

座談会

CKD の評価, 管理の仕方, 治療の仕方*

脇野 修^{司会} 柴垣有吾
竹中恒夫 岡田知也^{*_{発言順}}

脇野 本日は、お忙しいところどうもありがとうございます。よろしくお願いします。

慢性腎臓病(CKD)の評価, 管理の仕方, 治療の仕方に関して、実際の臨床の第一線で活躍されている先生方をお招きして、お話をうかがいたいと思っております。

皆さんご存じのように、CKD という新しい概念で腎臓病の治療, 診断が実践されるようになってきています。eGFR をもとにして5つのステージに分けて、その治療をしていく。それは結局、大規模データでCKDが腎不全の進行のみならず心血管イベントのリスクファクターであることが認識されてきて、しかも機能低下の早期の状態、たとえば微量アルブミン尿の状態でもすでに心血管イベントのリスクファクターになっているということから、早期に介入して治療をしなければいけないという考えで注目されるようになってきたわけです。

現在、CKDのキャンペーンもかなり広まってきて一般臨床家にもかなり浸透していますので、本日の座談会では残されているとか見逃されている問題点、あるいは専門家がみて一般臨床家に今後注意してほしいことなどに焦点を当ててお話をいただきたいと思います。

CKD の診断基準と評価

脇野 最初に、CKDの診断基準と評価ですが、腎障害はeGFRと尿蛋白、微量アルブミン尿を一つのマーカーとして分類しています。この診断基準だと、高齢者は年齢のファクターでほとんどCKDになってしまう。あるいは、eGFRを年齢とクレアチニン値で計算していくと、クレアチニンクリアランスとずれが出てくるといことも実地臨床ではよく起こると思います。それも一般臨床医はお困りでしょうし、本当にeGFRや尿蛋白が心血管病のリスクを予測しうるかという問題も出てくると思います。これらに対して、柴垣先生、何かご意見はありますか。

柴垣 実際、このCKDのステージングは世の中に大きな、非常によい意味でのインパクトを与えたと思っています。つまり、腎臓病というものを広く世の中の人たちが認識するようになった。とくに、開業の先生方を含めて、腎臓の病気というのは、単に腎臓がわるいだけではなくて、心臓の病気にもつながる重要な疾患であるということが認知された点、それから、今まではかなりひどくなるまで放置されていた腎臓病の進行する患者さんを早期にスクリーニングし、拾い上げたという点で、非常に重要な意味があったのではないかと評価しています。

ただ、その一方で大きな問題点もあると思っています。私は腎臓移植という分野にかかわっており、移植のドナー、いわゆる腎提供者をよくみていますが、当初は腎提供後に腎不全になる人が少

* 2010年10月17日(木)

** S. Wakino(講師): 慶應義塾大学腎臓内分泌代謝内科; Y. Shibagaki(准教授): 聖マリアンナ医科大学腎臓・高血圧内科; T. Takenaka(准教授): 埼玉医科大学腎臓内科; T. Okada(講師): 東京医科大学腎臓内科。



脇野 修氏

なからずいるということで、実際にはドナーになるべきではない人が提供しているのではないかと、つまり日本人のような GFR の低い人は、ドナーとして本当に適しているのだろうか、最初はそういう疑問からはじまったのです。ところが、実際には、腎提供後も腎機能はまったくわるくならない。最近では、『The New England Journal of Medicine』誌や『Lancet』誌などでも、通常は年齢を重ねるごとに GFR が下がっていくはずなのに、腎提供後の腎機能はほとんどわるくならないということがわかってきました。つまり、腎臓の機能は、GFR が低いだけでは進行せず、リスクファクターを伴ってはじめて進行する。そのリスクファクターの一番重要なものが蛋白尿であり、高血圧であり、糖尿病である。つまり、そういうリスクファクターをもっていない人は、ほとんどが進行しない単なる腎機能低下であることがわかってきました。

実際に、日本人の CKD の方をよくみると、とくにステージ 3 は全人口の 10% 以上もいるのではないかとされていますが、そのうち蛋白尿陽性は 1% に満たないことがわかっていて、つまり進行しない腎機能低下を捉えて、CKD という病気のレッテルを貼ってしまっているのではないかと考えています。

これは、どういう問題点があるかという点と、必要のない人を治療してしまい、たとえば、不必要に高価なレニン-アンジオテンシン系 (RAS) 抑制薬を使ってしまう医療経済的な問題が 1 点。もう一つは、GFR の低い人は、それが病的であろうとなかろうと、RAS 抑制薬を使うと、腎機能の悪化や高カリウム血症のリスクが高まるという医療被害の点です。

実際、抗アルドステロン薬を含めたレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (RAAS) 抑制薬を服用されて、かなりシビアな高カリウム血症になる高齢者を最近結構みかけるようになりました。そういう方に本当に必要なのかという大きな問題点があると思っています。その点は、最近 Richard Glassock らが『Kidney International』誌 (Kidney Int 75 : 1009, 2009) などで非常によい総説を書いています。今後スクリーニングツールとして非腎臓専門医が CKD の可能性のある方を拾い上げるための CKD 分類と、腎臓病を治療する立場の腎臓専門医が使うべき分類とを分けて考えなければいけないだろうと思っています。

脇野 eGFR プラス何か別のもの、尿蛋白なり、ほかにマーカーがあったほうがよいという意味ですか。

柴垣 そうですね。ただ、スクリーニングのツールはあくまでもシンプルさが命だと思いますので、スクリーニングツールとしての CKD 分類には、逆に入れられないほうがよいと思います。また、スクリーニングツールとして使うのであれば、逆にもっと単純なものにしてもよいのかもしれないと思います。

脇野 竹中先生、その点はいかがですか。

竹中 大賛成です。高齢になり、年齢のファクターで eGFR がどんどん減ってきてしまうのを CKD といって紹介いただくのですが、尿蛋白も出ていないし、血圧も正常だし、この方の腎臓はあ

柴垣有吾氏



る意味老化かもしれませんので、このままみていて問題ないでしょうということを申し上げて、開業医の先生にお返しすることもあります。逆にお願ひするのは、蛋白尿とか血圧が高いとか、糖尿病や高脂血症といったリスクを伴っている方は、ステージがいくつであっても腎臓内科がみてよいと思います。

とくに蛋白尿が著明でなければ、ステージ3になったからといって紹介されてきても、腎臓内科医がすべて抱え込むことはなく、eGFR でいえば、私どもの仕事は新しい CKD 分類のステージ 3b, eGFR 45 以下もしくはステージ 4 からが適切だと思います。ステージ 3 から全部みるには腎臓内科医の数が不足しているかと思ひます。

脇野 岡田先生は、どうですか。

岡田 私も同意見です。ステージ3で尿蛋白陰性の患者さんがしばしば紹介されますが、専門医の介入が不要と思われる場合はよくあると思ひます。ステージ3では、専門医が一度診て、治療介入の必要性を判断することは、意義があると思ひます。

脇野 蛋白尿も大事ですが、尿蛋白がなくても、たとえばクレアチニンの値がわなくて血管病変が主体であるいわゆる虚血腎症のような方に、RAS 抑制薬を投与すると高カリウム血症になったりする。そういう方は、よくみてみると、尿細管マーカーが結構上がっていることがあるのです。尿蛋白やアルブミンとしては異常が出なくても、尿細管障害が認められる症例があります。それが予後に関与するという話も、いくつかの病型で、たとえば IgA 腎症などがありますので、尿細管マーカーと血管もみて、悪化しそうかどうか評価する。尿蛋白がたとえ陰性でも、私はそう考えています。

この話と重なるのですが、腎臓が専門でない先生が、eGFR だけで紹介する症例に対し、尿蛋白のほかに予後の悪化を示唆する検査について教え

てください。開業医ではむずかしいかもしれませんが、とくに画像に関して、腎臓の分野は心エコーなどに比べると非常に弱いところがあると思ひます。同じ eGFR, 同じ尿蛋白でも、これはわなくなりそうだと示唆するようなものはありますか？

竹中 古くから行われているもので、シンチグラフィや超音波がありますが、私たちがここ数年で始めたのは、BOLD(functional)MRI です。MRI で腎臓の機能をみるというものです。酸素化されたヘモグロビンを指標にして、腎臓の血流を対比してみるような MRI を積極的に使っています。酸素化をみていますから、先ほど先生がおっしゃった虚血があるかないかがわかります。それから diffusion という方法でみると、腎臓の中の線維化がある程度わかるのです。尿細管間質性病変の程度が、生検せずに少しは把握できる。したがって、たとえば虚血があっても線維化がないとなると、この腎臓は eGFR が低くても可逆的だからということで治療の介入をしやすい。functional なものがかなりみられるようになってきたのは、よいことだと思います。

先ほど虚血性の腎障害の話が出ましたが、一番 BOLD MRI が有用なのは腎動脈狭窄です。腎動脈が細くなっていると、当然虚血になるので、その

竹中恒夫氏



動脈を開こうか開くまいか、よく迷うところだと思います。そのときに、BOLD MRIを行うと、患側の腎臓は酸素化がすごく低いのです。それに furosemide を投与して、尿細管機能を抑えてあげると、酸素化反応が改善する症例があります。そういう腎臓——つまりその片腎は腎血流量(RBF)が低いので、尿細管がたくさん働いて再吸収をして FENa が低いような状況です。そのため必要以上に虚血に陥っているように見える。これは逆に尿細管が intact, 生きているのだから、動脈狭窄を戻してやれば腎機能は戻るといことがわかるのです。腎予後予測というか、治療選択について非常に有用だと思いますので、これからもっと進めてよい分野ではないかと思っています。

脇野 開業の先生から紹介されたときに行ってみて、お墨つきをつけると納得いくし、説得力もありますね。

竹中 そうですね。精査をきちんとする。

脇野 柴垣先生は、何かありますか。

柴垣 私は、研究はあまりせず、大学の臨床業務がほとんどで、主にコンサルテーション業務をやっています。つまり、他科に入院されて、腎機能のわるい患者さんの評価が主な業務です。そうすると、私の大学には BOLD MRI みたいなものもありません。私たちがいつも行っているのは、

