

学位論文題名

脂質代謝、糖代謝における
マクロファージ遊走阻止因子の役割

学位論文内容の要旨

1. 緒言

現在、日本人の死因の第一位は悪性腫瘍である。第二、三位は脳血管障害と心疾患であり肥満、高血圧、糖尿病、高脂血症などの成人病がその発症に深く関与している。低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein : LDL) が動脈内膜に移行すると血管内皮細胞やマクロファージなどによってフリーラジカルが放出され LDL が酸化される。マクロファージは TNF- α 、IL-1 などの炎症性サイトカインを産生し、血管壁を構成する血管内皮細胞や平滑筋細胞を活性化する。特に酸化 LDL はこれらの生物活性の高い分子の産生を刺激しマクロファージの増殖も誘導する。また動脈硬化巣には酸化 LDL のような変性 LDL を、特異的レセプターを介して取込んだマクロファージ (泡沫細胞) がしばしば存在する。

マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor : MIF) は炎症や細胞増殖に関与する多機能分子として知られている。最近 MIF が動脈硬化巣で強く発現していることが報告され、動脈硬化症における MIF の役割が注目されている。本研究ではマクロファージにおける MIF の発現に対する酸化 LDL の影響および酸化 LDL の取り込みと分解に対する MIF の作用について解析した。

また糖代謝異常も動脈硬化の発症と密接に関与している。MIF の糖代謝における役割を解明するため、主要な糖利用器官である骨格筋のストレス刺激における糖代謝亢進に対する MIF の役割を検討した。

2. 方法

細胞はマウスマクロファージ様細胞株 (RAW 264.7) を用いた。LDL は超遠心法で健康成人空腹時血漿から分離精製した。酸化 LDL は得られた LDL を CuSO₄ (5 μ M) と 37°C で 24 時間反応させ調整した。酸化 LDL (10~50 μ g/ml) で RAW 264.7 を刺激し、MIF mRNA 発現量をノーザンブロット法で解析した。また RAW 264.7 の MIF 分泌に対する酸化 LDL の影響を検討するため、培養上清中 MIF 濃度を ELISA 法で測定した。さらに MIF の生物学的機能を解析するため、培養液を無血清培地 (Cos medium : Cosmo Bio、東京) に変更後 MIF を添加し 48 時間 37°C で培養し、¹²⁵I 標識酸化 LDL を添加後 37°C で 4 時間培養し放射活性を測定することにより、酸化 LDL の取り込み、分解能を解析した。

骨格筋の解糖系に対する MIF の役割を検討するため、ラット L6 筋芽細胞を筋管細胞に分化させ、MIF 刺激時における Fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP) 量と乳酸産生量を測定した。F2,6BP は解糖系の強力な刺激因子であり、その濃度の測定は糖代謝を知るうえで非常に有用である。また F2,6BP の合成を触媒する 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2) 遺伝子の発現も同時に検討した。さらに、TNF- α の解糖系亢進作用と MIF の関連を検討するため、L6 筋管細胞を TNF- α で刺激し培養上清中 MIF 濃度を測定した。また TNF- α による解糖系亢進作用に対する抗 MIF 抗体の影響を検討した。

3. 結果

酸化 LDL は RAW 264.7 の MIF mRNA の発現量を濃度依存性に増加させた。しかし native LDL は MIF mRNA 発現量に変化を与えなかった。また酸化 LDL による MIF mRNA の発現は時間依存性に増加し、12 時間で最高に達し、その後発現量は減少した。MIF の培養上清中への分泌は酸化 LDL の濃度依存性(10-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)に増加し、native LDL は培養上清中 MIF 濃度に影響を与えなかった。さらに、MIF は RAW 264.7 における酸化 LDL の取込み、分解を増加させた。

MIF は L6 筋管細胞における F2,6BP 量を濃度依存性 (5-100 ng/ml) に増加させた。また MIF は muscle PFK-2 遺伝子の発現を増加させた。さらに MIF は L6 筋管細胞における乳酸産生の増加作用を有することが確認された。また L6 筋管細胞を TNF- α で刺激すると培養上清中 MIF 濃度が増加した。同時に細胞内の MIF 量は減少し、細胞内の MIF プールが TNF- α の作用で細胞外に分泌されることが示唆された。また TNF- α は L6 筋管細胞の MIF mRNA の発現を時間依存性に増加させた。また TNF- α の解糖系亢進作用は抗 MIF 抗体によって抑制された。

4. 考察

動脈硬化の初期病変においてマクロファージは極めて重要な役割をしている。MIF は RAW 264.7 における酸化 LDL の取込みを増加させることが明らかになった。酸化 LDL は MIF のオートクライン、パラクライン作用を通して酸化 LDL 自身の取込みを刺激している可能性がある。そして MIF は泡沫細胞の形成を助長し、白色線条の形成、不安定プラークの形成、アテローム硬化の進展に寄与すると考えられる。MIF は炎症反応のみならず、細胞分化・増殖にも関与することが知られている。MIF は血管内皮細胞、動脈中膜平滑筋細胞にも発現し、マクロファージに発現する MIF とともに血管平滑筋の増殖にも関与することが考えられる。

