

学位論文題名

Identification of Macrophage Migration Inhibitory
Factor in Adipose Tissue and
Its Induction by Tumor Necrosis Factor- α (脂肪組織におけるマクロファージ遊走阻止因子の同定と
腫瘍壊死因子 α によるその誘導)

学位論文内容の要旨

肥満は脂肪細胞の数と大きさの増加により脂肪組織が肥大した状態であり、インスリン非依存性糖尿病(NIDDM)、高血圧、虚血性心疾患などとの関連が临床上注目されている。脂肪組織は単にエネルギーを脂肪として蓄積するだけの臓器ではなく、様々な生理活性物質を分泌する組織であることが最近の研究により明らかとなりつつある。この中には腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α 、以下TNF α)や摂食・エネルギー消費を調節する肥満遺伝子産物レプチン、また凝固線溶系の調節に関与するプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1などがある。これらの物質のうちでも特にTNF α は、肥満時の脂肪細胞で過剰発現しており、肥満やNIDDMに伴うインスリン抵抗性の発現において重要な役割を果たしていると考えられている。しかしその機序に関しては未だ十分解明されたとは言えない。

マクロファージ遊走阻止因子(macrophage migration inhibitory factor、以下MIF)は当初マクロファージの遊走を阻止する活性化Tリンパ球由来のサイトカインとして同定され、マクロファージを炎症部位に集める免疫機能を持つと考えられてきた。しかしその後の研究により、MIFはTリンパ球以外にもマクロファージ自身や下垂体前葉細胞、レンズなど多様な細胞から産生分泌されることが明らかとなり、その生理作用は免疫応答のみにとどまらない可能性が示唆されている。上述の如く肥満時には脂肪細胞でのTNF α 産生は亢進しているが、TNF α はマクロファージからのMIF分泌を促進すると報告されている。そこで我々は、MIFとインスリン抵抗性あるいは糖脂質代謝との関連についての研究の第一歩として、脂肪細胞におけるMIFの発現について検討した。

脂肪細胞のサンプルとしては、6週齢の雄性S-Dラットから摘出した副睾丸周囲脂肪組織およびin vitroの脂肪細胞培養系として確立しているマウス3T3-L1細胞を用いた。3T3-L1細胞はデキサメサゾン、インスリン、イソブチルメチルキサンチンを含む分化誘導メEDIUMで3日間分化誘導を行い、その後さらにインスリンのみを含む成熟メデイ

ウムで3日ごとにメデイウム交換を行い、分化誘導開始9日目の良く分化した脂肪細胞を実験に使用した。

ラットMIF cDNAをプローブとして用いたノーザンブロッティングにより、ラット脂肪組織においてMIF mRNAが発現していることが示された。脂肪組織内には脂肪細胞以外にも血管及び間質を構成する細胞が含まれている。これらの細胞を除くため脂肪組織をコラゲナーゼ消化した後、比重により分離した成熟脂肪細胞画分にもMIF mRNAの発現は同様に認められた。さらに3T3-L1脂肪細胞においてもMIF mRNAの発現が認められた。

脂肪細胞内にMIF蛋白質が存在することを確かめるために、抗ラットMIF抗体を用いてウェスタンブロッティングと免疫組織染色を行った。ウェスタンブロッティングでは、ラット脂肪組織およびマウス3T3-L1脂肪細胞の両方でMIF蛋白質が12.5 kDaの単一なバンドとして同定された。ラット脂肪組織の免疫組織染色においても、MIF蛋白質は成熟脂肪細胞の細胞質に局在していることが証明された。以上より、脂肪細胞はMIF遺伝子を発現しMIF蛋白質を合成しており、産生されたMIFは脂肪細胞の細胞質に蓄積していると考えられる。

次に我々は、脂肪細胞で産生されるMIFが細胞外に分泌されるかどうかを3T3-L1脂肪細胞を用いて検討した。5 × 10⁶個の3T3-L1脂肪細胞を5 mlのメデイウムで培養し、メデイウム中のMIF濃度をELISAで測定した。24時間後のメデイウム中MIF濃度は1.6 ± 0.5 ng/ml (mean ± SD, n=5)であった。したがって脂肪細胞で産生されたMIFの一部は細胞外へ分泌されると思われた。さらに我々は、脂肪細胞のMIF分泌に及ぼすTNF αの効果も同時に検討した。ヒトリコンビナントTNF αを最終濃度50 nMでメデイウム中に添加した場合、24時間後のメデイウム中MIF濃度は9.7 ± 2.8 ng/ml (mean ± SD, n=5)に増加し、TNF αを添加しない場合に比べて有意に上昇した(p < 0.001)。

脂肪細胞でMIFが発現していることを証明したのは今回の報告が初めてである。近年MIFの生理作用は今まで想像されていた以上に多彩であると考えられるようになった。MIFは単に炎症性サイトカインであるばかりではなく、下垂体ホルモンでもあり、またグルココルチコイドにより誘導される免疫調節因子としての働きも持つ。また極く最近、Waeber等はMIFが膵β細胞からグルコース濃度依存性に合成分泌され、さらに分泌されたMIFはオートクラインに作用してβ細胞からのインスリン分泌を刺激すると報告している。したがって脂肪細胞において産生分泌されるMIFも生体の糖脂質代謝に影響している可能性は十分に考えられる。

