

循環器疾患と Rho キナーゼ

田原俊介*, 下川宏明*

はじめに

1990年代半ばに、Rho キナーゼが低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho の標的蛋白質として同定されて約 10 年が経過した。今日までの研究により、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¹⁾。我々は、長年にわたり、循環器疾患における Rho キナーゼの関与および Rho キナーゼ阻害薬の作用について研究を進めてきた。

本稿では、Rho キナーゼが関与する生理機能と循環器疾患における Rho キナーゼの関与について、我々の研究成果を中心に概説する。

Rho キナーゼの生理機能

A. 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应答して惹き起こされる。血管は収縮弛緩により血管内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に寄与している。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って変化するミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化が中心的役割を果たしている (図 1)^{2,3)}。

血管平滑筋細胞はアンジオテンシン II などの血管収縮性作動物質の刺激を受けると、G 蛋白質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 (IP₃) が生成される。IP₃ は、細胞内の Ca²⁺ 貯蔵部位 (筋小胞体) 上の Ca²⁺ チャンネルを開く作用により Ca²⁺ 放出を惹き起こし、細胞内

の Ca²⁺ 濃度を上昇させる。また、細胞膜にも Ca²⁺ チャンネルが存在し、様々な刺激に应答してチャンネルが開くことにより細胞外からの Ca²⁺ 流入が惹き起こされる。筋小胞体からの放出、および細胞外からの流入によって上昇した細胞内 Ca²⁺ はカルモジュリンと結合して Ca²⁺/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 MCLK 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 Mg²⁺-ATPase のアクチンによる活性化が惹き起こされ、収縮が起こる。その後、細胞内 Ca²⁺ 濃度が低下すると、Ca²⁺ はカルモジュリンから解離して MCLK は不活性化する。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²⁾。一方、Rho キナーゼは細胞内 Ca²⁺ 濃度非依存的に血管平滑筋の収縮弛緩を制御する。血管収縮性作動物質の刺激により、G 蛋白質に共役した受容体を介して Rho が活性化され、その標的蛋白質の 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、MLC のリン酸化が上昇し、血管平滑筋は収縮する (図 1)^{4,5)}。

B. 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、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。これら遊走に関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様々な細胞で報告されている⁶⁾。遊走因子などによって活性化さ

*東北大学大学院医学系研究科循環器病態学

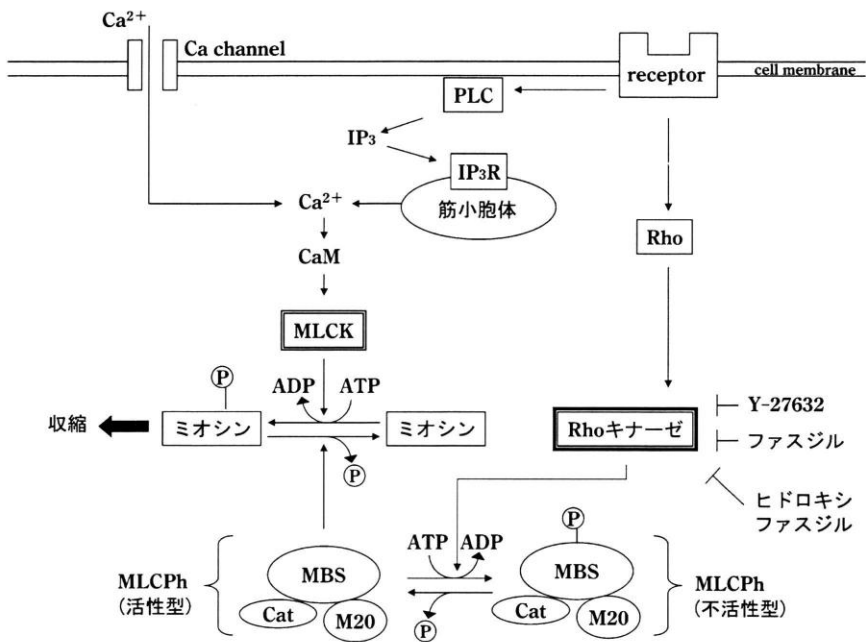


図1 血管平滑筋収縮の細胞内情報伝達経路

PLC: ホスホリパーゼ C, IP3: イノシトール 3 リン酸, CaM: カルモジュリン, MLCK: ミオシン軽鎖キナーゼ, MLCPh: ミオシン軽鎖フォスファターゼ, MBS: ミオシン結合サブユニット

