The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

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

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻（歯科保存学教室）

（指導教官：林　美加子教授）

池田　峻

本論文の一部は，第 137 回日本歯科保存学会 (2012 年 11 月，広島) および 2nd Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region (2013 年 8 月，バンコク) において発表した.

緒言

近年，失われた組織や機能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，めざましい成果が得られつつある．間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSCs) は，自己複製能と分化多能性を併せ持つことが知られており，*in vitro* において，骨芽細胞，軟骨細胞，脂肪細胞，および神経細胞などに分化することが報告されている[1, 2]．また，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も考えられており，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[3]．この間葉系幹細胞の単離法は未だ確立されていないが，幹細胞を含む細胞集団は，様々な組織から得られることが報告されている[4 - 6]．

骨髄ストローマ細胞 (Bone marrow stromal cells; BMSCs) は，この間葉系幹細胞を含むヘテロな細胞集団で，多系統の細胞に分化しうることで知られている[5, 7 - 9]．様々な分化誘導培地中で，骨髄ストローマ細胞は，骨芽細胞，軟骨芽細胞，筋芽細胞，脂肪細胞などといった様々な間葉系の細胞に分化することができる[1, 10]．そのため，骨髄ストローマ細胞は間葉系幹細胞の分化機構を解明する目的で，これまでに広く研究に用いられてきた．骨髄ストローマ細胞の分化機構を理解することにより，幹細胞を目的の細胞への分化をコントロールすることができ

れば，再生医療は飛躍的に進歩すると考えられる．そこで再生医療に幹細胞集団を応用する場合，骨芽細胞へと分化誘導させる一方で，脂肪細胞への分化を抑制することが出来れば，より効果的であると考えた．そのためには，脂肪細胞の分化過程を理解することが必要であり，本研究の目的とした．

この骨髄ストローマ細胞は，脂肪細胞へ分化する過程で脂肪前駆細胞に一旦分化した後，成熟脂肪細胞へと分化する[11)]．脂肪前駆細胞から脂肪細胞へと分化する過程の分化制御機構を明らかにするために，これまでにも多くの研究が行われてきたが，その制御機構については未だ不明な点が多い[12 - 14)]．近年，Wnt シグナル経路が脂肪細胞分化において重要な役割を果たしていることが報告されてきている[15 - 17)]．しかしながら，Wnt/β-catenin 経路は脂肪細胞よりもむしろ骨芽細胞の分化を制御する主たるシグナル伝達経路として知られている[18 - 22)]．例えば，*Wnt10b*ノックアウトマウスは，Wnt/β-catenin 経路の活性化による骨量の増加や，ホルモン依存性・加齢による骨量減少から免れるといった表現型を呈している[21)]．一方，脂肪前駆細胞では，Wnt/β-catenin 経路が活性化すると，脂肪細胞特有の転写因子である C/EBP や PPARγ の発現を抑制し，脂肪細胞への分化を抑制することが示されている[21, 23, 24)]．また，β-catenin シグナルを遮断することにより，様々な細胞種が脂肪細胞へと自発的に分化することも報告されており[25)]，Wnt/β-catenin 経路は脂肪細胞への分化を抑制する働きがあることが示唆されて

いる．幹細胞から脂肪前駆細胞への分化過程における Wnt シグナル経路の働きについての知見は少ないのが現状であるが，近年，マイクロアレイを用いた研究により，C3H10T1/2 細胞株と分化した脂肪前駆細胞株 A33 を比較すると，Wnt/β-catenin 経路関連分子の発現様式がかなり異なることが示された[26)]．また，間葉系幹細胞の自己複製や未分化な状態の維持に，Wnt/β-catenin 経路が関与しているという報告がある[27, 28)]．このように Wnt/β-catenin 経路は，間葉系幹細胞から脂肪前駆細胞への分化も制御している可能性がある[26)]．

