



Title	脂肪細胞分化における Leukemia inhibitory factor (LIF) の経時的機能解析
Author(s)	池田, 峻
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34346
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (池 田 峻)

論文題名

脂肪細胞分化における Leukemia inhibitory factor (LIF) の経時的機能解析

論文内容の要旨

【研究目的】

近年、失われた組織の回復を目指した再生医療に関する研究、特に幹細胞に対する研究が多面的に進められ、成果が得られつつある。間葉系幹細胞は、象牙質歯髄複合体や歯根膜そして歯槽骨の源となる幹細胞として考えられており、歯科領域において重要な幹細胞として位置づけられている。その間葉系幹細胞を含む骨髄ストローマ細胞の分化機構を理解することは、幹細胞を目的の細胞への分化をコントロールする上で非常に重要である。LIFは間葉系幹細胞の分化に影響を及ぼすサイトカインとして知られており、間葉系細胞から脂肪細胞への分化制御に関連するとの報告もあるが、現在のところ一致した見解は得られていない。そこで本研究では、骨髄ストローマ細胞を脂肪細胞へと分化誘導する一連の過程におけるLIFの作用を経時的に検討することとした。さらに、脂肪細胞の分化制御に関連するWntシグナル経路とLIFシグナル経路との関係性についても併せて解析を行うことを本研究の目的とした。

【材料と方法】

1) 骨髄ストローマ細胞の調整と培養

C57BL/6Jマウスより大腿骨と脛骨を採取し、シリンジを用いて α -MEMを骨髄腔内に注入し骨髄を得た。セルストレーナーを用いて軟組織を除去した後、細胞培養皿にて10%FCSと1%抗生物質を含む α -MEMにて培養を開始し、3日後にPBSを用いて浮遊細胞を除去した。その後、3日ごとに培養液を交換し、2週間後にTrypsin-EDTA処理にて付着細胞を回収して骨髄ストローマ細胞として実験に供した。

2) 脂肪細胞への分化誘導とOil red O染色

10% FCS含有 α -MEMに50 μ g/ml ascorbic acidと 10^{-2} mM rosiglitazone (BRL) を加えた脂肪細胞分化誘導培地を作成し、これに50ng/mlのLIFを添加した培地としない培地を用いて24穴プレートにて 6×10^5 /wellの細胞数で培養した後、Oil red O染色を行った。

3) 脂肪滴定量実験

Oil red O染色後、各wellに4% Nonidet P-40を含むisopropanolを加えて脂肪滴を抽出し、波長550nmにおける吸光度を分光光度計にて測定した。

4) 脂肪細胞分化マーカー、脂肪前駆細胞マーカー、およびWntシグナル伝達分子の定量

LIF存在下、非存在下にて5日間および15日間脂肪細胞分化誘導を行った後、Sepasolを用いてmRNAを回収し、逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、real-time PCRを行った。脂肪細胞分化マーカーである*aP2*と*PPAR γ* 、脂肪前駆細胞マーカーである*Pref-1*、またWntシグナル伝達分子である*Wnt10b*、*Wnt5a*、 *β -catenin*、*Lrp5*、*Lrp6*、*Tcf7*、*Tcf3*、*Dkk2*、*Sfrp1*のmRNA発現量を定量した。

5) ウエスタンブロッティング

脂肪細胞分化誘導培地中にて骨髄ストローマ細胞をLIF存在下および非存在下にて5日間および15日間培養した。また、骨髄ストローマ細胞を50ng/mlのマウスリコンビナントWnt10bおよびWnt10bとLIFにて2時間刺激した。それらの細胞より、細胞溶解バッファーにて細胞質中のタンパクを抽出し、電気泳動にてタンパクを分離後、メンブレンに転写した。抗 β -catenin抗体を反応させ、 β -cateninタンパクの検出を行った。

6) 統計処理

一連の実験では、Student's *t*-testまたはOne-way ANOVAおよびFisher's LSD testによって有意水準5%で統計学的検定を行った。

【結果】

1) LIFが脂肪細胞分化に及ぼす影響

LIFの濃度を50ng/ml以上に設定しても分化誘導後5日目において形成される脂肪滴量はほぼ同じであったため、本研究では作用させるLIFの濃度を50ng/mlと設定した。脂肪滴定量実験を行ったところ、5日目、10日目からLIFを添加した場合は、LIFを添加しない場合とほぼ同じ傾向で、LIFを培養開始から継続的に添加した場合のみ、異なる傾向を示した。したがって、本研究ではLIFを分化誘導開始時から継続的に添加した条件で、LIFが脂肪細胞分化誘導に及ぼす影響を比較検討することとした。その結果、分化誘導後5日目においては波長550nmにおける吸光度はLIF非存在下で培養したサンプルの方が高い数値を示した。ところが、分化誘導後15日目ではLIF存在下で培養したサンプルの方が高い数値を示した (Student's *t*-test ; $p<0.05$)。