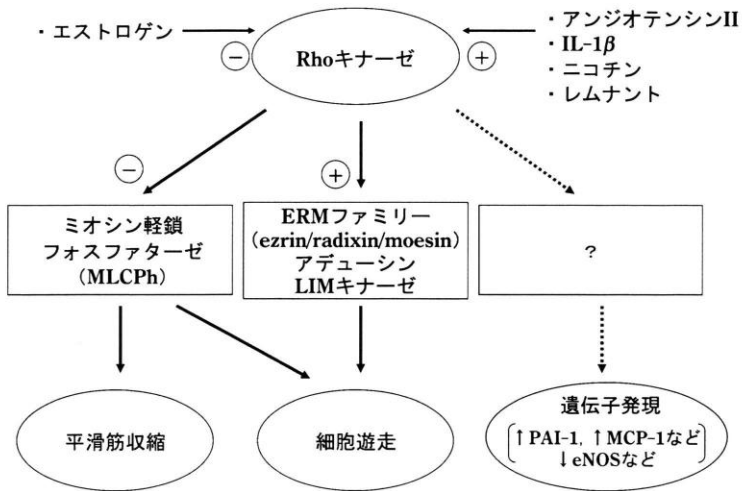


図2 Rho キナーゼの生理機能

れた Rho は Rho キナーゼを活性化して 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と推定される⁶⁾。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 (図2)⁷⁾。

C. 遺伝子発現制御

Rho キナーゼは遺伝子発現の制御にも関与することが明らかとなっている。Rho キナーゼは interleukin-6 (IL-6)⁸⁾ や monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)⁹⁾、interferon- γ (IFN- γ)¹⁰⁾ などのサイトカインや血栓形成に関わる platelet-activating factor-1 (PAI-1)¹¹⁾ や tissue factor¹²⁾、さらには線維化に関与する transforming growth factor- β (TGF- β)⁹⁾

