



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	渥美, 敏也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第6054号
Issue Date	2003-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6054
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32611
Type	doctoral thesis
File Information	6054.pdf



学 位 論 文

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

北 海 道 大 学

渥 美 敏 也

目 次

表題 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	1
目次	2
第一章 炎症性サイトカインと動脈硬化	5
1. 動脈硬化症の成因	6
2. プラークの破綻	7
3. 糖尿病患者における動脈硬化の特徴	8
4. 糖尿病性大血管障害、粥状動脈硬化症と炎症反応との関連	9
5. アディポサイトカインと動脈硬化	12
6. マクロファージ遊走阻止因子の発現と機能	13
7. MIF とシグナル伝達系	14
8. MIF と動脈硬化、糖代謝との関連	15
文献	17
第二章 マクロファージによる酸化低比重リポ蛋白の取り込みに対するマ クロファージ遊走阻止因子 (MIF) の役割	22
背景	23
実験方法	25

1. 実験材料	25
2. 細胞培養	25
3. Northern Blot Analysis	26
4. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	26
5. 酸化 LDL の分解活性と取り込み活性の測定	27
6. 統計処理	28
結果	29
1. 酸化 LDL 刺激による RAW 264.7 における MIF mRNA 発現誘導	29
2. RAW 264.7 における酸化 LDL 刺激による MIF 蛋白の分泌	34
3. RAW 264.7 における酸化 LDL の取り込み、分解に対する MIF の影響	38
考察	40
文献	42
第三章 骨格筋の糖代謝におけるマクロファージ遊走阻止因子の役割	44
背景	45
実験方法	47
1. 実験材料	47
2. 細胞培養	47

3. F2,6BP の測定	48
4. グルコース取り込み量の測定	48
5. 肝臓内グリコーゲン量の測定と生化学的検査	49
6. mRNA 発現量の解析	49
7. MIF の ELISA とウエスタンブロット解析	50
8. 動物実験	50
結果	52
1. 筋管細胞内 F2,6BP 量、乳酸産生量に対する MIF の影響	52
2. 筋管細胞における MIF 分泌に対する TNF- α の影響	54
3. TNF- α による F2,6BP 産生の増加、ブドウ糖取り込み亢進に対する MIF 抗体の影響	56
4. In vivo での TNF- α の解糖系への効果に対する抗 MIF 抗体の影響	58
考察	64
文献	67
謝辞	73

第一章

炎症性サイトカインと動脈硬化

1. 動脈硬化症の成因

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。脂質、糖代謝異常の解明は成人病の病態を知る上で不可欠である。

粥状動脈硬化の発症機序はRossらによる傷害反応仮説が一般的に受け入れられている (1)。粥状動脈硬化症の初期段階の病理学的特徴は細胞内に大量のコレステロールエステルを蓄積した泡沫細胞である。泡沫細胞の起源は単球由来のマクロファージおよび血管平滑筋細胞であり、特に初期の病変ではその大部分がマクロファージである。血管壁内に侵入したマクロファージは酸化低比重リポ蛋白(oxidized low density lipoprotein ; LDL)などの変性LDLを細胞内に蓄積し、脂肪線条と言われる初期病変を形成する。さらに血管平滑筋細胞が中膜から内膜へ遊走し収縮型から合成型に形質転換する。そしてコラーゲンやエラスチンといった細胞外マトリックスを産生することにより、内膜肥厚を促進し動脈硬化症を進展させる。この過程においては、血管内皮細胞および侵入したマクロファージが血管平滑筋に対する種々の因子を産生、放出する。また、粥状動脈硬化の病変部位にはT細胞の存在が知られ、これらの産生するサイトカインなどが病

変の進展に関与すると考えられている。

2. プラークの破綻

心筋梗塞死亡例の病理所見から、責任病巣となった冠動脈病変の多くは狭窄度が50%以下と軽度であることが知られている。このように心血管イベント発症には冠動脈の狭窄の程度よりも、プラークの性質（安定性）が重要である。つまりプラークの破綻とそれに続く血栓形成により、急性冠動脈症候群が発症する。

プラーク形成の背景には二つの因子が関与する。第一に血管壁におけるコレステロールエステルの蓄積、第二に血管壁における細胞成分の反応である。そして不安定プラークの形成はプラーク内での細胞成分の反応と平滑筋細胞の減少、コラーゲン量の減少に起因する。プラーク内で活性化されたマクロファージはマトリックスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinases ; MMPs）を産生しプラークの重要な構成成分である細胞外マトリックスを分解し線維性被膜を脆弱化させる。また粥種の肩の部分は血管新生に富みMMPsの発現のため脆弱であり、血管内腔にせり出しているため、流体学的なひずみの力を受けやすい。マクロファージは組織因子を高発現し、プラーク破綻後の血栓形成に重要と考えられている。また

線維性被膜を形成する平滑筋細胞のアポトーシスなどは粥種の破綻をきたし、急性冠動脈症候群の発症にいたると考えられている (2-4)。不安定狭心症は安定型に比し、血管平滑筋のアポトーシスが増加している。In vitroの解析で酸化ストレスにより血管平滑筋において、p53、Bax、Fas、Bcl-2などの遺伝子発現が調節されている。

3. 糖尿病患者における動脈硬化の特徴

糖尿病では細小血管合併症だけでなく、大血管合併症も発症率が高いことが知られている。さらに *impaired glucose tolerance* (IGT) の患者でもこれらの合併症が多いことが特徴的であり、この点が細小血管合併症と異なり、その発症機序も十分に明らかになっていない。さらに、食後血糖の上昇が脳梗塞や冠動脈疾患と関連することが報告され、大血管合併症には恒常的な血糖のレベルよりも血糖の上下や他の因子の関連も重要である。糖尿病性大血管合併症発症のメカニズムには高血糖、リポ蛋白代謝異常、内臓脂肪蓄積を基盤とする脂肪細胞由来生理活性物質（アディポサイトカイン）など、多数の因子が複雑に関与している。

インスリン抵抗性は高インスリン血症を招き、動脈硬化発症の危険因子である。種々の炎症性サイトカインがインスリン抵抗性と動脈硬

化症の両者に深く関与する。

4. 糖尿病性大血管障害、粥状動脈硬化症と炎症反応との関連

近年、動脈硬化症を炎症性疾患であるとする考え方が確立し、病変部位での種々のサイトカインや接着因子の発現亢進が重要であることが明らかとなった。粥状動脈硬化は血流による shear stress や酸化 LDL、糖化産物などさまざまな要因による血管内皮細胞の障害ではじまる。はじめに酸化の程度が低い minimally modified LDL (mmLDL) が血管内皮細胞に直接作用して MCP-1 の発現を誘導し (5)、単球が血管壁に呼び寄せられることがわかってきた。単球が血管壁に侵入するには活性化された内皮細胞に発現する VCAM-1、ICAM-1、PECAM-1 といった接着分子が必要である (6, 7)。単球は、炎症局所で活性化された血管内皮細胞に発現する P-セレクチンや E-セレクチンと結合し、その後、血管内皮細胞上の VCAM-1 や ICAM-1 と強固に接着する。血管内皮に接着した単球は血管壁を乗り越えて内膜下に移行する。また活性化した血管内皮細胞は MCP-1、IL-1、IL-6、IL-8 などのサイトカインを産生したり、組織因子(tissue factor)、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター 1(plasminogen activator inhibitor-1; PAI-1)などの凝固系因子を発現し、

凝固系の活性化を促す (8)。これらの炎症性因子の発現は、初期動脈硬化病変部位に選択的に単球やリンパ球を動員することとなる。

組織内に移行した単球はマクロファージへと分化し特異的レセプターを介して酸化 LDL を取り込み泡沫化し、脂肪線条(fatty streak)と呼ばれる初期病変を形成する。活性化された血管内皮細胞からは血小板由来増殖因子(platelet derived growth factor ; PDGF)やヘパリン結合上皮増殖因子(heparin-binding epidermal growth factor ; HB-EGF)といった増殖因子が産生され、血管平滑筋細胞の中膜から内膜への遊走と増殖を惹起させる。活性化されたマクロファージや泡沫細胞は TNF- α や IL-1、IL-6 をはじめとするサイトカインを分泌し、これらのサイトカインが血管内皮細胞をさらに活性化する (9)。また TNF- α や IL-1 は血管内皮細胞や血管平滑筋細胞に作用しマトリックスメタロプロテアーゼの発現を誘導し、これらによる細胞外マトリックスの分解が血管内皮下へのマクロファージの侵入や平滑筋細胞の内膜への遊走を容易にし、動脈硬化病変の進展にかかわっていると考えられる (10)。このように動脈硬化症は炎症反応、凝固亢進、マトリックス分解の過程を経て形成され急性冠動脈症候群にいたる。

一方インターフェロン γ (IFN- γ)は抗動脈硬化作用をもち、スカベ

ンジャーレセプターの減少、コラーゲン合成の抑制、そして血管平滑筋細胞の増殖抑制作用を示す。アポ・E と IFN- γ のダブルノックアウトマウスはアポ E のみのノックアウトマウスと比較して動脈硬化巣の形成が有意に抑制されていることや、コラーゲンの合成が抑制されていること、抗動脈硬化性リポ蛋白であるアポ A が増加していることが報告された (11)。また、動脈硬化の促進作用として、マクロファージや血管内皮細胞、血管平滑筋細胞による炎症誘発性サイトカインの産生やクラス II 主要組織適合抗原(MHC)分子の発現を促進する。

最近、高感度 CRP 測定の開発に伴い、微量の CRP の増加が冠動脈疾患のリスクを高めることが明らかになり、スタチンに CRP 低下作用を持つことが報告された (12)。またスタチンが IFN- γ のシグナルを抑制することで血管内皮細胞の抗原提示能を抑制し、T 細胞の活性化を抑制することが報告された (13)。このようにスタチンが脂質代謝改善作用に加え、pleiotropic effect と呼ばれる抗動脈硬化作用をもっていることが明らかになった。

糖尿病における大血管障害のメカニズムは炎症性サイトカインや、終末糖化産物(advanced glycation endproducts ; AGE)、酸化ストレスなどが働き血管内皮障害が惹起され、さらにこれらの因子が平滑筋細胞、

マクロファージ、内皮細胞、T 細胞にシグナルを伝え、NF- κ B を通じて核内の遺伝子に働き炎症反応として、TNF- α 、IL-1、M-CSF など種々の蛋白を合成することも明らかにされつつある (14)。またアディポネクチンも肥満を伴った糖尿病では重要な脂肪細胞から産生される因子として注目されている。

5. アディポサイトカインと動脈硬化

近年、過栄養に基づく内臓脂肪蓄積がインスリン抵抗性および 2 型糖尿病の発症と密接に関与していると言われている。脂肪細胞はアディポサイトカインと総称される多彩な生理活性物質を分泌する。アディポサイトカインは TNF- α や PAI-1 など内臓脂肪の蓄積に伴い血中濃度が増加するものと、逆にアディポネクチンなど血中濃度が低下するものが存在する。TNF- α 産生の増加はインスリン抵抗性を惹起し、PAI-1 の産生増加は血栓形成を促進する (15)。アディポネクチンは冠動脈疾患、糖尿病性大血管合併症で有意に低値であり、血中濃度はインスリン感受性の指標と強い正相関を示す (16)。アディポネクチン欠損マウスは高脂肪高蔗糖食で著名なインスリン抵抗性を示し、アディポネクチンは過栄養状態において、インスリン抵抗性の発症に重要な役割を果たしていると思

われる。

アディポネクチンの血管に対する作用として障害血管に集積し、血管内皮細胞における単球接着分子の発現 (16, 17)、マクロファージの泡沫化 (18)、血管平滑筋の増殖といった動脈硬化の進展因子をすべて抑制することが報告されている (19)。

