

## 72. ROCK2 による糖尿病腎症進展制御機構の解明

川浪 大治

東京慈恵会医科大学 糖尿病・代謝・内分泌内科

Key words : 糖尿病腎症, Rho-kinase

### 緒言

本邦において糖尿病患者数は増加の一途を辿っている。糖尿病患者の予後を規定するのは合併症であるが、その中でも糖尿病腎症（以下、腎症）は末期腎不全のみならず心血管疾患の危険因子であり、発症機序の解明が急務の課題となっている。糖尿病合併症に対しては血糖や血圧、脂質といったリスク管理が主体であり、特異的な治療が現在のところ存在しない。このような背景から、腎症の発症・進展を制御する因子の同定とその機能解析が求められている。我々は低分子量 G タンパク Rho とそのエフェクターである Rho-kinase (ROCK) が高血糖やインスリン抵抗性によって活性化し、メサンギウム細胞において炎症機転を惹起することにより糸球体硬化の形成を促進することを明らかにしてきた。しかしながら、糸球体上皮細胞（ポドサイト）において ROCK がどのような役割を果たしているかは明らかにされていない。本研究では、ROCK によるポドサイト調節機構について検討を行った。

### 方法および結果

ポドサイトのアポトーシスには Notch シグナルの活性化が関与する<sup>1)</sup>。このため、Notch シグナルにおける ROCK の役割について検討を行った。TGF- $\beta$  でポドサイトを刺激したところ Rho および ROCK が活性化していることを確認するとともに、Notch リガンドである Jag1 mRNA の発現が上昇することを確認した。ROCK 阻害薬である Y-27632 は TGF- $\beta$  による Jag1 の発現誘導を抑制した。ROCK には ROCK1 と ROCK2 の 2 つのアイソフォームが存在するが、siRNA を用いて検討を行ったところ、ROCK2 をノックダウンした場合にのみ Jag1 の発現が抑制された。このことから、TGF- $\beta$  は ROCK2 依存性に Jag1 の発現を誘導することが明らかになった。さらに ROCK を阻害することにより TGF- $\beta$  で誘導されるポドサイトのアポトーシスが抑制された。我々は細胞内シグナルについてさらに詳細に検討を進めた。各種シグナルの阻害剤を用いたところ、Smad、ERK1/2、JNK および p38MAPK が TGF- $\beta$  による Jag1 の発現を制御していることが分かった。このうち、ROCK 阻害薬である Y-27632 は Smad3 のリン酸化を抑制しなかったことから、ROCK は Smad 非依存性の経路で Jag1 発現を誘導することが明らかになった。また、Y-27632 は ERK1/2 と JNK のリン酸化を抑制したことから、ROCK は ERK1/2 および JNK、そして Notch シグナルの活性化を媒介し、ポドサイトのアポトーシスを誘導することが示された。

培養細胞を用いて得られた実験結果を基に、糖尿病モデルを用いた検討を行った。2 型糖尿病モデルである db/db マウス（5 週齢）に ROCK 阻害薬ファスジルを 100 mg/kg にて 3 週間投与した。その結果、ファスジルの投与によってアルブミン尿が抑制された。またポドサイトのマーカーである nephrin の尿中への排泄がファスジル投与群では抑制されており、ポドサイトの喪失がファスジルによって抑制されていることが示唆された。同様に、病理組織学的な検討においても、ポドサイトの消失やアポトーシスがファスジルによって抑制されていることを確認した。db/db マウスでは腎皮質での Jag1 の発現が亢進しており、Notch シグナルの活性化がこれら一連のポドサイト機能破綻を惹起していることが考えられた。次にポドサイトの初代培養を行った。db/db マウス由来のポドサイトでは Jag1 mRNA の発現レベルが亢進していたが、ファスジル投与群では抑制されていることが明らかになった。また Bax や CDKN1A といったアポトーシス関連マーカーについても db/db マウス由来のポドサイトでは発現が上昇していたが、ファスジル投与によってこれらの発現が抑制されていることが示された（図 1）。

