

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591043

研究課題名(和文) 心血管疾患におけるROCK活性の役割：トランスレーショナル研究

研究課題名(英文) Role of ROCK activity in cardiovascular diseases: a translational research

研究代表者

野間 玄督 (NOMA, KENSUKE)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：00379893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：内皮細胞実験、マウス実験を通じて、Rho-associated kinase (ROCK) 相同体のROCK2がeEF1Aリン酸化を介してeNOS mRNAの3'-UTRと結合することで、eNOS mRNAを不安定化すること、またROCK2がFHLを介して心肥大を制御することが判明した。

臨床研究では、白血球ROCK活性が血管機能を反映し、心血管イベント発症を予測するバイオマーカーとして有用であることを明らかにした。

これらトランスレーショナル研究により、ROCK2が心血管疾患における新たな治療ターゲットとなり得ること、また白血球ROCK活性が血管機能バイオマーカーとして有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：From endothelial cellular and murine experiments, we have revealed that ROCK2, one of ROCK isoforms, could destabilize eNOS mRNA via ROCK2-mediated phosphorylation of eEF1A and binding of ROCK2 with 3'-UTR of eNOS mRNA. In addition, we have further found that ROCK2 could regulate cardiac hypertrophy via modulation of FHL2.

From clinical studies, we have revealed that leukocyte ROCK activity could reflect vascular function and could be quite a useful biomarker to predict cardiovascular events.

Therefore, we concluded from such a translational study that ROCK2 could be a promising target in patients with cardiovascular diseases and leukocyte ROCK activity could be a useful biomarker to evaluate vascular function.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：ROCK 血管内皮機能 心血管障害 脳梗塞 血管機能 eNOS

## 1. 研究開始当初の背景

高血圧, 脂質異常症, 糖尿病, 喫煙, 加齢, メタボリック症候群などの冠危険因子や生活習慣病によって血管内皮機能障害が惹起され, 動脈硬化が発症・維持・進展することで脳血管障害や心筋梗塞など生命予後に直接影響する重篤な疾患が出現する。最近, 血管平滑筋および内皮における Rho-associated kinase (ROCK) 活性の亢進が脳心血管疾患の発症や進展に貢献しているとの報告がなされている。刺激により活性化された RhoA を介して ROCK は活性化され, 更に下流の標的蛋白を活性化することで ROCK は脳心血管障害に関与する。特に, Y-27632 やファスジルといった ROCK 阻害剤の開発により, ROCK が血管炎症, 動脈硬化, 心肥大, 虚血性脳血管障害, 血管攣縮などの病態において様々な役割を担っていることが明らかとなってきた。これまでに我々は, 酸化ストレスモデルである喫煙者における血管 ROCK 活性の亢進, ROCK 活性と内皮機能障害との相関, 年齢による血管弾性の亢進は ROCK を介したものであるなど報告したが, それらのメカニズム解明を目的としたマウス *in vivo* 研究, また細胞を用いた *in vitro* 研究でも成果を得た。ROCK には ROCK1 と ROCK2 の相同体とがあり, 全体では 62%, キナーゼドメインでは 92% の相同性を持つために両者の機能的役割は似ていると考えられていたが, 最近 ROCK1 と ROCK2 の機能的相違点の重要性に関する新たな知見が報告されている。これまでの ROCK 阻害剤では ROCK1 と ROCK2 の選択的阻害はできず, また高濃度下では PKA や PKC といった他のセリンスレオニンキナーゼをも阻害してしまうため, 特に *in vivo* における ROCK 相同体の役

割を検討することは非常に困難であった。遺伝子改変動物のシステミック ROCK1, ROCK2 ノックアウトマウス, 内皮細胞特異的 ROCK1, ROCK2 ノックアウトマウスは, 脳心血管疾患における ROCK 相同体のそれぞれの役割や作用機序を明らかにする目的において極めて有用である。実際, 臨床研究において ROCK 阻害剤が脳梗塞, 肺高血圧, 冠攣縮性狭心症に有効であると報告されているが, それぞれの病態でどちらの相同体がどのように作用しているか未だ明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は, トランスレーショナル研究によって ROCK 活性の亢進がどのように動脈硬化の発症・維持・進展に影響を与えているかを検討することである。遺伝子改変動物を用いた研究により, ROCK1 と ROCK2 のどちらの相同体が脳心血管疾患に関与しているのか, ROCK 活性の亢進は疾患の原因なのか結果なのかの検討も可能となる。臨床研究では, 白血球および血管 ROCK 活性を評価し, 冠危険因子と ROCK 活性との相関や, 薬剤や生活習慣改善といったインターベンションが ROCK 活性にどのような影響を与えるのかを検討する。

*In vitro* 実験の目的は, ROCK1 および ROCK2 ノックアウトマウスより培養した内皮細胞を用いて, ROCK1 もしくは ROCK2 がどのようなシグナルや機序を介して eNOS の発現やリン酸化を制御し, 血管内皮機能に影響を及ぼしているのかを検討することである。また *in vivo* 実験の目的は, それらのマウスを対象に内皮依存性である脳虚血再灌流障害モデルを用いた実験を行い, 各 ROCK 相同体の *in vivo* における血管内皮機能に対する役割を評価することである。臨床研究では, 海外共同協力者であるハーバード大学 James

K. Liao らと共同で開発した新規抗体を用いて測定される白血球 ROCK 活性 ,そしてプレシモグラフにより測定される血管 ROCK 活性をバイオマーカーとして検討することで ,白血球および血管 ROCK 活性を臨床応用することの有用性も確認する .