6. マクロファージ遊走阻止因子の発現と機能

マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor ; MIF) は遅延型アレルギー反応に関与する液性因子として30年以上も前に発見されたが、その機能や病態における意義はいまだ不明な点が多い。1989年、ヒトMIF cDNAがクローニングされて以来 (20)、MIFが炎症、免疫応答のみならず生体の恒常性の維持など幅広い生理的役割を担う事が次々に報告された (21)。MIFはTリンパ球のみならず種々の細胞で発現していることが報告されている。免疫系ではTリンパ球、単球、マクロファージ、好酸球などが主要な産生細胞である。特記すべきMIFの機能として、下垂体前葉から分泌されるエンドトキシンショックの致死率を高める主要な因子であること (22)、グルココルチコイドの抗炎症作用を抑制し炎症を惹起するユニークな作用を有すること (23)、またTリンパ球の活性化に

必須な因子であることなどがあげられる (24)。一方、MIFが成長因子の刺激により発現がうながされること (25)、レンズ細胞や脳の発生過程で時期特異的に発現され、臓器形成に関与する可能性のあること (26, 27)、また皮膚や角膜などの増殖の盛んな基底細胞層や未分化な骨芽細胞で発現が増加していることなどが報告されてきた (28)。このことからMIFが炎症性サイトカインのみならず、細胞の分化、増殖においても重要な役割を担っていることが明らかになってきた。さらにMIFの発現が腫瘍組織あるいは癌転移巣で著しく上昇していることも報告され (29)、癌細胞の増殖や転移における機能と役割についても関心が集まっている。

さらにMIFは、単球、マクロファージにおけるToll-like receptor 4の発現を誘導し、感染にたいする炎症反応を増強することが報告されている。

7. MIF とシグナル伝達系

線維芽細胞をMIFで刺激すると phospholipase A₂(PLA₂)が活性化され、引き続いて細胞増殖が誘導されることが報告された (30)。PLA₂はアラキドン酸カスケードからの生理活性脂質の産生を誘導するが、MIFはそのシグナル伝達系に p44/p42 ERK の持続的な刺激を介して関与する。

またリウマチ患者由来の滑膜細胞を MIF で刺激すると、matrix metalloproteinase (MMP)-1,3 の発現が上昇する。MMP mRNA の発現の上昇は刺激後 6 時間からみられ、その発現に先行して c-jun/c-fos mRNA の上昇を認めた。その発現は tyrosine kinase の阻害剤(genistein、herbimycin A)および protein kinase C の阻害剤(staurosporin、H-7)により有意に抑制された。同様に AP-1 の阻害剤である curcumin によっても阻害された。したがって MIF は tyrosine kinase、protein kinase C、AP-1 を介する経路を介して MMP の発現を上昇させると報告されている (31)。

最近 MIF が endocytosis により細胞内に取り込まれ、細胞内蛋白質である Jab1 と特異的に結合することが報告された。Jab1 は JNK を活性化するので、MIF は Jab1 と細胞質中で結合し、JNK の活性化を阻害することにより、c-Jun のリン酸化を抑制し、AP-1 の活性化を阻害すると示唆されている。また Jab1 は cyclin-dependent kinase inhibitor (CDK1)p27^{kip1} の分解を促進する。MIF は Jab1 と結合して CDK1 p27^{kip1} の分解を阻害することにより細胞周期を制御する (32)。

8. MIF と動脈硬化、糖代謝との関連

前述のようにMIFは炎症、免疫反応における重要な調節因子であり、高脂血症、動脈硬化との関連を示唆する報告もされている。ラットにおける高脂肪食誘因糸球体傷害モデルにおいてMIFが腎臓に高発現していること (33)、ヒト動脈硬化巣にMIFが高発現し動脈硬化の進行に応じてMIFの発現が強くなることが報告されている (34)。また、MIFは2型糖尿病患者での血中濃度が健常人に比較して高いこと (35)、膵β細胞に発現するインスリンの分泌促進因子であること、脂肪組織に発現しTNF- α やインスリン、グルコースの刺激で分泌されることが明らかになっている。したがってMIFは炎症性サイトカインとして糖尿病における大血管障害、とくにマクロファージの泡沫化や不安定プラークの形成に寄与する可能性がある。またアディポサイトカインとしてインスリン抵抗性や糖代謝とも密接に関与する可能性がある。今回私は糖尿病患者における大血管障害の成因に関するMIFの役割に関して、酸化LDL刺激によるMIFの発現と分泌、マクロファージにおける酸化LDLの取り込みと分解に関して検討した。

また第三章では、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おけるMIFの役割をin vitro、in vivoの両面から検討した。

文献

1. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126 (1999).
2. Dollery, C.M., McEwan, J.R. & Henney, A.M. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 77, 863-868 (1995).
3. Libby, P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 91, 2844-2850 (1995).
4. Boyle, J.J., Bowyer, D.E., Weissberg, P.L. & Bennett, M.R. Human blood-derived macrophages induce apoptosis in human plaque-derived vascular smooth muscle cells by Fas-ligand/Fas interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1402-1407 (2001).
5. Cushing, S.D. et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5134-5138 (1990).
6. Kume, N., Cybulsky, M.I. & Gimbrone Jr, M.A. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 90, 1138-1144 (1992).
7. Kita, T. et al. Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 947, 199-205 discussion 2 (2001).
8. Mantovani, A., Bussolino, F. & Introna, M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today* 18, 231-240 (1997).
9. Wilcox, J.N., Nelken, N.A., Coughlin, S.R., Gordon, D. & Schall,

T.J. Local expression of inflammatory cytokines in human atherosclerotic plaques. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 1 Suppl 1, S10-S13 (1994).

10. Rajavashisth, T.B. et al. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 274, 11924-11929 (1999).

11. Gupta, S. et al. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest* 99, 2752-2761 (1997).

12. Strandberg, T.E., Vanhanen, H. & Tikkanen, M.J. Effect of statins on C-reactive protein in patients with coronary artery disease. *Lancet* 353, 118-119 (1999).

13. Kwak, B., Mulhaupt, F., Myit, S. & Mach, F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 6, 1399-1402 (2000).

14. Collins, T. & Cybulsky, M.I. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* 107, 255-264 (2001).

15. Shimomura, I. et al. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med* 2, 800-803 (1996).

16. Ouchi, N. et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100, 2473-2476 (1999).

17. Ouchi, N. et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102, 1296-1301 (2000).

18. Ouchi, N. et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor

expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103, 1057-1063 (2001).

19. Arita, Y. et al. Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation* 105, 2893-2898 (2002).

20. Weiser, W.Y. et al. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7522-7526 (1989).

21. Nishihira, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth. *J Interferon Cytokine Res* 20, 751-762 (2000).

22. Bernhagen, J. et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 365, 756-759 (1993).

23. Calandra, T. et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377, 68-71 (1995).

24. Bacher, M. et al. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7849-7854 (1996).

25. Lanahan, A., Williams, J.B., Sanders, L.K. & Nathans, D. Growth factor-induced delayed early response genes. *Mol Cell Biol* 12, 3919-3929 (1992).

26. Wistow, G.J., Shaughnessy, M.P., Lee, D.C., Hodin, J. & Zelenka, P.S. A macrophage migration inhibitory factor is expressed in the differentiating cells of the eye lens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1272-1275 (1993).

27. Kobayashi, S. et al. Expression pattern of macrophage migration

inhibitory factor during embryogenesis. *Mech Dev* **84**, 153-156 (1999).

28. Shimizu, T., Ohkawara, A., Nishihira, J. & Sakamoto, W. Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human skin and its immunohistochemical localization. *FEBS Lett* **381**, 199-202 (1996).

29. Meyer-Siegler, K. & Hudson, P.B. Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology* **48**, 448-452 (1996).

30. Mitchell, R.A., Metz, C.N., Peng, T. & Bucala, R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem* **274**, 18100-18106 (1999).

31. Onodera, S. et al. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *J Biol Chem* **275**, 444-450 (2000).

32. Kleemann, R. et al. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature* **408**, 211-216 (2000).

33. Miyazaki, K. et al. Up-regulation of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and migration inhibitory factor (MIF) expression and monocyte recruitment during lipid-induced glomerular injury in the exogenous hypercholesterolaemic (ExHC) rat. *Clin Exp Immunol* **108**, 318-323 (1997).

34. Burger-Kentischer, A. et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1561-1566 (2002).

35. Yabunaka, N. et al. Elevated serum content of macrophage

migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23, 256-258 (2000).

第二章

マクロファージにおける酸化低比重リポ蛋白の取り込みに対するマクロ
ファージ遊走阻止因子 (MIF) の役割

背景

高脂血症は動脈硬化の主要な危険因子である。高脂血症によって誘導される血管壁の細胞浸潤と線維化は動脈硬化巣の病理学的特徴としてしばしば見受けられる。動脈硬化症では低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein : LDL) の酸化的修飾が重要なステップである。LDL 粒子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、血管壁を構成するマクロファージ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(1、2)。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(3)。

マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor : MIF) は遅延型過敏反応に関与する液性因子として発見されたが、炎症、免疫反応のみならず幅広い生理的役割を担うことが次々と報告された。近年、MIF が成長因子の刺激により発現が促されることや脳の発生過程で時期特異的に発現されることも報告され、細胞の分化、増殖さらに血管新生にも関与することが知られている(4、5)。特に MIF は、マ

クロファージのラテックスビーズ貪食能の亢進にオートクライン、パラクラインで作用する(6)。また MIF は MMPs の産生を刺激することも明らかになった。したがって、MIF は酸化 LDL の刺激でマクロファージから産生、分泌され泡沫細胞の形成や、続いて起こる細胞浸潤、増殖などの動脈硬化巣の形成過程さらに不安定プラークの形成と急性冠動脈症候群に関与している可能性がある。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。

本研究では酸化 LDL 刺激による MIF の発現および酸化 LDL の取り込みと分解に対する MIF の作用について解析し、MIF の動脈硬化発症機構への関与について検討した。

実験方法

1. 実験材料

ポリクローナル抗 MIF 抗体はリコンビナントラット MIF を New Zealand white rabbit に免疫して作成した。IgG 分画の採取はプロテイン A セファロースを用いた。LDL ($d=1.019-1.063$) は超遠心法によって健常人空腹時血漿から分離した(7)。酸化 LDL は LDL に $5\text{ }\mu\text{M}$ の CuSO_4 を添加し、無菌的に 37°C 、24 時間インキュベーション後、 1mM EDTA を添加し反応を停止させ、 1mM EDTA 含有 PBS で透析後濃縮し調整した。アガロースゲル電気泳動で LDL の純度を確認した(8)。過酸化脂質は malondialdehyde (MDA) を標準に使用した TBARS (Thiobarbituric acid-reactive substances) 法およびアガロースゲル電気泳動で確認した。AGE-BSA は 50 mg/ml BSA を 0.5 M リン酸バッファー ($\text{pH } 7.4$) 中で 2.5 M D-glucose と 37°C で 7 週間インキュベーションし PBS で透析し調整した。

2. 細胞培養

マウスマクロファージ様細胞株である RAW 264.7 は American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA) から購入した。細

胞は 10% FCS、2 nM glutamine、100 U/ml penicillin、100 mg/ml streptomycin 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で 37°C、5% CO₂ で培養した。

3. Northern Blot analysis

ノーザンブロット法は既報の方法に準じて行った(9)。Isogen (Nippon Gene、富山) により RNA を抽出後、total RNA (10 µg) を 0.6 M フォルムアルデヒド含有アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレンにトランスファーした。ランダムプライマーラベリングキット (Takara、京都) を用いて MIF cDNA を ³²P[dCTP] で標識し、42°C、16 時間ハイブリダイゼーションを施行した。洗浄は 0.2×SSC および 0.1% SDS を使用した。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA 発現量を対照にもちいた。

4. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

96 ウェルプレートに抗 MIF 抗体を固相化し、0.5% BSA 含有 PBS

でブロッキングをした。培養上清を 10 倍希釈し、ブロッキング済プレートに添加後室温で一時間静置した。0.05% Tween 20 含有 PBS で三回洗浄後ビオチン標識抗 MIF 抗体を添加した。室温で一時間静置後、洗浄バッファーで三回洗浄した。アビジン標識ペルオキシダーゼを添加し、室温で 15 分静置した。三回洗浄後、基質を添加し 20 分後 4N 硫酸で反応停止させ、492 nm の吸光度を測定した。

5. 酸化 LDL の分解活性と取込み活性の測定

LDL の ^{125}I 標識は Iodo-Gen (Pierce, Rockford, IL, USA) を使用した (specific activity, 110 cpm / ngLDL protein)。RAW 264.7 に ^{125}I -oxLDL を添加後 4 時間静置し、培養上清を採取した(10)。40% 氷冷トリクロロ酢酸を添加し、硝酸銀を加え、2000 rpm、10 分間遠心分離した。上清中放射活性を測定し分解活性とした。また細胞を 1% BSA 含有 PBS で二度洗浄後、0.1N NaOH で溶解し取込み活性を測定した。細胞を含まないウェルを対照とした。また非特異的酸化 LDL の分解、取込み活性を、50 倍量の非標識酸化 LDL の存在下で測定し、測定値から非特異的活性を引いて特異的分解、取込み酸化 LDL 活性とした(11)。また蛋

白濃度を BCA 試薬(Pierce, Rockford, IL, USA)で測定し各測定値を蛋白量で補正した。

6. 統計処理

統計学的分析は unpaired Student's t-test を用いた。

結果

1. 酸化 LDL 刺激による RAW 264.7 における MIF mRNA 発現誘導

RAW 264.7 を酸化 LDL (10~50 $\mu\text{g/ml}$) で 12 時間刺激し、MIF mRNA 発現量をノーザンブロット法で解析した。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。しかし native LDL は MIF mRNA 発現量に変化を与えなかった (Figure 1)。また酸化 LDL と同様に糖尿病性大血管障害の成因に関与すると考えられている AGE についても同様の検討を行った。しかし AGE-BSA は BSA と同様に RAW 264.7 における MIF mRNA の発現に影響を与えなかった (Figure 2)。

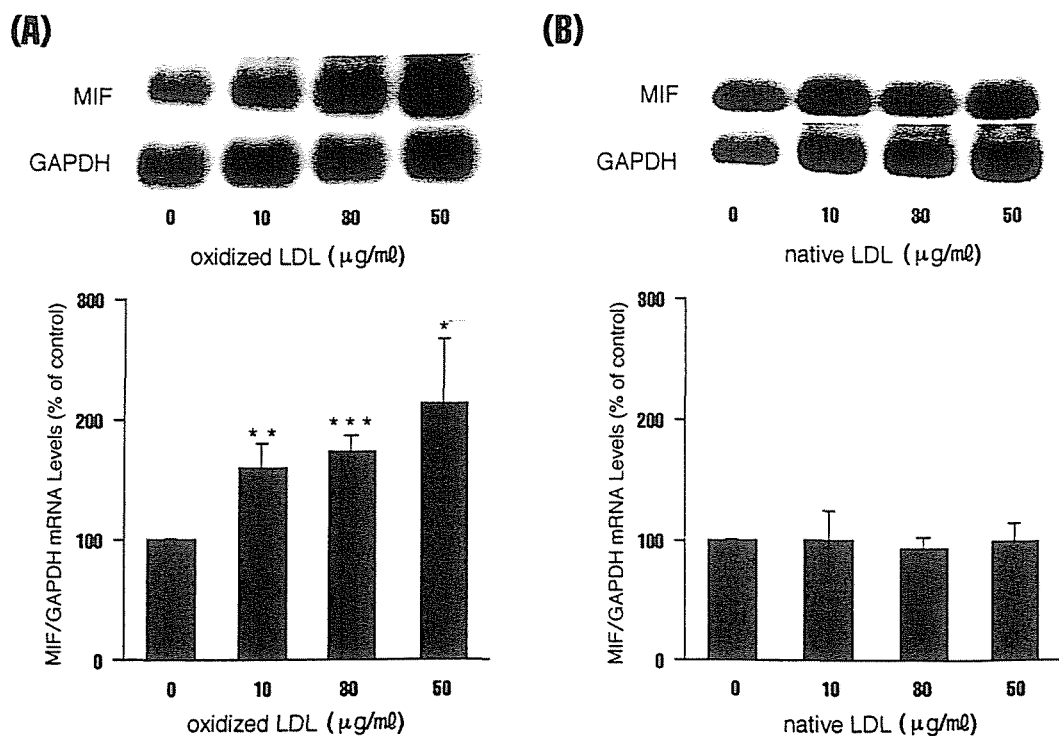


Figure 1. MIF mRNA expression of RAW 264.7 cells induced by native LDL and oxLDL

Cells ($8 \times 10^5/\text{ml}$) were harvested and then resuspended in DMEM containing 10% FCS. After incubation for 3 h at 37°C with 5% CO_2 , the cells were stimulated for 12 h by oxLDL (A) or native LDL (B) in DMEM containing 1% FCS, and Northern blot analysis was carried out. The cells' expression level was normalized relative to that of GAPDH mRNA. The upper panel shows a representative pattern of three experiments, and the lower panel shows the mean $\pm$ SD values after densitometric analysis of three blots with data expressed as the % change compared with the control value. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ in comparison with control using unpaired Student's *t*-test.

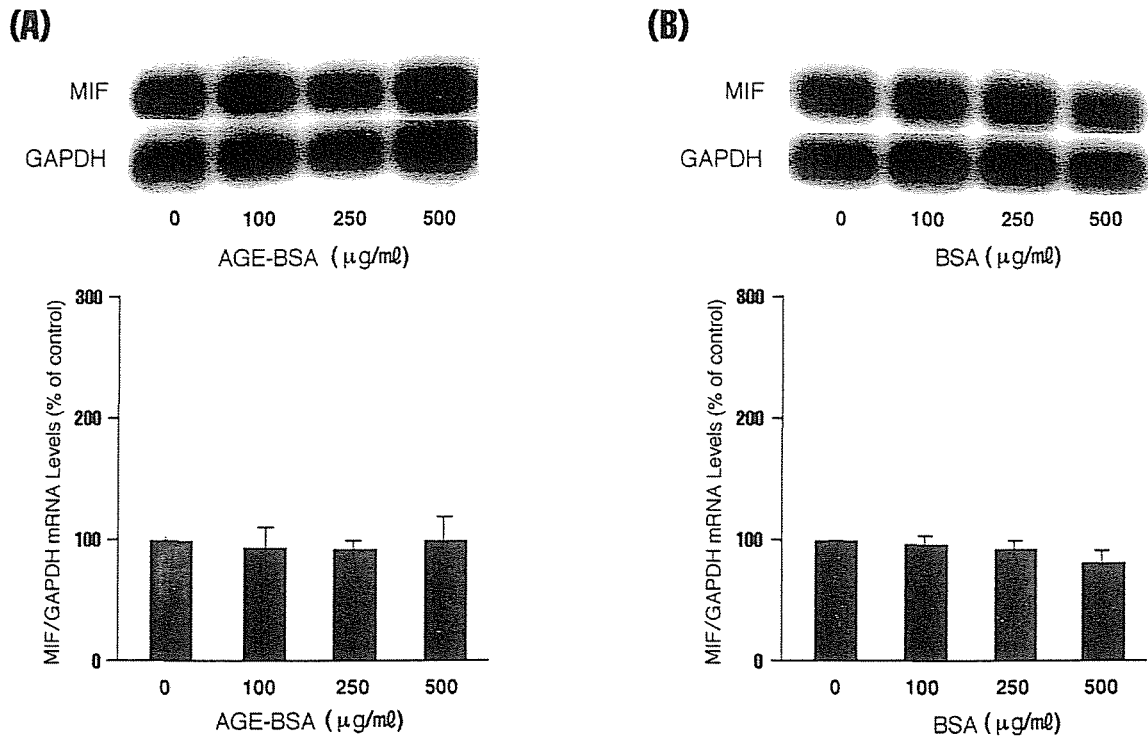


Figure 2. MIF mRNA expression of RAW 264.7 cells stimulated by AGE-BSA and BSA.

Cells ($8 \times 10^5/\text{ml}$) were harvested and then resuspended in DMEM containing 10% FCS. After incubation for 3 h at 37°C with 5% CO_2 , the cells were stimulated for 12 h by AGE-BSA (A) or BSA (B) in DMEM containing 1% FCS, and Northern blot analysis was carried out. The cells' expression level was normalized relative to that of GAPDH mRNA. The upper panel shows a representative pattern of three experiments, and the lower panel shows the mean $\pm$ SD values after densitometric analysis of three blots with data expressed as the % change compared with the control value.

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 (Figure 3)。

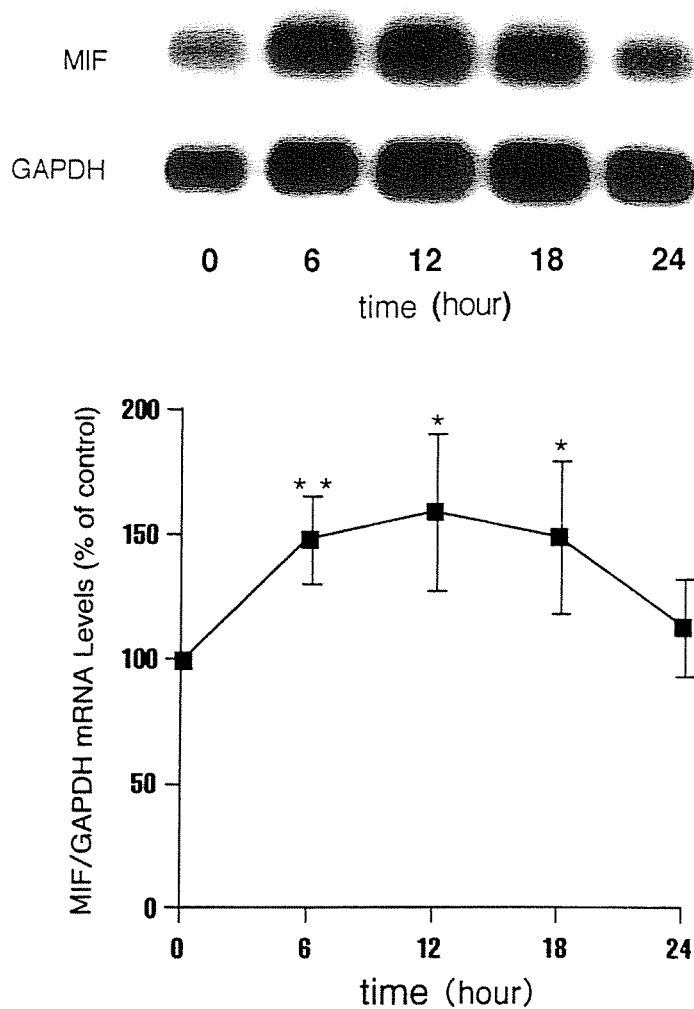


Figure 3. Time-course study on MIF mRNA expression of RAW 264.7 cells, as induced by oxLDL

Cell culture performed in the presence oxLDL (50 $\mu\text{g/ml}$), and MIF mRNA levels were determined in the same manner as described in Figure 1. The upper panel shows a representative pattern of three experiments, and the lower panel the mean $\pm$ SD values after desitometric analysis of three blots with data expressed as the % change compared with the control value. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, in comparison with control.

