

脂肪細胞分化におけるRho-ROCK pathwayの意義

野口 倫生, 細田 公則, 中尾 一和

京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学・内分泌代謝内科

はじめに

肥満における脂肪組織の増大は脂肪細胞の肥大化と脂肪細胞の新生によりもたらされる。重度の肥満症患者になると脂肪細胞の肥大化とともに小型の脂肪細胞が出現することも観察されており¹⁾, ヒト肥満における脂肪細胞分化の存在を示唆すると考えられる。肥満の病態形成の根幹を成す脂肪細胞分化の制御は肥満や2型糖尿病の治療標的だけでなく、動脈硬化性疾患の発症基盤であるメタボリックシンドロームの治療標的となる。

脂肪細胞は多能性幹細胞から前駆脂肪細胞を経て成熟脂肪細胞へと分化し、分化過程において細胞の形態が大きく変化する。具体的には分化誘導刺激にて紡錘形をした線維芽細胞様の前駆脂肪細胞が多房性の脂肪滴を蓄えた円形の成熟脂肪細胞へと変化する。脂肪細胞分化の結果としての形態変化か、あるいは形態変化が脂肪細胞分化をもたらすのかは非常に興味深い。Rho-ROCK pathwayは細胞骨格を調節することで広く知られている。アクチン線維の再構築を介し、細胞の生理的な形態変化や接着、遊走などに関与し

ている。またDrosophilaやC. elegansを用いた研究から、Rhoファミリーが初期発生における細胞の形態変化や胚葉形成に関与することも報告されている²⁾。したがって、Rho-ROCK pathwayは脂肪細胞分化過程における形態変化に関与し、脂肪細胞分化を制御する可能性が考えられる。

ROCKは約1360アミノ酸からなるセリンスレオニンカイネースであり、異なる遺伝子からなるROCK-I, ROCK-IIの2種類のアイソフォームが存在する。ROCK-Iはほぼユビキタスに発現し、ROCK-IIは骨格筋や心筋、脳に特に豊富に発現する。またROCK阻害薬が開発され、それによりROCKの生理的意義および病態生理的意義が次々と明らかになってきた。しかし脂肪細胞分化におけるRho-ROCK pathwayの意義は十分に明らかにされていない。そこでわれわれはROCK阻害薬とROCK-I, ROCK-IIのノックアウトマウス^{3,4)}由来胎児線維芽細胞(MEF)またROCK-I, ROCK-IIのsiRNAなどを用いて脂肪細胞分化におけるROCKのアイソフォーム特異的意義について検証した⁵⁾。

1. 脂肪細胞分化過程におけるROCKの発現とRho活性の変化

蛋白レベルでの解析では3T3-L1細胞においてROCK-I, ROCK-IIは共に一定の発現を認め、分化過程では発現に有意な変化は認められなかった⁵⁾。また活性に関しては3T3-F442A細胞において分化にともないRho活性が低下することが報告されている⁶⁾。

2. ROCK阻害薬は脂肪細胞分化を促進させる

3T3-L1細胞において2種類のROCK阻害薬(Y-27632, fasudil)投与群は非投与群と比較し、脂肪蓄積が著しく亢進し、その効果は濃度依存性であった。またROCK阻害薬の脂肪細胞分化に対する時期特異的な効果に関する検討では、非投与群と比較すると前半のday 0からday 4までの投与で十分な脂肪蓄積増強作用を示したが、後半のday 4からday 8まで投与では全く脂肪蓄積を増強させなかった⁵⁾。脂肪細胞分化関連遺伝子の蛋白発現調節に関して、ROCK阻害薬投与群は非投与群と比較し、day 4においてPPAR γ , C/EBP α の遺伝子発現を有意に上昇させ、それに引き続きaP2, adiponectinの遺伝子発現を有意に上昇させた(図1)。さらにRho-ROCK pathwayを活性化させるlysophosphatidic acid (LPA)は脂肪細胞分化を抑制し、その抑制はY-27632投与により回復することが明らかとなった⁵⁾。以上の結果からROCK阻害薬は脂肪細胞分化のmaster regulatorであるPPAR γ やC/EBP α の発現上昇を