一つはもちろんエコーです。エコーはドプラ評価も含めて必ず行うようにしています。

私たちも、ドプラ評価で RI(resistive index)などを結構みているのですが、エコーの術者の技量に依存する部分が多くて、なかなか均一な結果が出ないところがあります。また、ペルフルブタンなどを使った造影剤エコーなどもやっているのですが、われわれの検討では、蛋白尿と弱い相関があるものの、実地臨床に応用できるところまでは精度が高くないのが実情で、エコーはサイズとか形状とか、水腎症の評価など、すごく単純なレベルでは有用だとは思っているのですが、それ以上の有用性はあまりない気がします。私が実際の臨床で強く思うのは、入院患者さんの場合には CT を撮られていることが多く、大動脈硬化や腎動脈の硬化・石灰化の評価が、とくに単純 CT でわかります。このような動脈硬化の強い患者さんは相対的な体液量欠乏や血圧低下・RAS 抑制薬を含めた GFR に影響する薬剤の使用で急性腎障害(AKI)を起こしやすく、きちんとしたデータでみたわけではないのですが、術後の AKI の頻度や、ACE 阻害薬(ACEI)、ARB 使用後のクレアチニン上昇、高カリウム血症の頻度は、かなり相関が強いのではないかと。これは普通の基幹病院レベル以上であれば非常に簡単にできる検査だし、かつ、そういう術前後、手術期、あるいは何か治療 intervention 前後の AKI の予防、血圧管理をどうすればよいかなども含めて、個人的には非常に有用ではないかと思って、重宝しています。

脇野 今、エコーの話が出ましたが、私どももドプラエコーには興味があって、行っています。すでにいろいろなグループで報告が出ていますが、私たちも operator dependent で、自分たちではやらないで operator を決めているのです。その場合、よく話を聞くのは、プローブの角度についてです。一応 RI 値は速度で補正しているのですが、

岡田知也氏



角度が変わって、速度が変わっても、それなりには補正できている。ただ、RI 値は全体の抵抗なので、線維化だとか尿細管周囲毛細血管の消失に影響してくるところがある。確かに eGFR とも関連するのですが、最近、データとしては、RI と同時に Vmax と立ち上がり、acceleration のあたりを注目しています。

また、当院では葉間動脈を撮っています。葉間動脈がなぜよいかというと、長軸のセントラルエコーのところをみると、そこから大体垂直に葉間動脈が出ているので、プローブと直角に入ってくれて、角度が一致する。だから、速度の評価はある程度ブレを減らすことができる。フローと尿細管障害はきれいな相関を認めています。確かに operator dependent であり、大学病院など限られたところしかできないかもしれませんが、一応最近話題になっている高齢者の虚血などに、そういうものが使えるかなと考えています。

岡田先生、いかがですか。

岡田 私たちも必ずエコー検査を行います。ドプラエコーはルーチンでは行わず、腎血管病変を疑う症例が対象です。動脈硬化が進行している患者さんは、大動脈瘤などの大血管病変を合併していることがありますので、スクリーニングとして全例行うのは問題がありますが、エコーよりも CT のほうが有用な場合があると思います。

CKD の管理の仕方

脇野 腎臓内科医は、CKD をみた後、リスクファクターの管理もありますし、腎臓自身の管理もあると思います。心血管イベントを進行させる、あるいは腎不全を進行させるキープレイヤーとして何に注目していますか。最近では asymmetric dimethylarginine (ADMA) などがいろいろいわれていますが、新しいものでもよいですし、実地臨床でこれはマーカーとしてちゃんとフォローすべ

きであるというものはありますか。

竹中 実地臨床では、マーカーは測定できないのですが、CKD や心血管病を進行させるキープレイヤーは酸化ストレスではないかと思っています。酸化 LDL を測定したことがあるのですが、やはり CKD のステージが高いほど上がってきますし、腎臓や血管を悪化させている重要な要因の一つだろうと思います (Fig. 1)。

これは勝手な思い込みかもしれませんが、正常な腎臓は、生体にとって還元剤ではないかと思うのです。それがなくなってくると、全身の酸化能が上がっていった血管障害もきたすのではないかと考えています。

それから、実地臨床でやるとなると、本当にプリミティブなファクターになりますが、酸化ストレスの原因であろう尿蛋白、とくにアルブミン尿ですね。それが CKD 進行に関しては一番。それを管理するために血圧や脂質の測定ということになってくると思います。

脇野 柴垣先生が管理なさる腎臓もしくは心血管イベントは、いかがですか。

柴垣 研究レベルの話は、私は非常に疎いところがあり、かつ現在の実地臨床のうえではまだ使われていないところがありますが、実地臨床上では、やはり CKD の合併症としての貧血や骨ミネ

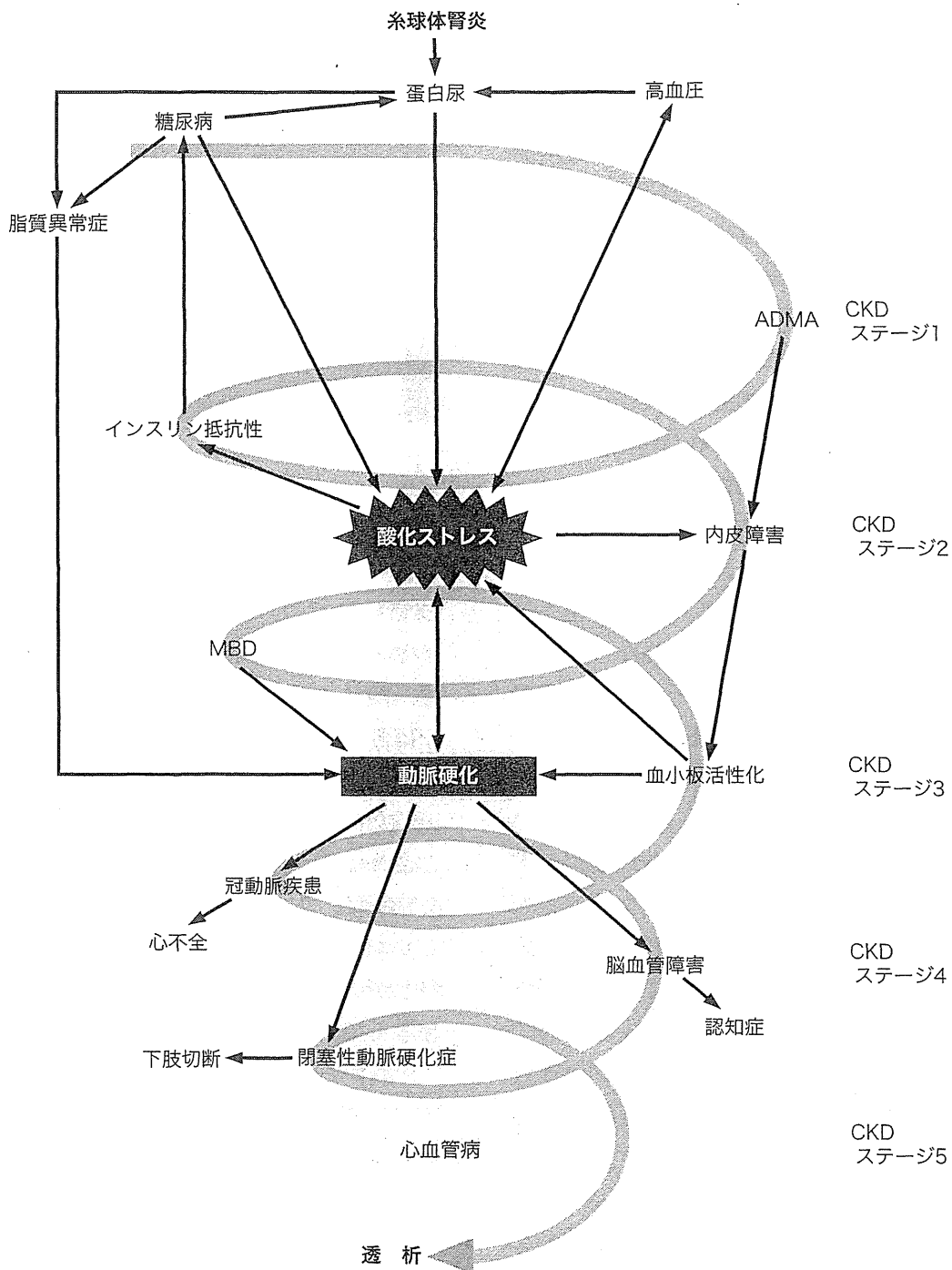


Fig. 1. 腎心連関

ラル代謝異常(MBD), 心血管病, それからアシドーシスですね. たとえば, 正常にまで戻さなくても, 高度な貧血をある程度改善させると腎疾患をよくする可能性があるとか, 重曹を投与すると

腎疾患の進行を抑制できるとか, MBD の治療をすると抑制できるといったエビデンスがあると思います.

ただ, 問題はそういうエビデンスが結構出てい

でも、実際のプラクティスでは、いわゆる腎臓学会や K/DOQI ガイドラインの目標レベルまで管理できていないことのほうが圧倒的に多い。つまり、エビデンス・プラクティス・ギャップが非常に大きいことのほうが大きな問題ではないかと思えます。たとえば、ACEI, ARB がよいことはわかっている、とりあえず出せば、それでよいところがある。蛋白尿が多い場合は、蛋白尿が限りなく下がるまで ACEI とか ARB を増やしていったほうがよいこともありますし、そういうきわめて単純なレベルですら、まだ十分に行われていないのではないかと思えます。

さらに、一つの因子だけではなくて、集学的なリスク管理が必要で、いわゆる糖尿病の Steno-2 study が有効だったということもあるように、いろいろなリスクファクターを同時進行的に管理することが必要かと思えます。

CKD の合併症管理すべてを実際の外来でやるのは非常に面倒なので、私は個人的には腎臓の合併症を A, B, C, D, E, F, G, H とやっています。A は ACEI とか ARB, B は Blood pressure, C は Ca (CKD-MBD), D はダイエット (Diet) や DM 管理, E はエリスロポエチン (EPO) で貧血, F と G は Follow GFR でクレアチニンの値を測定して腎臓の進行度をみる。H は Heart (心血管病)。それで、A はできているか、B はできているかを確かめながら、1 人 1 人の患者さんを診るくせをつけています。大学にいる者として研究をもっとしていかなければいけないのですが、個人的には、それ以前の段階ですらできていないのがそれ以上に大きな問題だと感じています。

脇野 K/DOQI のガイドラインにも出ていますが、確かにエビデンス・プラクティス・ギャップは、きちんと押さえておくべきであるということですね。非常に教訓的な話だと思えます。