ところで，白血病阻害因子 (Leukemia inhibitory factor; LIF) は，インターロイキン 6 ファミリーサイトカインに属するサイトカインで，間葉系幹細胞の分化に影響を及ぼすことで知られている[29)]．LIF は，LIFRβ と Glycoprotein 130 (Gp130) からなる受容体複合体に結合して，Janus kinase (JAK) の自己リン酸化を誘導する．活性化した JAK 分子は，LIFRβ や Gp130 の細胞質内ドメインに存在する，いくつかのチロシン残基をリン酸化する．リン酸化したチロシン残基は, Src homology 2 (SH2) ドメインを持つシグナル伝達分子の結合領域となる[30)]．ここへ, Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) が結合し，JAK によりリン酸化を受けて活性化する[31, 32)]．活性化した STAT3 は核内に移行し，目的の遺伝子のプロモーター領域に結合し，目的のタンパクを合成する[33)]．LIF は，JAK-STAT3 経路以外にも MAP キナーゼ経路や，PI3K/Akt 経路を活性

化することが知られている[29, 34, 35]．そして，これらの経路の活性化の選択性については細胞種によって異なることが報告されている[34, 36 - 38]．例えば，3T3-F442A や Ob1771 そして 3T3-L1 細胞株において，LIF は STAT3 を活性化すると報告されているが，脂肪細胞分化における STAT3 の役割については今のところ明らかとなっていない[39]．

脂肪細胞分化との関連では，LIF は脂質代謝を制御する遺伝子の発現を誘導し，骨芽細胞への分化を抑制するという実験結果がラット胎仔頭蓋冠細胞を用いた研究により示されている[40]．骨芽細胞と脂肪細胞は共通の間葉系前駆体に由来し，二つの系統は分化に関して相関関係があると考えられており，この研究結果はこれまでの報告と一致している[16, 17, 41]．しかしながら，マウス細胞における LIF の脂肪細胞分化に対する効果については一致した見解が得られていないのが現状である[29]．例えば，間葉系幹細胞株である BMS2 を用いた研究では，LIF は脂肪細胞分化を抑制する働きがあると報告されている[42]．ところが，脂肪前駆細胞株である Ob1771 や 3T3-F442A を用いた研究では，LIF は逆に脂肪細胞分化を促進するという結果が得られている[43, 44]．このように，LIF が脂肪細胞分化に及ぼす影響は，細胞の分化段階に応じて変化する可能性が示唆されてはいるが，詳細は未だ明らかとなっていない．

そこで，LIF が脂肪細胞分化に及ぼす影響を明らかにすることを本研究の目

的として，初代培養系マウス骨髄ストローマ細胞を用いて，脂肪細胞分化の初期と後期における LIF の影響を比較検討することとした.

材料および方法

１．骨髄ストローマ細胞の調整と培養

4 - 6 週齢の C57BL/6J マウス (日本チャールス・リバー, 横浜) の大腿骨および脛骨を採取した. 骨頭を除去した後に, 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% penicillin-streptomycin を含む α-MEM にて培養を開始し, 3 日後に PBS を用いて 3 回洗浄することで浮遊細胞を除去した. その後, 2～3 日ごとに培養液を交換しながら, 80% セミコンフルエントになるまで, 2 週間培養を続けた. そして, Trypsin-EDTA (0.2% Trypsin, 1 mM EDTA) 処理にて付着細胞を回収し, 骨髄ストローマ細胞として実験に供した[45].

なお, 本研究における全ての動物実験は, 大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の審査を受け, 承認のもとに実施した. (受付番号: 動歯-21-002-0)

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 μg/ml ascorbic acid と PPARγ のリガンドとして知られる 10^{-2}mM rosiglitazone (BRL49653; Cayman Chemical, Michigan, USA) を添加した脂肪細胞分化誘導培地を作成し，これに 50 ng/ml の LIF (Merck Millipore, Massachusetts, USA) 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 の細胞を培養した．分化誘導を行った後，脂肪滴を内在する細胞を 10% 中性ホルマリン溶液にて固定し，Oil red O 溶液 (0.5% Oil red O 含有 isopropanol を 3：2 の割合にて蒸留水で希釈したもの) を用いて 30 分間染色を行った．染色後，蒸留水にて 3 回洗浄した．