介して分化促進作用をもたらすと考えられる。

3. ROCK-IIの抑制は脂肪細胞分化を促進させる

ROCK阻害薬はROCK-I, ROCK-IIを共に活性を低下させる。また高濃度ではPKAなどに対する非特異的阻害作用も存在する。したがって、脂肪細胞分化におけるROCKのアイソフォーム特異的意義については、発生工学的あるいは遺伝子工学的な手法による検討が必須である。われわれはROCK-I, ROCK-IIのノックアウトマウス^{3,4)}を用いて、脂肪細胞分化に関して解析を行った。ROCK-Iホモノックアウトマウスは臍ヘルニアなどの表現型のため喰殺され、生後の解析はほぼ不可能である。またROCK-IIホモノックアウトマウスも子宮内発育不全で胎生18日目頃までにはほぼ死亡する。そのためノックアウトマウス由来MEFを用いて、脂肪細胞分化の検討を行った。ROCK-II^{-/-} MEFでは野生型MEFと比較し、著明な脂肪蓄積の亢進とPPAR γ , C/EBP α の有意な発現上昇が認められた。一方、ROCK-I^{-/-} MEFでは野生型MEFと比較し脂肪蓄積、分化関連遺伝子発現において有意差は認められなかった(図2)。続いて3T3-L1細胞においてROCK-I, ROCK-IIの各々のsiRNAを導入することでROCKの脂肪細胞分化に関する機能解析を行った。ROCK-II siRNAの導入群ではコントロールsiRNA導入群と比較し、PPAR γ , C/EBP α の有意な発現上昇が認められたがROCK-IのsiRNAの導入群では分化関連遺伝子の発現に有意な発現の変化は認められなかった⁵⁾。以上の結果からROCK-Iの抑制ではなく、ROCK-IIの抑制が脂肪細胞分化を促進させることが明らかとなり、脂肪細胞分化におけるROCKのアイソフォーム特異的