岡田先生はいかがですか。

岡田 新しいリスクファクターを探して注目の

することも重要ですが、臨床の場では、すでにわかっている進行因子に関して、どれだけ管理できるかということが基本的に重要だと思います。多くの進行因子の中でもっとも強く影響するのは血圧と尿蛋白量だと思います。血圧に関しては、家庭血圧の管理の重要性が認識されているものの、まだ不十分であるし、必ずしも容易ではないと思えます。蛋白尿の減少は薬物療法、食事療法の両面でコントロールを図りますが、必ずしもコントロールできずに腎機能低下が進行する患者さんもいます。もちろん、蛋白尿が少なくても進行する病態もあります。

脇野 しっかりとした古典的なところをきっちり押さえるのはもちろん当然で、私自身は大賛成です。

一つ問題になるのが、reverse epidemiology だと思います。いわゆるリスクファクターの逆現象で、血圧を下げればよいと思って、どんどん血圧を下げていくと、たとえば透析患者さんの場合は血圧の低いほうが、死亡率は高い。肥満に関しても、普通はやせればよいという感じでどんどんやせていくのですが、透析患者さんは逆に太っているほど予後がよい。これはいくつかの病態でわかっているといわれていて、たとえばエイズや心不全患者さん、老人ホームの方などや腎不全のステージが進んだ患者さんをみていくと、だんだん活力が低下してリスクファクターの意味が reverse になってくるような病態が出てきます (Table 1)。さらに大規模臨床試験で腎不全を抑制した薬は、ステージ 3 に行くか行かないかをエンドポイントにしています。ステージ 4 やステージ 5 を対象にしたものは私どもが知る限りでは、そうないと思えます。透析患者さんは明らかに逆転しているのですから、CKD の患者さんは、どこかで必ずリスクファクターが逆転している。そこが、これから明らかにしていかなければいけないところではないかと考えています。もちろんリスク

Table 1. CKD における reverse epidemiology

心血管リスク	一般人口	血液透析患者	CKD 患者	留意点
BMI	BMI が高ければ CVD のリスクが高くなる	BMI が高ければ生存率が高い	高い BMI が高い生存率となる報告と低い生存率となる報告がある	COPD, 慢性心不全, 慢性関節リウマチ, 高齢者では高い BMI は高い生存率
血圧	高血圧ほど CVD のリスクが高くなる	低血圧ほど生存率が低い	収縮期血圧と生存率については J-shape 現象が成立する. 拡張期血圧は低いほど生存率が高い	eGFR<30 で血圧と生存率の関係が逆転する
脂質	総コレステロール, LDL コレステロール高値および HDL- コレステロール低値は CVD のリスクファクターである	総コレステロール高値は生存率が高い	コレステロール, 中性脂肪が低いと生存率は低い	コレステロール値と生存率との関係が逆転するのは MICS や MIA 症候群において成立

CVD : 心血管病.

[Semin Dial 20 : 566, 2007 より抜粋]

ファクターの管理は、今のところ重要になっていきますが、血圧および脂質は the lower, the better. その一方でステージ 4 の方、あるいはステージ 5D に入る前のステージ 5 の方はそれでよいかを今後検証することが、腎臓内科医としては必要なのではないでしょうか。この辺について何かご意見はありますか。

柴垣 腎機能のよいレベルでは、厳格なコントロールは非常に重要ですが、腎機能がかなりわるいのは、腎臓の予備能が落ちていて、状態がわるいことも手伝っていると思うのです。RAS 抑制薬を含めた厳格な降圧管理をしていると、AKI を合併しやすい。ですから、腎機能がステージ 3 までは厳格なコントロールをしても、ステージ 4 の後半あるいはステージ 5 に近い方に、そこまで厳格なコントロールが必要なのか。とくに蛋白尿があまり出ていない人、動脈硬化の強い高齢者でのコントロールは、再評価しなければいけないのではないかと。そういう意味では先生のおっしゃるとおりだと思います。

脇野 貧血に関してはどうでしょうか。透析患者さんだと、10~12 g/dl ぐらいが一番よくて、上昇すると死亡率が上がるというデータが出ていますね。ステージ 4、ステージ 5 の患者さんにエリ

スロポエチンをどんどん導入して、正常ぐらいまでもっていったほうがよいのかどうか、いかがですか。

柴垣 貧血に関しては、CHOIR, CREATE, TREAT と、すべて正常レベルまでの貧血の完全な是正治療は生命予後、心血管イベント抑制、腎臓の進行という意味でメリットがあまりなかったという結果が出ていますし、恐らくそのとおりだと思います。

ただ、実際の臨床で常に思うのは、ステージ 4 や、とくに高度な腎障害の患者さんを、現在のいわゆるエポジン、エスポーの保険適用量ではコントロールできないことのほうが多いのではないかと。実際にはヘモグロビン 10 g/dl 以下の方に 1ヵ月 2万 4,000 単位を使ったとしても、そこまで上げられない場合がかなり多いと思っています。そういう意味では……。

脇野 結果オーライみたいな形でよいということですか。

柴垣 ええ。いわゆるヘモグロビンをその程度のレベルまで戻すのは必要ですし、とくに、今後 darbepoetin が保存期 CKD に使用される場合には、ある程度の貧血の改善は可能かと思えます。とくに、心不全合併例では重要で、腎保護効果は

それほどエビデンスはないかもしれませんが, 心不全の改善は FAIR-HF とか RED-HF という大規模スタディーで, かなりポジティブな結果が出ていますので, 最後には, 心不全になって BNP が高くなって, 透析導入になる症例が多いことを考えると, 心不全合併例では, 一定以上のヘモグロビンを保つ努力はしたほうがよいのかなと感じています。

脇野 竹中先生, 血圧は the lower, the better なのですか? 透析に入ると血圧が低いと生存率が下がりますね。

竹中 むずかしいですね。K/DOQI でもまだ結論が出ていないと思います。日本では, 透析患者の透析前の血圧が 160 mmHg ぐらいが予後がよいというデータがあります。しかし, 血圧測定が仰臥位であったり, 患者さんが穿刺で緊張されていたり, 一定しないので, 現在は協力いただける方は家庭血圧を参考にして血圧管理を行っています。

血圧を管理するとき, 血圧が体の場所で違うことも考慮します。中心と末梢で違う。上腕血圧と大動脈の血圧は同時測定しても異なります。当然, 中心血圧, 大動脈の血圧が上腕血圧よりも心血管病の発症や予後に強く関与しているので, 中心血圧を考慮して降圧療法を行っています。中心血圧は, 脈波で簡単に測定できるようになってきたので, そういう方法を使ってリスク管理を行っています。

日本腎臓学会のガイドラインに従えば血圧は基本的に the lower, the better でよいこととなります。といっても 130 mmHg まで落とすことはなかなか大変ですが。ただし, 一つ問題になるのは, 血管狭窄の度合いですね。とくに脳動脈, 頸動脈狭窄がある方は血圧を下げすぎると, めまいなどの症状が出てしまうので, 上腕血圧 140 mmHg 程度まであまり下げません。CKD ステージ 4~5 期にはこういった患者さんが増えてくると思いま

す。血圧を下げなくても蛋白尿を減らせるように ACEI や ARB にさらに輸出細動脈が開いてくれるような Ca 拮抗薬を加えるなど, 一応そういった工夫をして血圧管理をしています。

最近では FMD (flow mediated dilation) に注目しています。CKD の患者さんでは酸化ストレスのためか内皮障害のためか悪化しています。CKD の患者さんで心血管病の存在を示す値として FMD はまだカットオフ値がわからないのですが, 下肢の動脈狭窄を示す ABI は 0.9, 中心動脈を表す AI では 87 とか, 血管伸展性を表す CAVI は 7.5, ある程度のカットオフ値があります。これらを超えた方は無症状でも心血管病を 7~8 割が併発していますので, そこで検査, 治療介入に入ることができる。CKD の患者さんに心血管の合併症が出ないようにするのが一番なので, イベントを起こす前に何とか治療に入れないかという努力をしています。

低たんぱく質食

脇野 岡田先生は, 食事療法で低たんぱく質食を非常に厳格にやっていて, かなり詳しいと思うのですが, やはり低たんぱく質食を継続していくのがよいのですか。透析に入っても, 緩めないで低たんぱく質食にしていると, 透析の回数がかなり少なくなるという研究結果があるようですが, いかがでしょうか。

岡田 低たんぱく質食の効果に議論があるのはご存知のとおりです。末期腎不全に近い状態の患者さんでは, 尿毒症症状の軽減, 二次性副甲状腺機能亢進症の抑制, アシドーシスの軽減などのためにとても重要です。問題はステージ 3, 4 程度の段階で腎機能低下抑制効果があるのかどうかです。蛋白尿のある患者さんでは, 低たんぱく質食によって尿蛋白量が減少する場合, 腎機能低下抑制効果があると考えています。しかし, 低たんぱく質食を遵守しても効果が発揮されない病態もあ

ります。患者さんの遵守の問題が大きく、簡単にできる治療ではないと思います。透析期になると話は変わりますが、われわれの施設では、透析導入後も低たんぱく質食を続けることによって、低頻度の血液透析、腹膜透析を行っている患者さんがいます。そのような治療を求めている患者さんがいますので、透析期においても行う意義のある治療法の一つだと思います。

柴垣 私は常々思っているのですが、末期腎不全には保存期、透析期とあって、透析期に入るとたんぱく制限を緩めてよいとなってしまっていますね。しかし、疾患はやはり連続性があるはずなので、残腎機能の維持という点で、もしたんぱく制限が有効であれば、透析期に入っても、低栄養がなければ、逆にたんぱく制限を続けたほうがよいのかとも思っているのですが。

岡田 透析導入期以降のたんぱく質制限による残腎機能低下抑制効果に関しては、腹膜透析患者さんを対象にした報告があります(Jiang N et al: Nephrol Dial Transplant 24: 2251, 2009) また、たんぱく質摂取量が少ないほど残腎機能低下速度が小さいという観察研究もあります(Hidaka H et al: Nephrology 8: 184, 2003)。日本人の食事摂取基準によるたんぱく質の推奨量は、一般成人男性 60 g、女性 50 g(約 0.9 g/kg/day)です。それを参考にしても、透析期になって必ずしもガイドラインにある指示量(血液透析週 3 回の場合 1.0~1.2 g/kg/day)に増やさなくてもよいのではないかと思います。リン管理上も問題になると思います。

竹中 私も一つ質問してよいですか。カロリーはどうですか。トータルカロリーは糖尿病があっても CKD としての病期が進めば、ある程度カロリーを増やしたほうがよいのではないかという印象です。高スターチ食といいますか、高炭水化物のほうが予後がよいと思うのですが、それはいかがでしょうか。