### 3 . 研究の方法

#### 1) ROCK1 および ROCK2 ノックアウトマウスより培養した内皮細胞を用いた *in vitro* 検討

##### A. 対象

遺伝子改変マウスであるシステミック ROCK1 ノックアウト (ROCK1<sup>-/-</sup>) , ROCK2 ノックアウトマウス (ROCK2<sup>-/-</sup>) , およびコントロールマウス .

##### B. 方法

ノックアウトマウス , コントロールマウスより培養した内皮細胞を使って , eNOS promotor assay , eNOS mRNA stability の評価 , MAPK , ERK1/2 , MAPK , Akt , PI3K などのシグナルと ROCK1 あるいは ROCK2 との関係 , シグナル制御の機序を検討する . また , 3'-untranslated lesion of eNOS mRNA に接着する 51kD 蛋白が存在し eNOS mRNA stability を制御しているのだが , その蛋白の機能も検討 .

#### 2) ROCK1 および ROCK2 ノックアウトマウスを用いた一過性脳虚血再灌流障害の *in vivo* 検討

##### A. 対象

遺伝子改変マウスであるシステミック ROCK1 ノックアウト (ROCK1<sup>-/-</sup>) , ROCK2 ノックアウトマウス (ROCK2<sup>-/-</sup>) , およびコントロールマウス .

ス .

##### B. 方法

フィラメントを用いて中大脳動脈を 2 時間完全閉塞し , 22 時間の再還流後に脳梗塞領域を評価する一過性脳虚血再還流障害モデルを用いて脳虚血領域を評価する . また対象マウスの大動脈を用いて血管内皮機能を評価検討する .

#### 3) 臨床研究における , 血管および白血球内 ROCK 活性の検討

##### A. 対象

心血管病リスクを有さない健常人群 100 例 , 冠危険因子を有する明らかな心血管合併症を有さない軽症動脈硬化症例群 200 例を目標に行った .

##### B. 方法

##### a) プレシモグラフ ( Hokanson system : 現有設備 )

ROCK 阻害剤ファスジルの前腕動脈内直接投与による前腕血流量 (FBF) の増加率 (%) をもって血管 ROCK 活性を評価する .

##### b) 白血球 ROCK 活性

海外共同協力者の James K. Liao と共同開発した抗体 ( myosin-binding subunit of myosin light chain phosphatase ; リン酸化抗体 ) を用いて末梢単核球における ROCK 活性を Western Blot 法によって測定 . この抗体の特異性が高いことは既に確認している . また , 血管と白血球における ROCK 活性が強い相関関係にあることも報告している<sup>2</sup> .

### 4 . 研究成果

#### < 研究成果内容 >

*In vivo* 研究では , ROCK2 KO マウスが , ROCK1 KO および WT マウスと比して脳虚血領域が低下すること , その機序が ROCK2 阻害による内皮細胞 eNOS の発現亢進によるこ

とを明らかにした。In vitro 研究では、ROCK2 による eEF1A1 のリン酸化を介した ROCK2-eEF1A1-eNOS mRNA の 3'-UTR の結合による eNOS mRNA の不安定化が、その機序であることを明らかにした(投稿準備中)。さらに、マウス心肥大モデルを用いて、ROCK2 が FHL2 を介して心肥大を制御していることを明らかにした(*FASEB J.* 2013)。

臨床研究では、侵襲的な血管 ROCK 活性が非侵襲的な白血球 ROCK 活性と強く関連することを明らかにし(*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011)、以降は非侵襲的な白血球 ROCK 活性を中心に検討した。高血圧患者における検討では、エプレレノン(アルドステロン阻害薬)、ロサルタン(アンジオテンシン II 受容体拮抗薬)の投与により血管内皮機能障害は改善したが、ニフェジピン(Ca 拮抗薬)の投与では改善を認めなかった。一方、エプレレノン、ニフェジピンの投与により ROCK 活性は低下したが、ロサルタンでは低下しなかった。これらより、ROCK 活性は血管機能を反映するバイオマーカーとしては有用であるが、内皮機能検査とは異なった血管機能を示すことを明らかにした(*Clin Pharmacol Ther.* 2012)。さらに、ROCK 活性が、心血管イベント発症を予測するバイオマーカーとしても有用であることを明らかにした(*Hypertension.* 2013)。

