

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22591017  
 研究課題名（和文） 脂肪細胞肥大化に伴う伸展刺激と Rho/Rho キナーゼ経路の肥満発症における意義  
 研究課題名（英文） The role of stretch signal induced by the adipocytes hypertrophy and activation of Rho/Rho kinase pathway in the pathogenesis of obesity  
 研究代表者  
 脇野 修 (WAKINO SHU)  
 慶應義塾大学・医学部・講師  
 研究者番号：50265823

研究成果の概要（和文）：

肥満の発生機構の1つとして、低分子Gタンパク Rho とそのエフェクターである Rho キナーゼを介する脂肪細胞のシグナル伝達を同定した。Rho キナーゼ阻害薬で処置すると、高脂肪食（HFD）下のマウスの体重増加が減弱した。ドミナントネガティブ型の RhoA を脂肪細胞特異的に過剰発現するマウスでは、HFD によって誘導される体重増加、脂肪細胞内での脂質の蓄積が抑制された。Rho-Rho キナーゼシグナルの抑制は、肥満に伴う脂肪細胞の伸展、脂肪組織の炎症からなる悪循環を断つための治療法を提供するかもしれない。

研究成果の概要（英文）：

The development of obesity involves multiple mechanisms. Here we demonstrate adipocyte Rho/Rho-kinase as a culprit in obesity. In high fat diet (HFD)-fed mice, Rho-kinase inhibitor treatment prevented body weight gain and insulin resistance. Transgenic mice overexpressing adipocyte-specific dominant-negative RhoA mutant manifested less HFD-induced weight gain and improved glucose metabolism. Our findings indicate that hypertrophic process during lipid accumulation in adipocytes activates Rho/Rho-kinase pathway through mechanical stretch and induces adipose tissue inflammation in obesity. The intervention of Rho/Rho-kinase pathway may constitute a novel strategy disrupting vicious circles aggravating obesity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内科、シグナル伝達、肥満

### 1. 研究開始当初の背景

低分子量 GTP 結合蛋白 Rho とその標的分子である Rho-kinase からなる経路は、血圧調節や細胞遊走、胚の形態形成など、生体内の様々な反応に影響を与える。我々の研究グループでは、肥満マウスの高血圧および耐糖能異常にこの経路が関与していることを報告した。さらに、脂肪組織における同経路の意義について検討し、高脂肪食を与えたマウスにおいて、脂肪組織の Rho-kinase が活性化していること、Rho-kinase 阻害薬を経口投与することで、体重の増加・脂肪組織におけるアディポサイトカインの発現の変化・マクロファージの浸潤が抑えられることを報告した。

### 2. 研究の目的

脂肪組織における Rho-kinase 経路の意義をより特異的に検証するため、脂肪組織特異的にこの経路を抑制したトランスジェニックマウスを作成し、肥満発症の意義について今回、検討した。

さらに、肥満における Rho-kinase 活性化のメカニズムを検討した。脂肪細胞は、脂肪滴を細胞内に蓄え肥大化していく過程で、この脂肪滴により内部から伸展刺激を受けている可能性を考えた。また、血管平滑筋では伸展刺激により Rho-kinase が活性化することが報告されており、脂肪細胞肥大化と Rho-kinase 活性化のメカニズムとして伸展刺激の関与を検討した。

### 3. 研究の方法

3T3-L1 細胞を、脂肪細胞へ分化誘導させ分化

誘導開始後 8 日目には成熟脂肪細胞に分化、以降、培養を続けると脂肪細胞は肥大化していく。実験群としては、control 群と分化誘導後 8 日目から Rho-kinase 阻害薬である Y27632 を投与した Y 群の 2 群とした。この系を用い、Rho-kinase の活性化およびアディポサイトカインの発現を検討した。

脂肪細胞へ分化誘導した 3T3-L1 細胞に伸展刺激を加え、Rho-kinase の活性化と細胞骨格の変化を見るためファロイジンを用いアクチンの蛍光免疫染色を行った。

Transgenic (TG)マウスは、脂肪組織特異的なプロモーターである AP-2 promoter の下流に human dominant negative Rho A 遺伝子を挿入し、マウスに導入した。トランスジェニックマウスのジェノタイピングを示したサザンブロットを行った。左のレーンは dominant negative のラインで 14 コピーの DNA の導入が確認されました。以下の実験では、遺伝子の導入が確認されたこのラインを用いた。

TG マウスにおける脂肪組織特異的な遺伝子発現をみるため、DN-Rho 遺伝子の発現を RT-PCR で、Rho-kinase の活性は抗 phospho-MYPT 抗体を用いた western blot で検討した。

TG マウスの表現型を検討するため、6 週齢の DN および WT マウスに高脂肪食を 12 週間投与し、体重・脂肪組織重量、脂肪細胞面積・マクロファージ浸潤、アディポサイトカインの発現、糖負荷試験を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 3T3-L1 細胞の結果