岡田 エネルギー摂取量の評価がなかなかでき

ません。栄養士による聞き取り調査や食事記録で評価するしかありません。低たんぱく質食を行うためにはエネルギー摂取不足がないことが必要ですが、実際はエネルギー指示量を必ずしも摂取できないことがしばしばあります。末期腎不全では一般人よりもエネルギー摂取量を増やす必要があるのかについてはわかりません。日本人の食事摂取基準に従えば十分だと思います。必要量については年齢や身体活動レベルの因子のほうが大きいと思います。およそ 30~35 kcal/kg/day でしょうか。

竹中 35 kcal/kg/day どまりですか。

岡田 それだけ摂ることも必ずしもできない患者さんもいます。

竹中 なかなか摂れないですよ。本当は 30 kcal/kg/day を摂ってほしいと思っている人も、なかなか摂れないのが現実ですね。

脇野 食事療法はなかなか客観的に、うまく評価できないところがあるのではないかと思います。

CKD と腎臓の老化

脇野 次に老化についてお話をうかがいます。先ほど CKD でも、高齢者になってくるとどんどん eGFR が落ちてくるのは、正常の老化ではないかという竹中先生のお話がありました。

たとえば、年齢別の腎機能の分布(Fig. 2)をみると一目瞭然で、男性であれば 80 歳を超えると半分以上は CKD になってしまう。女性になると、80 歳を超えると 70% は CKD。これを本当に CKD といってよいかは、先ほど議論したとおり、もう一つのファクターがあるのではないかということです。このグラフの年齢分布から、正常に老化している腎臓はどうイメージすればよいのでしょうか。

私どもはセネッセンス(senescence)、老化ということを考えているのですが、やはり老化は合目的なものであると思うのです。細胞が老化してく

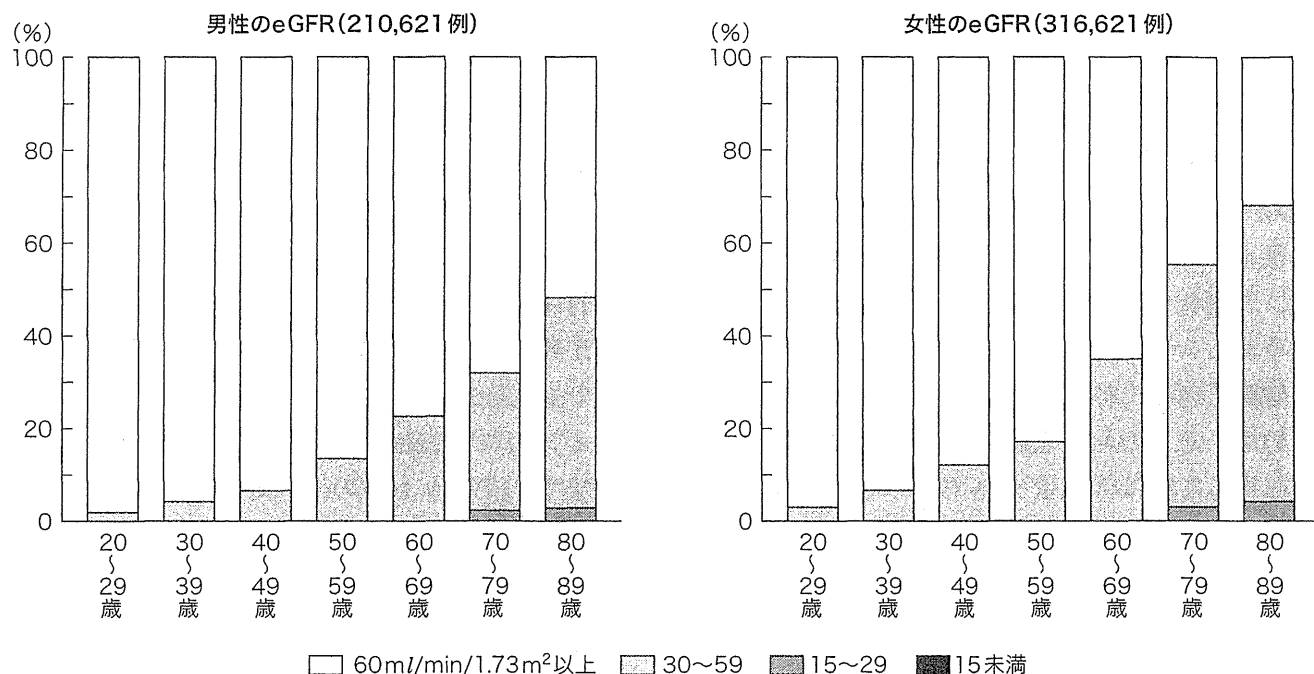


Fig. 2. 年齢別の腎機能の分布(日本人の eGFR の分布)

れるというのは、異常に増殖しない、がん化をさせないための防御の仕組みであるといわれています。腎臓が正常に老化していく現象も、非常に合目的である。そう考えると、骨粗鬆症ではないですが、eGFR も、年齢とマッチさせて、「あなたは同年齢の何% ぐらいの eGFR ですよ」ということもやったらよいのかなと考えたりすることがあります。

竹中先生は、腎臓の老化に関して研究をされていますね。

竹中 eGFR に限らず、確かにいろいろな正常値が年齢別で設定されていますが、ただ、CKD の場合はスクリーニングですね。スクリーニングに関しては、先ほどあったようにシンプルのほうがよいし、eGFR と尿蛋白のパターンで分けておいたほうがよいのではないかと個人的には考えます。

老化については、先ほどもありましたが、精査して「蛋白も出ていないし、血圧も正常だし、年をとっているだけで、ただ eGFR が見かけ上、低い

だけだから、これは老化ですよ」といってお返しすることもある。そういった例は本当の老化でよいと私は思っているのですが、もう一つ、いわゆる本当の CKD, 蛋白尿もあって、血圧も高い方は、正直いって老化速度が速いのだと思います。

老化を何でみるか。それはむずかしいのですが、それこそ研究室レベルでは、テロメアが短くなるとか、セネッセンスのいろんな蛋白が出てくるとかいうことがあると思います。私がみているのは Klotho です。腎臓にある Klotho という蛋白はいろいろな作用をしますが、ノックアウトすると骨粗鬆症や動脈硬化など老化兆候を示します。Klotho はリンの再吸収を抑制して、リン利尿を起こします。Klotho は CKD の病期とともにどんどん減り、高リン血症の原因かもしれません。動物実験ですが、尿中リン濃度が高い動物ほど寿命が短いことがわかっています。

それから、Klotho は血液中に分泌されるので、昔はホルモンだといわれていたのですが、どうもそうではないらしくて、いろいろなレセプターが

くつつく。そこで受容体に本当のホルモンが作用するのをブロックする働きがあるようなのです。その一つが TGFβ だったり、Wnt だったりするので、Klotho が減ると Wnt が働いて stem cell (幹細胞) が減少したり、TGFβ だったら線維化をどんどん促進させたりします。そういった意味では、老化、腎硬化が進みやすくなるのではないかと思いますね。

脇野 老化に伴う蛋白が出てくるのですね。

竹中 そういった意味で、CKD で Klotho が下がってくる方は、GFR が落ちるのも早くなる。

先ほども出しましたが、MBD の治療をすると CKD の進行が遅くなる。不思議なことに Klotho をビタミン D が誘導します。Klotho への作用がビタミン D で予後がよくなることに関与しているのかなと考えていました。最近ではエリスロポエチンで Klotho が upregulate されるなど、いろいろなことがいわれていて、おもしろいと思っています。

脇野 最先端のお話をありがとうございます。確かにおっしゃるとおり、普通の人に老化反応が加速して起こるとよくない、そういうイメージです。

竹中 そうですね。普通の老化はよいけれども、CKD があって、もっと老化を促進するようなことがあるのはよくない。

脇野 老化している細胞が出していくサイトカインの中には、TGFβ もあって、それが線維化の促進に関与する。要するに、普通の老化は静かに TGFβ を出して、ゆっくりその組織を線維化して穴を埋める。ところが、それが若い人にどんどん出てくると結局よくない。後でいろいろなサイトカインが悪さをするということです。

CKD の治療の仕方

脇野 研究の最先端を教えていただいたところで、最後に、治療の仕方についてお聞きします。

現在の治療薬で腎疾患の進行をとめるのは ACEI, ARB が筆頭で出ていますね。ほかにはエリスロポエチンとか吸着薬のクレメジンなどが証明されていますが、実地臨床で適用外の薬でも、よいものはありますか。竹中先生、抗老化ビタミン D については、いかがでしょう。

竹中 リウマチの抗体医療のような画期的な治療が残念ですが腎臓には今までありません。あくまでも Klotho を中心に、リサーチで考えれば、ビタミン D です。Klotho はいろいろな物質で誘導されます。PPARγ もその一つだし、スタチン、ビタミン D も、最近では EPO も、どうもそういった作用があるというデータが出ています。同時に、アンジオテンシン II は Klotho を抑えるほうですので、ACEI, ARB も Klotho を温存することになります。全部になってしまいますね(笑)。Klotho 蛋白は合成できるので、それを打ってあげるのもよいかもしれませんが、倫理がなかなか許さないというところですね。

脇野 柴垣先生はいかがですか。

柴垣 私は実地臨床家にすぎないので、研究段階の治療に関しては、正直、知識がなくてよくわからないのですが、先ほどいいましたように集学的治療が一番重要だし、もう少ししたほうがよいのではないかと。ACEI, ARB だけで終わってしまっていないか、あるいは貧血に興味があったときに貧血だけ治して満足していないか。もっと同時進行的にやらなければいけない。

その一方で、高齢者にそういう集学的な治療を行っていくと、いわゆるポリファーマシーという問題が出てきて、そことの兼ね合いにいつも悩みます。こんなに食べるように投薬してよいのだろうかという反省もあるので、個々にバランスをとりながら、その患者さんに合った治療を考えていかなければいけないと思います。

脇野 ベーシックは大事だけれども、その辺のジレンマがあるのです。

柴垣 もう1点は、どこまで治療するべきなのかということ。とくに高齢者において、正常な老化と病的なものの区別が重要で、つまり、代謝がそこまで高くなくて、高いGFRが必要ないから低下しているのか、実際にGFRが低下して病的なことが起こっているのかという区別が必要です。そこに、先ほど話題となっていたKlothoなどが一つのヒントになったりするのかもしれない。病的なものとの違いをもう少しわかりやすいマーカーでみて、それによって、この人は本当に治療が必要なのか、そのレベルからはじめることも、すごく重要ではないでしょうか。