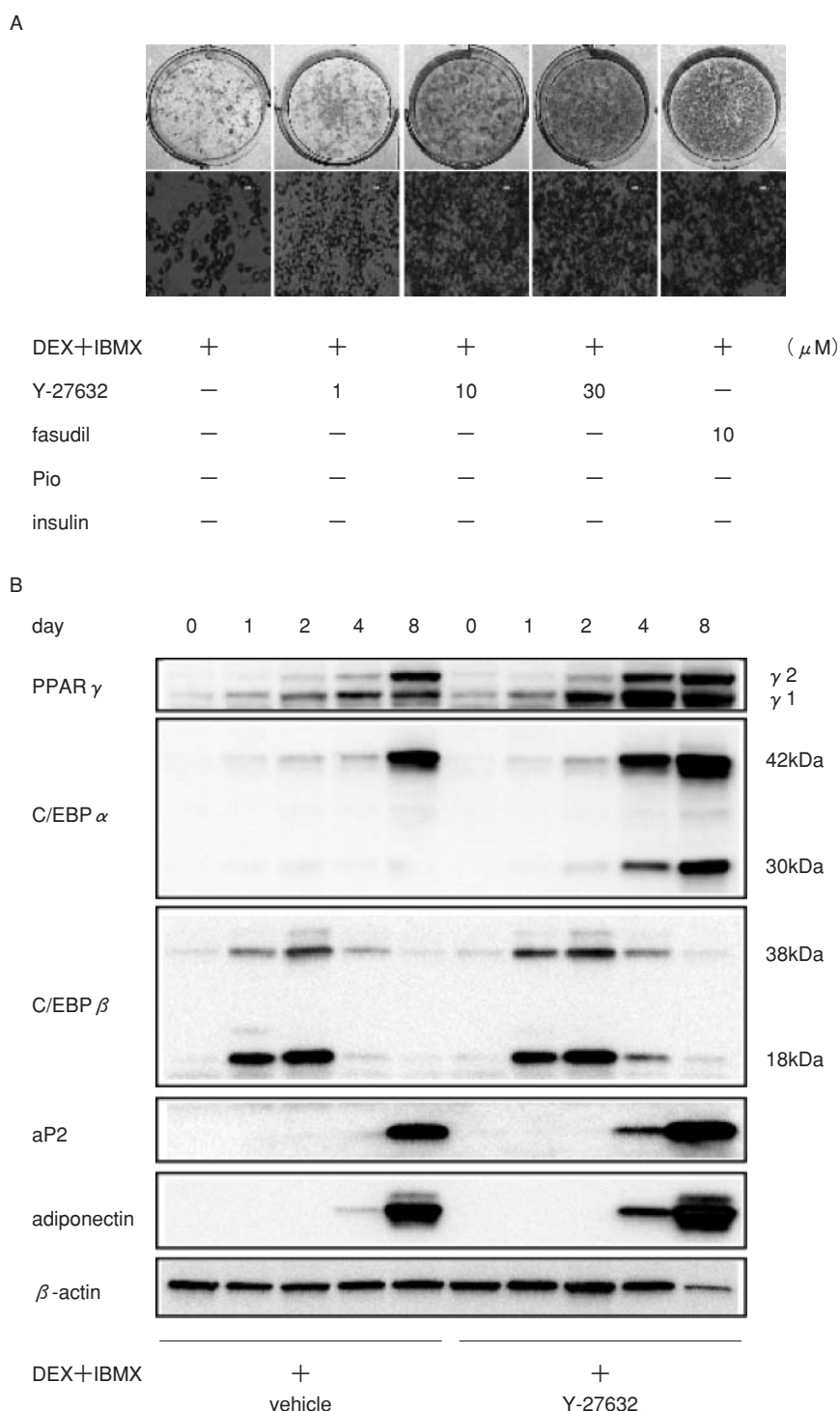


図1 ROCK阻害薬による脂肪細胞分化調節

A: ROCK阻害薬投与による脂肪蓄積の亢進

B: ROCK阻害薬投与による脂肪細胞分化関連遺伝子の蛋白発現の変化

意義が示された。

4. ROCKによるインスリン/IGF-1シグナル調節

これまでの検討でROCK阻害薬が脂

脂肪細胞分化を促進させ、ROCK-IIの抑制が脂肪細胞分化を促進させることが明らかとなった。そこでわれわれはメカニズムに関する検証の一つとしてROCKによるインスリンシグナルの調節に関して検討を行った。インスリンシグナルは脂肪細胞分化に必須であることが広く知られている。3T3-L1細胞においてROCK阻害薬は非投与群と比較し、インスリン刺激下のIRSセリンリン酸化レベルを抑制し、Aktリン酸化レベルを促進させた。またノックアウトマウス由来MEFを用いた検討では、ROCK-II $-/-$ MEFでは野生型MEFと比較し、インスリンによるAktリン酸化レベルの亢進が認められた。一方、ROCK-I $-/-$ MEFではインスリンによるAktリン酸化レベルの亢進は

認められなかった(図3)。以上の結果からROCK-IIの抑制による脂肪細胞分化の促進はAktリン酸化の亢進を介する可能性が示唆された。

5. 細胞骨格制御と脂肪細胞分化

細胞骨格調節と脂肪細胞分化における観点からみると、ROCK阻害薬を用いるとストレスファイバーの形成阻害が生じ、脂肪細胞分化は促進する。またROCK-II $-/-$ MEFは野生型と比較し、ストレスファイバーの形成や細胞の形態に関して差が認められない⁵⁾にもかかわらず、脂肪細胞分化が促進する。すなわち、ROCKによる脂肪細胞分化調節は細胞骨格制御とは異なるメカニズムで調節されている可能性が考

えられる。

おわりに

われわれはROCK-IではなくROCK-IIの抑制が脂肪細胞分化を促進させることを初めて明らかにした。Aktリン酸化の亢進が関与することが示唆される。本研究によりROCK-IIが新規の脂肪細胞分化の負の調節因子としての意義を持つことが明らかとなった。最近、ROCK-IIが骨格筋細胞への分化を正に調節する報告もなされ⁷⁾、幹細胞の細胞系譜決定におけるROCKの意義がクローズアップされている。また、ROCK阻害薬については肥満、インスリン抵抗性モデル動物に対して糖代謝改善作用を示すことも報告されており⁸⁾、ROCKが肥満、2型糖尿病、メタ