2. RAW 264.7 における酸化 LDL 刺激による MIF 蛋白の分泌

酸化 LDL 刺激による RAW 264.7 の MIF 分泌能を検討するため、培養上清中 MIF 濃度を ELISA 法で測定した。MIF の培養上清中への分泌は酸化 LDL の濃度依存性(10-50 $\mu\text{g/ml}$)に有為に増加し、native LDL は培養上清中 MIF 濃度に影響を与えなかった (Figure 4)。また酸化 LDL は時間依存性に培養上清中 MIF 濃度を増加させた。しかし native LDL では培養上清中 MIF 濃度は変化しなかった (Figure 5)。さらに AGE-BSA 刺激でも MIF の培養上清中への分泌は認められなかった (Figure 6)。

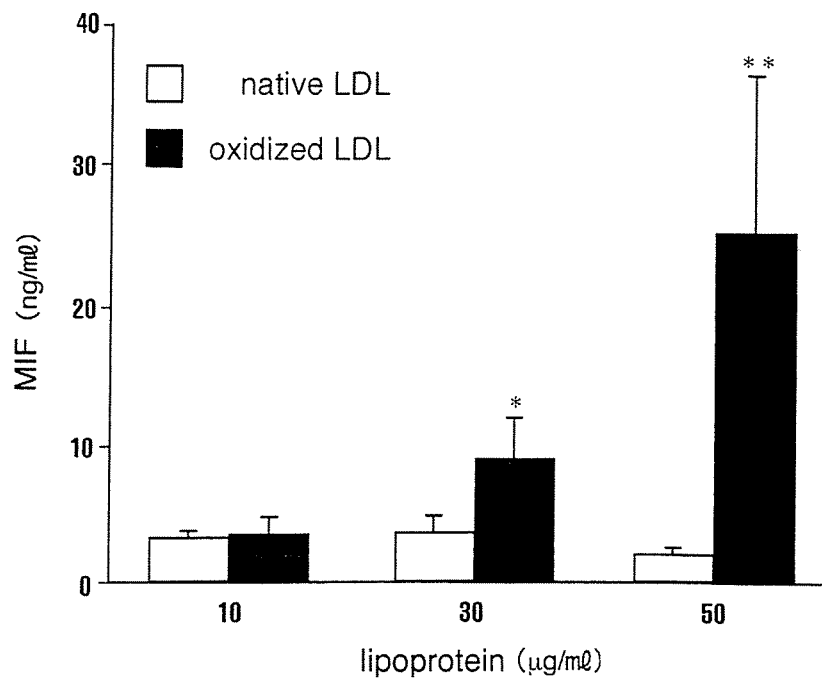


Figure 4. Dose-dependencies of MIF release induced by native and oxLDL.

RAW 264.7 cells ($8 \times 10^5/\text{ml}$) were incubated with various concentration of native LDL or oxLDL for 24 h in DMEM containing 1% FCS. MIF content was determined by ELISA. Values represent mean $\pm$ SD of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ in comparison with native LDL.

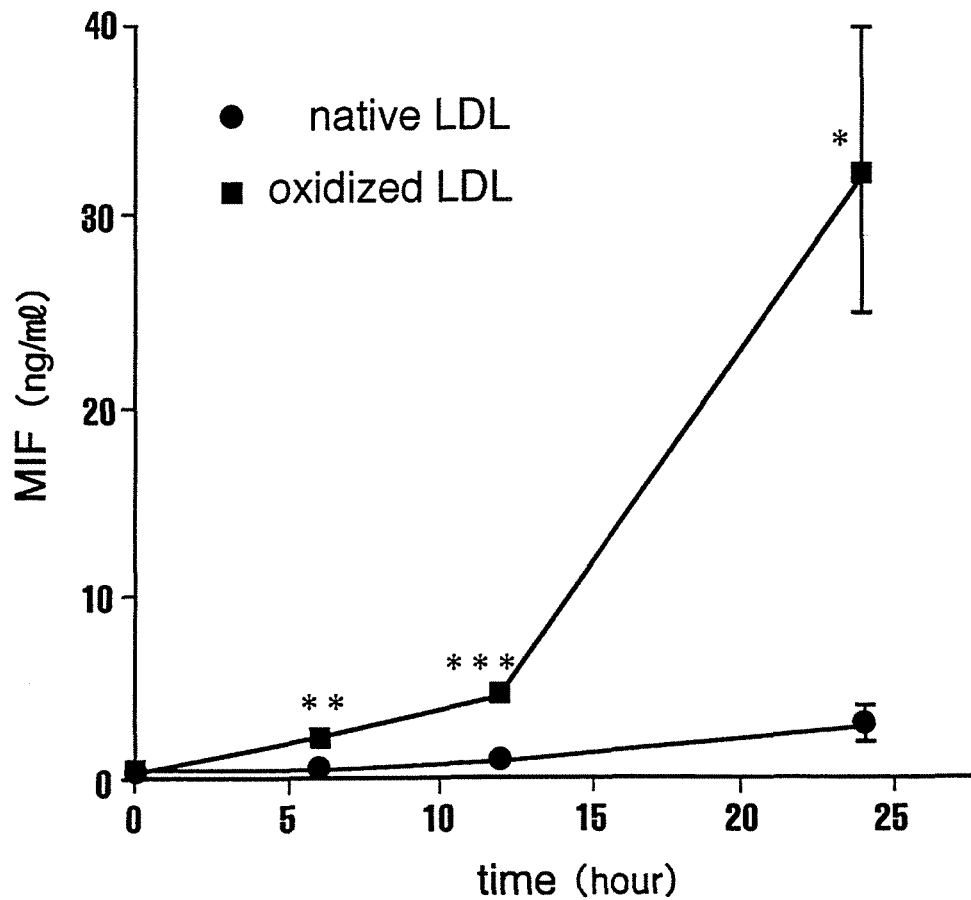


Figure 5. Time course analysis of oxLDL induced MIF release by RAW264.7 cells.

RAW 264.7 cells ($8 \times 10^5/\text{ml}$) were incubated with $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ of native LDL or oxLDL in DMEM containing 1% FCS. MIF content was determined by ELISA. Values represent mean $\pm$ SD of three independent experiments. * $P < 0.005$, ** $P < 0.0005$, *** $P < 0.0001$

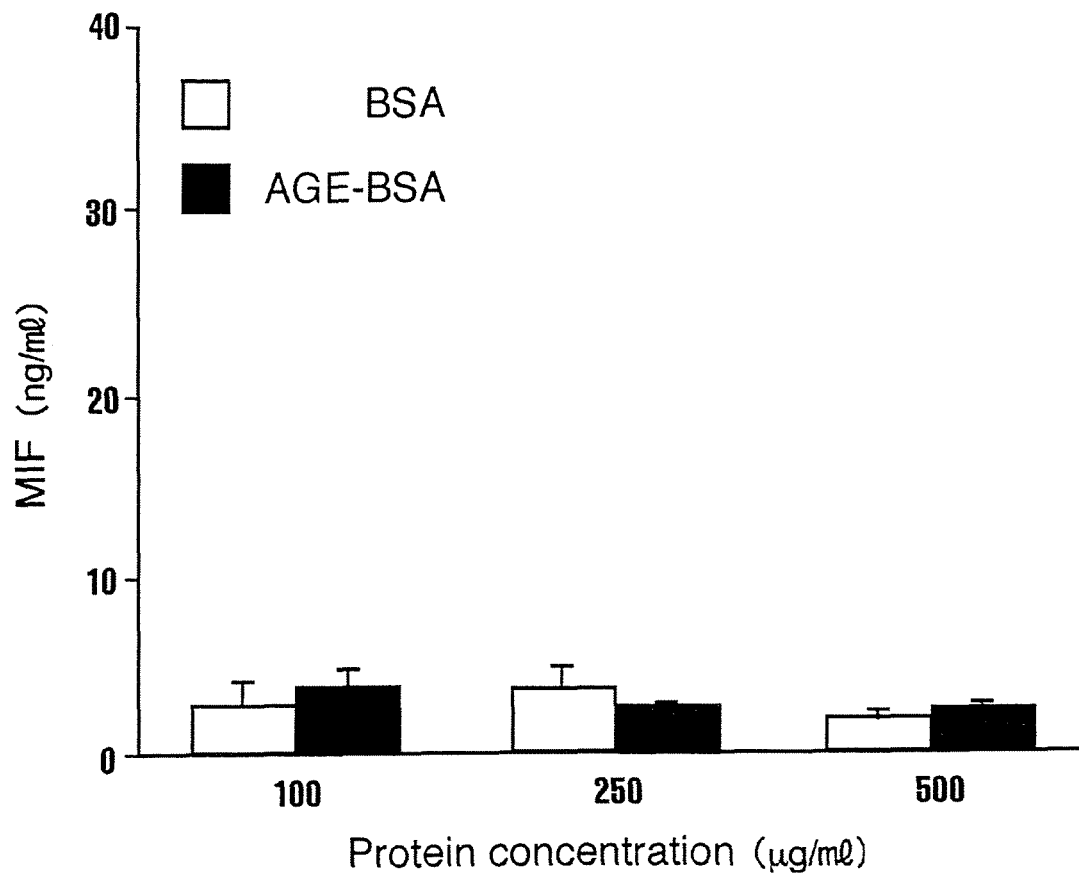


Figure 6. Effect of AGE-BSA on MIF release from RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells ($8 \times 10^5/\text{ml}$) were incubated with various concentration of AGE-BSA or BSA for 24 h in DMEM containing 1% FCS. MIF content was determined by ELISA.

3. RAW 264.7 における酸化 LDL の取込み、分解に対する MIF の影響

MIF の生物学的機能を解析するため、MIF の RAW 264.7 における酸化 LDL の取込み、分解に与える影響を測定した。細胞を無血清培地 (Cos medium : Cosmo Bio、東京) に変更後 MIF を添加し 48 時間 37°C で培養した。¹²⁵I 標識 oxLDL を添加後 37°C で 4 時間培養し放射活性を測定した。MIF は RAW 264.7 における酸化 LDL の取込み、分解を有為に増加させた (Figure 7)。

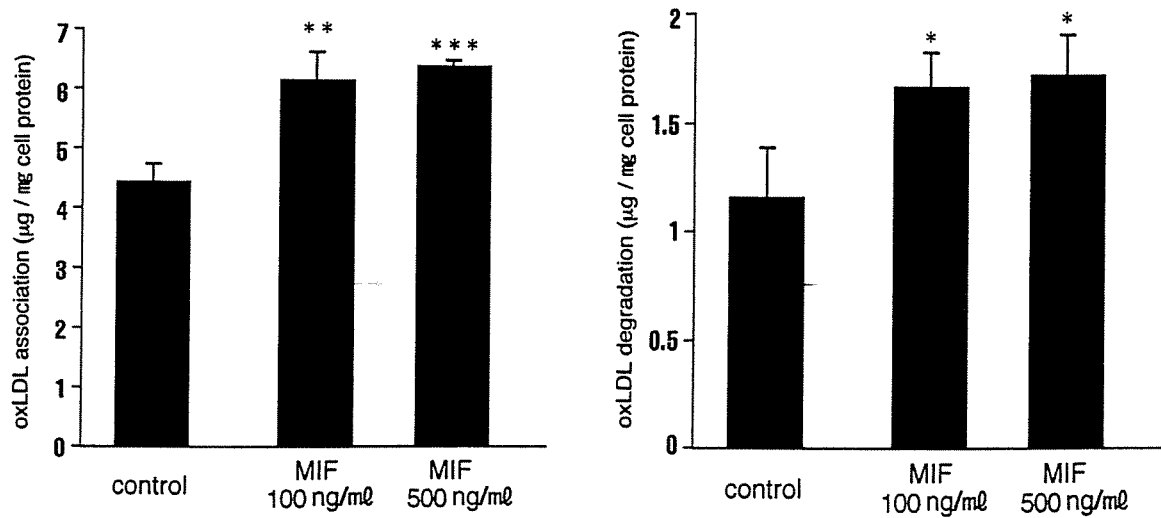


Figure 7. Effects of MIF on cellular association and degradation of ^{125}I -oxLDL.