先ほどいいましたように、高齢者の正常の老化でGFRが下がっている方に、ACEI, ARBを使って高カリウム血症になってしまうとか、治療することで患者さんのQOLを下げたり、状態をわるくすることは絶対避けなければいけないので、そのような臨床に即した研究をしていかなければと思います。

岡田 一つ一つの進行因子に注目していくと、限りなく薬剤が増えてしまうので、重要性を考えて薬物の選択を行う必要があると思います。実際の診療ではガイドラインにすべて従うことはできず、血压管理一つ取り上げても、降圧目標、薬剤の選択には患者さんそれぞれの病態をみながら考える必要があると思います。とくに高齢者です。心血管合併症があるような場合には、腎機能低下抑制だけでなく、さらに合併症を起こさないような全身管理という観点で診療を行う必要があると思います。最近の薬物治療で私が感銘を受けたのは、古典的ではありますが、代謝性アシドーシスの是正による腎機能低下抑制効果に関する報告です(de Brito-Ashurst I et al: J Am Soc Nephrol 20:2075, 2009)。これについては検証する必要があると思います。

脇野 私は基礎研究的なところに話を戻させて

いただくのですが、最近では腎不全の患者さんのインスリン抵抗性に興味をもっていまして、集中的にやっています。これは、数年前、ドイツのグループがステージ1, ステージ2の患者さんでもHOMA-IRが上がっているというデータを出していますし、eGFRが50を切ると、グルコースクランプをして、腎不全だけでインスリン抵抗性が認められることが示されています。機序としてはビタミンDとか尿毒症とかいわれていますが、私もそれをいくつか研究しています。心血管イベントの原因としてのインスリン抵抗性と、腎症進行のファクターとしてのインスリン抵抗性を少し見直したほうがよいのではないかと思います。

そういった意味で、今後期待しているのが、インスリン抵抗性改善薬なのです。最近、アディポネクチンレセプターのノックアウトマウスの腎症のデータが出ていますし、いずれにせよインスリン抵抗性が腎機能をわるくするというデータが出ている。今までRASを中心に話が出ていましたが、肥満などの観点から、インスリンシグナルの管理も今後、腎臓の分野でも、あるいはその腎臓から出てくる心血管イベントの分野でも、重要になってくるのではないかと感じて、そういう薬剤の腎症に対する効果がおもしろいのではないかと考えています。

本日は、基礎から臨床を中心に精力的にされている先生方から広範なご意見をお聞きして、CKDの管理、その問題点、管理の仕方、そしてかなり広まっている方法に対するコントロールシーや限界、治療に関してお話ししました。血压、貧血など基本的なリスクファクターの管理は非常に重要だという合意もできて勉強になりました。実地臨床の先生も、専門の先生も非常に啓発されるような内容をいろいろ聞くことができたと思います。どうもありがとうございました。

Science Signaling

Report

Rho and Rho-Kinase Activity in Adipocytes Contributes to a Vicious Cycle in Obesity That May Involve Mechanical Stretch

Yoshikazu Hara, Shu Wakino, Yoshiyuki Tanabe, Maki Saito, Hirobumi Tokuyama, Naoki Washida, Satoru Tatematsu, Kyoko Yoshioka, Koichiro Homma, Kazuhiro Hasegawa, Hitoshi Minakuchi, Keiko Fujimura, Koji Hosoya, Koichi Hayashi, Koichi Nakayama, Hiroshi Itoh

25 January 2011

Volume 4, pp.1-11



ADVANCING SCIENCE. SERVING SOCIETY.

METABOLISM

Rho and Rho-Kinase Activity in Adipocytes Contributes to a Vicious Cycle in Obesity That May Involve Mechanical Stretch

Yoshikazu Hara,¹ Shu Wakino,^{1*} Yoshiyuki Tanabe,² Maki Saito,² Hirobumi Tokuyama,¹ Naoki Washida,¹ Satoru Tatematsu,¹ Kyoko Yoshioka,¹ Koichiro Homma,¹ Kazuhiro Hasegawa,¹ Hitoshi Minakuchi,¹ Keiko Fujimura,¹ Koji Hosoya,¹ Koichi Hayashi,¹ Koichi Nakayama,² Hiroshi Itoh¹

The development of obesity involves multiple mechanisms. Here, we identify adipocyte signaling through the guanosine triphosphatase Rho and its effector Rho-kinase as one such mechanism. Mice fed a high-fat diet (HFD) showed increased Rho-kinase activity in adipose tissue compared to mice fed a low-fat diet. Treatment with the Rho-kinase inhibitor fasudil attenuated weight gain and insulin resistance in mice on a HFD. Transgenic mice overexpressing an adipocyte-specific, dominant-negative form of RhoA (DN-RhoA TG mice) showed decreased Rho-kinase activity in adipocytes, decreased HFD-induced weight gain, and improved glucose metabolism compared to wild-type littermates. Furthermore, compared to HFD-fed wild-type littermates, DN-RhoA TG mice on a HFD showed decreased adipocyte hypertrophy, reduced macrophage recruitment to adipose tissue, and lower expression of mRNAs encoding various adipocytokines. Lipid accumulation in cultured adipocytes was associated with increased Rho-kinase activity and increased abundance of adipocytokine transcripts, which was reversed by a Rho-kinase inhibitor. Direct application of mechanical stretch to mature adipocytes increased Rho-kinase activity and stress fiber formation. Stress fiber formation, which was also observed in adipocytes from HFD-fed mice, was prevented by Rho-kinase inhibition and in DN-RhoA TG mice. Our findings indicate that lipid accumulation in adipocytes activates Rho to Rho-kinase (Rho–Rho-kinase) signaling at least in part through mechanical stretch and implicate Rho–Rho-kinase signaling in inflammatory changes in adipose tissue in obesity. Thus, inhibition of Rho–Rho-kinase signaling may provide a therapeutic strategy for disrupting a vicious cycle of adipocyte stretch, Rho–Rho-kinase signaling, and inflammation of adipose tissue that contributes to and aggravates obesity.

INTRODUCTION

A growing body of evidence has implicated obesity as a major risk factor for cardiovascular disease. Many factors, including chronic inflammation, contribute to metabolic syndrome (1), a condition characterized by metabolic and circulatory complications of obesity that predispose to the development of type 2 diabetes and cardiovascular disease. Obesity is associated with increased lipid accumulation in adipocytes; adipocytes store this increased lipid as fat deposits, leading to adipocyte hypertrophy. These hypertrophic adipocytes secrete cytokines that have been implicated in various obesity-related disorders, including cardiovascular disease (2). These cytokines, called adipocytokines, include bioactive molecules specific to adipocytes, such as adiponectin, as well as proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF α) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (3). In obesity, adipose tissue is also infiltrated by inflammatory cells, especially monocytes and macrophages (4), which may be recruited by chemotactic signals produced by expanding adipocytes or their neighboring preadipocytes (5). These infiltrating inflammatory cells secrete cytokines, which in turn affect adipocyte phenotype and accelerate adipocytokine production (4). However, the molecular mechanisms that link all of these obesity-related changes—that is to say, adipocyte hy-

pertrophy, abnormal adipocytokine secretion, and the associated inflammatory changes in adipose tissue—remain to be fully elucidated.

The small monomeric guanosine triphosphatase (GTPase) Rho is a critical modulator of vascular smooth muscle cell (VSMC) contraction. Signaling through Rho and its downstream effector Rho-associated kinase (Rho-kinase, also known as ROCK, and consisting of two functionally distinct isoforms) increases myosin light-chain phosphorylation and thereby contributes to agonist-induced Ca²⁺ sensitization in VSMC contraction (6) and, consequently, to the pathogenesis of hypertension (7). Mechanical stress, including cyclic stretch (8) and shear stress (9), activates the Rho to Rho-kinase (Rho–Rho-kinase) pathway in the cardiovascular system, as do various vasoactive substances. In cardiomyocytes, RhoA, a member of the Rho family, is pivotal to the progression of stretch-induced cellular hypertrophy (10). The Rho–Rho-kinase pathway, which promotes insulin resistance and thus decreases glucose tolerance (11), is activated in muscle tissue in obese Zucker rats (11). Rho–Rho-kinase signaling leads to serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and, consequently, to reduced insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation and protein kinase B (Akt) activation and thereby to muscle insulin resistance. The Rho-kinase inhibitor fasudil attenuates serine phosphorylation of IRS-1 in obese Zucker rats, with a concomitant improvement in glucose metabolism (11). Fasudil also attenuates adipocyte hypertrophy and decreases TNF α and MCP-1 abundance and macrophage infiltration in white adipose tissue (WAT) (11). However, whether these represent direct effects of fasudil in adipose tissue or are secondary to increased systemic insulin sensitivity remains unclear.

¹Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan. ²Department of Molecular and Cellular Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Iwate Medical University, Iwate 028-3694, Japan. *To whom correspondence should be addressed. E-mail: swakino@sc.itc.keio.ac.jp

Here, we investigated whether activation of Rho-kinase in adipose tissue participates in the development of obesity. Because Rho can be activated by mechanical stress, we hypothesized that the Rho–Rho-kinase pathway might be activated as mature adipocytes become hypertrophic in obesity. We showed that mechanical stretch to adipocytes was, indeed, a trigger for activation of the Rho–Rho-kinase pathway in adipose tissue, and identified this pathway as a culprit in the initiation and progression of obesity and its pathological complications.

RESULTS

Effects of the Rho-kinase inhibitor fasudil on the phenotype of diet-induced obesity

We first examined the effects of the Rho-kinase inhibitor fasudil in mouse models of diet-induced obesity. C57BL/6J mice maintained on a high-fat diet (HFD) for 12 weeks weighed more than mice fed a low-fat diet (LFD). Although fasudil at 3 mg per kilogram of body weight per day had no effect on body weight, 30 mg/kg per day attenuated the increase in body weight of C57BL/6J mice fed a HFD (Table 1). There was no difference in food intake among these four groups (mice fed a LFD and mice fed a HFD with or without fasudil, 3 or 30 mg/kg per day). Epididymal WAT weighed less in mice fed a HFD treated with fasudil (30 mg/kg per day) than in mice fed a HFD without fasudil, whereas a dosage of 3 mg/kg per day had no effect on epididymal WAT weight (Table 1). Although serum concentrations of triglyceride were not altered among the three groups fed a HFD, increases in total serum cholesterol concentration and serum free fatty acid concentration in response to a HFD were attenuated by fasudil at a dosage of 30 mg/kg per day. These data indicate that 30 mg/kg per day attenuated the initiation or progression (or both) of HFD-induced obesity.

