

学位論文題名

Regulation of Macrophage Migration Inhibitory  
Factor (MIF) Expression by Glucose  
and Insulin in Adipocytes In Vitro

(脂肪細胞におけるブドウ糖とインスリンによる  
マクロファージ遊走阻止因子発現の制御)

学位論文内容の要旨

マクロファージ遊走阻止因子(macrophage migration inhibitory factor; MIF)は、当初その名のとおりマクロファージの遊走を阻害するリンホカインとして同定された。しかし、近年の研究により、MIF は生体内に広く存在し、その作用も炎症・免疫を中心として多岐にわたることが明らかとなってきている。MIF は膵β細胞においても発現がみられ、ブドウ糖によるインスリン分泌増加において重要な役割を果たすと報告された。このことは、糖代謝における MIF の重要性を示唆している。我々は、以前、脂肪細胞でも MIF が発現していることを見いだした。脂肪細胞は種々の生理活性物質を産生・分泌し、インスリン非依存型糖尿病(non-insulin-dependent diabetes mellitus; NIDDM)の病態に大いに関与している。そこで我々は、培養脂肪細胞と肥満・糖尿病ラットの脂肪組織を用いて、MIF 発現の制御機構を検討した。

方法としては、マウス由来の培養脂肪細胞である 3T3-L1 を、種々の濃度のブドウ糖・インスリンなどの存在下で培養し、MIF mRNA の発現と MIF 蛋白の産生をそれぞれ Northern blot 法、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により評価した。肥満・糖尿病モデルラットである Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラット、Wistar fatty ラットの副睾丸周囲脂肪組織における MIF mRNA の発現を Northern blot 法で評価し、血漿中の MIF 量を ELISA 法で測定した。

3T3-L1 脂肪細胞を、5  $\mu\text{g/ml}$  のインスリン存在下に種々のブドウ糖濃度で 24 時間培養したところ、ブドウ糖濃度が 200  $\text{mg/dl}$  以上のとき、MIF mRNA 発現が増強した。しかし、この変化はインスリンを加えていない場合にはみられなかった。このことは、MIF mRNA 発現にはブドウ糖のみならず、インスリンの関与が必要であることを示唆していると考え、次に 400  $\text{mg/dl}$  のブドウ糖存在下に種々のインスリン濃度で 24 時間培養したところ、インスリンが 1  $\mu\text{g/ml}$  以上のとき MIF mRNA 発現が増強した。刺激時間の検討では、この反応はインスリン刺激 8 時間で認められた。しかしブドウ糖が存在しないときにはインスリンによる MIF mRNA 発現の増強は認められなかった。これらの結果により、3T3-L1 脂肪細胞においては、ブドウ糖・インスリンによるそれぞれの単独刺激では MIF mRNA 発現は変化しないが、共存下において MIF mRNA の発現が増強することが明らかとなった。このことから細胞内へのブドウ糖の輸送が MIF mRNA 発現の制御に重要な因子になっていることが推測される。

細胞内 MIF 蛋白量は、mRNA と同様に 400  $\text{mg/dl}$  のブドウ糖・5  $\mu\text{g/ml}$  のインスリン共存下で 24 時間の培養により有意に増加した。しかし、同様の刺激により、培養液中の MIF 蛋白量は減少していた。このことはブドウ糖・インスリン刺激は MIF mRNA 発現のみならず、MIF 蛋白の分泌あるいは細胞内への取り込みや分解を調節している可能性があると考えられる。

次に、3T3-L1 脂肪細胞を、ブドウ糖・インスリンとともに、ブドウ糖輸送を阻害する作用を

持っているサイトカラシン B (20  $\mu$ M) を培養液に加えて刺激した。その結果、24 時間後の培養液中の MIF 蛋白は増加していた。サイトカラシン B の他の作用による影響は否定できないが、細胞内へのブドウ糖輸送が MIF 分泌の調節に重要であることを示唆する結果と考えられる。