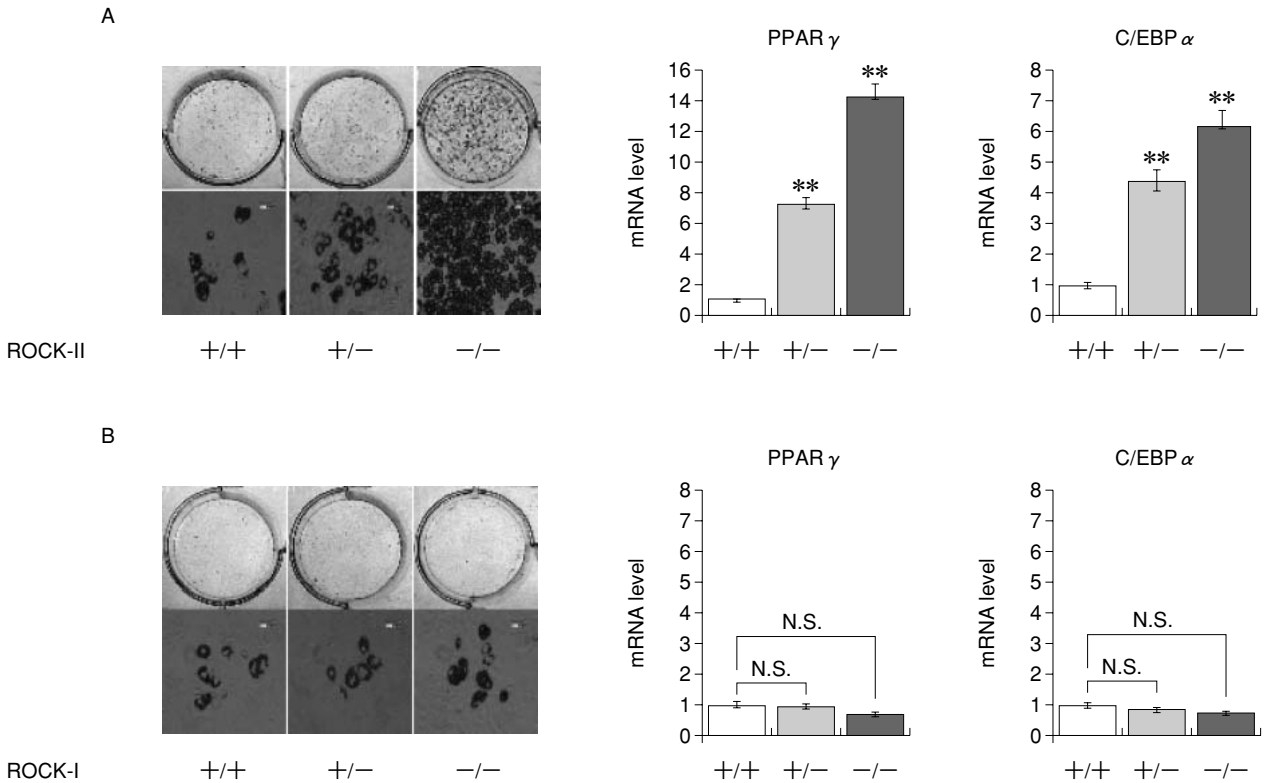


図2 ROCKノックアウトMEFの脂肪細胞分化
 A: ROCK-IIノックアウトMEFにおける脂肪細胞分化に関する検討。
 ** $p < 0.01$
 B: ROCK-IノックアウトMEFにおける脂肪細胞分化に関する検討。
 N.S.; not significant