Mice fed a HFD showed glucose intolerance, as evaluated by intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT); glucose tolerance was improved by both fasudil dosages of 3 and 30 mg/kg per day (Fig. 1A). Intraperitoneal insulin injection lowered serum glucose concentration in mice fed a LFD, an effect that was blunted in mice on a HFD (Fig. 1B). Both dosages of 3 and 30 mg/kg per day restored the response to insulin challenge to a degree comparable to that of mice on a LFD (Fig. 1B). These results demonstrated favorable effects by fasudil on systemic glucose metabolism, which could not be ascribed simply to secondary effects of reduced fat mass or body weight.

Effects of the Rho-kinase inhibitor fasudil on adipose tissue in diet-induced obesity

Adipocyte size was increased in mice fed a HFD compared with that in mice fed a LFD. This change was attenuated by a fasudil dosage of 30 mg/kg per day (Fig. 1C). Macrophage infiltration of adipose tissue was also

increased in mice fed a HFD, and this was reduced by both dosages of fasudil (Fig. 1D). Abundance of the mRNA transcripts encoding the adipocytokines MCP-1 and TNF α was increased in adipose tissue of mice fed a HFD compared to mice fed a LFD, increases that were attenuated at both concentrations of fasudil. Conversely, abundance of the mRNA encoding adiponectin was decreased in mice on a HFD, a change that was partially reversed at both concentrations of fasudil (Fig. 1E). These data indicate that hypertrophic changes of adipocytes, macrophage migration into adipose tissue, and dysregulation of adipocytokine expression that occur in HFD-induced obesity depend on signaling through the Rho–Rho-kinase pathway.

Attenuation of the aberrant adipocyte phenotype in diet-induced obesity by adipocyte-specific inhibition of Rho–Rho-kinase signaling

The inhibitory effects of fasudil on several aspects of the aberrant phenotype associated with diet-induced obesity suggested that the Rho–Rho-kinase pathway was activated in adipose tissues of obese mice. Immunoblot analysis with an antibody directed against the phosphorylated form of myosin phosphatase target subunit (MYPT), a substrate of Rho-kinase, indicated that Rho-kinase was active in adipose tissue of mice fed a HFD, and that this was inhibited by systemic fasudil (Fig. 1F). Subfractionation of adipose tissues into a stromal vascular fraction (SVF) and a mature adipocyte fraction revealed that activation of Rho-kinase in the adipose tissue of HFD-fed mice occurred mostly in mature adipocytes rather than in macrophages or vascular cells (Fig. 1G).

To delineate the pathological relevance of the activation of Rho–Rho-kinase pathway in adipocytes, we explored the effects of a HFD in transgenic mice in which Rho activation was specifically blocked in adipose tissue. We generated transgenic mice that expressed a dominant-negative human RhoA (DN-RhoA) mutant driven by the promoter of the adipose tissue-specific protein, adipocyte fatty acid binding protein (aP2) (DN-RhoA TG mice) (Fig. 2, A and B). DN-RhoA TG mice were of normal birth weight and were fertile, and the mutant gene was specifically expressed in adipose tissue (Fig. 2C). The following analyses were performed on DN-RhoA TG mice and wild-type littermates fed a HFD. At 18 weeks of age, Rho-kinase activity was specifically decreased in the adipose tissue of DN-RhoA TG mice compared with that of wild-type littermates, as assessed by phosphorylation of the Rho-kinase substrates MYPT and ERM (ezrin, radixin, and moesin) (Fig. 2, D and E, respectively), but was not altered in other tissues. The increase in body weight of DN-RhoA TG mice was significantly attenuated compared with that of wild-type littermates (Fig. 3A). In ipGTT, glucose tolerance was enhanced in DN-RhoA TG mice compared to wild-type mice (Fig. 3B), and serum concentrations of free fatty acid were lower (Fig. 3C). In addition, increases in adipocyte size (Fig. 3D) and infiltration of macrophages in adipose tissue (Fig. 3E) observed in HFD-fed wild-type mice, as well as the

Table 1. Basal characteristics of mice fed a low-fat diet (LFD), high-fat diet (HFD), or HFD plus fasudil (HFD + F3, HFD + F30). F3, 3 mg of fasudil per kilogram of body weight per day; F30, 30 mg of fasudil

per kilogram of body weight per day; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; FFA, free fatty acid. ** $P < 0.01$ versus LFD; ### $P < 0.01$ versus HFD; $n = 6$.

	LFD	HFD	HFD + F3	HFD + F30
Body weight (g)	28.7 \pm 0.75	43.95 \pm 2.55**	42.88 \pm 2.93	38.15 \pm 1.95##
WAT weight (g)	0.67 \pm 0.13	2.24 \pm 0.17**	2.18 \pm 0.19	1.52 \pm 0.12##
TC (mg/dl)	72 \pm 12	147 \pm 22**	147 \pm 18.5	95 \pm 15##
TG (mg/dl)	35.6 \pm 6.9	48.0 \pm 12.0	50.5 \pm 8.3	49.0 \pm 2.1
FFA (meq/liter)	0.51 \pm 0.12	1.02 \pm 0.15**	0.712 \pm 0.17##	0.66 \pm 0.11##

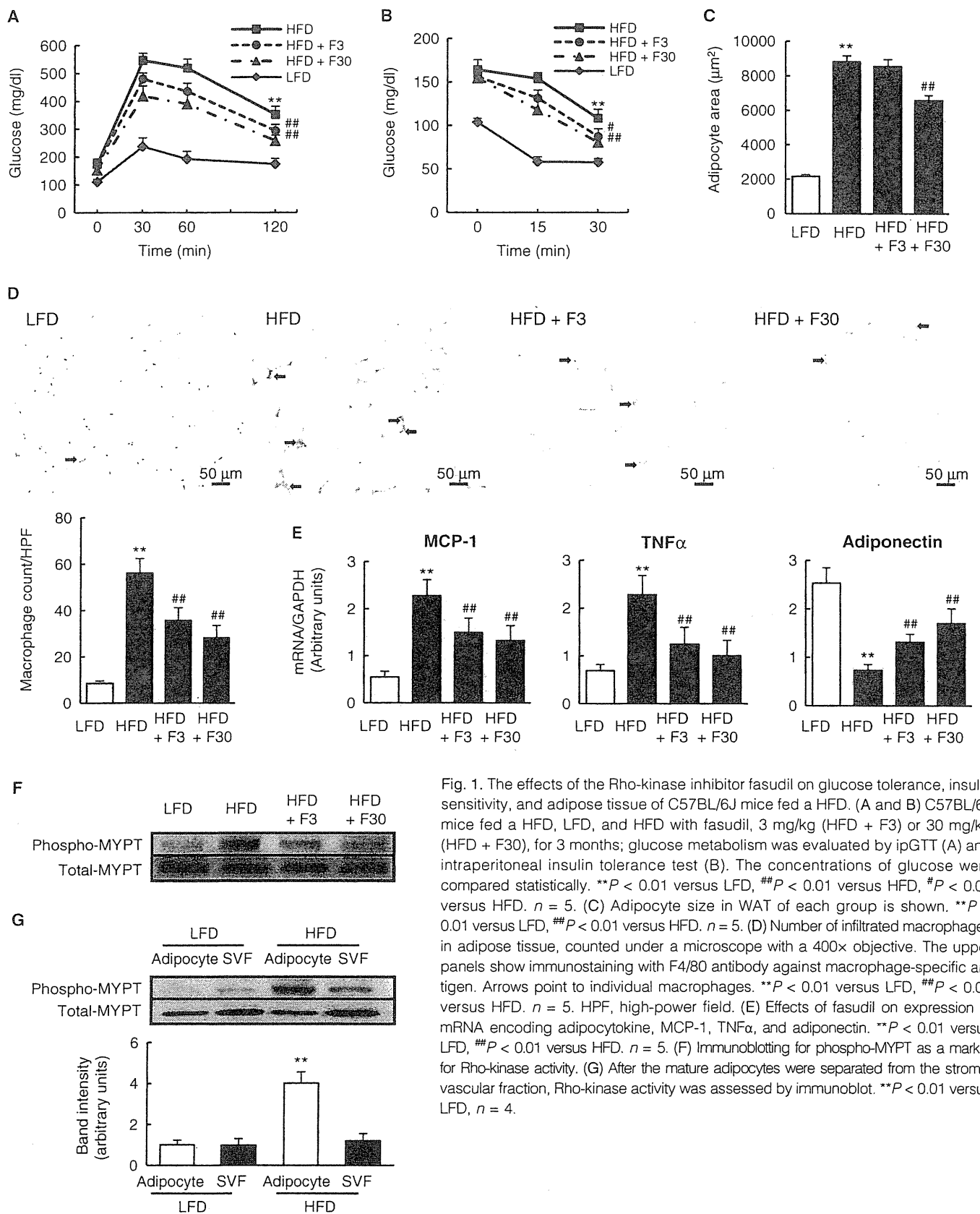


Fig. 1. The effects of the Rho-kinase inhibitor fasudil on glucose tolerance, insulin sensitivity, and adipose tissue of C57BL/6J mice fed a HFD. (A and B) C57BL/6J mice fed a HFD, LFD, and HFD with fasudil, 3 mg/kg (HFD + F3) or 30 mg/kg (HFD + F30), for 3 months; glucose metabolism was evaluated by ipGTT (A) and intraperitoneal insulin tolerance test (B). The concentrations of glucose were compared statistically. $**P < 0.01$ versus LFD, $##P < 0.01$ versus HFD, $#P < 0.05$ versus HFD. $n = 5$. (C) Adipocyte size in WAT of each group is shown. $**P < 0.01$ versus LFD, $##P < 0.01$ versus HFD. $n = 5$. (D) Number of infiltrated macrophages in adipose tissue, counted under a microscope with a 400x objective. The upper panels show immunostaining with F4/80 antibody against macrophage-specific antigen. Arrows point to individual macrophages. $**P < 0.01$ versus LFD, $##P < 0.01$ versus HFD. $n = 5$. (E) Effects of fasudil on expression of mRNA encoding adipocytokine, MCP-1, TNF α , and adiponectin. $**P < 0.01$ versus LFD, $##P < 0.01$ versus HFD. $n = 5$. (F) Immunoblotting for phospho-MYPT as a marker for Rho-kinase activity. (G) After the mature adipocytes were separated from the stromal vascular fraction, Rho-kinase activity was assessed by immunoblot. $**P < 0.01$ versus LFD, $n = 4$.

abnormal pattern of adipocytokine mRNA abundance (Fig. 3F), were significantly attenuated in DN-RhoA TG mice. To control for effects of body weight on glucose tolerance and insulin sensitivity, we performed ipGTT on 11-week-old mice, a time point when body weight did not differ between the two groups (wild type, 29.4 ± 3.1 g; DN-RhoA TG, 27.2 ± 2.3 g; *n* = 5). As shown in Fig. 3, G and H, fasting glucose concentrations were higher in wild-type mice (wild type versus DN-RhoA TG: 154 ± 18 mg/dl versus 131 ± 14 mg/dl, *P* < 0.05, *n* = 5), as were fasting insulin concentrations (wild type versus DN-RhoA TG: 424 ± 36 pg/ml versus 308 ± 24 pg/ml, *P* < 0.01, *n* = 5). In addition, glucose tolerance was improved in 11-week-old DN-RhoA TG mice compared with that of wild-type mice (Fig. 3G), and DN-RhoA TG mice were also more insulin-sensitive (Fig. 3H). Thus, DN-RhoA TG mice were more insulin-sensitive and had improved glucose tolerance independent of body weight.