更に、3T3-L1 脂肪細胞を抗糖尿病薬であるピオグリタゾン (5  $\mu$ M) を加えて 24 時間刺激したところ、培養液中の MIF 蛋白量は有意に増加した。ピオグリタゾンは脂肪細胞の分化を促進し、インスリン抵抗性を改善する薬剤である。インスリン抵抗性状態にある脂肪細胞に対しては、ピオグリタゾンはブドウ糖の細胞内への輸送を促進させるが、通常の 3T3-L1 脂肪細胞に対しては、ピオグリタゾン単独では細胞内へのブドウ糖輸送は亢進させないことが以前示されている。したがって、この培養液中 MIF 増加という結果は細胞内へのブドウ糖輸送とは別の機序によるものであると考えられる。ピオグリタゾンの作用を考えると、脂肪細胞の分化促進が一つの候補に挙げられる。

このような *in vitro* における脂肪細胞の MIF 発現・分泌と NIDDM の病態との関連を調べるため、OLETF ラット、Wistar fatty ラットの副腎丸周囲脂肪組織における MIF mRNA の発現を検討したところ、それぞれの対照ラットと比較して明らかに減弱していた。肥満・糖尿病モデルラットでは高血糖を呈していたにもかかわらず、このような結果が得られたことは、*in vitro* におけるブドウ糖による MIF mRNA 発現増強という結果と一見合致しないように思われる。しかし、NIDDM の病態は脂肪細胞を含む末梢組織のインスリン抵抗性と膵 $\beta$ 細胞のインスリン分泌不全が相まって生じるインスリン作用不足であることを考えると、糖尿病ラットの脂肪細胞におけるインスリン作用も減少しているはずである。したがって高血糖状態であっても細胞内へのブドウ糖輸送が十分ではないため、糖尿病ラットの脂肪組織における MIF mRNA 発現が減弱していたと考えられる。

血漿中の MIF 濃度は、肥満・糖尿病ラットと対照ラットの間に有意な差はみられなかったが、OLETF ラットでやや増加している傾向がみられた。インスリン作用不足状態における脂肪細胞の mRNA 減少と、細胞外 MIF 蛋白増加は *in vitro* の結果と一致する。

Wistar fatty ラットの血清中の MIF は、ピオグリタゾン投与により有意に増加した。ピオグリタゾン投与によりインスリン抵抗性が改善され、高血糖の改善がみられたが、血中の MIF は増加していた。この結果は、脂肪細胞の MIF mRNA 発現がブドウ糖、インスリンのみによって規定されないことを示している。*in vitro* の結果と同様に脂肪細胞の分化を含めた他の要因が考えられるが、現時点ではその理由は不明である。

脂肪細胞における MIF の分泌は、膵 $\beta$ 細胞へ作用することによりインスリン分泌を制御している可能性がある。糖尿病状態で、脂肪細胞からの MIF 分泌が増加するということは、インスリン分泌を代償性に刺激するメディエーターになっている可能性がある。さらに脂肪組織局所においても何らかの作用を及ぼしている可能性もある。MIF の糖代謝に対する作用についてのさらなる研究により、糖尿病の病態生理の解明に新たな展開がもたらされるものと期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 教 授 皆 川 知 紀

副 査 教 授 川 上 義 和

## 学 位 論 文 題 名

# Regulation of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Expression by Glucose and Insulin in Adipocytes In Vitro

(脂肪細胞におけるブドウ糖とインスリンによる  
マクロファージ遊走阻止因子発現の制御)

マクロファージ遊走阻止因子(macrophage migration inhibitory factor; MIF)は、膵 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌に重要な役割を果たす。また、脂肪細胞はインスリン非依存型糖尿病(non-insulin-dependent diabetes mellitus; NIDDM)の病態に大いに関与しているが、MIFの発現が脂肪細胞でも以前示された。そこで申請者は、脂肪細胞におけるMIF発現の制御機構を検討した。