#### <研究成果の意義・重要性>

動脈硬化の発症と進展において、ROCK2 がメディエーターとして重要な役割を担っており、新たな治療ターゲットとなり得ることをトラスレーショナル研究によって示した。バイオマーカーとしても、白血球 ROCK 活性が心血管イベント発症予測に有用であることを示した。現在の ROCK 活性評価はラボユーズと限定的であるため、さらなる簡易的 ROCK 活性測定の開発が期待されており、現在検討中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Kajikawa M, Noma K, Maruhashi T, Mikami S, Iwamoto Y, Iwamoto A, Matsumoto T, Hidaka T, Kihara Y, Chayama K, Nakashima A, Goto C, Liao JK, Higashi Y. Rho-associated kinase is a predictor of a predictor of cardiovascular outcomes. *Hypertension*. 査読有, 64,2013;856-864. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.022296
2. Noma K, Okamoto R, Li Y, Hiroi Y, Liu PY, Taniguchi M, Ito M, Liao JK. FHL2 prevents cardiac hypertrophy in mice with cardiac-specific deletion of ROCK2. *FASEB J.* 査読有, 27,2013,1439-1449. doi: 10.1096/fj.12-217018
3. Fujimura N, Noma K, Hata T, Soga J, Hidaka T, Idei N, Fujii Y, Mikami S, Maruhashi T, Iwamoto Y, Kihara Y, Chayama K, Kato H, Liao JK, Higashi Y. Mineralocorticoid Receptor Blocker Eplerenone Improves Endothelial Function and Inhibits Rho-associated Kinase Activity in Patients With Hypertension. *Clin Pharmacol Ther.* 査読有, 91, 2012, 289-297. doi: 10.1038/clpt.2011.227.
4. Noma K, Kihara Y, Higashi Y. Striking Crosstalk of ROCK Signaling with Endothelial Function. *J Cardiol.* 査読有, 60, 2012, 1-6. doi: 10.1016/j.jjcc.
5. Noma K, Higashi Y. How to Use Ezetimibe as an Anti-Atherogenic Agent via Inhibition of Rho-Kinase. *Circ J.* 査読有, 76, 2012, 1836-1837. URL: <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/circj/>
6. Soga J, Noma K, Hata T, Hidaka T, Fujii Y, Idei N, Fujimura N, Mikami S, Maruhashi T, Kihara Y, Chayama K, MD, Kato H, Liao JK,

Higashi Y. Rho-Associated Kinase (ROCK) Activity, Endothelial Function and Cardiovascular Risk Factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 査読有, 31, 2011, 2353-2359. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.227892.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 野間玄督, 木原康樹, 東幸仁. Destabilization of eNOS mRNA via ROCK2-mediated eEF1A1 phosphorylation. 第 3 回臨床高血圧フォーラム. 24-25 May 2014, 広島, 日本.
2. Noma K, Goto C, Kihara Y, Liao JK, Higashi Y. Role of ROCK in sustained vasoconstriction in patients with essential hypertension. The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting (IVBM2014). 14-17 Apr 2014, 京都, 日本.
3. Noma K, Goto C, Kihara Y, Liao JK, Higashi Y. ROCK as a modulator of sustained vasoconstriction of resistance artery in patients with essential hypertension. 第 78 回日本循環器学会総会・学術集会. 22-22 Mar 2014, 東京, 日本.
4. Noma K, Goto C, Kihara Y, Liao JK, Higashi Y. Role of ROCK in sustained vasoconstriction of resistance artery in patients with essential hypertension. Scientific Sessions 2013, American Heart Association. 16-20 Nov 2013, Dallas, USA.
5. 野間玄督, 木原康樹, 東幸仁. Regulation of eNOS mRNA stability via ROCK2-mediated eEF1A1 phosphorylation. 第 21 回日本血管生物医学会学術集会. 26-28 Sep 2013, 大阪, 日本.
6. 野間玄督, 東幸仁. ROCK 関連研究の新たな展開. 第 41 回日本心臓血管作動物質学会. 11-11 Feb 2012, 秋田, 日本.
7. 野間玄督, 東幸仁, 木原康樹. 心血管疾患における ROCK 活性:メディエーターそしてマーカーとしての役割. 第 19 回日本血管生

物医学会学術集会 9-9 Dec 2011, 東京, 日本.  
8. 野間玄督, 木原康樹, 東幸仁. Leukocyte ROCK activity: a potential candidate for vascular and anti-aging biomarker. アンチエイジングフェスタ 2011, 2-2 Dec 2011, 大阪, 日本.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

野間 玄督 (NOMA KENSUKE)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教  
研究者番号: 00379893

### (2)研究分担者

東 幸仁 (HIGASHI YUKIHITO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授  
研究者番号: 40346490