

論文内容要旨

Rosiglitazone-induced bone marrow adipogenesis and Klotho β

(ロシグリタゾン依存性の骨髄脂肪化と Klotho β)

主指導教員：香西 克之 教授

(医歯薬保健学研究科 小児歯科学)

副指導教員：谷本 幸太郎 教授

(医歯薬保健学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：光畑 智恵子 准教授

(医歯薬保健学研究科 小児歯科学)

入江 泰正

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

骨髄は造血幹細胞や間質細胞等を含み、赤色骨髄で占められている。臨床的には、老化・骨粗鬆症・薬物治療等により骨量減少を伴って脂肪組織が増加し、黄色骨髄を呈する。脂肪細胞、骨芽細胞はいずれも骨髄間質細胞から分化し、それぞれマスター転写因子 PPAR γ 、RUNX2 等による分化制御を受ける。これらのマスター転写因子は他方の転写因子を負に制御する。例えば、PPAR γ ハプロ不全マウスでは骨量が増加することが知られており、ヒトでは骨粗鬆症患者において活性型の PPAR γ が有意に高い。したがって、上記の臨床所見はこれらの分化制御機構の破綻が要因とされている。2 型糖尿病を適応疾患として上市された PPAR γ のアゴニスト thiazolidinedione (TZD) は、インスリン抵抗性の改善および肝臓の糖新生を抑制し、血中グルコースを低下させる。しかし、骨髄においては脂肪細胞分化を促進し、骨芽細胞分化を抑制することが示唆されており、TZD による骨髄脂肪化が懸案となっている。TZD は白色脂肪細胞による FGF21 産生を促進することが報告されている。FGF21 はグルコースと脂質代謝の強力な調節因子であり、主に肝臓や脂肪組織などで産生される。FGF21 は FGF レセプターと膜タンパク質 Klotho β (KL β) のヘテロダイマーを特異的レセプターとし、細胞内シグナル伝達経路 ERK を活性化する。KL β は肝臓、膵臓などで発現しており、これらの組織は FGF21 の主なターゲットである。KL β 過剰発現はマウス線維芽細胞株 NIH3T3 の脂肪分化を促進すると報告されている。また、FGF21 トランスジェニックマウスの解析により、骨髄脂肪細胞での KL β の発現が確認されており、骨髄での FGF21-KL β 軸を介した作用が示唆されている。そこで、本研究では、骨髄間質細胞の脂肪細胞分化に KL β がどのように関与するか検討した。

はじめに、TZD の影響を *in vivo* で確認するため、C57BL/6J マウス (オス 4 週齢) に高脂肪食 (60 Kcal%) を負荷した。13 週齢からは TZD 誘導体 rosiglitazone (RG) を投与し、さらに 4 もしくは 12 週間飼育した。高脂肪食 (High fat diet, HFD) は体重増加を促した。25 週齢マウス大腿骨骨髄では RG、HFD 共に骨髄脂肪化を認めた。骨量は高脂肪食と RG の併用により減少した。骨髄の *Klb* mRNA レベルを比較すると、RG 負荷により普通食、HFD 共に *Klb* mRNA が検出された。一方、17 週齢マウスにおいても RG、HFD 共に骨髄脂肪化を認めたが、両者の併用が際立って顕著であった。一方、骨パラメーターにグループ間の差は認められなかった。そこで、17 週齢マウスの血中グルコースレベルを測定したところ、高脂肪食で増加傾向にあり、RG はこれを改善する傾向を示した。血中 FGF21 レベルは HFD で増加し、RG はこれを改善した。骨髄脂肪分化にともなう *Klb* の発現プロファイルを確認するため、マウス骨髄細胞に RG を加えて培養したところ、*Klb* mRNA は脂肪細胞 (*Pparg* mRNA と oil red O 陽性の脂肪滴) を認める以前に誘導され、KL β の脂肪細胞分化初期への関与が示唆された。

骨髄脂肪化における KL β の役割を詳細に検討するため、マウス骨髄間質細胞株 ST2 を RG 存在下で培養した。RG は濃度依存的、経時的に脂肪細胞を誘導し、ALP 陽性細胞 (骨芽細胞) 分化を抑制した。このことは各種分化マーカーの発現プロファイルと一致した。一方、*Klb* mRNA は、脂肪細胞分化の初期マーカー *Lpl* および *Plin1* の発現と一致して早期に上昇した。*In situ*

hybridization、免疫染色を行ったところ、*Klb*/*KLβ* は *Plin1*/*PLIN1* 陽性細胞に確認された。これら
のことより、*KLβ* は脂肪細胞分化初期に誘導されることが示唆された。早期脂肪細胞分化にお
ける *KLβ* の役割を検討するため、組換えマウス *Klb* アデノウイルス (*Adv-Klb*) を ST2 細胞に感染
し、*KLβ* を過剰発現させても RG 依存性の *PLIN1* 陽性細胞数および脂肪細胞マーカー遺伝子の
発現レベルは変動しなかった。一方、*KLβ* 過剰発現細胞に *FGF21* を添加したところ、*PLIN1*
陽性細胞数および脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現レベルはともに減少した。また、*MEK* 阻
害剤 *U0126* は、*FGF21* 依存性の脂肪細胞マーカーの減少を回復させた。上記のように、*RG* はマ
ウス骨髄細胞および ST2 細胞において *KLβ* の発現を誘導したことから、ST2 細胞の内在性 *KLβ*
を *Stealth RNAiTM siRNA* を用いてノックダウンした。*KLβ* ノックダウンは予想に反し、*PLIN1*
陽性細胞数および脂肪細胞マーカー遺伝子発現レベルをともに減少させた。*KLβ* の発現をマウ
スの骨髄で確認するため、*C57BL/6J* マウス (8 週齢オス) に高脂肪食および *RG* を 20 日間摂取
させた。脛骨脱灰凍結標本を用いて免疫染色を行ったところ、*KLβ* は *PLIN1* 強陽性の細胞で脂
肪滴を持つもののみならず、*PLIN1* 弱陽性の細胞にも確認された。

以上の結果から、*KLβ* は *TZD* 依存性の骨髄間質細胞の脂肪細胞分化に関与する一方、*FGF21* は
KLβ を介して脂肪細胞分化を早期の段階で抑制することが示唆された。*TZD* は 2 型糖尿病の治
療薬として有用であるが、*TZD* による骨髄脂肪化の初期に発現する *KLβ* は脂肪細胞分化に不可
欠であり、一方、*TZD* により *FGF21* の血中レベルが低下すると、骨髄脂肪化がさらに進行する
可能性が推察された。これらのことより、肥満患者においては、*TZD* による治療時に、血中 *FGF21*
レベルをモニターするなど、骨髄脂肪化、長期投与による骨粗鬆化に注意する必要があるもの
と思われる。