2) 脂肪細胞分化に対するLIFの効果についての脂肪細胞分化マーカー発現量による検証

分化誘導後5日目において、LIFは脂肪細胞分化マーカーである*aP2*および*PPAR γ* の発現量を抑制した。一方、分化誘導後15日目においては両マーカーの発現量を増強した (Student's *t*-test ; $p<0.05$)。

3) 脂肪細胞分化誘導後5日目と15日目の脂肪細胞分化段階についての考察

分化誘導後5日目では小型の脂肪滴を内部に多数含む細胞が多く観察されたが、分化誘導後15日目になると大型の脂肪滴を含む細胞が見られるようになった。脂肪前駆細胞のマーカーである*Pref-1*のmRNAならびにタンパク発現量も分化誘導後5日目に比べて15日目では低下していた。

4) 脂肪細胞分化段階におけるWntシグナル伝達分子発現量の解析

脂肪細胞分化誘導前と比較して分化誘導後5日目では、*Wnt10b*、*Wnt5a*、*Tcf7*、*Tcf3*の発現量が上昇し、*Dkk2*と*Sfrp1*の発現量は低下していた。一方、分化誘導15日目においては5日目と比べ、*Wnt10b*、*Wnt5a*、*Lrp5*、*Lrp6*、 β -*catenin*、*Tcf7*、*Tcf3*の発現量が低下し、*Dkk2*と*Sfrp1*の発現量が上昇していた (One-way ANOVAおよびFisher's LSD test ; $p<0.05$)。

5) LIFによる脂肪細胞分化過程のWntシグナル伝達分子発現量への影響

LIFは脂肪細胞分化誘導後5日目、15日目の両方において、*Wnt10b*、*Wnt5a*、 β -*catenin*、*Tcf7*、*Tcf3*の発現量を抑制し、*Dkk2*、*Sfrp1*の発現量を著明に上昇させた (Student's *t*-test ; $p<0.05$)。また、LIFは分化誘導後5日目だけではなく15日目においても β -*catenin*タンパクの発現量を抑制した。さらに、*Wnt10b*により上昇した β -*catenin*タンパクの発現量は、LIFを加えることによって顕著に減少した。

【考察および結論】

本研究の実験結果から、LIFは、脂肪細胞分化誘導後5日目では脂肪細胞への分化を抑制するが、分化誘導後15日目では分化を促進することが分かった。これより、分化初期 (5日目) と分化後期 (15日目) でLIFの作用は相反することが推察された。近年、Wntシグナル経路が脂肪細胞分化に関連していることが報告されていることから、LIFとWntシグナル経路の関係について解析した。その結果、LIFは誘導後5日目と15日目の両方において、シグナル伝達物質である*Wnt10b*、*Wnt5a*、 β -*catenin*、*Tcf7*、*Tcf3*の発現を抑制し、シグナル抑制因子である*Dkk2*、*Sfrp1*の発現を著明に上昇させた。また β -*catenin*タンパクの発現量も抑制することから、LIFシグナルは、脂肪細胞分化初期および後期に関わらずWntシグナル分子の発現を抑制していることが分かった。

Wntシグナル経路には、 β -*catenin*を介する古典的経路とそれを介さない非古典的経路が存在する。*Wnt10b*は古典的経路を活性化させ、脂肪細胞への分化を抑制することが報告されている。一方、*Wnt5a*は非古典的経路を介して、古典的経路を抑制する働きが報告されているが、脂肪細胞分化に及ぼす影響に関しては、一致した見解が未だ得られていない。本研究において、*Wnt10b*により上昇した β -*catenin*タンパクの発現量はLIFを加えることによって顕著に減少したことから、LIFは、古典的経路を抑制することにより、その効果を発揮している可能性がある。非古典的経路についてはさらなる解析が必要と思われる。

以上の結果から、LIFはWntシグナル経路を調節することによって、分化初期には脂肪細胞への分化を抑制し、分化後期においては脂肪細胞への分化を促進している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (池 田 峻)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	林 美加子
	副 査	教授	西村 理行
	副 査	准教授	河合 伸治
	副 査	講師	山田 聡

論文審査の結果の要旨

本研究は、骨髄ストローマ細胞を脂肪細胞へと分化誘導する一連の過程における LIF の作用を経時的に検討し、さらに、脂肪細胞の分化に影響を及ぼす Wnt シグナル経路と LIF シグナル経路との関係性について解析を行ったものである。

その結果、LIF は脂肪細胞分化誘導後 5 日目では脂肪細胞への分化を抑制するが、分化誘導後 15 日目では分化を促進することが分かった。そして、LIF は分化誘導後 5 日目と 15 日目の両方において、Wnt シグナル経路を抑制していることが認められた。以上より、骨髄ストローマ細胞が脂肪細胞へと分化する際、LIF は Wnt シグナル経路を調節することにより、分化初期と後期で相反した効果を発揮する可能性が示唆された。

以上の研究成果は、間葉系幹細胞分化のメカニズムの解明において重要な知見を提供するものであり、本研究は博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。