また骨格筋における解糖系活性化の機序に MIF が関与することも示唆された。骨格筋は生体内における糖代謝に極めて重要な役割を果たす。MIF や TNF- α による解糖系活性化機序とインスリン作用の関連を解明することが、インスリン抵抗性、肥満、糖尿病などの成人病の新たな治療法の開発につながる可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

脂質代謝、糖代謝における マクロファージ遊走阻止因子の役割

動脈硬化巣には酸化 LDL のような変性 LDL を、特異的レセプターを介して取込んだマクロファージ (泡沫細胞) がしばしば存在する。マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor : MIF) は炎症や細胞増殖に関与する多機能分子として知られている。本研究ではマクロファージにおける MIF の発現に対する酸化 LDL の影響および酸化 LDL の取り込みと分解に対する MIF の作用について解析した。また成人病と関連がある糖代謝と MIF の役割についても検討した。

酸化 LDL (10~50 $\mu\text{g/ml}$) でマウスマクロファージ様細胞である RAW 264.7 を刺激し、MIF mRNA 発現量と培養上清中 MIF 濃度を測定した。さらに RAW 264.7 における酸化 LDL の取り込み、分解能に対する MIF の役割についても検討した。また解糖系の強力な活性化因子である Fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP) に関して、ラット L6 筋管細胞の MIF 刺激時における F2,6BP 量と乳酸産生量を測定し、F2,6BP の合成を触媒する 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2) 遺伝子の発現も同時に検討した。さらに、L6 筋管細胞を TNF- α で刺激し培養上清中 MIF 濃度を測定した。また TNF- α による解糖系亢進作用に対する抗 MIF 抗体の影響を検討した。

酸化 LDL は RAW 264.7 の MIF mRNA の発現量を濃度依存性に増加させた。また酸化 LDL による MIF mRNA の発現は時間依存性に増加し、12 時間で最高に達し、その後発現量は減少した。MIF の培養上清中への分泌は酸化 LDL の濃度依存性に増加し、native LDL は培養上清中 MIF 濃度に影響を与えなかった。さらに、MIF は RAW 264.7 における酸化 LDL の取り込み、分解を増加させた。

糖代謝との関連では、MIF は L6 筋管細胞における F2,6BP 量を濃度依存性に増加させた。また MIF は PFK-2 遺伝子の発現を増加させた。さらに MIF は L6 筋管細胞における乳酸産生の増加作用を有することが確認された。また L6 筋管細胞を TNF- α で刺激すると培養上清中 MIF 濃度が増加した。同時に細胞内の MIF 量は減少し、細胞内の MIF プールが TNF- α の作用で細胞外に分泌されることが示唆された。また TNF- α は L6 筋管細胞の MIF

mRNA の発現を時間依存性に増加させた。TNF- α の解糖系亢進作用は抗 MIF 抗体によって抑制された。

動脈硬化の初期病変においてマクロファージは極めて重要な役割をしている。MIF は RAW 264.7 における酸化 LDL の取込みを増加させることが明らかになった。酸化 LDL は MIF のオートクライン、パラクライン作用を通して酸化 LDL 自身の取込みを刺激している可能性がある。そして MIF は泡沫細胞の形成を助長し、白色線条の形成、不安定プラークの形成、アテローム硬化の進展に寄与すると考えられる。また骨格筋における解糖系活性化の機序に MIF が関与することも示唆された。骨格筋は生体内における糖代謝に極めて重要な役割を果たす。MIF や TNF- α による解糖系活性化機序とインスリン作用の関連を解明することが、インスリン抵抗性、肥満、糖尿病などの成人病の新たな治療法の開発につながる可能性があることが示唆された。

質疑応答においては副査石橋教授から、生理的酸化 LDL での検討、TNF- α や MIF の刺激で好氣的解糖ではなく嫌氣的解糖が促進する理由についての質問があった。次いで副査浅香教授から、動脈硬化症における MIF の役割に対する炎症反応の関連、動脈硬化症における炎症のメカニズム、MIF の解糖系亢進作用と糖尿病との関連、糖尿病患者において血中 MIF が高い理由についての質問があった。次いで主査小池教授から、RAW 264.7 以外の細胞における検討、マクロファージの泡沫化の測定、炎症反応と動脈硬化症に関して慢性関節リウマチなどの炎症性疾患における動脈硬化との関連、TNF- α や MIF の動脈硬化における生理的機能と病因としての役割についての質問があった。最後に副査浅香教授から、TNF- α 抗体の治療への応用、MIF ノックアウトマウスでの検討に関する質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切に回答した。

本論分における検討から、今後糖尿病や動脈硬化症における MIF の役割を明らかにし、臨床医学への応用が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。