方法としては、培養脂肪細胞である3T3-L1を、種々の濃度のブドウ糖・インスリンなどの存在下で培養し、MIF mRNAの発現とMIF蛋白の産生をそれぞれNorthern blot法、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法により評価した。肥満・糖尿病モデルラットであるOtsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)ラット、Wistar fattyラットの副睾丸周囲脂肪組織におけるMIF mRNAの発現をNorthern blot法で、血漿中のMIF量をELISA法で評価した。

3T3-L1脂肪細胞をブドウ糖・インスリンによりそれぞれ単独で刺激した際には、MIF mRNA発現は変化しなかった。しかし、ブドウ糖とインスリン共存下では、MIF mRNA発現が増強した。この反応は刺激8時間以降で認められた。これらの結果により、3T3-L1脂肪細胞においては、細胞内へのブドウ糖の輸送がMIF mRNA発現の制御に重要な因子であることが推測される。

細胞内MIF蛋白量は、mRNAと同様に400 mg/dlのブドウ糖・5  $\mu$ g/mlのインスリン共存下での培養により有意に増加した。しかし、同様の刺激により、培養液中のMIF蛋白量は減少していた。更に、ブドウ糖・インスリンとともに、細胞内へのブドウ糖輸送阻害作用を持つサイトカラシンB (20  $\mu$ M)を培養液に加えた結果、培養液中のMIF蛋白は増加した。これらのことはブドウ糖・インスリン刺激はMIF mRNA発現のみならず、MIF蛋白の分泌や細胞内への取り込みや分解を調節している可能性を示唆している。

次に、3T3-L1脂肪細胞を抗糖尿病薬であるピオグリタゾン (5  $\mu$ M)を加えて24時間刺激したところ、培養液中のMIFは有意に増加した。この結果は、MIF分泌量が細胞内へのブドウ糖輸送だけでは制御されないことを示している。

OLETFラット、Wistar fattyラットの副睾丸周囲脂肪組織のMIF mRNAの発現は、それぞれの対照ラットと比較して明らかに減弱していた。これは、NIDDMにおいてみられるインスリン作用不足のため、脂肪細胞内へのブドウ糖輸送が減少していたためと考えられる。

血漿中のMIF濃度は、肥満・糖尿病ラットと対照ラットの間に有意な差はみられなかったが、

OLETF ラットでやや増加している傾向がみられた。インスリン作用不足状態における脂肪細胞の mRNA 減少と、細胞外 MIF 蛋白増加は *in vitro* の結果と一致する。

Wistar fatty ラットへのピオグリタゾン投与により高血糖の改善がみられたが、血清中の MIF は有意に増加した。この結果は、*in vitro* の結果と同様に脂肪細胞の MIF 分泌が細胞内へのブドウ糖輸送のみによって規定されないことを示しており、その機序は不明であるが、脂肪細胞の分化を含めた他の要因が考えられる。

脂肪細胞における MIF の発現・分泌は、膵  $\beta$  細胞さらに脂肪組織局所においても何らかの作用を及ぼしている可能性があり、さらなる研究により、糖尿病の病態生理の解明に新たな展開がもたらされるものと期待される。

審査にあたり、副査皆川教授より、1) MIF に着目した理由について、2) 糖尿病における MIF 以外の factor の関与について、3) *in vivo* での抗 MIF 抗体の効果について、4) MIF が糖尿病発症にどのように関与しているのか、5) MIF が治療の指標になりうるかについて質問があり、副査川上教授より 1) 使用したモデルラットの妥当性について、2) ピオグリタゾンに代わる薬剤についての質問があった。主査石橋教授からは、1) 3T3-L1 の特徴について、2) glucose と insulin による MIF mRNA の上昇の意義について、3) 細胞内と細胞外 MIF 量の和について、4) MIF の mRNA と蛋白のどちらが先に増加するのかについての質問があった。フロアからは *in vivo* でインスリンを投与した際の MIF についての質問があった。申請者はこれらの質問に対して適切な解答をおこなった。

審査員一同は本研究を、脂肪細胞における MIF 発現の制御機構について検討した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と判定した。