３．脂肪滴定量実験

Oil red O 染色後，各 well に 4% Nonidet P-40 (NP40) を含む isopropanol を 200 μl 加え，45 分後に脂肪滴を抽出した．抽出した脂肪滴へ 4% NP40 を含む isopropanol を加えて全体量を 1 ml に調整した．波長 550 nm における吸光度を分光光度計 (ARVO MX; Perkin Elmer, Massachusetts, USA) にて，各サンプルに対して 3 回の計測を行った．

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-RNA Ⅰ (ナカライテスク，京都) を用いて mRNA を抽出した．この mRNA から，Oligo-dT Primer (Life Technologies, California, USA) および逆転写酵素 (東洋紡，大阪) を用いて cDNA を合成した．cDNA は，脂肪細胞分化マーカーである *aP2* と *PPARγ*，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* に特異的なプライマー (表1) および SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, California, USA) そして ABI 7500 Fast System (Applied Biosystems) を用いて (95℃ 10 秒 / 60℃ 30 秒) × 40 サイクルのリアルタイム PCR を行った．これらの遺伝子発現量の定量は，内在性コントロールとして用いた *L32* 遺伝子の発現量との比較により行った．この相対的定量化に必要な計算は，⊿⊿ Ct 法により行った．

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 50 ng/ml のマウスリコンビナント Wnt10b (R&D Systems, Minnesota, USA) および Wnt10b と LIF にて 2 時間刺激した．それらの細胞を，細胞溶解バッファー [20 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP40, 500 μM sodium vanadate, 1 mM dithiothreitol, 5 μg/ml aprotinin, 5 μg/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] にて溶解し，30 分間の遠心分離 (14,000 rpm 4℃) 後に，上清を回収し，これをタンパク抽出液とした．タンパク抽出液を 3 × Laemmli's sodium dodecyl sulfate (SDS) サンプルバッファーにて希釈し，100℃ で 5 分間加熱処理した．7.5% 濃度勾配ポリアクリルアミドゲル (和光純薬，大阪) 上に，SDS-PAGE にてサンプルを展開し，PVDF 膜 (Immobilon-P; Merck Millipore) に転写した．PVDF 膜をブロックエース (DS ファーマバイオメディカル，大阪) にてブロッキングした後，ラビット抗 β-catenin 抗体 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA)，ラビット抗 Pref-1 抗体 (Merck Millipore)，およびラビット抗 β-actin 抗体 (Cell Signaling Technology) と反応させた．これに，西洋わさび過酸化酵素 (HRP) 抱合型ヤギ抗ラビット IgG 抗体 (Zymed Laboratories,

California, USA) を反応させ, ECL Western Blotting Detection System (GE ヘルスケア ジャパン, 東京) を用いて発光シグナルを増幅した後, エックス線フィルム (RX-U 12 × 16; 富士フィルム, 東京) に現像した.

６．統計処理

結果は平均値 ± 標準誤差で表示した. 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

実験で用いる LIF の濃度を決定するために, 0, 0.5, 5, 10, 30, 50, 100 ng/ml の濃度の LIF を含む脂肪細胞分化誘導培地を作成し, 分化誘導後 5 日目の脂肪滴定量実験を行った. その結果, LIF の濃度を 50 ng/ml 以上に設定しても脂肪滴量は, ほぼ同一であったため, 本実験では LIF の濃度を 50 ng/ml と設定した (図1) .

次に, LIF 非添加にて分化誘導を行った群, LIF を継続的に添加して分化誘導を行った群, 分化誘導後 5 日目から LIF を添加した群, 分化誘導後 10 日目から LIF を添加した群, 以上 LIF を作用させる期間を変えた 4 群において, 脂肪細胞分化に対する影響について解析を行った. そして, 5 日目, 10 日目, 15 日目, 20 日目で, それぞれ脂肪滴定量実験を行い, 比較検討を行った. その結果, 5 日目, 10 日目から LIF を添加した場合は, LIF 非添加群とほぼ同じ傾向となり, 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 (図2) . そこで, 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 が脂肪細胞分化に及ぼす影響を比較検討することとした.