RAW 264.7 cells (4×10^5 per 16 mm dish) were preincubated with MIF (100 ng/ml or 500 ng/ml) in serum free Cosmedium (Cosmo-Bio, Tokyo, Japan) for 48 h at 37°C . Then $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ of ^{125}I -labelled oxLDL was added to the cells which were further incubated for 4 h at 37°C . (A) cellular association, (B) cellular degradation. Values represent mean $\pm$ SD of three experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ in comparison with non-stimulated control.

考察

マクロファージは過酸化脂質の生成や炎症性サイトカインの産生などの点で動脈硬化の形成に重要な役割を果たす。これらのサイトカインは血管壁に存在する平滑筋細胞、マクロファージなどを活性化する。とくに酸化 LDL は生理活性の高い分子の産生を刺激するとともに、細胞増殖も誘導する(12)。MIF は炎症性サイトカインとして同定され、グルコルチコイドの作用を抑制する(13)。私の今回の研究で酸化 LDL がマクロファージの MIF mRNA の発現を誘導し MIF 蛋白の分泌を促すことが解明された。また最近 MIF が線維芽細胞の増殖を刺激する作用を有することも報告された(14)。したがって MIF は血管壁における炎症反応のみならず、マクロファージや平滑筋細胞の増殖作用を有する可能性がある。さらに MIF はマクロファージを活性化し TNF- α のような他のサイトカインの産生を調節することが報告されている(13)。TNF- α がヒト動脈硬化巣で同定されていることは興味深い。そして TNF- α は細胞増殖、血管新生、細胞壊死を引き起こす。したがって MIF と TNF- α は互いに関連して動脈硬化を形成していく可能性がある。

MIF は RAW 264.7 における酸化 LDL の取込みを刺激することが解明された。MIF がマクロファージの異物貪食機能を刺激するという報告

と考えあわせると、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 が MMPs 産生刺激作用をもちことから、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係することが考えられる。

この研究で酸化 LDL が MIF の発現を誘導し、また MIF がオートクライン、パラクライン作用で酸化 LDL の取込み、分解を助長していることが示された。そして MIF は高脂血症、肥満、糖尿病などの成人病の病態に関与している可能性が示唆された。

文献

1. Fogelman, A.M. et al. Lymphokines secreted by an established lymphocyte line modulate receptor-mediated endocytosis in macrophages derived from human monocytes. *J Immunol* **131**, 2368-2373 (1983).
2. Fogelman, A.M. et al. Lymphocyte-conditioned medium protects human monocyte-macrophages from cholesteryl ester accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 922-926 (1982).
3. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809 (1993).
4. Bucala, R. MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. *FASEB J* **10**, 1607-1613 (1996).
5. Nishihira, J. Novel pathophysiological aspects of macrophage migration inhibitory factor (review). *International Journal of Molecular Medicine* **2**, 17-28 (1998).
6. Onodera, S. et al. Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. *Immunology* **92**, 131-137 (1997).
7. Hatch, F.T. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv Lipid Res* **6**, 1-68 (1968).
8. Steinbrecher, U.P. Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J Biol Chem* **262**, 3603-3608 (1987).
9. Sakai, M., Nishihira, J., Hibiya, Y., Koyama, Y. & Nishi, S. Glutathione binding rat liver 13k protein is the homologue of the

macrophage migration inhibitory factor. *Biochem Mol Biol Int* 33, 439-446 (1994).

10. Sparrow, C.P., Parthasarathy, S. & Steinberg, D. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem* 264, 2599-2604 (1989).

11. Yagi, K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 15, 212-216 (1976).

12. Yui, S., Sasaki, T., Miyazaki, A., Horiuchi, S. & Yamazaki, M. Induction of murine macrophage growth by modified LDLs. *Arterioscler Thromb* 13, 331-337 (1993).

13. Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R.A. & Bucala, R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 179, 1895-1902 (1994).

14. Mitchell, R.A., Metz, C.N., Peng, T. & Bucala, R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem* 274, 18100-18106 (1999).

15. Miyazaki, K. et al. Up-regulation of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and migration inhibitory factor (MIF) expression and monocyte recruitment during lipid-induced glomerular injury in the exogenous hypercholesterolaemic (ExHC) rat. *Clin Exp Immunol* 108, 318-323 (1997).

第三章

骨格筋の糖代謝におけるマクロファージ遊走阻止因子の役割

背景

外傷、感染、組織浸潤などのストレスにはしばしば炭水化物、脂質、蛋白質の動因を伴うエネルギー代謝が起こる。この反応における初期段階で組織における乳酸産生の増加、一過性高血糖およびインスリン抵抗性が惹起される。続いて肝臓におけるグリコーゲンの減少と一過性低血糖が起こる。もし炎症反応が十分に解決されなければ、過剰なエネルギー消費を招き、悪液質、さらに死へといたる (1)。この異化作用の進展には内分泌反応と炎症性サイトカインの働きが重要である。炎症反応において高濃度で循環しているサイトカインの中で、TNF- α はその代謝作用が注目されている (1)。生体におけるブドウ糖利用の主要臓器である骨格筋で、TNF- α は解糖系の主要な活性化因子であるFructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP) の産生を誘導し乳酸産生を増加させる。しかしながら TNF- α は直接骨格筋の糖代謝に影響するのではなく、下流に存在する別な因子を介して作用するとも考えられている (2, 3)。一方 TNF- α は全身性炎症反応の結果起こるインスリン抵抗性に関与する。そして肥満、糖尿病におけるインスリン抵抗性の形成に寄与していると考えられている (1, 4, 5)。

マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は、炎症、免疫反応におけ

る重要な調節因子である (6, 7)。MIF は T リンパ球のみならず種々の細胞で発現していることが報告されている (8-13)。免疫系では T リンパ球、単球、マクロファージ、好酸球などが主要な産生細胞である。MIF は T リンパ球を活性化し B リンパ球による抗体産生に必要である (10-16)。特記すべき MIF の機能として、下垂体前葉から分泌されるエンドトキシンショックの致死率を高める主要な因子であること、グルココルチコイドの抗炎症作用を抑制し炎症を惹起するユニークな作用を有することなどがあげられる (9, 16, 17)。また MIF は膵臓のランゲルハンス島の β 細胞に発現し、インスリンの分泌に寄与している (18)。このように MIF は生理的、病的状態で広範囲に発現しており、糖代謝にも深く関与している可能性がある。この研究では全身性炎症反応やストレス反応における MIF と糖代謝との関連を *in vitro* と *in vivo* の両面から検討した。

実験方法

1. 実験材料

2-Deoxy- ^3H glucose は NEN Life Science Products Inc. (Boston, Massachusetts, USA) から購入した。マウスリコンビナント TNF- α は R&D system (Minneapolis, Minnesota, USA) から購入した。ヒト TNF- α およびマウス MIF は Metz 博士から供与された。また chromogenic Limulus amoebocyte assay (LAL-Test : BioWhittaker Inc., Walkersville, Maryland, USA) によって測定したリコンビナント MIF 中のエンドトキシンは 10 pg/ μg recombinant protein 以下であった。マウスモノクローナル抗 MIF 抗体はこれまでに、in vivo、in vitro でマウス、ラット MIF の生物学的活性を中和すると報告されおり (11-13, 19, 20)、この研究に準備された抗体溶液中のエンドトキシンは 4 pg/ μg immunoglobulin であった。

2. 細胞培養

ラット筋芽細胞株である L6 は American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA) から購入した。細胞は 10% FCS 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で 37°C、5% CO₂ で培

養した。筋管細胞の分化は 1%馬血清含有 DMEM に 0.3 mM ウシインスリンを添加し、3 日間培養した。TNF- α 、MIF による刺激は 24 から 72 時間行った。

3. F2,6BP の測定

十分に分化した L6 細胞をモノクローナル抗 MIF 抗体あるいは対照アイソタイプ IgG (10-100 μ g/ml) で 2 時間前処置し、TNF- α (10-100 ng/ml) でさらに 24 から 72 時間刺激した。細胞を無血清培地で洗浄後、50 mM NaOH を添加し破壊後 Van Schaftingen の方法で F2,6BP 量を測定した (21)。

4. グルコース取込み量の測定

十分に分化した L6 細胞をモノクローナル抗 MIF 抗体あるいは対照アイソタイプ IgG で前処置し、さらに TNF- α (10 ng/ml) の存在下、あるいは非存在下で 24 時間培養した。細胞をトランスポート溶液 (140 mM NaCl, 20 mM HEPES/Na, 5 mM KCl, 2.5 mM MgSO₄ and 1 mM CaCl₂) で 2 回洗浄後、0.3 μ Ci/ml 2-deoxy-[³H]glucose 含有 10 mM 2-deoxyglucose で 10 分間培養し、トランスポート溶液で 3 回洗浄し、50

mM NaOH で細胞を溶解後、シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。サンプル中総蛋白量は Bio-Rad Reagent (Bio-Rad Laboratory Inc, Richmond, California, USA) を用い、非特異的ブドウ糖取り込みは Cytocalasin B (10 μ M) 存在下で測定し補正した (22)。

5. 肝臓内グリコーゲン量の測定と生化学的検査

肝臓を液体窒素存在下で破碎し、5 倍量 (質量) の氷冷 perchloric acid (10 %) でホモジナイズした。アミノグルコシダーゼ法を用いグリコーゲン量を測定した (23)。血中乳酸、ブドウ糖、中性脂肪は Sigma 社のキットを用いて測定した。

6. mRNA 発現量の解析

total RNA は分化した L6 細胞から RNAzolB (Tel-Test Inc, Friendswood, Texas, USA) で抽出した。プライマーは以下のようにデザインした。GAPDH (360bp), 5'-ACCCCAATGTATCCGTTGT-3', 5'-CCCTGTTGCTGTAGCCATAT-3', MIF (430bp), 5'-CCTATGTTGATC GTGAACAC-3', 5'-AGTTGATGTAGACCCGGTC-3', rat muscle isoform PFK-2 (780bp), 5'-CAGTATGCAGAGGACACTTG-3', 5'-CACACCTCG ATCTATCTACC-3' (14, 24)。3 μ g total RNA を用い、400 U の MMLV

Reverse Transcriptase, 0.25 ng の oligo-(dT) を含む 0.1 ml の反応混合液で cDNA を合成した。3 μ l の cDNA から上記のプライマーを用い PCR を行った。条件は 95°C 30 秒、53°C 30 秒、72°C 30 秒で 27 サイクル行った。

7. MIF の ELISA とウエスタンブロット法

L6 細胞の培養上清と細胞抽出液中の MIF 量はサンドイッチ ELISA 法で測定した (10)。モノクローナル抗 MIF 抗体を投与したマウスの血中 MIF 濃度はサンドイッチ ELISA を有為に干渉するので、以下のようにウエスタンブロット法で解析した。10 μ l の血清を脱イオン水で 2 倍に希釈し当量の Laemmli ローディングバッファーを混合した。サンプルを 5 分間煮沸し SDS-PAGE で分離した。Immobilon-P (Millipore Corp, Bedford, Massachusetts, USA) にトランスファー後ポリクローナル抗 MIF 抗体を反応させ、結合抗体は HRP 標識ヤギ抗ウサギ抗体を反応させ ECL キットを用いて発色させた。MIF に相当する一本のバンドをデンシトメトリーで解析し、一緒に電気泳動した rMIF を標準に血清中 MIF 濃度を計算した。

