

# 論文の全文要約

## Rosiglitazone-induced bone marrow adipogenesis and Klotho $\beta$

(ロシグリタゾン依存性の骨髄脂肪化と Klotho  $\beta$ )

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、肥満・加齢・薬剤性などにより脂肪髄が増加することが報告されているが、骨髄脂肪化のメカニズムに関して不明な点が多い。脂肪分化のマスターレギュレーターPPAR $\gamma$  のアゴニストであるチアゾリジン系化合物 (TZD) のロシグリタゾン (RG) は、抗 2 型糖尿病薬として開発されたが、肥満・骨髄脂肪化を引き起こすなどの副作用が報告されている。また、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  $\beta$  (KL $\beta$ ) 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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  の発現が確認されており、骨髄での FGF21-KL $\beta$  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 $\beta$  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 RG を投与し、さらに 4 もしくは 12 週間飼育した。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、高脂肪食で増加し、RG はこれを改善する傾向を示した。一方、血中 FGF21 レベルは高脂肪食で増加し、RG はこれを減少させた。骨髄脂肪化にともなう *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 は脂肪細胞を認める以前に誘導され、KL $\beta$  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 $\beta$  の役割を詳細に検討するため、マウス骨髄間質細胞株 ST2 をアスコルビン酸・RG 存在下で培養した。濃度依存的、経時的に RG は脂肪細胞を誘導し、ALP 陽性細胞 (骨芽細胞) 分化を抑制した。この結果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*、免疫染色による解析では、*Klb*/KL $\beta$  は *Plin1*/PLIN1 陽性細胞に確認された。これらの結果より、KL $\beta$  は脂肪細胞分化初期に誘導されることが示唆された。脂肪細胞分化初期段階における KL $\beta$  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、KL $\beta$  を過剰発現させたが、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、KL $\beta$  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 を用いて ERK シグナルが抑制された細胞では、FGF21 依存性の脂肪細胞マーカーの減少を回復させた。また、RG はマウス骨髄細胞および ST2 細胞において KL $\beta$  の発現を誘導したことから、ST2 細胞の内在性 KL $\beta$  を Stealth RNAi™ siRNA を用いてノックダウンした。KL $\beta$  ノックダウンにより、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。KL $\beta$  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、KL $\beta$  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。

KLβ は、RG 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 と FGF 受容体を共受容体と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。RG は 2 型糖尿病の治療薬として有用であるが、RG 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、RG 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。