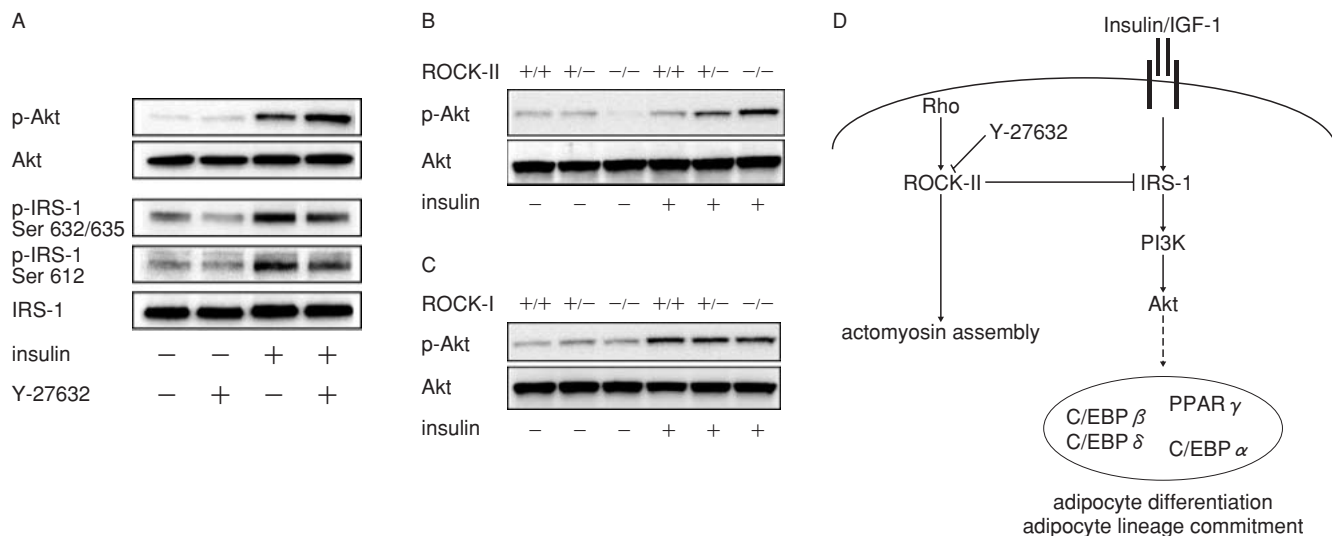


図3 ROCKによるインスリン/IGF-1シグナル調節

A: 3T3-L1細胞におけるROCK阻害薬によるインスリン/IGF-1シグナル調節
 B: ROCK-IIノックアウトMEFにおけるAktリン酸化レベルについての検討
 C: ROCK-IノックアウトMEFにおけるAktリン酸化レベルについての検討
 D: Rho-ROCK pathwayによる脂肪細胞分化調節

ボリックシンドローム領域に対する新しい治療標的となりうるであろう。今後、組織特異的な遺伝子改変動物を用いたROCKの糖代謝における病態生理的意義の解明やROCK阻害薬の肥満、2型糖尿病領域での臨床応用、さらにROCKのアイソフォーム特異的阻害薬の開発などが益々注目される。

謝辞

京都大学大学院医学研究科神経・細胞薬理学 成宮周教授をはじめ、本研究にご指導、ご協力を戴きました先生方に深謝致します。

文献

- 1) 杉浦 甫, 青木茂久, 田端寿美: 肥満の脂肪組織診断. 脂肪細胞と脂肪組織. 東京: 文光堂, 2007, 76-80.
- 2) Riento K, Ridley AJ: ROCKs: multi functional kinase in cell behaviour. Nat Rev Mol Cell Biol 2003, 4: 446-456.
- 3) Shimizu Y, Thumkeo D, Narumiya S, et al.: ROCK-I regulates closure of the eyelids and ventral body wall by inducing assembly of actomyosin bundles. J Cell Biol 2005, 168: 941-953.
- 4) Thumkeo D, Keel J, Narumiya S, et al.: Targeted disruption of the mouse rho-associated kinase 2 gene results in intrauterine growth retardation and fetal death. Mol Cell Biol 2003, 23: 5043-5055.
- 5) Noguchi M, Hosoda K, Nakao K, et al.: Genetic and pharmacological inhibition of Rho-associated kinase II enhances adipogenesis. J Biol Chem 2007, 282: 29574-29583.
- 6) Sordella R, Jiang W, Settleman J, et al.: Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. Cell 2003, 113: 147-158.
- 7) Pelosi M, Marampon F, Rosenthal N, et al.: ROCK2 and its alternatively spliced isoform ROCK2m positively control the maturation of the myogenic program. Mol Cell Biol 2007, 27: 6163-6176.
- 8) Kanda T, Wakino S, Saruta T, et al.: Rho-kinase as a molecular target for insulin resistance and hypertension. FASEB J 2006, 20: 169-171.

* 本論文の内容は2008年度日本肥満学会若手研究者奨励賞(YIA)の受賞対象となったものである