LIF が Oil red O 陽性細胞の形成に及ぼす影響を解析するために，骨髄ストローマ細胞を脂肪細胞分化誘導培地中で，LIF 存在下ならびに非存在下にて培養した．脂肪細胞分化誘導培地中で，骨髄ストローマ細胞は多くの Oil red O 陽性細胞を形成した．分化誘導後 5 日目においては，LIF 非存在下にて培養した時の方が多数の Oil red O 陽性細胞が認められた (図3 A, B) . 10 日目では，形成される Oil red O 陽性細胞の数に差は認められなかった (図3 C, D) . ところが, 15 日目になると LIF 存在下にて培養した方が多数の Oil red O 陽性細胞が認められた (図3 E, F) . これらの結果から, LIF は脂肪細胞分化段階で異なる働きを持つ可能性が示唆された．この時期特異的な LIF の効果を確認するために, 分光光度計を用いて脂肪滴の定量を行った．その結果，分化誘導後 5 日目では, LIF 非存在下で培養した時の方が吸光度は高い数値を示したのに対し，15 日目においては, LIF 存在下で培養した時の方が高い数値を示した (図4) .

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

脂肪滴定量実験で得られた結果を検証するために，脂肪細胞分化マーカーで

ある *aP2* と *PPARγ* の発現量についてリアルタイム PCR にて解析した. 分化誘導後 5 日目では, LIF の添加により *aP2* ならびに *PPARγ* の発現量がともに抑制されていた (図5 A, B) . 一方, 15 日目においては両マーカーの発現量は LIF の添加により, 増強していた (図5 C, D) . これらの結果から, LIF は分化初期には脂肪細胞分化マーカーの発現を抑制し, 分化後期には発現を増強していることが確認された.

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

脂肪細胞分化誘導後 5 日目と 15 日目で観察される細胞を Oil red O 染色後に高倍率 (400 倍) にて観察した. 分化誘導前は線維芽細胞様の細胞が観察されるのに対し (図6 A) , 分化誘導後 5 日目になると小型の脂肪滴を内部に多数含む細胞が多く観察された (図6 B) . これが, 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 (図6 C) . 脂肪前駆細胞のマーカーである Pref-1 の発現量を比較したところ, 分化誘導後 5 日目に比べて 15 日目では, Pref-1 の mRNA ならびにタンパク発現量が低下していた (図6 D, E) .

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 (図7) .

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, 分化誘導後 5 日目と 15 日目における *Wnt10b*, *Wnt5a*, *β-catenin*, *Tcf7*, *Tcf3* の発現量を抑制し, *Dkk2*, *Sfrp1* の発現量を上昇させた (図8) . また, β-catenin タンパクの発現量を調べたところ, β-catenin タンパクの発現量は分化誘導前に比べて分化誘導後 5 日目と 15 日目において上昇していることが分かった. そして, 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ていた (図9) . 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ていることが明らかとなった (図10) .

考察

骨髄ストローマ細胞は培養条件により，骨芽細胞や脂肪細胞へと分化することができる．Wnt/β-catenin 経路が活性化すると骨芽細胞へと分化が進み，抑制されると脂肪細胞へと分化が進むことから，この 2 つの細胞への分化経路は互いに相反関係にあるといった報告もある[16, 17, 41]．松下らは，骨髄ストローマ細胞を用いた実験で LIF が骨芽細胞への分化を抑制することを既に確認しており(現在投稿中) , LIF は上記のことから脂肪細胞への分化を促進するのではないかとの仮説を立てた．しかし緒言で述べたとおり，マウス細胞において LIF が脂肪細胞分化に及ぼす影響についての実験結果は一致しておらず，細胞や組織の分化段階に応じて変化する可能性が示唆されているものの，詳細は未だ明らかとなっていない[29]．そこで，初代培養系マウス骨髄ストローマ細胞を用い，間葉系幹細胞から脂肪前駆細胞を通して成熟脂肪細胞へと分化していく一連の過程における LIF の働きを経時的に調べることとした．