Treatment with fasudil at 30 mg/kg per day did not further improve glucose tolerance or insulin sensitivity in 11-week-old DN-RhoA TG mice (Fig. 3, G and H). Thus, RhoA activation in adipocytes appears to be crit-

ical for Rho-kinase activation–induced systemic insulin resistance in obesity. Together, these data indicate that the activation of Rho–Rho-kinase pathway in the adipose tissue directly promotes the hypertrophic adipocyte phenotype in HFD-induced obesity.

Rho-kinase activation in hypertrophic adipocytes

We investigated the mechanism for the activation of Rho–Rho-kinase signaling in an in vitro model in which 3T3-L1 fibroblasts were exposed to factors that promoted their differentiation into adipocytes (see Materials and Methods). Before adipocytic differentiation (day 8 of exposure to differentiating agents), Rho-kinase activity was low. Rho-kinase activity increased after differentiation and as lipid accumulated and cells increased in size (Fig. 4, A and B). Rho-kinase activation induces the expression of cytokines and chemokines including MCP-1 (12) and TNF α (13). Consistent with this, the abundance of the mRNAs encoding MCP-1 and TNF α was increased in adipocytes at days 12 and 16. These increases in mRNA abundance were inhibited by the Rho-kinase inhibitor Y-

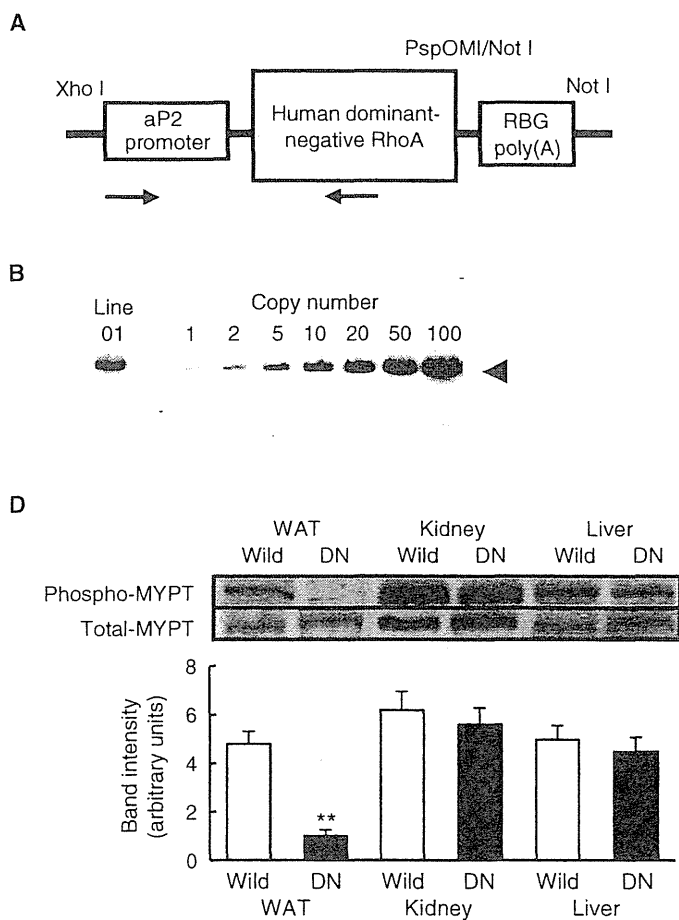
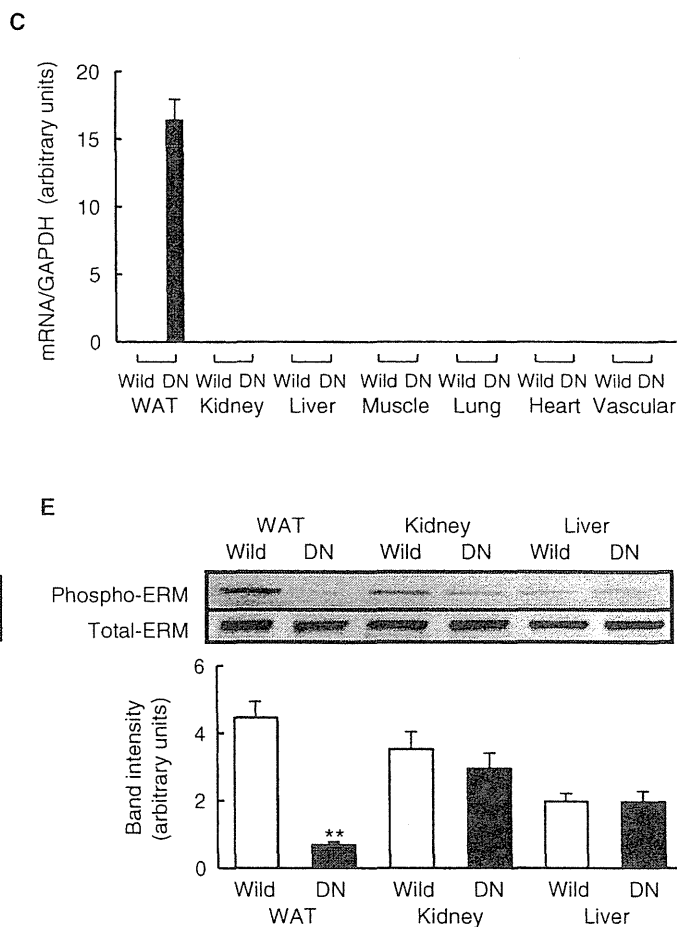


Fig. 2. Generation of transgenic mice with adipose tissue–specific dominant-negative human RhoA. (A) The construct used for the generation of adipose tissue–specific dominant-negative human RhoA transgenic (DN-RhoA TG) mice. A fragment composed of the aP2 promoter, human DN-RhoA cDNA, and RBG poly(A) sequences was excised from aP2 promoter vector by Xho I and Not I and injected into one-cell fertilized mouse embryos obtained from superovulated C57BL/6 × C3H mice for the production of TG mice. The primers used for genotyping in PCR are indicated as arrows. (B) Southern blot



analysis shows 13 copies of the RhoA transgene in mice of line 01. An arrow indicates bands corresponding to transgene-derived RhoA. Transgenic vector including human DN-RhoA genes used as a positive control. (C) Real-time PCR analysis with specific primers shows the presence or absence of mRNA for DN-RhoA in various tissues. DN, DN-RhoA TG mice; Wild, wild-type mice. *n* = 4. (D and E) Immunoblot analysis of phospho-MYPT (D) and phospho-ERM (E). ***P* < 0.01 versus wild type, *n* = 4. (D) and (E) indicate that the Rho-kinase activity is specifically inhibited in WAT in DN-RhoA TG mice.

