

氏 名	の 野 ぐち みち お 生
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3173 号
学位授与の日付	平 成 20 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Genetic and Pharmacological Inhibition of Rho-associated Kinase II Enhances Adipogenesis (脂肪細胞分化における Rho-associated kinase II の意義：遺伝子工学的、薬理学的手法を用いた検討)
論文調査委員	(主 査) 教 授 稲 垣 暢 也 教 授 松 田 文 彦 教 授 岩 田 想

論 文 内 容 の 要 旨

脂肪細胞分化は肥満の世界規模での増大とともに近年急速に研究が進展しつつある分野であり、様々な細胞外シグナルや転写因子、転写共役因子により脂肪細胞分化が規定されることが明らかとなってきた。Rho-ROCK pathway は細胞骨格を調節するシグナルとして広く知られているが、細胞分化に関与することも指摘されている。しかし、脂肪細胞分化における ROCK の意義は未だ明らかとなっていない。また ROCK には異なる遺伝子でコードされる ROCK-I, ROCK-II という 2 種類のアイソフォームが存在する。本研究は遺伝子工学的手法と薬理学的手法を組み合わせる脂肪細胞分化における ROCK の意義を明らかにすることを目的とし、以下の検討を行った。

2 種類の ROCK 阻害薬 (Y-27632, fasudil) 投与群は非投与群と比較し、3T3-L1 細胞において脂肪蓄積を亢進させ、蛋白レベルで PPAR γ (6 倍) や C/EBP α (5.6 倍) の著明な発現亢進が認められた。また脂肪蓄積についての検討から Rho-ROCK pathway を活性化する lysophosphatidic acid (LPA) は脂肪細胞分化を抑制し、Y-27632 は LPA による脂肪細胞分化の抑制を回復させた。ROCK 阻害薬は ROCK-I、ROCK-II の両方の活性を阻害するため、アイソフォーム特異的な意義を検討することはできない。そこで各々のノックアウトマウス由来胎児線維芽細胞 (MEF) を用いて、また 3T3-L1 細胞へ ROCK siRNA を導入することでアイソフォーム特異的な意義を検討した。ROCK-II $-/-$ MEF では wild type と比較し著明に脂肪蓄積が亢進し、mRNA レベルで PPAR γ (14.2 倍) や C/EBP α (6.2 倍) の有意な発現上昇が認められた。一方、ROCK-I $-/-$ MEF では wild type と比較し、脂肪蓄積及び PPAR γ や C/EBP α の発現における有意差は認められなかった。また 3T3-L1 細胞における ROCK-II siRNA の導入は mRNA レベルで PPAR γ (2 倍) や C/EBP α (1.8 倍) の有意な発現上昇を引き起こしたが、ROCK-I siRNA の導入では有意な発現の変化は認められなかった。脂肪細胞分化においてインスリンシグナルは必須であることが知られており、これらの現象を説明するメカニズムの一つとして ROCK によるインスリンシグナル調節について検討した。3T3-L1 前駆脂肪細胞において Y-27632 はインスリンによる IRS-1 Ser リン酸化を低下 (36%) させ、Akt リン酸化を亢進 (3.2 倍) させた。同様に ROCK-II $-/-$ MEF では wild type と比較し、インスリンによる Akt リン酸化レベルの亢進 (5.6 倍) が認められた。一方、ROCK-I $-/-$ MEF では wild type と比較しインスリンによる Akt リン酸化レベルに有意差は認められなかった。

以上の結果より、ROCK-I ではなく ROCK-II の抑制が脂肪細胞分化関連遺伝子の発現を上昇させ、脂肪細胞分化を促進させることを明らかにし、Akt リン酸化の亢進が関与している可能性が示唆される。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。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

細胞骨格を調節する Rho 及び Rho-associated kinase (ROCK) pathway の細胞分化制御を含む多彩な生理機能が注目されている。しかし脂肪細胞分化における ROCK の意義は未だ明らかでない。本研究では脂肪細胞分化における ROCK の

意義を明らかにすることを目的とし、遺伝子工学的手法と薬理学的手法を組み合わせ、3T3-L1 細胞およびマウス由来胎児線維芽細胞 (MEF) を用いて以下の検討が行われた。

ROCK 阻害薬 (Y-27632,fasudil) 投与または ROCK-II siRNA を導入された 3T3-L1 細胞及び ROCK-II 遺伝子欠損 MEF はいずれも対照と比較し脂肪細胞分化を促進させた。一方 ROCK-I siRNA を導入された 3T3-L1 細胞及び ROCK-I 遺伝子欠損 MEF は対照と比較し、脂肪細胞分化に有意差は認められなかった。さらに Y-27632 を投与された 3T3-L1 前駆脂肪細胞及び ROCK-II 遺伝子欠損 MEF では対照と比較しインスリンによる Akt リン酸化レベルを亢進させた。一方 ROCK-I 遺伝子欠損 MEF では対照と比較し Akt リン酸化レベルに有意差は認められなかった。

以上の研究は ROCK-II の抑制が脂肪細胞分化を促進させることを明らかにし、脂肪細胞分化の分子機構の解明及び Rho-ROCK pathway による細胞分化制御機構の解明に寄与するものである。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお本学位授与申請者は、平成 19 年 12 月 21 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。