

学 位 論 文 題 名

3T3-L1細胞において
macrophage migration inhibitory factor (MIF) が
脂肪細胞分化に与える影響に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景】肥満は2型糖尿病や心血管疾患など様々な疾患の危険因子であり、社会的にも重大な問題である。肥満すなわち白色脂肪組織の容量の増加は、脂肪細胞のサイズの増大 (hypertrophy) と数の増加 (hyperplasia) が関与する。hypertrophy は脂肪細胞へのトリグリセリドの蓄積により起こり、アディポサイトカイン分泌を変化させるといわれている。これに対して hyperplasia は主として脂肪前駆細胞の増殖・分化により起こるとされているが、その生物学的役割は未だに十分に解明されているとは言えず、脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化 (adipogenesis) のメカニズムを知ることは肥満の病態解明に重要である。MIF は炎症性サイトカインとして知られているが、MIF の血中濃度は肥満で上昇し、食事・運動療法による減量で低下することが知られている。更に MIF の遺伝子多型は肥満に関連していることも報告された。これらの報告は肥満と MIF の間の結びつきを推測させる。MIF は脂肪細胞においても発現がみられ、分化に伴ってその発現量が増加すると報告されているが、脂肪細胞において MIF がどのような作用を持っているか、いまだ明らかではない。

【目的】脂肪細胞の分化に MIF が与える影響を明らかにする。

【方法】未分化の 3T3-L1 脂肪細胞に RNA interference を用いて MIF 発現を抑制し、insulin, 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethazone による分化誘導を行なった (分化誘導刺激開始時を day 0 とする)。3T3-L1 脂肪細胞を Oil-red-O 染色を用いた方法と酵素反応を用いた方法により細胞内トリグリセリド含有量を測定し、さらにアディポネクチンの mRNA 量も測定し、これらを脂肪細胞分化の指標とした。その変化のメカニズムを調べるため、脂肪細胞の分化に関連する転写因子の mRNA 量を測定し、mitotic clonal expansion を検討するため細胞数の計測と、細胞内への 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) 取り込みの測定を行なった。

【結果】MIF をノックダウンした 3T3-L1 細胞で MIF mRNA 発現は day 0-4 で抑制されていた。細胞内 MIF 蛋白量は分化誘導 12 時間以降で明らかに抑制されていたが、培養液中の MIF 蛋白量は day 2 までは変化なく、day 2 以降になってから低下がみられた。細胞

内トリグリセリド含有量は Oil-red-O 染色と酵素法のいずれの方法でも有意に低下した。この低下はリコンビナントマウス MIF を培養液中に加えることでは打ち消されなかった。アディポネクチン mRNA 量は脂肪細胞の分化とともに増加するが、MIF をノックダウンした細胞ではその増加が抑制されていた。

adipogenesis に関連する転写因子の mRNA の発現については Peroxisome proliferation-activated receptor (PPAR) γ 、CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α 、C/EBP δ が抑制されており、逆に C/EBP β は増強されていた。MIF をノックダウンした細胞の培養液に PPAR γ のアゴニストであるピオグリタゾンを追加しておく、細胞内トリグリセリド含有量の低下はみられなかった。

mitotic clonal expansion を反映した細胞数や BrdU の取り込みの増加も MIF のノックダウンにより抑制されていた。

【考案】C/EBP δ と C/EBP β は分化誘導数時間後に発現がピークに達し、adipogenesis を促進させる重要な転写因子である。C/EBP δ は C/EBP α の発現を誘導し、更に C/EBP δ の存在下で PPAR γ の発現を増加させることが知られている。MIF のノックダウンが C/EBP δ を抑制したことから、それにより adipogenesis の重要なレギュレーターである C/EBP α と PPAR γ の発現低下を介して adipogenesis を抑制している可能性がある。逆に C/EBP β の増加は adipogenesis の阻害を説明できず、むしろ補完するための現象かもしれない。

コンフルエントになり細胞周期を停止した脂肪前駆細胞が分化誘導刺激を受けると、上記のような転写因子の反応と平行して、再び細胞周期に入り数回細胞分裂する mitotic clonal expansion という現象が起こる。mitotic clonal expansion は adipogenesis に不可欠と考えられている。この研究では MIF siRNA を導入すると細胞数増加と BrdU 取り込みが抑制されることが示され、これは即ち mitotic clonal expansion が阻害されていることを示している。この mitotic clonal expansion の阻害が adipogenesis を抑制している可能性がある。C/EBP δ が mitotic clonal expansion に直接影響するデータはないが、C/EBP δ と協調して影響を及ぼしている可能性がある。

細胞外からの MIF のシグナルは、細胞表面の受容体 CD74 を介すると報告されている。しかし、細胞内に存在する MIF も、様々な活性を持っていることが知られている。この研究で MIF siRNA 導入細胞において細胞外 MIF 濃度は day 0-2 で変化なかったが、細胞内 MIF レベルが分化誘導 12 時間後に既に低下しており、BrdU 取り込みが分化誘導後 14 時間に低下していた。更にリコンビナント MIF を細胞外に添加しても adipogenesis は有意な変化をしなかった。以上の結果から細胞外ではなく細胞内 MIF が低下したことにより adipogenesis が阻害されたと考えられた。

【結論】細胞内 MIF の抑制が 3T3-L1 脂肪細胞の分化を抑制する。その機序として少なくとも一部は C/EBP δ 発現抑制と mitotic clonal expansion の抑制を介していると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 畠 山 鎮 次