8. 動物実験

マウス (Balb/c、18-20 g、雄) は 5 日間の予備飼育後実験に用いた。モノクローナル抗 MIF 抗体あるいは対照 IgG1 (100 μ g/mouse) を腹腔内に投与し、2 時間後リコンビナント TNF- α (160 μ g/kg, 静脈内)を投与した。TNF- α ノックアウトマウスと対照マウスは 16.6 mg/kg の LPS を腹腔内に投与し眼窩後静脈から麻酔下で採血した。そして肝臓と骨格筋を採取し、液体窒素で凍結した。

結果

1. 筋管細胞内 F2,6BP 量、乳酸産生量に対する MIF の影響

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上で非常に有用である(25)。F2,6BP は Phosphofructokinase-1 (PFK-1)の Fructose 6-phosphate (F-6-P) に対する親和性を増加させることにより PFK-1 の活性を刺激し、ATP による負のアロステリック効果を消去する (26)。過去の報告のように (27)、TNF- α は L6 筋管細胞内の F2,6BP の産生量を増加させた。MIF も濃度依存性 (5-100 ng/ml) に F2,6BP 量を増加させた(Figure 1a)。細胞内 F2,6BP 濃度は MIF、TNF- α 投与後 24 時間で頂値が認められた。F2,6BP の合成を触媒するのは 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2) である (26)。PFK-2 は組織特異的アイソフォームが幾つか報告されている。例えばヒト単球に炎症性刺激を与えると、3'UTR に AUUUA 配列を含む PFK-2 アイソフォームの mRNA が増加する (28)。TNF- α あるいは MIF 刺激による F2,6BP 量の増加は muscle PFK-2 遺伝子の発現に平行して増加した (Figure 1b)。さらに TNF- α の刺激に伴う乳酸産生量の増加は多種の細胞で知られているが (29, 30)、この実験で TNF- α と同様に MIF にも L6 筋管細胞における乳酸産生の増加作用があることが確認された(Figure 1c)。

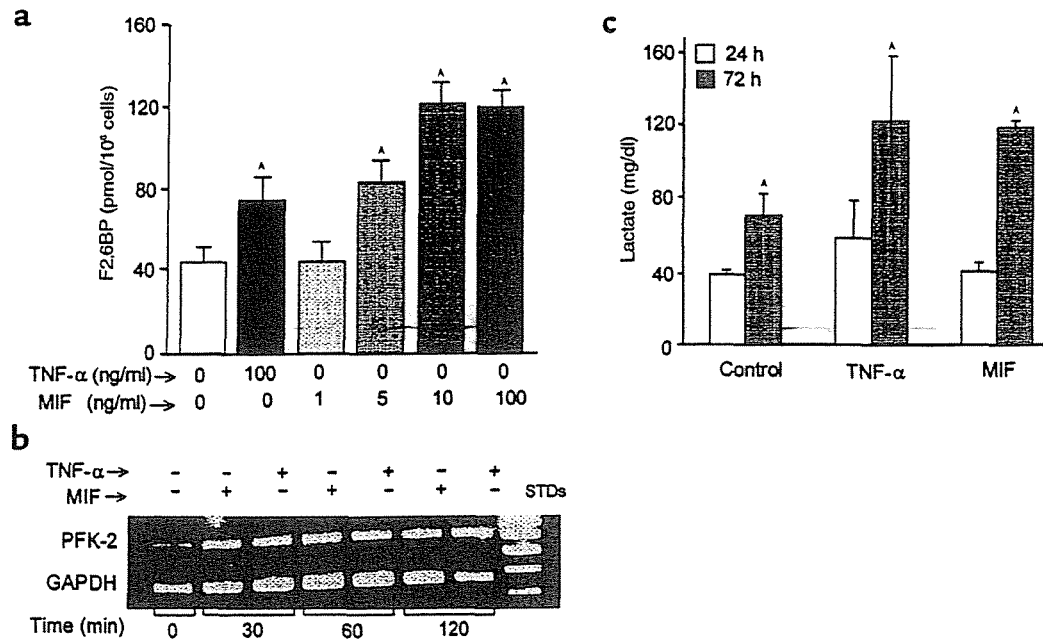


Figure 1 (a) Intracellular F2,6BP levels in L6 myotubes. Fully differentiated L6 muscle cells were stimulated with TNF- α (100 ng/ml) or MIF (1-100 ng/ml) for 72 hours at 37°C. Lysates were prepared and analyzed for F2,6BP content as described in Methods. Data are expressed as mean $\pm$ SD (*P<0.05 versus control medium) of triplicate wells and are representative of three independently performed experiments. (b) Induction of rat muscle PFK-2 expression by TNF- α or MIF in L6 muscle cells, as detected by RT-PCR analysis using gene-specific primers. (c) Lactate production by L6 myotubes. Differentiated L6 muscle cells (1.4×10^6 cells per well) were stimulated with either TNF- α or MIF (each at 100 ng/ml). Supernatants were collected at 24 and 72 hours after stimulation, and the lactate levels were measured. Data are expressed as mean $\pm$ SD (*P<0.05 versus control medium) of triplicate wells and are representative of three independently performed experiments.

2. 筋管細胞における MIF 分泌に対する TNF- α の影響

MIF は種々の細胞に発現し、内在性 MIF の分泌がマクロファージ、T 細胞、線維芽細胞の反応を活性化する (10, 11, 20)。TNF- α がマクロファージから MIF の分泌を刺激することが示されているので (10)、L6 細胞における TNF- α による PFK-2 の発現と解糖系の亢進が、TNF- α 刺激による内在性 MIF の分泌を介する可能性がある。L6 筋管細胞を TNF- α で処理すると培養上清中 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 の刺激で細胞外に分泌されることが示唆された。また TNF- α による刺激は MIF の mRNA を時間依存性に増加させた (Figure 2)。

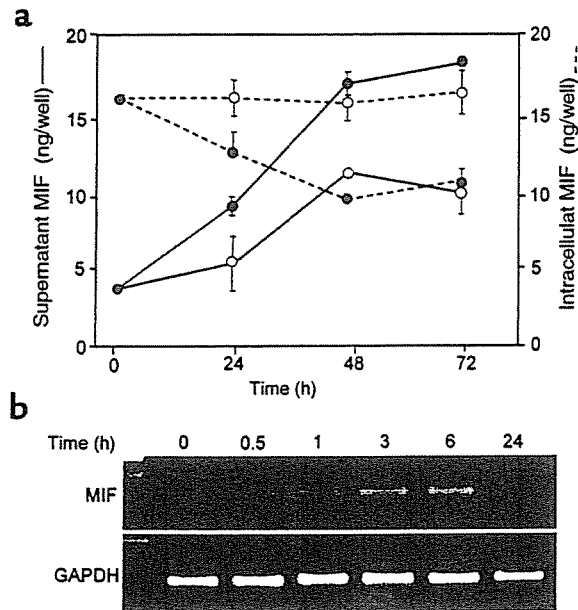


Figure 2. (a) MIF levels in L6 muscle myotube cultures. MIF was measured by ELISA in culture supernatants (solid lines) and cell lysates (dashed lines) after treatment with 10 ng/ml TNF- α (filled circles) versus medium alone (open circles). There were no detectable differences in cell death as assessed by viability testing with MTT (data not shown). Data are the mean ($\pm$ SD) of three different experiments, each performed with triplicate cultures. For culture supernatants, $P < 0.05$ for all TNF- α -treated points ≥ 24 hours versus medium alone. Error bars are absent for those points in which the width of the error bar is less than the plotted symbol. (b) Time-dependent increase in steady-state MIF mRNA levels in L6 cells after treatment with TNF- α (10 ng/ml) as detected by RT-PCR.

3. TNF- α による F2,6BP 産生の増加、ブドウ糖取り込み亢進に対する抗 MIF 抗体の影響

次に TNF- α によって L6 筋管細胞から分泌された MIF の F2,6BP 産生に対する影響について検討した。分化した L6 筋管細胞を抗 MIF 抗体あるいは対照アイソタイプ IgG の存在下で TNF- α (1-100 ng/ml)で処置した。F2,6BP 産生量は抗 MIF 抗体投与群で 70%に阻害された(Figure 3)。これらの結果は内因性の TNF- α が MIF を介して F2,6BP の産生を増加させるという仮説を裏付ける。TNF- α は L6 筋管細胞のブドウ糖の取り込みを増加させることが知られている (27, 29, 31-33)。しかしこの効果は実験モデルによっては認められないとする報告もある (34-37)。そこで TNF- α によって分泌される MIF のブドウ糖取り込みへの影響を検討した。細胞を TNF- α (10 ng/ml で 24 時間) 処理し 2-deoxy-[3 H]glucose の取り込みを抗 MIF 抗体あるいは対照アイソタイプ IgG の存在下で検討した。TNF- α は 2-deoxy-[3 H]glucose の取り込みを有為に増加させ、抗 MIF 抗体はほぼ完全にこの効果を阻害した。抗 MIF 抗体のみの投与では 2-deoxy-[3 H]glucose の取り込みに影響しなかった。

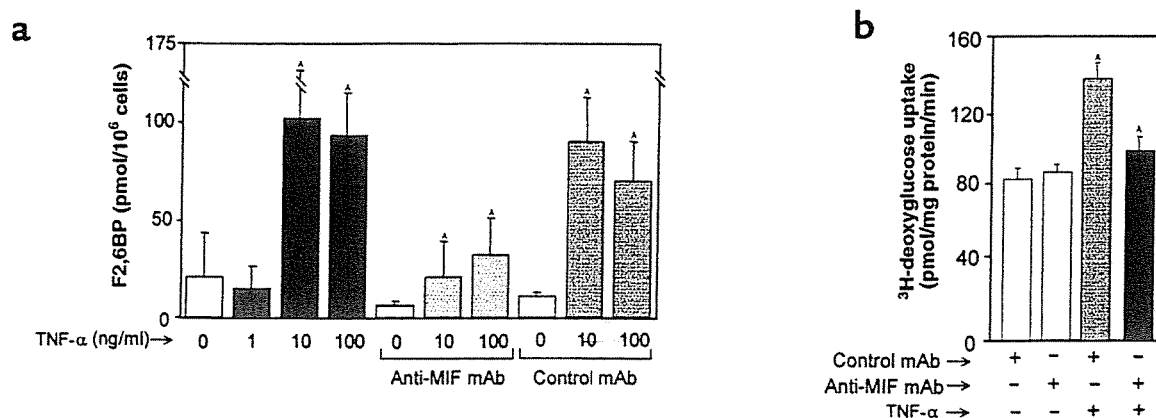


Figure 3. (a) F2,6BP levels in cultured L6 muscle cells (1.4×10^6 cells per well). Cells in triplicate wells were pretreated with medium alone, anti-MIF mAb, or control mAb, and then stimulated with TNF- α . After 72 hours of incubation, the cells were lysed and the intracellular F2,6BP concentrations measured as described in Methods. Data are mean ($\pm$ SD) of three separate experiments. * $P < 0.05$ versus corresponding control (TNF- α versus no TNF- α , or anti-MIF versus control mAb). (b) Deoxyglucose uptake by L6 cells 24 hours after TNF- α (10 ng/ml) stimulation. Neither anti-MIF or control mAb (100 μ g/ml) alone was found to alter basal or insulin-stimulated glucose uptake. Measured values were obtained in triplicate wells and are expressed as total uptake rate. The data shown (mean $\pm$ SD) are representative of four independently performed experiments. * $P < 0.05$ versus each corresponding control.