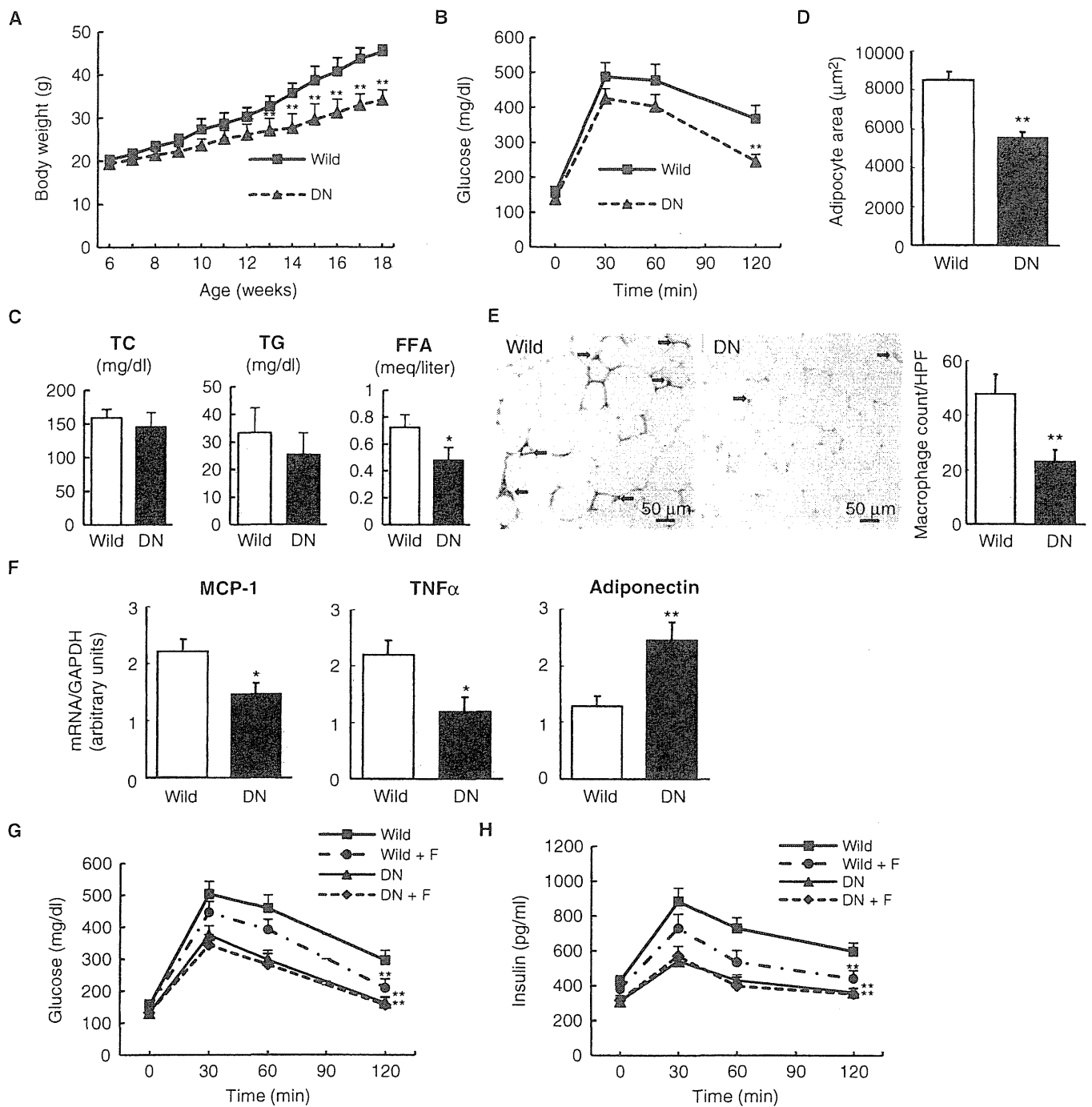


Fig. 3. Phenotype of DN-RhoA TG mice and wild-type littermates. (A) Weight gain of DN-RhoA TG mice (DN) and wild-type littermates (Wild) fed a HFD for 12 weeks, from 6 to 18 weeks of age. $**P < 0.01$ versus wild type, $n = 5$. (B) ipGTT of DN and wild type at 18 weeks of age. $**P < 0.01$ versus wild type, $n = 5$. (C) Serum concentrations of lipid of DN and wild type at 18 weeks of age. $*P < 0.05$ versus wild type, $n = 8$. (D) Adipocyte size in WATs of DN and wild type at 18 weeks of age. $**P < 0.01$ versus wild type, $n = 5$. (E) Number of infiltrating macrophages (arrows) in adipose tissue of DN and wild type at 18 weeks of age, counted under a microscope with a 400 \times objective. The left panels show immunostaining of F4/80 anti-

body against macrophage-specific antigen. $**P < 0.01$ versus wild type. HPF, high-power field. (F) mRNA encoding MCP-1, TNF α , and adiponectin in adipose tissues of DN and wild type at 18 weeks of age. $*P < 0.05$ versus wild type, $**P < 0.01$ versus wild type. $n = 5$. (G and H) ipGTT with HFD-fed DN and wild type at 11 weeks of age, a point when the body weight did not differ significantly between the two groups. ipGTT was also performed on mice treated with fasudil (30 mg/kg per day). Glucose concentrations (G) and insulin concentrations (H) were measured during ipGTT. $**P < 0.01$ versus wild, $n = 5$. "F" represents 30 mg of fasudil per kilogram of body weight per day treatment.

27632 (Fig. 4C). The expression of adiponectin was decreased in adipocytes at day 16, a change that was also reversed by Y-27632 (Fig. 4C). Similar results were obtained in experiments with fasudil as a Rho-kinase inhibitor instead of Y-27632 (fig. S1). These data indicate that, as adipocytes increase in size, Rho-kinase activity increases, leading to altered adipocytokine expression.

Stretch-induced Rho-kinase activation and stress fiber formation in mature adipocytes

To explore the mechanisms underlying Rho-kinase activation in hypertrophic adipocytes, we examined the effects of mechanical stretch on Rho-kinase activation in mature adipocytes. Our data with the DN-RhoA TG mice indicated that an ~50% increase in adipocyte area, corresponding to an ~20% increase in diameter, provided sufficient mechanical stress to elicit adipocyte biochemical responses. Therefore, we stretched mature adipocytes grown on a silicon substratum up to 120% of initial diameter for 72 hours and investigated the effects on Rho-kinase activity. We found that Rho-kinase was activated after this constant, long-lasting stretch (Fig. 5A). Furthermore, the expression of the mRNA encoding adiponectin was decreased 43% and that of the mRNA encoding MCP-1 was increased 60% in stretched adipocytes compared with their expression in non-stretched adipocytes ($P < 0.01$, $n = 5$). These results were similar to those obtained in vivo in the diet-induced obese mice and the DN-RhoA TG mice models (Figs. 1E and 3F). Staining of the Rho-kinase effector F-actin

was increased in stress fibers by mechanical stretch (Fig. 5B), indicating that Rho-kinase was activated in stretched adipocytes and induced stress fiber reorganization. F-actin staining of adipose tissue was increased in HFD-fed mice, and this was attenuated by the Rho-kinase inhibitor fasudil (Fig. 5C). F-actin staining was also decreased in adipose tissue of DN-RhoA TG mice compared with that of wild-type mice (Fig. 5D). Measurements of cellular size indicated that F-actin-positive adipocytes were larger in size than F-actin-negative cells, providing a link between Rho-kinase activity and adipocyte size (Fig. 5, C and D, lower right panel).

DISCUSSION

The small GTPase Rho and its downstream effector Rho-kinase were initially identified as mediators of vascular contraction. Activation of Rho-kinase inhibits insulin signaling in VSMCs through formation of a complex with IRS-1 (14), suggesting that Rho might affect systemic glucose metabolism. Formation of a complex between Rho-kinase and IRS-1 increases serine phosphorylation of IRS-1 and decreases its tyrosine phosphorylation of IRS-1 (14). Similar changes in IRS-1 phosphorylation occur in muscle tissue in obese rats and are attenuated by inhibition of Rho-kinase (11). Furthermore, long-term treatment with fasudil attenuates weight gain and abdominal fat deposition in Zucker obese rats, although these effects are marginal (11) and the direct involvement of Rho-Rho-kinase pathway in adipose tissue has been unclear. Here, we used a mouse model of obesity

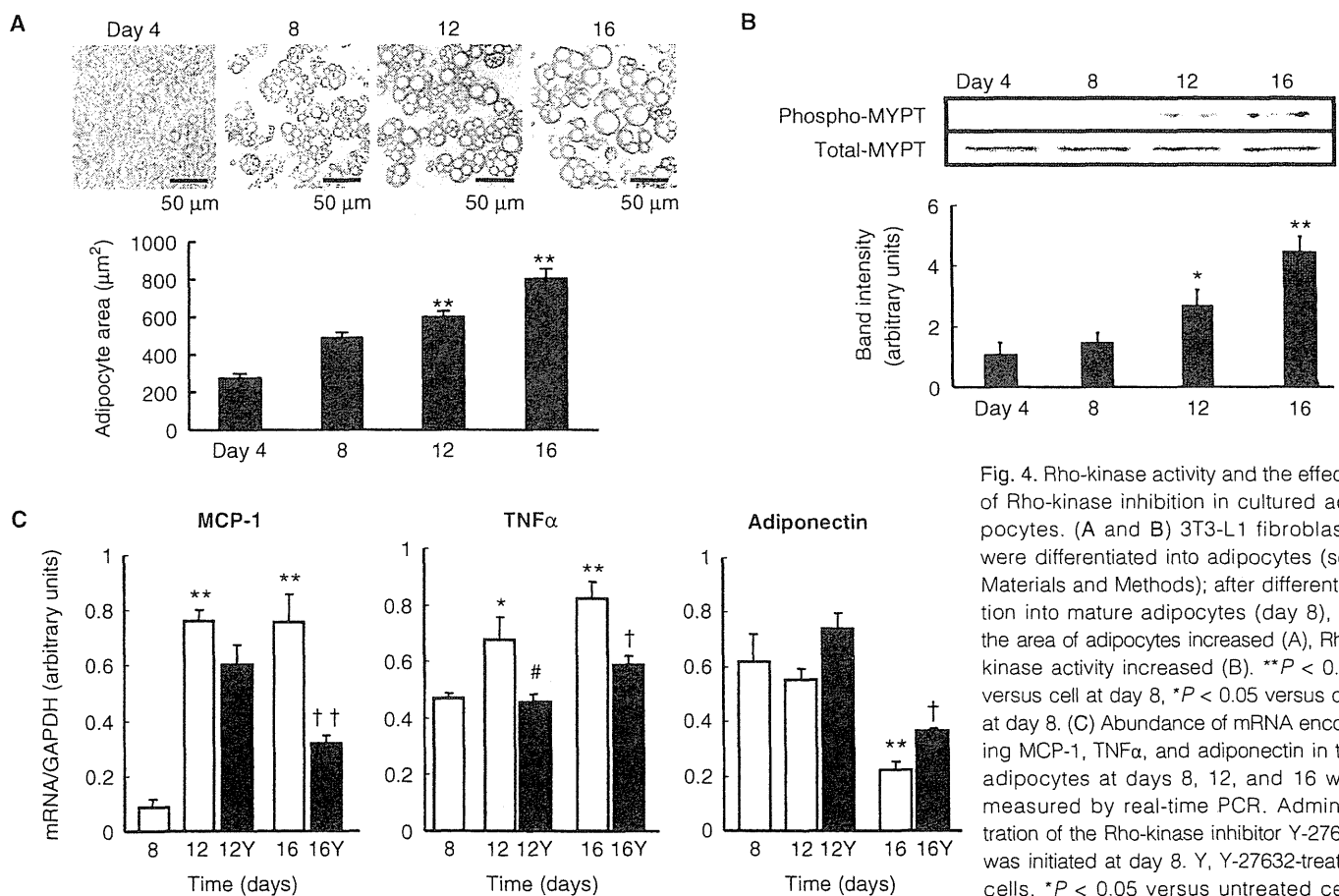


Fig. 4. Rho-kinase activity and the effects of Rho-kinase inhibition in cultured adipocytes. (A and B) 3T3-L1 fibroblasts were differentiated into adipocytes (see Materials and Methods); after differentiation into mature adipocytes (day 8), as the area of adipocytes increased (A), Rho-kinase activity increased (B). ** $P < 0.01$ versus cell at day 8, * $P < 0.05$ versus cell at day 8. (C) Abundance of mRNA encoding MCP-1, TNF α , and adiponectin in the adipocytes at days 8, 12, and 16 was measured by real-time PCR. Administration of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 was initiated at day 8. Y, Y-27632-treated cells. * $P < 0.05$ versus untreated cells at day 8, ** $P < 0.01$ versus untreated cells

at day 8, # $P < 0.05$ versus untreated cells at day 12, † $P < 0.05$ versus untreated cells at day 16, †† $P < 0.01$ versus untreated cells at day 16. $n = 5$.