3T3-L1 細胞が、成熟脂肪細胞になり、以降、肥大化するにつれ Rho-kinase の活性化が認められた。アディポサイトカインの発現については、脂肪細胞が肥大化するにつれ、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 の発現が上昇し、Adiponectin の発現が低下した。Rho-kinase 阻害薬を投与した Y 群では、これらの変化を抑制した。

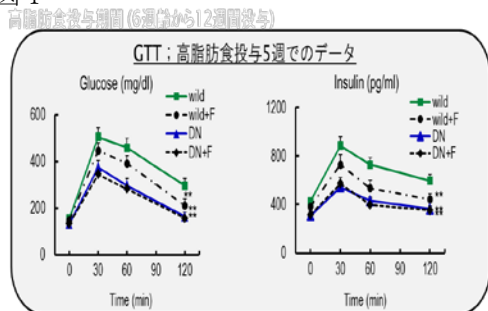
さらに伸展刺激の結果では成熟脂肪細胞以降の脂肪細胞に伸展刺激を加えると、Rho-kinase の活性化が認められた。また、ファロイジンによる免疫染色の結果、伸展刺激を加えることで、アクチン線維の増加を認めた。

### (2) TG マウスにおける結果

各組織における DN-Rho 遺伝子の発現を RT-PCR で検出した結果、DN マウスの脂肪組織特異的に DN-Rho 遺伝子の発現を認めた。

次に、高脂肪食餌下での各組織における Rho-kinase の活性化を WT と DN で比較した。DN マウスの脂肪組織において Rho-kinase の活性が特異的に抑制された。高脂肪食下における体重変化では DN マウスでは、WT における体重増加が有意に抑えられた。摂餌量には有意差はなかった。WAT および BAT の重量に関しても同様な結果を得られ、DN マウスの脂肪組織重量は有意に低下した。糖負荷試験では、DN マウスは、WT に比べ、血糖の上昇が有意に抑えられ、糖代謝の改善が認められた (図 1)。

図 1



白色脂肪組織における脂肪細胞の面積およ

びマクロファージの浸潤の結果では DN マウスでは、WT と比較し、脂肪細胞面積、マクロファージ浸潤共に有意に減少した (図 2)。アディポサイトカインの発現については、DN マウスで、WT と比較し有意に TNF- $\alpha$ および MCP-1 の発現が低下し、Adiponectin の発現が上昇した (図 3)。

図 2

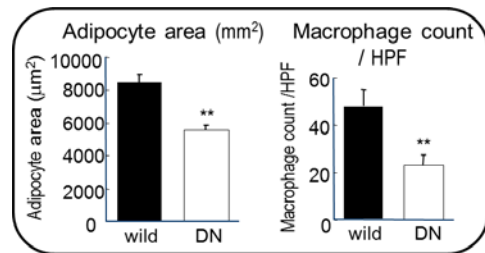
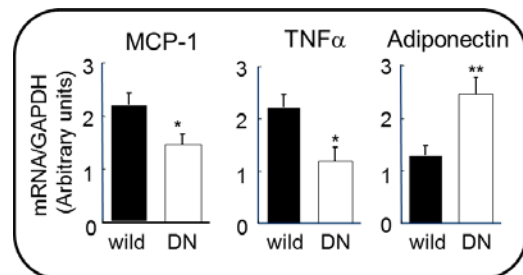


図 3



高脂肪食餌下での WT および DN マウスの白色脂肪組織におけるアクチン染色では DN マウスでは、WT と比較し、アクチン線維の増生が抑制された。

以上結果をまとめると

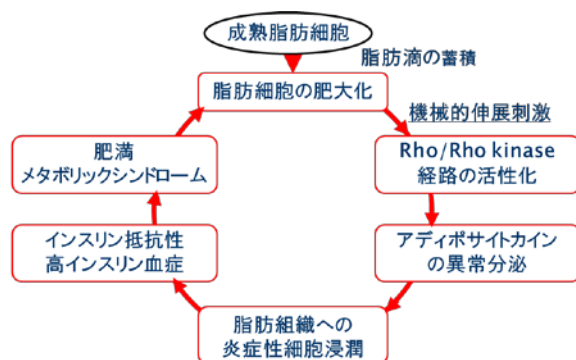
- ・分化誘導した脂肪細胞では、肥大化に伴い、Rho-kinase が活性化した。
- ・肥大化した脂肪細胞に伸展刺激を加えると、Rho-kinase が活性化、アクチン線維の増生を認めた。
- ・脂肪組織特異的に Rho-kinase 経路を抑制した DN マウスは、WT と比較し、高脂肪食餌下で、体重・脂肪組織重量の増加が抑えられ、糖負荷試験で血糖の上昇が抑えられた。

脂肪組織における脂肪細胞面積およびマクロファージ浸潤が減少、TNF- $\alpha$ および MCP-1

の発現が低下、Adiponectin の発現が上昇、アクチン線維の増生が抑制された。

以上我々は成熟脂肪細胞は、脂肪滴を蓄え肥大化します。この肥大化の過程で脂肪細胞に伸展刺激が加わり、Rho-kinase が活性化します。Rho-kinase が活性化すると、脂肪細胞の形質転換がおきアディポサイトカインの発現に変化がおき、マクロファージが浸潤し、脂肪組織における炎症を惹起する。これにより、インスリン抵抗性となり、肥満、糖尿病、メタボリックシンドロームを発症します。これらはさらに、脂肪細胞の肥大化を起し、悪循環が生じると考えられた。(図 4)

図 4



## 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 4 件)

1. Tokuyama H, Wakino S, Hara Y, Washida N, Fujimura K, Hosoya K, Yoshioka K, Hasegawa K, Minakuchi H, Homma K, Hayashi K, Itoh H. Role of mineralocorticoid receptor/Rho/Rho-kinase pathway in obesity-related renal injury. 査読有 Int J Obes (Lond). 2012 ;36(8):1062-71.