4. In vivo での TNF- α の解糖系への効果に対する抗 MIF 抗体の影響

次に in vivo での糖代謝における TNF- α の効果に対する MIF の役割を検討した。実験動物で TNF- α は骨格筋でのブドウ糖取り込みのため急性の低血糖を起こす (23, 38-41)。また TNF- α は骨格筋の F2,6BP 産生の増加と乳酸の放出、肝臓でのグリコーゲン減少を引き起こす (29)。BALB/c マウスに抗 MIF 抗体あるいは対照アイソタイプ IgG を投与し、2 時間後 TNF- α を静脈内投与した。以前の報告と同じように TNF- α は低血糖を起こし (42)、骨格筋の F2,6BP 量を増加させた。抗 MIF 抗体はこの TNF- α の効果を阻害した (Figure 4)。

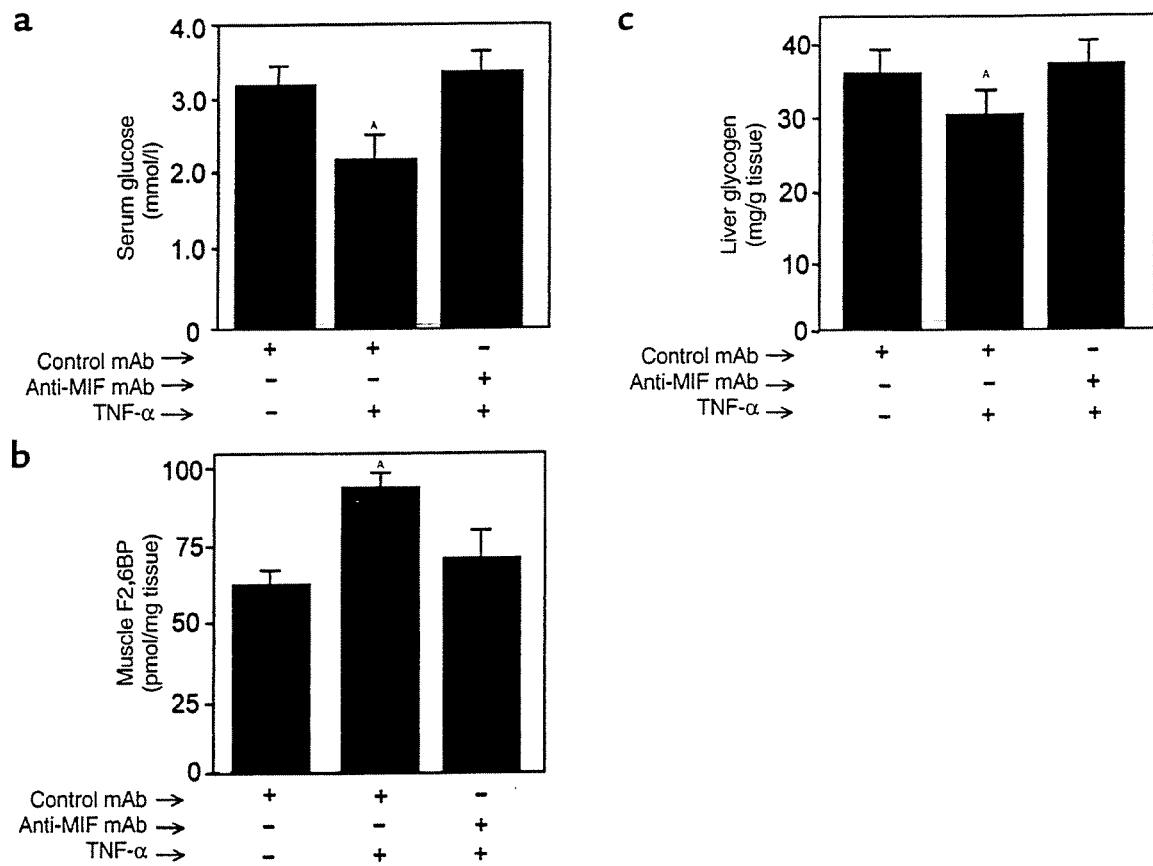


Figure 4 (a) Serum glucose, (b) muscle F2,6BP, and (c) liver glycogen levels in mice 6 hours after TNF- α treatment. Mice (n=5 per group) were injected intraperitoneally with 100 μ g of anti-MIF mAb or isotype control antibody 2 hours before an intravenous injection of TNF- α . Data are mean $\pm$ SD and are representative of one experiment that was repeated twice. *P<0.05 versus control mAb.

Figure 5 に示すように、TNF- α の投与は循環している血清 MIF を増加させた。そしてそれは抗 MIF 抗体の投与で減少した。最大の循環 MIF の減少は 6 時間後にみられ、この時間は腹腔内に投与された抗 MIF 抗体が血中の濃度で最大になる時間である (13)。

これらの結果は、in vivo で骨格筋における TNF- α の解糖系活性化作用が MIF を介しているという仮説と矛盾しない。また MIF は膵臓の β 細胞に発現し分泌され、抗 MIF 抗体がブドウ糖によるインスリン分泌を阻害することが知られている (18)。この実験で TNF- α 投与後の血中インスリン濃度を測定したが、過去の報告と同様に (34)、変化は認めなかった。これらの結果は TNF- α によって増加した血中 MIF はインスリンの分泌に関与する低血糖は起こさないことを示している。また TNF- α は肝臓のグリコーゲン量を減少させ抗 MIF 抗体はこの TNF- α の効果を阻害した。

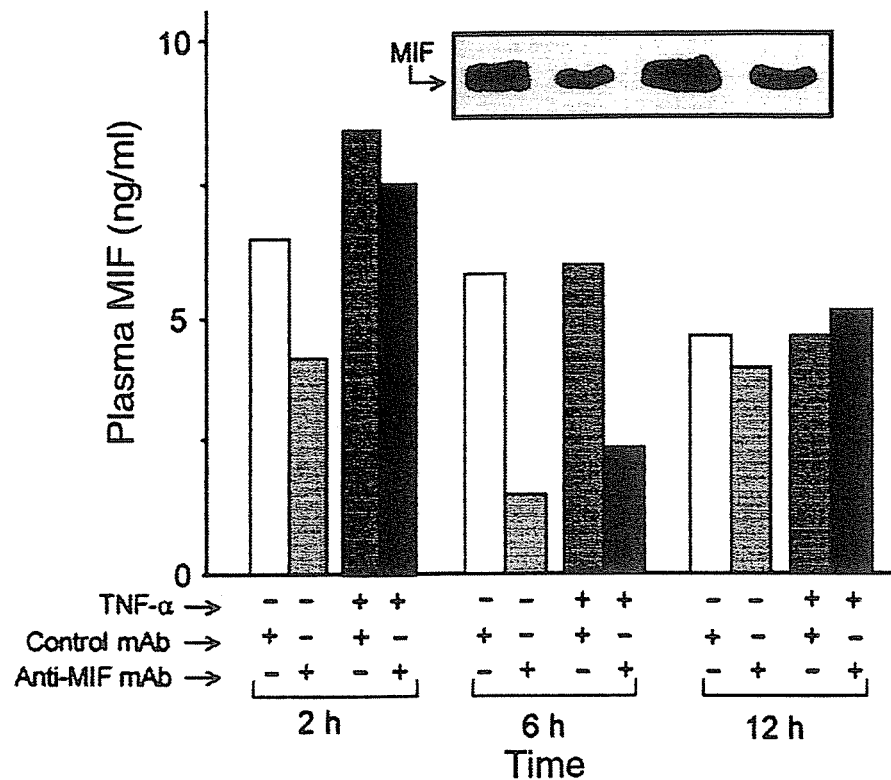


Figure 5. Plasma concentrations of MIF in mice pretreated intraperitoneally with anti-MIF or control mAb 2 hours before the intravenous injection of TNF- α . Plasma from each animal (n=5 per group) was collected at 2, 6, and 12 hours after TNF- α injection, pooled and subjected to Western blotting analysis as described in Methods. Note that the presence of anti-MIF mAb in the serum of treated animals prevented us from quantifying these samples by sandwich ELISA. A representative Western blot result for the 6-hour time point analysis is displayed in the inset. Immunoreactive bands were quantified by laser densitometry and compared with a standard curve of rMIF (1-20 ng). In a separate group of mice, we established base-line (time 0 hours) plasma MIF levels to be 2-4 ng/ml, in agreement with ref. 13.

さらに $\text{TNF}\cdot\alpha$ の効果として血中中性脂肪の増加があげられる。これはリポ蛋白リパーゼの阻害と血清グルココルチコイドの増加による (39, 42-44)。グルココルチコイドの増加はストレス反応により、その一部は急性の低血糖反応に拮抗する。しかし抗 MIF 抗体の投与はこれらの $\text{TNF}\cdot\alpha$ による効果を阻害せず MIF はこれらの効果には有為に関連していないと思われる。

さらなる $\text{TNF}\cdot\alpha$ の効果における MIF の役割を明らかにするため $\text{TNF}\cdot\alpha$ ノックアウトマウスをもちいて同様の実験を行った。LPS ないしはグラム陰性菌の投与後 6 から 12 時間後に MIF 濃度がピークを示した。抗 MIF 抗体ないしは MIF 遺伝子のノックアウトマウスはエンドトキシンショックを予防をする効果があることが報告されている (13, 14, 45)。抗 MIF 抗体は $\text{TNF}\cdot\alpha$ ノックアウトマウスにおける LPS による血糖と骨格筋の F2,6BP の変化を阻害した。これらの結果は、MIF の効果は $\text{TNF}\cdot\alpha$ に依存しないことを示す (Figure 6)。

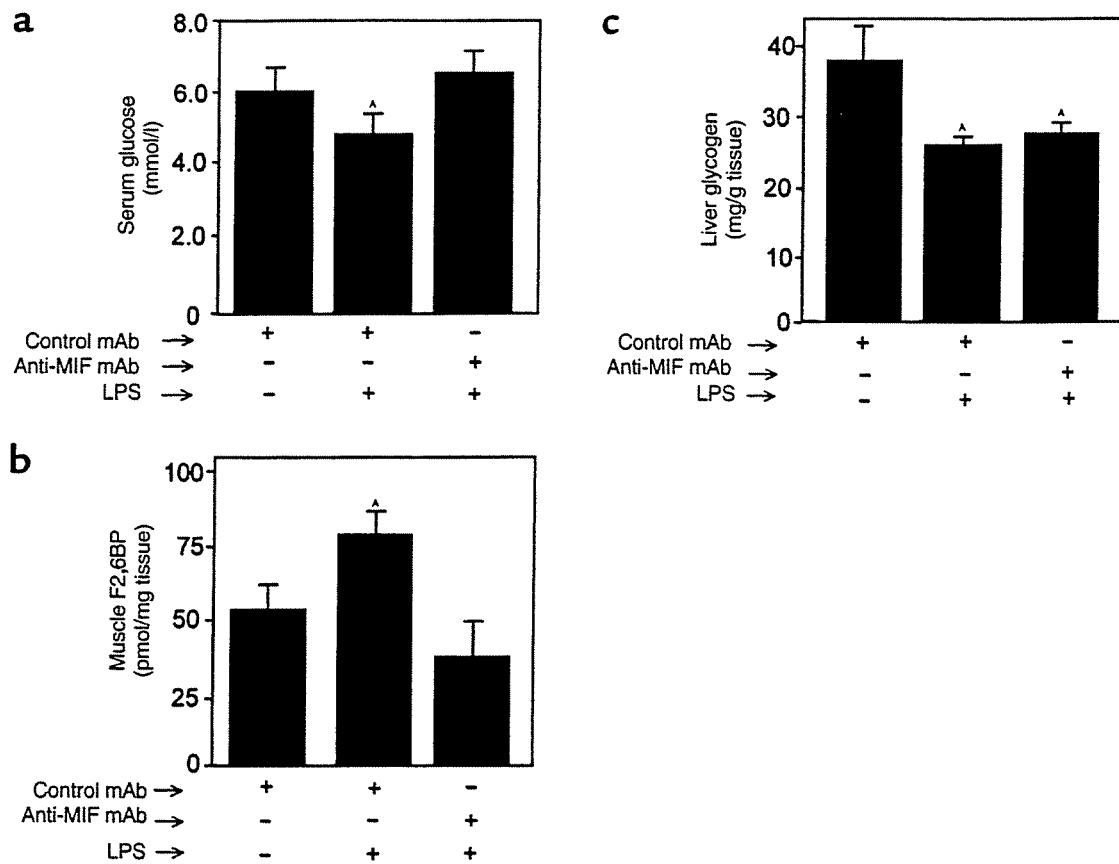


Figure 6. (a) Serum glucose, (b) muscle F2,6BP, and (c) liver glycogen levels in TNF- α -KO mice 8 hours after LPS treatment. Mice (n=5 per group) were injected intraperitoneally with 100 μ g of anti-MIF mAb or isotype control antibody 2 hours before an intraperitoneal injection of 16.6 μ g LPS/g body weight. Data are expressed mean $\pm$ SD. *P<0.05 versus control mAb.