今回の研究でもう一つ明らかになったことは、脂肪細胞からのMIF分泌がTNF αにより誘導されるということである。冒頭でも述べたように、脂肪組織におけるTNF αの産生亢進はオートクラインあるいはパラクラインに作用して、末梢組織(筋肉・脂肪組織)でのインスリン抵抗性を惹起する。一方でMIFはマクロファージからのTNF α分泌を刺激することが知られているので、脂肪組織においてもMIFとTNF αとは局所でお互いに協同的に働いてインスリン抵抗性の発現に関与している可能性がある。

肥満はNIDDM、高血圧、虚血性心疾患など多くの成人病の危険因子として临床上重要

であり、またこれらに共通の基盤としてインスリン抵抗性の存在が関心を集めている。したがって今後、脂肪細胞で発現しているMIFがインスリン抵抗性あるいは糖脂質代謝に生体内でどの様に関わっているのかについてさらに研究をすすめることは、肥満の病態の解明に新しい道を開くものとして意義のあることと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 教 授 西 信 三
副 査 教 授 川 上 義 和

学 位 論 文 題 名

Identification of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Adipose Tissue and Its Induction by Tumor Necrosis Factor- α

(脂肪組織におけるマクロファージ遊走阻止因子の同定と
腫瘍壊死因子 α によるその誘導)

肥満は脂肪細胞の数と大きさの増加により脂肪組織が肥大した状態であり、糖尿病、高血圧、虚血性心疾患などとの関連が臨床に注目されている。脂肪組織は単にエネルギーを脂肪として蓄積するだけの臓器ではなく、様々な生理活性物質を分泌する組織であることが最近の研究により明らかとなった。これらの物質のうちでも特にTNF α は、肥満時の脂肪細胞で過剰発現しており、肥満や糖尿病に伴うインスリン抵抗性の発現において重要な役割を果たしていると考えられている。

マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor、以下MIF) は当初マクロファージの遊走を阻止するTリンパ球由来のサイトカインとして同定され、マクロファージを炎症部位に集める免疫機能を持つと考えられてきた。しかしその後の研究によりその生理作用は免疫応答のみにとどまらない可能性が示唆されている。上述の如く肥満時には脂肪細胞でのTNF α 産生は亢進しているが、TNF α はマクロファージからのMIF分泌を促進すると報告されている。本研究では脂肪細胞におけるMIFの発現及びTNF α によるその変化について検討した。

ノーザンブロッティングにより、ラット脂肪組織及び3T3-L1脂肪細胞においてMIF mRNAの発現が認められた。ウェスタンブロッティングでは、ラット脂肪組織及びマウス3T3-L1脂肪細胞の両方でMIF蛋白質が同定された。ラット脂肪組織の免疫組織染色においても、MIF蛋白質は成熟脂肪細胞の細胞質に局在していることが証明された。

次に、脂肪細胞で産生されるMIFが細胞外に分泌されるかどうかを3T3-L1脂肪細胞を用いて検討した。5 \times 10⁶個の3T3-L1脂肪細胞を5 mlのメディウムで培養し、メディウム中のMIF濃度を測定した。24時間後のメディウム中MIF濃度は1.6 \pm 0.5 ng/ml (mean

±SD, n=5)であった。したがって脂肪細胞で産生されたMIFの一部は細胞外へ分泌され
ると考えられた。さらにTNF α を最終濃度50 nMでメディウム中に添加した場合、24時
間後のメディウム中MIF濃度は9.7±2.8 ng/ml (mean±SD, n=5)に増加し、TNF α を添
加しない場合に比べて有意に上昇した(p<0.001)。

脂肪細胞でMIFが発現していることを証明したのは今回の報告が初めてである。極く
最近、MIFは膵 β 細胞からグルコース濃度依存性に合成分泌され、オートクラインに作
用して β 細胞からのインスリン分泌を刺激すると報告されている。したがって脂肪細胞
において産生分泌されるMIFも生体の糖・脂質代謝に影響している可能性は十分に考え
られる。今回の研究でもう一つ明らかになったことは、脂肪細胞からのMIF分泌がTNF α
により誘導されるということである。脂肪組織におけるTNF α の産生亢進はオートク
ラインあるいはパラクラインに作用して、末梢組織（筋肉・脂肪組織）でのインスリン
抵抗性を惹起する。一方でMIFはマクロファージからのTNF α 分泌を刺激することが知
られているので、脂肪組織においてもMIFとTNF α とは局所でお互いに協同的に働いて
インスリン抵抗性の発現に関与している可能性が示唆される。

審査に当たっては、皆川教授より、TNF α 以外のサイトカインとMIFとの関連につい
て、肥満におけるTNF α 過剰発現の意義について質問があった。また副査西教授より
MIFのクロニング法・酵素活性・マクロファージ遊走阻止活性について、他臓器にお
けるMIF発現について、MIFとエンドトキシンショックとの関連について質問があっ
た。また副査川上教授より、TNF α 以外のインスリン抵抗性誘導因子について、脂肪細胞か
ら分泌される物質を肥満時に測定する際の標準化について質問があった。さらに主査石
橋より、MIFのアッセイ法について、脂肪細胞においてMIFを研究対象とした理由につ
いて、TNF α によるMIF誘導作用の濃度依存性について、悪性腫瘍と糖尿病とでのTNF α
発現の意義の相違について質問があった。申請者はこれらのいずれの質問に対しても
適切な回答をおこなった。

さらに、脂肪細胞で発現しているMIFがインスリン抵抗性あるいは糖代謝・脂質代謝
に生体内で実際にどの様に関わっているのかについて研究をすすめることにより、肥満
の病態におけるMIFの役割をさらに解明することができると期待される。

審査員一同は、本研究を脂肪細胞におけるインスリン抵抗性にMIFが関与していること
を示唆する研究として高く評価し、博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有す
るものと判定した。