2. 脇野 修, 伊藤 裕【慢性腎臓病:最近の進歩】 慢性腎臓病と各種疾患 肥満・メタボリックシンドローム 査読なし 日本内科学会雑誌 101 巻 5 号 Page1310-1317, 2012
3. 脇野 修, 伊藤 裕【心腎連関の病態と治療の進歩-心臓と腎臓からみた循環器疾患】 メタボリックシンドロームに伴う心腎連関の治療 カレントセラピー 査読なし 30 巻 8 号 Page804-810, 2012
4. Hara Y, Wakino S, Tanabe Y, Saito M, Tokuyama H, Washida N, Tatematsu S, Yoshioka K, Homma K, Hasegawa K, Minakuchi H, Fujimura K, Hosoya K, Hayashi K, Nakayama K, Itoh H Rho and Rho-kinase activity in adipocytes contributes to a vicious cycle in obesity that may involve mechanical stretch. Science Signaling 査読有 4(157) 2010 1-10

[学会発表] (計 9 件)

1. 徳山 博文, 脇野 修, 神田 武志, 鷺田 直樹, 長谷川 一宏, 水口 斉, 藤村 慶子, 本間 康一郎, 林 晃一, 伊藤 裕 肥満関連腎症における脂肪腎臓連関の病態生理の解明 日本心血管内分泌代謝学会 2012 年 11 月 23 日 東京
2. 徳山 博文, 脇野 修, 神田 武志, 鷺田 直樹, 長谷川 一宏, 水口 斉, 藤村 慶子, 本間 康一郎, 林 晃一, 伊藤 裕 肥満関連腎症における脂肪腎臓連関の病態生理の解明 日本高血圧学会総会 2012 年 11 月 23 日 名古屋

3. 脇野 修, 徳山 博文, 水口 斉, 林 晃一, 伊藤 裕 高血圧学会員が知っておくべき他領域の基本知識 肥満と高血圧の接点 肥満とCKD 肥満によるCKDとCKDにおける腎性リポディストロフィー 日本高血圧学会総会 2012年9月20日 名古屋
  4. 徳山 博文, 脇野 修, 神田 武志, 鷺田直輝, 長谷川 一宏, 水口 斉, 二木 功治, 本間 康一郎, 林 晃一, 伊藤 裕 肥満関連腎症の病態生理における脂肪腎臓連関の重要性 日本腎臓学会学術総会 2012年6月1日 横浜
  5. 徳山 博文, 脇野 修, 神田 武志, 鷺田直樹, 長谷川 一宏, 水口 斉, 藤村 慶子, 本間 康一郎, 林 晃一, 伊藤 裕 肥満関連腎症における脂肪腎臓連関の病態生理の解明 日本心血管内分泌学会 2011年11月25日 大阪
  6. 徳山 博文, 脇野 修, 神田 武志, 鷺田直樹, 長谷川 一宏, 水口 斉, 藤村 慶子, 本間 康一郎, 林 晃一, 伊藤 裕 肥満関連腎症における脂肪腎臓連関の病態生理の解明 日本高血圧学会総会 2011年10月20日 宇都宮
  7. 脇野 修, 原 義和, 徳山 博文, 林 晃一, 伊藤 裕 メタボリックシンドロームの分子メカニズム 2011 次なるDecadeに向けて 肥満症における脂肪細胞のRho/Rhoキナーゼ経路の意義 肥大化による機械的伸展刺激の役割 日本薬学会 2011年3月28日 静岡
  8. 脇野 修 細胞内シグナル異常と肥満 Rho kinase と肥満 日本肥満学会 2010年10月1日 前橋
  9. 脇野 修 シグナル伝達研究から臨床応用への展開 Rho/Rho キナーゼ経路の病的意義とその臨床応用への可能性 日本臨床分子医学会学術総会 2010年4月10日 東京
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
脇野 修 (WAKINO SHU)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：50265823
- (2) 研究分担者  
伊藤 裕 (ITOHI HIROSHI)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：40252457  
田辺 由幸 (TANABE YOSHIYUKI)  
岩手医科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：10275109  
斉藤 麻希 (SAITO MAKI)  
岩手医科大学・薬学部・助教  
研究者番号：40365185  
徳山 博文 (TOKUYAMA HIROUMI)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：50276250  
原 義和 (HARA YOSHIKAZU)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：30383863  
(H22年まで分担者として参画)
- (3) 連携研究者  
なし