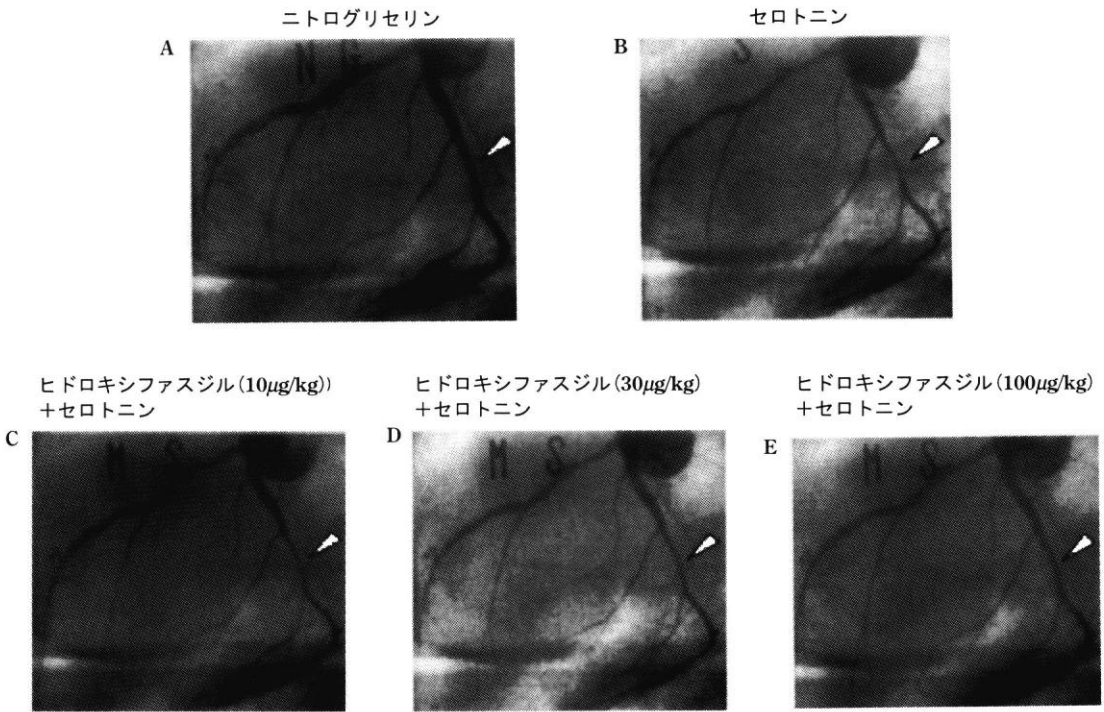


図3 セロトニン誘発性冠攣縮に対するヒドロキシファスジルの抑制作用(冠動脈造影)²⁶⁾
 B: セロトニン投与(10 μ g/kg)により IL-1 β 投与部位(白矢印)に一致して冠攣縮が誘発された。
 C~E: ヒドロキシファスジルの前投与により用量依存性に冠攣縮が抑制された。

や Bcl-2¹²⁾などの遺伝子を正に制御する。一方, endothelial nitric oxide synthase (eNOS)を負に制御することも知られている¹³⁾。また, Rho キナーゼ自身の発現はアンジオテンシン II や IL-1 β といった炎症性刺激によって正に制御される¹⁴⁾。さらに, 最近の我々の研究ではニコチンやエストロゲン¹⁵⁾, レムナトリポ蛋白¹⁶⁾も Rho キナーゼの発現に関与していることを見出している(図2)。しかし, これらの発現制御の詳細な分子機構については不明であり, 今後の研究課題である。

上記のように Rho キナーゼが幅広く生理機能に関与している理由は, 様々な血管作動性物質の刺激による作用発現のための細胞内シグナル伝達経路に Rho キナーゼが関与しているからである。今日までの研究により, アンジオテンシン II¹⁷⁾, 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 II²⁴⁾などが Rho キナーゼを介して収縮や遊走, 遺伝子発現誘導といった作用を発現することが知られている。今後, これらの血

管作動性物質のさらなる研究により, 新たな Rho キナーゼの関与する生理機能が明らかになる可能性がある。

循環器疾患と Rho キナーゼ

A. 冠動脈攣縮

冠動脈攣縮は, 異型狭心症の原因にとどまらず, 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²⁵⁾。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内皮機能の低下と血管平滑筋の収縮能の亢進が考えられている。我々は, 冠動脈攣縮の本体は血管平滑筋の過収縮であると考へ, 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。

IL-1 β で誘発したブタ冠動脈攣縮モデルにおいて, 冠動脈攣縮部位に Rho キナーゼ特異的な抑制作用を有するヒドロキシファスジル²⁶⁾および Y-27632²⁷⁾を前投与することにより, *in vivo*におけるセロトニン誘発性冠動脈攣縮が用量依存性に抑制され(図3), また *in vitro*におけるセロトニン誘発性の冠動

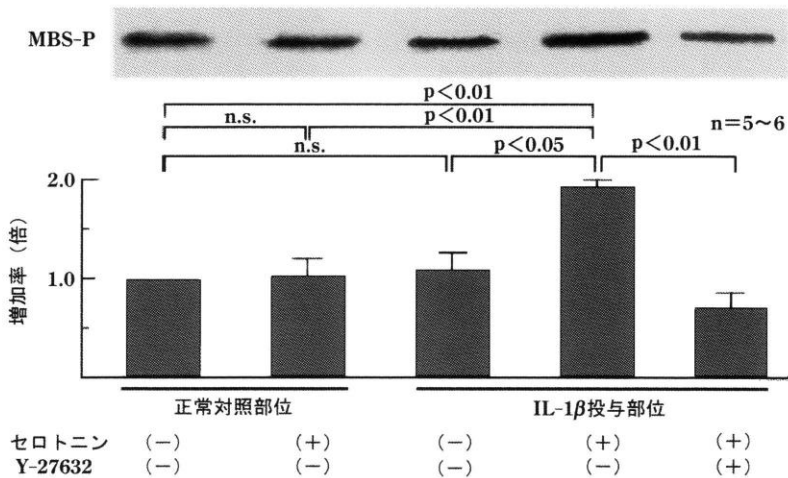


図4 冠攣縮部位における MBS リン酸化亢進と Y-27632 の抑制作用(ウエスタンブロット)²⁷⁾
 セロトニン 1 μ M の投与により IL-1 β 投与部位においてのみ MBS リン酸化レベルの亢進が認められ、Y-27632 の前投与により抑制された。