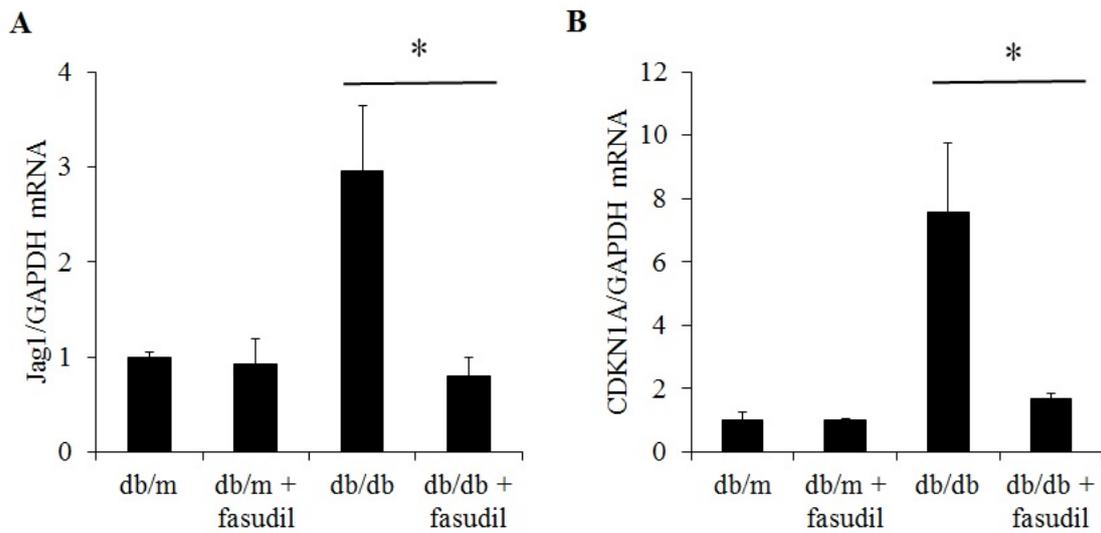


図1. ROCK 阻害薬のアポトーシスへの効果

A. db/db マウス由来のポドサイトでは Jag1 発現が上昇していたが、ファスジルの投与によって抑制された。B. アポトーシスマーカー (CDKN1A) も同様に抑制されていた。\* $p < 0.01$  (Bonferroni 法)

以上の結果から、Rho-kinase 中でも ROCK2 がポドサイトの機能調節を行い、糖尿病腎症の発症・進展に重要な役割を持つことが明らかになった。これらの知見に基づき、ROCK2 の腎症への関与を詳細に検討するため我々は ROCK2 コンディショナルノックアウトマウスの作製を行った (図2)。

(A) Wild allele

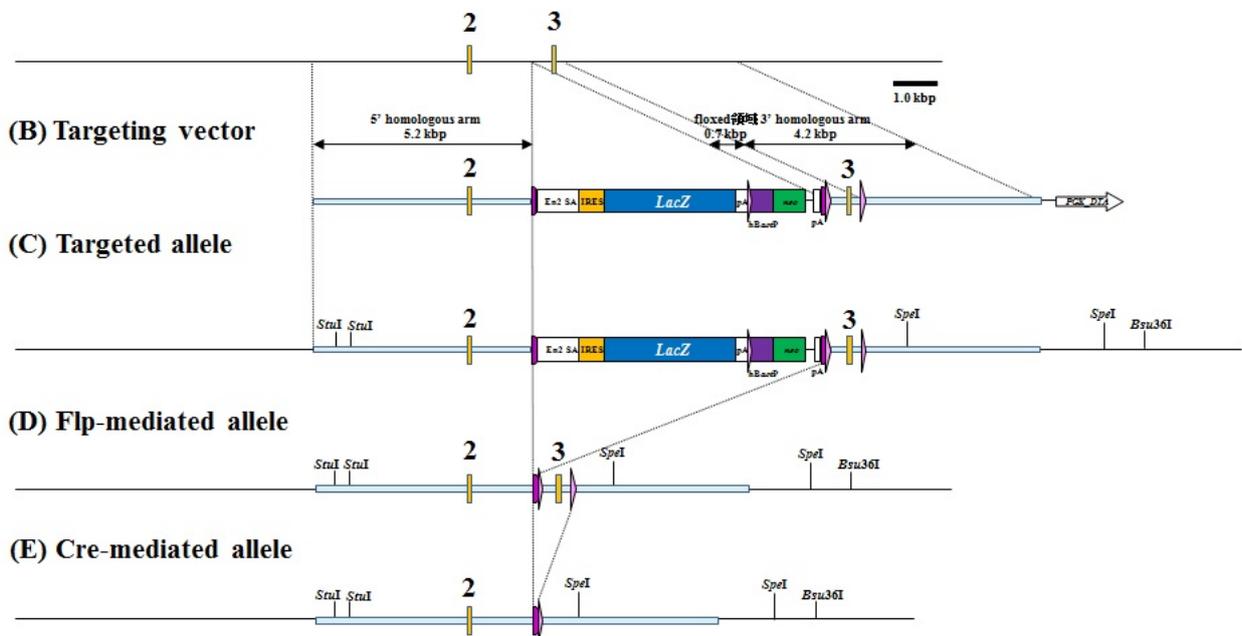


図2. ROCK2 遺伝子 targeting strategy

ROCK2 遺伝子の exon3 を Cre-loxP システムにより欠損させた。

今後は、ポドサイト特異的に ROCK2 をノックアウトしたマウスの作製作業に着手し、腎症の発症・進展における ROCK2 機能の全容解明につとめる。

## 考 察

ポドサイトの機能障害は糖尿病腎症の発症早期にみられ、この過程を制御する因子の同定と機能解析は重要な意義を持つ。我々は ROCK が糖尿病状態において糸球体硬化の形成を促進する因子であることが報告してきた<sup>2,3)</sup>。しかしながら、これらの報告はメサンギウム細胞にその解析の焦点を当てたものであり、ポドサイトにおける ROCK の機能についてはほとんど明らかにされていなかった。本研究は、ポドサイトにおける Notch シグナリングの活性化とそれに伴うアポトーシスに ROCK2 が関与することを明らかにした。