考察

微生物の感染や組織の浸襲は宿主の炎症反応を惹起し、糖代謝の増加を伴う。最初に一過性の高血糖とインスリン抵抗性が起こり続いて乳酸産生、代謝性アシドーシス、グリコーゲン減少、低血糖が起こる。HIV、結核、寄生虫などの感染症と同様に進行癌、全身性炎症反応はしばしば組織障害や悪液質につながる (1)。

IL-1、TNF- α 、IL-6、IFN- γ などの炎症性サイトカインはこれらの代謝反応に寄与し、なかでも TNF- α は重要な役割をもつと考えられている (1-3, 28, 29)。TNF- α の糖代謝における効果は実験モデルによって異なる結果が報告されている (2, 3, 27, 31-33)。TNF- α は幾つかの *in vitro* の系で F2,6BP の合成増加、糖輸送、グリコーゲン分解、乳酸産生を誘導するが、動物実験では TNF- α の効果は二次的な因子が関与していることが報告されている (1-3)。

この研究で MIF が TNF- α の糖代謝における効果に関与することが示された。L6 筋管細胞において TNF- α は MIF mRNA の発現、MIF 蛋白の分泌を誘導する。MIF は TNF- α による PFK-2 の発現にオートクライン、パラクラインに作用する (10, 16)。この機構はマクロファージにおける TNF- α 、T リンパ球における IL-2 (11)、ランゲルハンス島にお

けるインスリン (18)、線維芽細胞における MAPK (20)と同様である。筋管細胞における PFK-2 発現増加と F2,6BP 産生の増加は糖の取り込み、乳酸産生と平行しており、解糖系が亢進していることを示す。また *in vivo* における TNF- α の投与は F2,6BP の増加、血糖低下、肝臓のグリコーゲン減少を惹起し、抗 MIF 抗体による MIF の中和がこれらの TNF- α の効果を阻害した。

MIF は他の解糖系に関与する蛋白にも影響するように思われる。TNF- α は骨格筋や脂肪細胞などで糖輸送の亢進と GLUT1 の発現増加を誘導する (33, 46)。この研究で TNF- α による糖の取り込みを抗 MIF 抗体が阻害した。この効果が GLUT1 の発現や活性の変化によるものかはまだ不明である。

過去の報告のように (38)、TNF- α による血中インスリンの変化はこの研究でも確認されなかった。MIF は β 細胞から分泌され、インスリンの分泌を刺激することが知られているが (18)、TNF- α 投与マウスにおいて抗 MIF 抗体はインスリン値に影響しなかった。これは抗 MIF 抗体の作用の大部分は筋肉における糖取り込みによることを示している。

TNF- α の投与によってグルコルチコイドや脂肪酸が増加する (39, 43, 44)。抗 MIF 抗体はこれらの因子には影響しなかった。したがっ

て TNF- α は MIF とは無関係にこれらの因子に働くと思われる。

血中 MIF は敗血症性ショックの患者で高い。ここに示した結果は MIF が感染や組織浸襲における代謝反応において中心的な役割を担うことを示唆している。そして代謝が亢進している組織で MIF がブドウ糖消費、低血糖、グリコーゲン消費に中心的な役割を果たすことは、MIF 作用の阻害が高エネルギー代謝を伴うストレス反応を軽減する可能性がある。

文献

1. Michie, H.R. Metabolism of sepsis and multiple organ failure. *World J Surg* **20**, 460-464 (1996).
2. Furnsinn, C. et al. Acute and chronic exposure to tumor necrosis factor- α fails to affect insulin-stimulated glucose metabolism of isolated rat soleus muscle. *Endocrinology* **138**, 2674-2679 (1997).
3. De Blaauw, I. et al. TNF- α has no direct in vivo metabolic effect on human muscle. *Int J Cancer* **71**, 148-154 (1997).
4. Hotamisligil, G.S., Murray, D.L., Choy, L.N. & Spiegelman, B.M. Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 4854-4858 (1994).
5. Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L. & Spiegelman, B.M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* **95**, 2409-2415 (1995).
6. Bloom, B.R. & Bennett, B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* **153**, 80-82 (1966).
7. David, J.R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **56**, 72-77 (1966).
8. Weiser, W.Y. et al. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 7522-7526 (1989).
9. Bernhagen, J. et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that

potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* **365**, 756-759 (1993).

10. Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R.A. & Bucala, R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* **179**, 1895-1902 (1994).

11. Bacher, M. et al. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 7849-7854 (1996).

12. Calandra, T., Spiegel, L.A., Metz, C.N. & Bucala, R. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 11383-11388 (1998).

13. Calandra, T. et al. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* **6**, 164-170 (2000).

14. Bacher, M. et al. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am J Pathol* **150**, 235-246 (1997).

15. Rossi, A.G. et al. Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *J Clin Invest* **101**, 2869-2874 (1998).

16. Calandra, T. et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* **377**, 68-71 (1995).

17. Nishino, T. et al. Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol Med* **1**, 781-788 (1995).

18. Waeber, G. et al. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 4782-4787 (1997).
19. Donnelly, S.C. et al. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat Med* **3**, 320-323 (1997).
20. Mitchell, R.A., Metz, C.N., Peng, T. & Bucala, R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem* **274**, 18100-18106 (1999).
21. Van Schaftingen, E., Lederer, B., Bartrons, R. & Hers, H.G. A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Application to a microassay of fructose 2,6-bisphosphate. *Eur J Biochem* **129**, 191-195 (1982).
22. Bedard, S., Marcotte, B. & Marette, A. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* **325**, 487-493 (1997).
23. Lang, C.H., Bagby, G.J., Buday, A.Z. & Spitzer, J.J. The contribution of gluconeogenesis to glycogen repletion during glucose infusion in endotoxemia. *Metabolism* **36**, 180-187 (1987).
24. Nishihira, J. et al. The structure and physicochemical properties of rat liver macrophage migration inhibitory factor. *Biochim Biophys Acta* **1247**, 159-162 (1995).
25. Hue, L. & Rousseau, G.G. Fructose 2,6-bisphosphate and the control of glycolysis by growth factors, tumor promoters and oncogenes. *Adv Enzyme Regul* **33**, 97-110 (1993).
26. Rousseau, G.G. & Hue, L. Mammalian

6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **45**, 99-127 (1993).

27. Lee, M.D., Zentella, A., Vine, W., Pekala, P.H. & Cerami, A. Effect of endotoxin-induced monokines on glucose metabolism in the muscle cell line L6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2590-2594 (1987).

28. Chesney, J. et al. An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3047-3052 (1999).

29. Zentella, A., Manogue, K. & Cerami, A. Cachectin/TNF-mediated lactate production in cultured myocytes is linked to activation of a futile substrate cycle. *Cytokine* **5**, 436-447 (1993).

30. Jones, J.P., MacLean, P.S. & Winder, W.W. Correlation between fructose 2,6-bisphosphate and lactate production in skeletal muscle. *J Appl Physiol* **76**, 2169-2176 (1994).

31. Ranganathan, S. & Davidson, M.B. Effect of tumor necrosis factor-alpha on basal and insulin-stimulated glucose transport in cultured muscle and fat cells. *Metabolism* **45**, 1089-1094 (1996).

32. Yamasaki, H. et al. TNF-alpha stimulates glucose uptake in L6 myoblasts. *Diabetes Res Clin Pract* **32**, 11-18 (1996).

33. Ciaraldi, T.P., Carter, L., Mudaliar, S., Kern, P.A. & Henry, R.R. Effects of tumor necrosis factor-alpha on glucose metabolism in cultured human muscle cells from nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Endocrinology* **139**, 4793-4800 (1998).

34. Begum, N. & Ragolia, L. Effect of tumor necrosis factor-alpha on insulin action in cultured rat skeletal muscle cells. *Endocrinology*

137, 2441-2446 (1996).

35. del Aguila, L.F., Claffey, K.P. & Kirwan, J.P. TNF- α impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol* **276**, E849-E855 (1999).

36. Ling, P.R., Sierra, P., Qu, Z. & Bistrian, B.R. Insulin-like growth factor-I improves glucose utilization in tumor necrosis factor-treated rats under hyperinsulinemic-euglycemic conditions. *Metabolism* **46**, 1052-1058 (1997).

37. Fawcett, R.L. et al. Tumor necrosis factor- α inhibits leptin production in subcutaneous and omental adipocytes from morbidly obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 530-535 (2000).

38. Metzger, S. et al. Tumor necrosis factor inhibits the transcriptional rate of glucose-6-phosphatase in vivo and in vitro. *Metabolism* **46**, 579-583 (1997).

39. Tracey, K.J. & Cerami, A. Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med* **21**, S415-S422 (1993).

40. Evans, D.A., Jacobs, D.O. & Wilmore, D.W. Tumor necrosis factor enhances glucose uptake by peripheral tissues. *Am J Physiol* **257**, R1182-R1189 (1989).

41. Van der Poll, T. et al. Tumor necrosis factor mimics the metabolic response to acute infection in healthy humans. *Am J Physiol* **261**, E457-E465 (1991).

42. Chajek-Shaul, T. et al. Lethal hypoglycemia and hypothermia induced by administration of low doses of tumor necrosis factor to adrenalectomized rats. *Metabolism* **39**, 242-250 (1990).

43. Sweep, C.G. et al. Chronic intraperitoneal infusion of low doses of tumor necrosis factor α in rats induces a reduction in plasma

triglyceride levels. *Cytokine* 4, 561-567 (1992).

44. Krauss, R.M., Grunfeld, C., Doerrler, W.T. & Feingold, K.R. Tumor necrosis factor acutely increases plasma levels of very low density lipoproteins of normal size and composition. *Endocrinology* 127, 1016-1021 (1990).

45. Bozza, M. et al. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med* 189, 341-346 (1999).

46. Hauner, H., Petruschke, T., Russ, M., Rohrig, K. & Eckel, J. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia* 38, 764-771 (1995).

謝辞

稿を終えるに当たり、御指導・御校閲を賜りました北海道大学大学院
医学研究科分子病態制御学講座・免疫病態内科学分野 小池 隆夫教授
ならびに、北海道大学大学院医学研究科分子医科学分野において御指導
いただきました 西平 順助教授に深甚なる謝意を表します。あわせて
米国ニューヨーク州ピコワー医学研究所においてご指導いただきました
Richard Bucala 教授に心より感謝いたします。