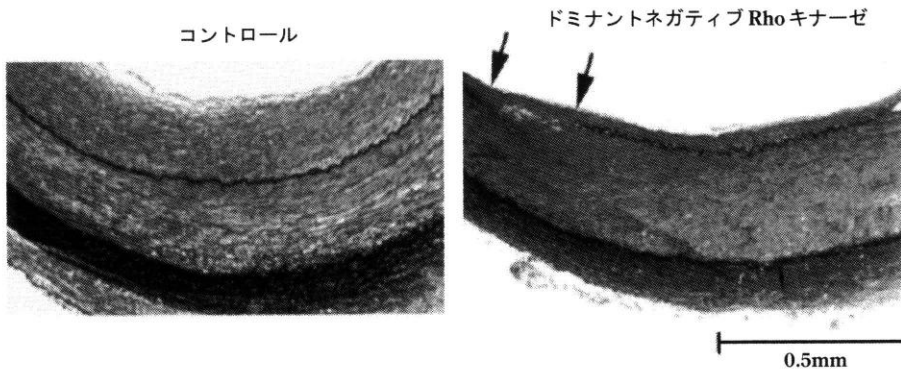


図5 ドミナントネガティブ Rho キナーゼによる新生内膜肥厚の抑制²⁹⁾
 バルーン傷害血管の断面組織像。矢印はドミナントネガティブ Rho キナーゼを導入した部分を示す。

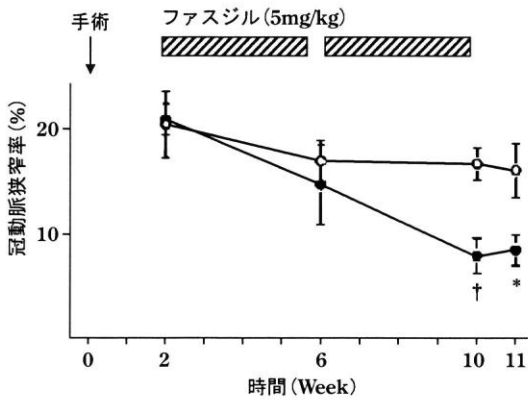
脈過収縮と MLC リン酸化亢進の双方もまた用量依存性に抑制されることを明らかにした²⁶⁾。さらに、冠動脈攣縮部位において Rho キナーゼの mRNA 発現が亢進していることを示した²⁷⁾。摘出冠動脈攣縮部位(内皮剥離標本)ではセロトニン収縮時の Rho キナーゼ活性(MBS リン酸化)が亢進し、この亢進が Y-27632 の前投与により有意に抑制されることも明らかとした(図4)²⁷⁾。突然死患者から単離したレムナントリポ蛋白誘発のブタ冠動脈攣縮モデルにおいても同様に、冠攣縮部位の Rho キナーゼ活性亢進が認められ、ヒドロキシファスジルにより *in vivo* におけるセロトニン誘発性冠動脈攣縮、および *in vitro* におけるセロトニン誘発性の冠動脈過収縮と過収縮部位の Rho キナーゼ活性が抑制された¹⁶⁾。これらの事実は、冠動脈攣縮部の血管平

滑筋において Rho キナーゼの機能が亢進していることを示している。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^{26,27)}。

B. 動脈硬化、再狭窄

動脈硬化は、変性 LDL などによって活性化された血管内皮細胞が接着分子を発現し、同部位に単球(マクロファージ)が接着して内皮下に浸潤・集積することと、中膜に存在する平滑筋細胞の分化・増殖および内膜へと遊走すること(新生内膜肥厚)で発症・進展すると考えられている²⁸⁾。

我々は、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、ドミナントネガティブ Rho キナーゼを発現させることにより抑制されることを見出した(図5)²⁹⁾。また、酸化 LDL と MCP-1



○: コントロール群 * p < 0.05 vs. コントロール
●: ファスジル投与群 † p < 0.01 vs. コントロール

図6 IL-1 β モデルにおける動脈硬化病変に対するファスジルの効果³¹⁾

モデル作製手術2週間後、動脈硬化病変が形成された後にファスジルを慢性投与した。ファスジル投与により動脈硬化病変の退縮が認められた。

を結合させたビースを冠動脈外膜に処理したブタ冠動脈におけるマクロファージの内膜および中膜への遊走と新生内膜肥厚が、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も確認している³⁰⁾。さらに、ブタ冠動脈ステント留置後の再狭窄に対しても、ファスジル慢性投与によりその形成が抑制された¹²⁾。特筆すべきことに、IL-1 β 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、その後のファスジル慢性投与によって病変が退縮した(図6)³¹⁾。これらのモデルの冠動脈病変部ではいずれにおいてもRho キナーゼ活性が亢進していた。これらの結果から、Rho キナーゼはマクロファージの遊走、平滑筋細胞の増殖・遊走を介して動脈硬化病変形成に関与することが示唆された。