学 位 論 文 題 名

3T3-L1細胞において macrophage migration inhibitory factor (MIF) が 脂肪細胞分化に与える影響に関する研究

肥満すなわち脂肪組織の容量の増加は、脂肪細胞のサイズの増大 (hypertrophy) と数の増加 (hyperplasia) が関与する。Hyperplasia は主として脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化 (脂肪細胞分化: adipogenesis) により起こるとされるが、そのメカニズムは未だに十分に解明されていない。近年臨床的に炎症性サイトカインとして知られる MIF と肥満の関連を推測させる報告があるが、脂肪細胞における MIF の作用は未だ明らかではない。そこで脂肪細胞の分化に MIF が与える影響を明らかにすることを目的に研究を行なった。3T3-L1 脂肪前駆細胞に siRNA を用いて MIF 発現を抑制し直後に分化誘導を行なった。MIF をノックダウンした細胞で MIF mRNA 発現は分化誘導 4 日後まで抑制されていた。細胞内 MIF 蛋白量は分化誘導 12 時間以降で明らかに抑制されたが、培養液中の MIF 蛋白量は分化誘導 2 日前までは変化がなく、2 日後以降に低下がみられた。細胞内トリグリセリド量は Oil-red-O 染色と酵素法のいずれの方法でも有意に低下した。この低下はリコンビナントマウス MIF を培養液中也に加えても打ち消されなかった。脂肪細胞分化に伴い増加するアディポネクチン mRNA 量も MIF ノックダウンにより抑制されていた。

脂肪細胞分化の中心的な転写因子である peroxisome proliferation-activated receptor (PPAR) γ と CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α の mRNA 発現が低下しており、更に C/EBP δ mRNA 発現も低下しており、逆に C/EBP δ は増強されていた。一方、脂肪細胞分化の際に培養細胞では、上記の転写因子の反応と平行して、コンフルエントになり細胞周期を停止した前駆脂肪細胞が、再び細胞周期に入り数回細胞分裂する mitotic clonal expansion という現象が起こると知られている。Mitotic clonal expansion を反映した細胞数の増加も抑制されており、細胞分裂の過程で S 期から G1 期への移行を反映する 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) 取り込み増加も抑制されていた。

最後に 4 点について概説した。まず、MIF は細胞外と細胞内で異なる活性を持つことが知られている。本研究では MIF siRNA 導入細胞において MIF の細胞外濃度の変化が遅れ、BrdU 取り込みは細胞外 MIF 濃度の変化より早期に起こっていた。更にリコンビナント MIF を細胞外に添加しても脂肪細胞分化は有意な変化をしなかった。このため脂肪細胞分化の阻害は細胞外ではなく細胞内 MIF の低下によるものと考えた。次に C/EBP δ と C/EBP δ は脂肪細胞分化の早期に発現する重要な転写因子であるが、本研究では C/EBP δ が抑制され、C/EBP δ は亢進していた。C/EBP δ は C/EBP α の発現を誘導し、C/EBP δ の存在下で PPAR γ の発現を増加させると報告されており、MIF のノックダウンが早期に C/EBP δ を抑

制し、C/EBP α と PPAR γ を介して脂肪細胞分化を抑制している可能性がある。一方 C/EBP δ の増加は脂肪細胞分化の阻害を説明できず、補完するための現象と推察された。更に本研究では MIF ノックダウンが mitotic clonal expansion も抑制した。Mitotic clonal expansion は脂肪細胞分化に不可欠とされ、MIF が細胞増殖を抑制するとの報告もあるため、MIF ノックダウンが mitotic clonal expansion 抑制を介して脂肪分化を抑制したものと考えた。最後に MIF ノックアウトマウス胚線維芽細胞を用いた研究では脂肪細胞分化がむしろ亢進することが報告されている。この研究とは、用いた細胞または遺伝子抑制方法、分化誘導方法が異なっているためではないかと考えた。本研究の結果が一般化されるには、異なる細胞や様々な条件下での研究や In vivo での検証が必要と考えた。

本研究では細胞内 MIF の抑制が 3T3-L1 脂肪細胞の分化を抑制することが示された。それは、少なくとも C/EBP δ と mitotic clonal expansion のどちらか一方、または両方を介する効果と考えられる。

審査にあたり、副査畠山教授より 1) 異なる MIF siRNA を使用した際の MIF mRNA の反応が異なっている理由、2) MIF が adiponectin 発現に直接的な影響の有無、3) リコンビナント MIF を用いた実験結果を踏まえて細胞内、細胞外いずれの MIF が脂肪分化に影響を及ぼしたか、4) mitotic clonal expansion を調べる際の細胞周期の確認、について質問があった。副査小池教授からは 1) この研究を始める契機、2) MIF と炎症性マーカーとの関連、3) 過去に報告があった MIF ノックアウトマウス胚線維芽細胞における結果との異同と PPAR γ agonist を用いた実験、について質問があった。主査の西村教授から 1) 今回の実験結果と生体内での MIF の役割との関係、2) 成熟脂肪細胞で MIF の機能をみる実験の技術的な可能性、について質問があった。

申請者はこれらの質問について、自験データと文献を引用して概ね適切な回答を行った。

今回の研究は、3T3-L1 細胞という一般的な培養細胞を用いて、脂肪細胞分化における MIF が及ぼす影響の一面を明らかにし、そのメカニズムを示した点が高く評価される。今後、MIF の肥満という病態における役割、特に脂肪細胞／組織での関係が更に解明されると期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。