導入は、ブタ冠動脈の収縮性リモデリングの著明な退縮を惹起した。この退縮は、Rho-kinase の標的である ERM (ezrin, radixin and moesin) や adducin の機能的抑制を伴っており、これらの分子が収縮性リモデリングの分子機構に関与している可能性が示唆された⁴⁹⁾。Rho-kinase は、移植臓器に生じる動脈硬化の分子機構にも関与している可能性がある。事実、マウスの異種移植心に生じる冠動脈硬化病変の発生は、fasudil の長期投与により著明に抑制された⁵⁰⁾。

その他の心血管病や循環器疾患以外の疾患の成因における Rho-kinase の役割

Rho-kinase は、冠動脈攣縮や動脈硬化以外にも、脳血管攣縮は勿論のこと、高血圧症^{51, 52)}・脳卒中・心不全・閉塞性動脈硬化症などの心血管病の成因にも深く関与している可能性がある(図4)。また、心血管病以外でも、平滑筋の過収縮性疾患(気管支喘息・緑内障)、骨粗鬆症・勃起不全・悪性腫瘍などの病態にも関与している可能性が報告されている(図4)。詳細は最近の総説⁵³⁾を参照されたい。

まとめ

上述したように、Rho-kinase は、冠動脈攣縮や動脈硬化性疾患をはじめとした多くの循環器疾患の成因に深く関与している可能性がある。また、冠動脈攣縮や脳血管攣縮が日本人に多い臨床的事実を考えると、Rho-kinase が、日本人の動脈硬化性疾患の分子機構においてかなり重要な役割を果たしている可能性がある。したがって、Rho-kinase 阻害薬が、今後、本邦の循環器疾患の治療に広く応用されることが期待される。

謝 辞

Rho-kinase に関する一連の基礎的・臨床的研究に協力いただいた竹下彰教授をはじめとする九州大学大学院医学研究院循環器内科学の教室員諸氏に感謝申し上げます。また、共同研究者の名古屋大学大学院医学系研究科細胞情報薬理学講座の貝淵弘三教授に深謝申し上げます。本稿で述べた一連の研究は、文部科学省科研費(Nos. 08557050, 09281225, 09470169, 10177223, 10357006, 12032215, 12470158, 12877114, 13307024, 13557068)の補助を得て行った。

文 献

- 1) Takai Y, Sasaki T, Matozaki T : Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81 : 153-208, 2001
- 2) 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
- 3) Matsui T, Amano M, Yamamoto T, et al : Rho-associated kinase, a novel serine threonine kinase, as a putative target

- for small GTP binding protein Rho. *EMBO J* 15 : 2208-2216, 1996
- 4) Leung T, Manser E, Tan L, et al : A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem* 270 : 29051-29054, 1995
 - 5) Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, 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
 - 6) Hall A : Rho GTPase and the actin cytoskeleton. *Science* 279 : 509-514, 1998
 - 7) Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M : Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Ann Rev Biochem* 68 : 459-486, 1999
 - 8) Kimura K, Ito M, Amano M, et al : Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273 : 245-248, 1996
 - 9) Amano M, Ito M, Kimura K, et al : Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271 : 20246-20249, 1996
 - 10) Asano T, Ikegaki I, Satoh S, et al : Mechanism of action of a novel antivasospasm drug, HA1077. *J Pharmacol Exp Ther* 24 : 1033-1040, 1987
 - 11) Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, et al : Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389 : 990-994, 1997
 - 12) Davies SP, Reddy H, Caivano M, et al : Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351 : 95-105, 2000
 - 13) 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 : 1138-1141, 1999.
 - 14) Yamakawa T, Tanaka S, Numaguchi K, et al : Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 35 : 313-318, 2000
 - 15) Funakoshi Y, Ichiki T, Shimokawa H, et al : A critical role of Rho-kinase in angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 38 : 100-104, 2001.
 - 16) Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, et al : Critical role of Rho-kinase and MEK/ERK pathways for angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor-1 gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 : 868-873, 2001
 - 17) Shimokawa H : Cellular and molecular mechanisms of coronary artery spasm. - Lessons from animal models- *Jpn Circ J* 64 : 1-12, 2000
 - 18) van Nieuw Amerongen GP, van Delft S, Vermeer MA, et al : Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res* 87 : 3365-70, 2000
 - 19) Seasholtz TM, Majumdar M, Kaplan DD, et al : Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res* 84 : 1186-1193, 1999
 - 20) Yamamoto Y, Ikegaki I, Sasaki Y, et al : The protein kinase inhibitor fasudil protects against ischemic myocardial injury induced by endothelin-1 in the rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol* 35 : 203-11, 2000
 - 21) Tangkijvanich P, Tam SP, Yee HF Jr. : Wound-induced migration of rat hepatic stellate cells is modulated by endothelin-1 through Rho-kinase-mediated alterations in the actomyosin cytoskeleton. *Hepatology* 33 : 74-80, 2001
 - 22) Martinez MC, Randriamboavonjy V, Ohlmann P, et al : Involvement of protein kinase C, tyrosine kinases, and Rho kinase in Ca²⁺ handling of human small arteries. *Am J Physiol* 279 : H1228-1238, 2000
 - 23) Kishi H, Bao J, Kohama K : Inhibitory effects of ML-9, wortmannin, and Y-27632 on the chemotaxis of vascular smooth muscle cells in response to platelet-derived growth factor-BB. *J Biochem* 128 : 719-722, 2000
 - 24) Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, et al : P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, and P2Y₆ receptors are coupled to Rho and Rho kinase activation in vascular myocytes. *Am J Physiol* 278 : H1751-1761, 2000
 - 25) Sauzeau V, Le Mellionnec E, Bertoglio J, et al : Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ Res* 88 : 1102-1104, 2001
 - 26) Kandabashi T, Shimokawa H, Miyata K, et al : Inhibition of myosin phosphatase by upregulated Rho-kinase plays a key role for coronary artery spasm in a porcine model with interleukin-1 β . *Circulation* 101 : 1319-1323, 2000
 - 27) Kandabashi T, Shimokawa H, Mukai Y, et al : Involvement of Rho-kinase in agonists-induced contractions of atherosclerotic human arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:243-248,2002
 - 28) Hiroki J, Shimokawa H, Kandabashi T, et al : Molecular mechanisms of Rho-kinase expression in human coronary smooth muscle cells. -Upregulation by angiotensin II and interleukin-1 β and downregulation by estrogen- *Circulation* 104 (Suppl II) : II-238, 2001
 - 29) Takemoto M, Sun J, Hiroki J, et al : Rho-kinase mediatesia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106 : 57-62, 2002
 - 30) Katsumata N, Shimokawa H, Seto M, et al : Enhanced myosin light chain phosphorylations as a central mechanism for coronary artery spasm in a swine model with interleukin-1 β . *Circulation* 96 : 4357-4363, 1997
 - 31) Shimokawa H, Ito A, Fukumoto Y, et al : Chronic treatment with interleukin-1 β induces coronary intimal lesions and vasospastic responses in pigs in vivo: the role of platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* 97 : 769-776, 1996.
 - 32) Satoh S, Ikegaki I, Asano T, et al : Antiischemic properties of fasudil in experimental models of vasospastic angina. *Jpn J Pharmacol* 87 : 34-40, 2001
 - 33) Utsunomiya T, Satoh S, Ikegaki I, et al : Antianginal effect of hydroxyfasudil, a Rho-kinase inhibitor, in a canine

