

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 歯 学 ）	氏名	入江 泰正
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 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 $\beta$ )			
論文審査担当者			
主 査	教 授	兼松 隆	印
審査委員	教 授	柴 秀樹	
審査委員	教 授	吉子 裕二	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>骨髄脂肪化は加齢により進行し、肥満、糖尿病、薬剤などによる影響を受け、骨量減少を伴うことがある。骨髄脂肪化は間葉系幹細胞あるいは骨芽細胞系譜において脂肪細胞分化のマスター転写因子 PPAR<math>\gamma</math> が活性化されることで進行するが、その過程は十分に理解されていない。マウス線維芽細胞株 NIH3T3 に Klotho<math>\beta</math> (KL<math>\beta</math>) を過剰発現させると脂肪分化が促進し、また線維芽細胞増殖因子 21 (FGF21)トランスジェニックマウスの骨髄脂肪細胞に KL<math>\beta</math> が発現することから、骨髄脂肪化における KL<math>\beta</math> の役割が示唆される。KL<math>\beta</math> は 1 回膜貫通型膜タンパク質で、FGF レセプターとヘテロダイマーを形成し、FGF21 の特異的受容体を形成する。KL<math>\beta</math> は肝臓、膵臓などで発現しており、これらは FGF21 の主な標的臓器である。PPAR<math>\gamma</math> の合成リガンドである抗糖尿病薬ロシグリタゾン (RG) は、白色脂肪細胞において FGF21 産生を促進することが報告されている。このような背景から、本論文では、RG による骨髄脂肪化において KL<math>\beta</math> が脂肪細胞分化にどのように寄与するか検討した。</p> <p>C57BL/6J 雄マウスに 4 週齢から普通食または高脂肪食 (60 Kcal%) を負荷した。13 週齢からは一部に RG を投与し、さらに 4 (17 週齢) もしくは 12 週間飼育した。計 4 グループ (普通食、普通食+RG、高脂肪食、高脂肪食+RG) のうち、高脂肪食を負荷したマウスで体重増加を認めた。大腿骨の組織切片では、RG 投与、高脂肪食共に骨髄脂肪化を認め、脂肪組織の分布は両者の併用が最も顕著であった。25 週齢においては、RG、高脂肪食の併用により骨量が有意に減少した。骨髄の <i>Klb</i> mRNA レベルを比較すると、RG 負荷により普通食、高脂肪食共に <i>Klb</i> mRNA が検出された。骨パラメーターにグループ間の差を認めなかった 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 <i>Klb</i> の発現パターンを詳細に確認するため、8 週齢の C57BL/6J 雄マウス由来の骨</p>			

髓細胞を RG 存在下で培養した。*Klb* mRNA は脂肪細胞 (*Pparg* mRNA の発現上昇と oil red O 陽性の脂肪滴の形成)の形成に先立ち上昇し、脂肪細胞分化初期における *KLβ* の関与が示唆された。

そこで、マウス骨髄間質細胞株 ST2 を用い、以下を検討した。RG は濃度依存的、経時的に oil red O 陽性細胞 (脂肪細胞) の分化を促進し、ALP 陽性細胞 (骨芽細胞)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 RG 負荷後速やかに上昇した。*In situ* hybridization および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*)を作製し、ST2 細胞に導入して *KLβ* を過剰発現させた。しかしながら、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いずれも減少した。また、*KLβ* 過剰発現細胞に MEK 阻害剤 U0126 を加えたところ、FGF21 依存性の脂肪細胞マーカーの減少が阻害された。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、RG 存在下、ST2 細胞の内在性 *KLβ* を siRNA を用いてノックダウンした。その結果、*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はいずれも減少した。*KLβ* 発現細胞を *in vivo* で確認するため、8 週齢の C57BL/6J 雄マウ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。

以上の結果より、RG は骨髄間質細胞の *KLβ* の発現を上昇させることで初期の脂肪細胞分化に関与し、FGF21 はこれを抑制すると推察された。一方、RG は高脂肪食で上昇した血中 FGF21 レベルを抑制するため、結果的に骨髄間質細胞にける FGF21-*KLβ* 経路が阻害され、骨髄脂肪化が助長される可能性が考えられた。これらの結果は、複雑な骨髄脂肪化のメカニズムの一端を示す新知見であり、またチアゾリジン系化合物の使用に関する重要な所見を提供するものである。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	入江 泰正
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 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 $\beta$ )			
最終試験担当者			
主査	教授 兼松 隆	印	
審査委員	教授 柴 秀樹		
審査委員	教授 吉子 裕二		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年12月19日の第6回広島大学研究科発表会（歯学）及び平成31年2月4日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 間葉系幹細胞/間質細胞における線維芽細胞増殖因子 (FGF) 受容体の発現について</li> <li>2 Klotho <math>\beta</math> の役割について</li> <li>3 Klotho <math>\beta</math> の上流/下流のマーカーについて</li> <li>4 Klotho <math>\beta</math> の局在について</li> <li>5 FGF21 を添加する意図について</li> <li>6 ロシグリタゾンと FGF21 による骨への影響の可能性について</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			