C. 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、詳細なメカニズム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³²⁾。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³²⁾。また、我々は高血圧自然発症ラット(SHR)の頸動脈平滑筋において、

Rho キナーゼの発現およびその活性(MBSのリン酸化)が亢進していることを示している(図7)³³⁾。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(図8)³⁴⁾。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た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、冠動脈病変が形成される(血管リモデリング)。SHRにファスジルを慢性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(血管中膜の肥厚、血管周辺部線維化)形成が抑制された³³⁾。さらに、アンジオテンシンII持続投与誘発高血圧ラットにおける冠動脈病変形成および心筋細胞の肥大に対しても、ファスジル慢性投与によって血圧を低下させずに抑制作用が確認された³⁵⁾。これらの結果は、高血圧に伴う血管病変形成や心肥大にもRho キナーゼが関与している可能性を示唆している。

D. 肺高血圧症

肺高血圧症は肺動脈圧およ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、中膜肥厚や内膜線維性肥厚などの病理所見がみられることが知られている。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およ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³⁶⁾。

我々は、モノクローリン誘発性ラット肺高血圧モデルの肺動脈において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が見られることを示した(図9)³⁷⁾。また、組織学的解析では中膜肥厚、微小肺動脈の筋性化が観察された。これらはいずれもファスジル慢性投与により抑制された³⁷⁾。また、肺高血圧モデルラットの摘出肺動脈におけるアセチルコリン誘発性内皮依存性弛緩反応の低下も、ファスジル慢性投与によって抑制された³⁷⁾。特筆すべきことに、肺動脈病変形成後からのファスジル慢性投与によっても肺動脈病変の退縮および生存率の改善がモノクローリン誘発性肺高血圧モデルで確認された³⁷⁾。さらに、種々の肺高血圧モデルにおいて、ファスジルまたはY-27632を急性的に吸入投与することによって、肺動