- model of effort angina. *Br J Pharmacol* 2001, in press.
- 34) Masumoto A, Mohri M, Shimokawa H, et al : Suppression of coronary artery spasm by a Rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina. *Circulation* 105 : 1545-1547, 2002
 - 35) Mohri M, Shimokawa H, Hirakawa Y, et al : Rho-kinase inhibition with intracoronary fasudil prevents myocardial ischemia in patients with angina and normal coronary angiograms. *J Am Coll Cardiol.*, in press.
 - 36) Shimokawa H, Inuma H, Kishida H, et al : Antianginal effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina: a multicenter study. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002
 - 37) Amano M, Chihara K, Kimura K, et al : Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 275 : 1308-1311, 1997
 - 38) van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VWM : Cytoskeletal effects of Rho-like small guanine nucleotide-binding proteins in the vascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 : 300-311, 2001
 - 39) Horwitz AR, Parsons JT : Cell migration: movein' on. *Science* 286 : 1102-1103, 1999
 - 40) Narumiya S : The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem (Tokyo)* 120 : 215-228, 1996
 - 41) Chihara K, Amano M, Nakamura N, et al : Cytoskeletal rearrangements and transcriptional activation of c-fos serum response element by Rho-kinase. *J Biol Chem* 272 : 25121-25127, 1997
 - 42) van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, van Hinsbergh VW : Role of RhoA and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 : E127-133, 2000
 - 43) Eto Y, Shimokawa H, Hiroki J, et al : Gene transfer of dominant negative Rho kinase suppresses neointimal formation after balloon injury in pigs. *Am J Physiol* 278 : H1744-1750, 2000
 - 44) Sawada N, Itoh H, Ueyama K, et al : Inhibition of Rho-associated kinase results in suppression of neointimal formation of balloon-injured arteries. *Circulation* 101 : 2030-2033, 2000
 - 45) Shibata R, Kai H, Seki Y, et al : Role of Rho-associated kinase in neointima formation after vascular injury. *Circulation* 103 : 284-289, 2001
 - 46) 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
 - 47) Anderson HR, Maeng M, Thwest M, et al : Remodeling rather than neointimal formation explains luminal narrowing after deep vessel wall injury: insights from a porcine coronary (re)stenosis model. *Circulation* 93 : 1716-1724, 1996
 - 48) Shimokawa H, Morishige K, Miyata K, et al : Long-term inhibition of Rho-kinase induces a regression of arteriosclerotic coronary lesions in a porcine model in vivo. *Cardiovasc Res* 51 : 169-177, 2001
 - 49) Morishige K, Shimokawa H, Eto Y, et al : Adenovirus-mediated transfer of dominant-negative Rho-kinase induces a regression of coronary arteriosclerosis in pigs in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 : 548-554, 2001
 - 50) Hattori T, Mukai Y, Higashi M, et al : Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses the development of cardiac allograft vasculopathy in mice. *Circulation* 104 Suppl: II-243, 2001
 - 51) Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, et al : Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *FASEB J* 15 : 1062-1064, 2001
 - 52) Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, et al : Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension* 38 : 1307-1310, 2001
 - 53) Shimokawa H : Rho-kinase as a novel therapeutic target in treatment of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 39 : 319-327, 2002