まず、我々は TGF- $\beta$  によってポドサイトの Jag1 mRNA 発現が上昇することが確認し、この Jag1 mRNA の発現誘導に ROCK が関与することを明らかにした。さらに db/db マウスでも腎皮質での Jag1 発現が亢進しており、ROCK 阻害薬ファスジルの投与によって抑制されることを確認した。TGF- $\beta$  は Smad 依存性および Smad 非依存性の経路で下流シグナルを活性化させることが明らかにされている。今回の検討では、ROCK は Smad 非依存性に ERK と JNK が活性化させることが明らかになった。メサンギウム細胞や乳がん細胞において ROCK は Smad のリン酸を制御しないことが示されており<sup>4)</sup>、今回の結果もこれらに矛盾しない。我々はこれまでに、メサンギウム細胞では TNF- $\alpha$  刺激に伴う p38MAPK の活性化に ROCK が関与することを示してきたが<sup>3)</sup>、TGF- $\beta$  の刺激下では ROCK は p38MAPK を制御しないことが明らかになった。これは細胞の違いや刺激によって活性化されるシグナルが異なることに起因していると考えられた。ポドサイトにおける ERK の活性化が酸化ストレスや NF- $\kappa$ B を介してアポトーシスを惹起することが知られている<sup>5,6)</sup>。JNK はアンジオテンシン II によるポドサイトのアポトーシスに重要な役割を果たす<sup>7)</sup>。JNK が TGF- $\beta$  によって誘導されるアポトーシスにも関与することが今回、明らかになった。我々はこれまでに糖尿病ラットの腎皮質における TGF- $\beta$  の発現をファスジルが抑制することを示している。このことは ROCK が TGF- $\beta$  と Notch シグナルのループを制御する因子であると考えられる。

ROCK アイソフォームの機能分担については明らかにされていなかった。我々は、メサンギウム細胞においては ROCK1 と ROCK2 は明確な機能分担を示さないことを過去に報告した。しかしながら、本研究では ROCK1 ではなく ROCK2 がポドサイト機能の制御を行っていることが明らかとなり、糸球体構成細胞ごとに ROCK アイソフォームが異なる機能を有する可能性が示された。この点を明らかにするべく、コンディショナルノックアウトマウスを用いた検討を今後も進めていくことが、腎症における治療標的を明らかにするためにも重要であると考えられた。

## 共同研究者

本研究は宇都宮一典教授の指導のもと、的場圭一郎との共同研究で実施した。本研究にご支援をいただきました上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Niranjana T, Bielez B, Gruenwald A, Ponda MP, Kopp JB, Thomas DB, et al. The Notch pathway in podocytes plays a role in the development of glomerular disease. *Nature medicine*. 2008;14(3):290-8. doi: 10.1038/nm1731. PubMed PMID: 18311147.
- 2) Matoba K, Kawanami D, Okada R, Tsukamoto M, Kinoshita J, Ito T, et al. Rho-kinase inhibition prevents the progression of diabetic nephropathy by downregulating hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Kidney international*. 2013;84(3):545-54. doi: 10.1038/ki.2013.130. PubMed PMID: 23615507.
- 3) Matoba K, Kawanami D, Tsukamoto M, Kinoshita J, Ito T, Ishizawa S, et al. Rho-kinase regulation of TNF- $\alpha$ -induced nuclear translocation of NF- $\kappa$ B RelA/p65 and M-CSF expression via p38 MAPK in mesangial cells. *American journal of physiology Renal physiology*. 2014;307(5):F571-80. doi: 10.1152/ajprenal.00113.2014. PubMed PMID: 25007875.
- 4) Peng F, Zhang B, Wu D, Ingram AJ, Gao B, Krepsinsky JC. TGF- $\beta$ -induced RhoA activation and fibronectin production in mesangial cells require caveolae. *American journal of physiology Renal physiology*. 2008;295(1):F153-64. doi: 10.1152/ajprenal.00419.2007. PubMed PMID: 18434385; PubMed Central PMCID: PMC2494513.

- 5) Das R, Xu S, Nguyen TT, Quan X, Choi SK, Kim SJ, et al. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1-induced Apoptosis in Podocytes via Extracellular-signal-regulated Kinase-Mammalian Target of Rapamycin Complex 1-NADPH Oxidase 4 Axis. *The Journal of biological chemistry*. 2015. doi: 10.1074/jbc.M115.703116. PubMed PMID: 26565025.
- 6) Yu L, Lin Q, Liao H, Feng J, Dong X, Ye J. TGF- $\beta$ 1 induces podocyte injury through Smad3-ERK-NF- $\kappa$ B pathway and Fyn-dependent TRPC6 phosphorylation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2010;26(6):869-78. doi: 10.1159/000323996. PubMed PMID: 21220918.
- 7) Liu Y, Liang W, Yang Q, Ren Z, Chen X, Zha D, et al. IQGAP1 mediates angiotensin II-induced apoptosis of podocytes via the ERK1/2 MAPK signaling pathway. *American journal of nephrology*. 2013;38(5):430-44. doi: 10.1159/000355970. PubMed PMID: 24247724.