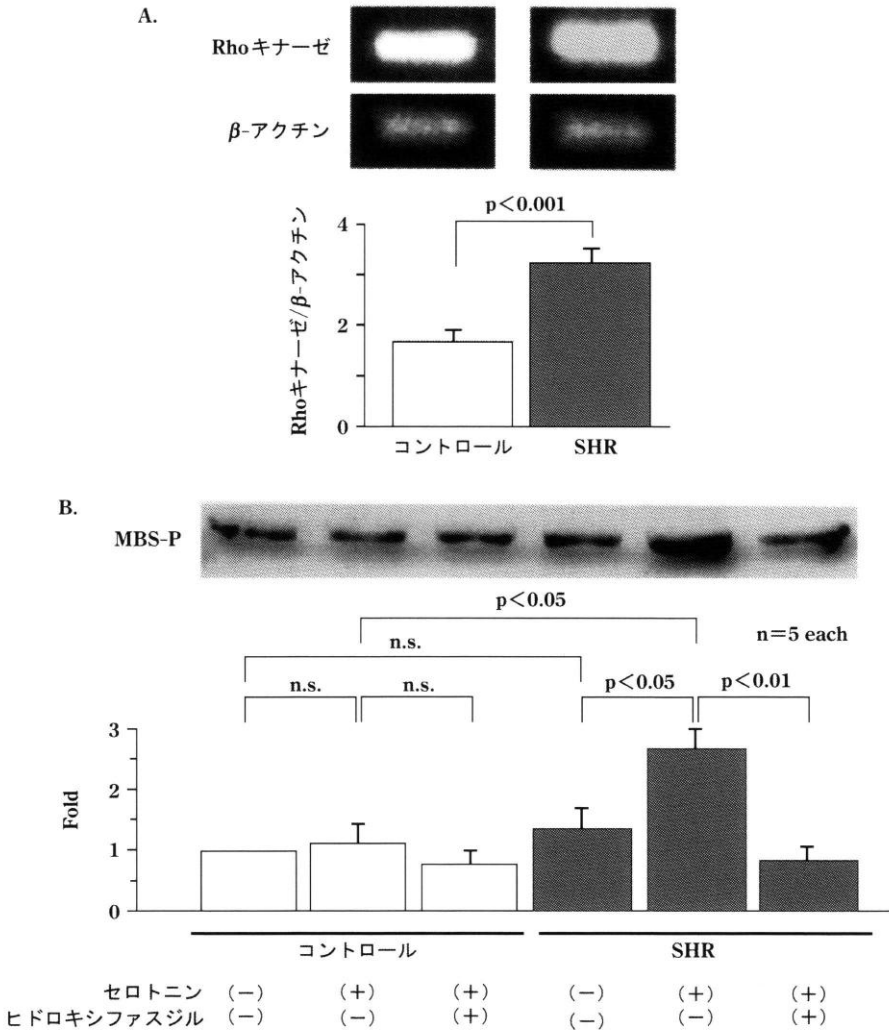


図7 高血圧自然発症ラット (SHR) 血管における Rho キナーゼの発現と活性³³⁾
A: RT-PCR による Rho キナーゼの発現 **B:** ウェスタンブロットによる MBS のリン酸化 (Rho キナーゼ活性)

脈圧が低下することも報告されている³⁸⁾。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、肺血管抵抗の有意な低下が認められた(図10)³⁹⁾。これらの結果から、肺高血圧症の内皮細胞障害、肺動脈病変形成と肺動脈の持続的収縮に Rho キナーゼが関与している可能性が示唆された。

E. 虚血・再灌流傷害

血栓の形成などによって特定の組織が一定時間以上虚血にさらされた後、血流が回復する(再灌流)と組織に傷害が生じることが知られている。これが、虚血・再灌流傷害である。虚血・再灌流傷害には内皮細胞障害、血管攣縮、活性酸素、炎症性細胞の浸潤などが関与することが報告されてい

る⁴⁰⁾。

我々は、イヌの冠動脈虚血・再灌流傷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およ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。これらはいずれもヒドロキシファシルの前投与によって抑制された。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シ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シルの前投与により有意に抑制された⁴¹⁾。これらの結果から、虚血・再灌流による内皮細胞障害、血管攣縮には Rho キナーゼが重要

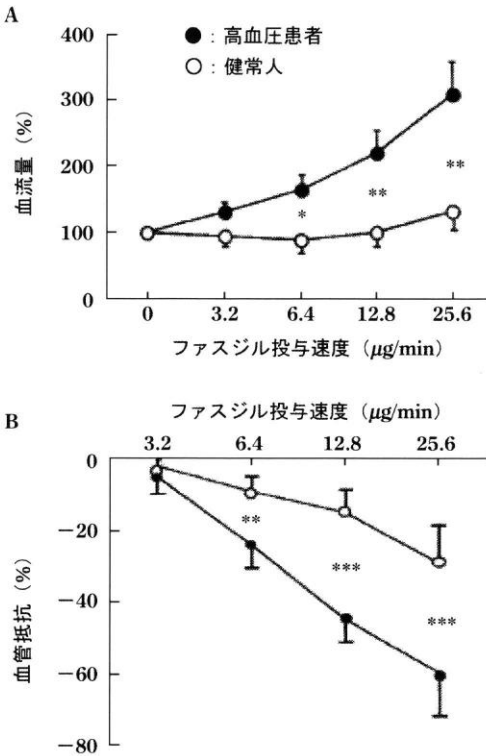


図8 高血圧症患者におけるファスジルの急性効果³⁴⁾
A: 前腕の血流量変化 B: 前腕の血管抵抗変化

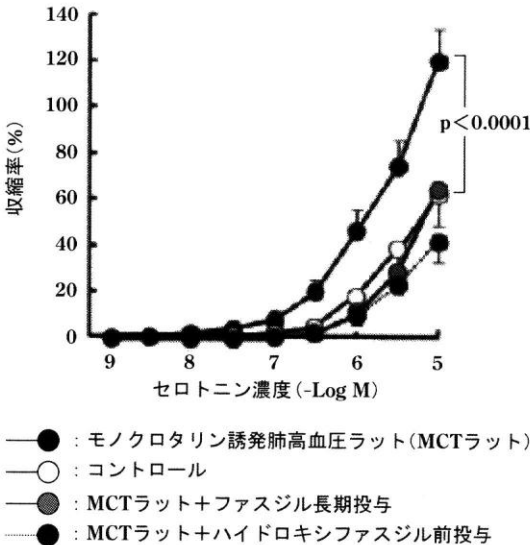


図9 モノクロタリン(MCT)肺高血圧モデル肺動脈におけるセロトニン誘発血管平滑筋過収縮³⁷⁾
MCTモデルの摘出肺動脈(内皮剥離標本)においてセロトニンに対する過収縮反応が認められた。この反応はファスジル慢性投与およびヒドロキシファスジルの前投与により抑制された。

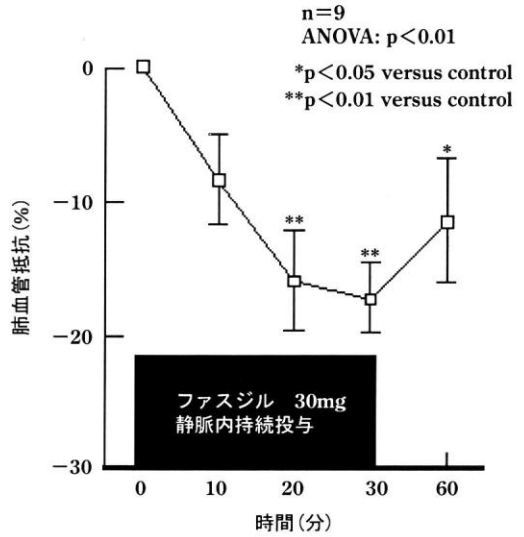


図10 肺高血圧症患者におけるファスジルの急性効果³⁹⁾

重度の肺高血圧症患者に対してファスジルを30mg, 30分静脈内持続投与した。ファスジル投与により有意な肺血管抵抗の低下が認められた。

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⁴²⁾や活性酸素産生⁴³⁾にも関与していることが報告されており、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。

F. その他の疾患

Rho キナーゼは循環器疾患のみならずその他の領域の疾患においても関与することが報告されている。イヌにおけるくも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⁴⁴⁾。それ以外の平滑筋の異常収縮が原因とされるものの中では、気管支喘息⁴⁵⁾や緑内障⁴⁶⁾などで Rho キナーゼの関与が示唆されている。また、脳梗塞モデルに対してファスジルおよびヒドロキシファスジルが有効であることも報告されている^{47,48)}。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負に調節する⁴⁹⁾ことから、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。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⁵⁰⁾や、がん細胞の浸潤抑制⁵¹⁾などについても報告がある。

おわりに

Rho キナーゼが関与する生理機能と循環器疾患について、我々がこれまでに得た知見を中心に概説した。それぞれの生理現象や疾患の詳細な分子機構は複雑であり、いまだ詳細については不明な点が多い。しかし、選択的 Rho キナーゼ阻害薬などにより、生理機能や疾患における Rho キナーゼの関与、および Rho キナーゼを阻害することによる新しい循環器疾患治療の可能性が見出されてきた。今後の臨床応用が期待される。

文 献

- Shimokawa H, Takeshita A: Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1767-75.
- Horowitz A, Menice CB, Laporte R, et al: Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 1996; 76: 967-1003.
- Somlyo AP, Somlyo AV: Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994; 372: 231-6.
- Amano M, Ito M, Kimura K, et al: Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 1996; 271: 20246-9.
- Kimura K, Ito M, Amano M, et al: Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 1996; 273: 245-8.
- Horwitz AR, Parsons JT: Cell migration-movin' on. *Science* 1999; 286: 1102-3.
- Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M: Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 459-86.
- Radeff JM, Nagy Z, Stern PH: Rho and Rho kinase are involved in parathyroid hormone-stimulated protein kinase C alpha translocation and IL-6 promoter activity in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1882-91.
- Funakoshi Y, Ichiki T, Shimokawa H, et al: Rho-kinase mediates angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2001; 38: 100-4.
- Hattori T, Shimokawa H, Higashi M, et al: Long-term treatment with a specific Rho-kinase inhibitor suppresses cardiac allograft vasculopathy in mice. *Circ Res* 2004; 94: 46-52.
- 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* 2001; 21: 868-73.
- Matsumoto Y, Uwatoku T, Abe K, et al: Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses neointimal formation after stent implantation in porcine coronary arteries—Involvement of multiple mechanisms—. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 181-6.
- Takemoto M, Sun J, Hiroki J, et al: Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002; 106: 57-62.
- Hiroki J, Shimokawa H, Higashi M, et al: Inflammatory stimuli upregulate Rho-kinase in human coronary vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37: 537-46.
- Hiroki J, Shimokawa H, Mukai Y, et al: Divergent effects of estrogen and nicotine on Rho-kinase expression in human coronary vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326: 154-9.
- Oi K, Shimokawa H, Hiroki J, et al: Remnant lipoproteins from patients with sudden cardiac death enhance coronary vasospastic activity through upregulation of Rho-kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 918-22.
- Funakoshi Y, Ichiki T, Shimokawa H, et al: Rho-kinase mediates angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2001; 38: 100-4.
- 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* 2001; 21: 868-73.
- 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* 2000; 87: 335-40.
- 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* 2000; 35: 203-11.
- Martínez 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* 2000; 279: H1228-38.
- 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* 2000; 128: 719-22.
- 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* 2000; 278: H1751-61.
- Sauzeau V, Le Mellionec 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* 2001; 88: 1102-4.

- 25) Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, et al: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992; 326: 310-8.
- 26) 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* 1999; 43: 1029-39.
- 27) 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-1beta. *Circulation* 2000; 101: 1319-23.
- 28) Ross R: Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
- 29) 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 Heart Circ Physiol* 2000; 278: H1744-50.
- 30) 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* 2001; 21: 548-54.
- 31) 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* 2001; 51: 169-77.
- 32) Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, et al: Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997 30; 389: 990-4.
- 33) Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, et al: Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease. — A novel therapeutic target in hypertension—. *FASEB J* 2001; 15: 1062-4.
- 34) Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, et al: Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension* 2001; 38: 1307-10.
- 35) Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, et al: Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo. Effects on endothelial NAD(P)H oxidase system. *Circ Res* 2003; 93: 767-75.
- 36) Stenmark KR, McMurtry IF: Vascular remodeling versus vasoconstriction in chronic hypoxic pulmonary hypertension: a time for reappraisal? *Circ Res* 2005; 97: 95-8.
- 37) Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, et al: Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circ Res* 2004; 94: 385-93.
- 38) Nagaoka T, Fagan KA, Gebb SA, et al: Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 494-9.
- 39) Fukumoto Y, Matoba T, Ito A, et al: Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart* 2005; 91: 391-2.
- 40) Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MI, et al: The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ Res* 1985; 57: 599-609.
- 41) Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, et al: Beneficial effects of hydroxyfasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, on ischemia/reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 599-607.
- 42) Satoh S, Utsunomiya T, Tsurui K, et al: Pharmacological profile of hydroxy fasudil as a selective Rho-kinase inhibitor on ischemic brain damage. *Life Sci* 2001; 69: 1441-53.
- 43) Arai M, Sasaki Y, Nozawa R: Inhibition by the protein kinase inhibitor HA1077 of the activation of NADPH oxidase in human neutrophils. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 1487-90.
- 44) Sato M, Tani E, Fujikawa H, et al: Involvement of Rho-kinase-mediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm. *Circ Res* 2000; 87: 195-200.
- 45) Iizuka K, Shimizu Y, Tsukagoshi H, et al: Evaluation of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 2000; 406: 273-9.
- 46) Honjo M, Inatani M, Kido N, et al: Effects of protein kinase inhibitor, HA1077, on intraocular pressure and outflow facility in rabbit eyes. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 1171-8.
- 47) Toshima Y, Satoh S, Ikegaki I, et al: A new model of cerebral microthrombosis in rats and the neuroprotective effect of a Rho-kinase inhibitor. *Stroke* 2000; 31: 2245-50.
- 48) Satoh S, Utsunomiya T, Tsurui K, et al: Pharmacological profile of hydroxy fasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage. *Life Sci* 2001; 69: 1441-53.
- 49) Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H, et al: Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biophys Biochem Res Commun* 2001; 287: 337-42.
- 50) Chitale K, Wingard CJ, Clinton Webb R, et al: Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. *Nat Med* 2001; 7: 119-22.
- 51) Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, et al: An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med* 1999; 5: 221-5.