間葉系幹細胞は，まず脂肪前駆細胞へと分化した後，増殖していく．そして，増殖停止後に成熟脂肪細胞へと最終分化していくことが報告されており[11, 28]，脂肪細胞の分化段階は，細胞内での脂肪滴の蓄積が一つの目安となっている[11]．本研究においても，分化誘導後 5 日目では小型の脂肪滴が内部に多数見られる

細胞が観察されたのに対して，15 日目では大型の脂肪滴が見られる細胞が観察された (図6 B, C) ．さらに分化が進むと，脂肪前駆細胞マーカーとして知られる Pref-1 の発現量も減少していた (図6 D, E) ．この Pref-1 は，Notch/Delta/Serrate ファミリーに属する上皮成長因子様リピート含有タンパク質で，脂肪細胞分化を抑制する働きがあり，脂肪前駆細胞のマーカーとして報告されている[46]. *aP2* や *PPARγ* が脂肪細胞分化とともに発現が上昇していくのに対し，*Pref-1* は脂肪前駆細胞株である 3T3-L1 細胞において高発現を認める．そして，脂肪細胞分化が進むとともにその発現量が低下していくことが報告されている[47]. 以上のことから，本研究において，分化誘導 5 日目を分化初期段階の脂肪前駆細胞として，また 15 日目を分化後期の成熟脂肪細胞として設定し，比較検討できると考えた.

次に，LIF を作用させる期間と脂肪滴形成量との関係について検索したところ，LIF を継続的に添加した場合の解析結果から，LIF は脂肪細胞分化初期 (培養 5 日目) と後期 (培養 15 日目) で異なる働きをしていることが分かった (図4) ．また，脂肪細胞分化誘導開始後 5 日目もしくは 10 日目から LIF を誘導培地に添加した結果と比較すると，分化誘導開始後 5 日目および 10 日目から LIF を添加したいずれの場合も，吸光度の値はあまり上昇せず，LIF 非添加群と同じ傾向となった (図2) ．以上のことから, LIF を継続的に添加することが,

LIF の効果を発することにつながると分かった.

脂肪細胞の分化過程において，分化後期に関しては，初代培養細胞系や3T3-L1 といった細胞株を用いて比較的多くの研究がなされており，分化に影響する因子やその作用機序に関して多くの知見が集積しつつある．それに対し，幹細胞から脂肪前駆細胞への分化初期段階についての知見はほとんどないのが現状である．しかし近年行われたマイクロアレイの結果から，Wnt/β-catenin 経路がこの分化初期段階に関与していることが示唆された．つまり，Wnt/β-catenin 経路は脂肪細胞分化初期には正の制御因子として[28)]，また分化後期には負の制御因子として機能していることが推測された[18, 19)]．本研究の実験結果から，LIF は脂肪細胞分化において，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ことが分かった．Bowers ら[26)]は，時期特異的に Wnt/β-catenin 経路関連分子の発現量は相反することを報告していることより，LIF と Wnt/β-catenin 経路の間に何らかの関連性があるのではないかと考えた．本研究において，Wnt10b を加えることによって発現が上昇した β-catenin タンパクは，LIF 刺激後 2 時間で発現が低下したことから (図10) ，LIF は，Wnt10b を直接分解もしくは，Wnt10b 下流のシグナル経路を抑制している可能性が示唆された.

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[48]. 活性化される経路の選択性については, Wnt とレセプターである Frizzled の組み合わせによって決まると考えられている[49]. Wnt10b は, 古典的経路を活性化させる代表的な Wnt として知られており, 脂肪前駆細胞の段階で最も発現量が高くなり, その後, 分化が進行するにつれてその発現量は急速に低下していくことが報告されている[18, 25]. 間葉系幹細胞株である ST2 やマウス胎仔線維芽細胞株を用いた *in vitro* の実験では, *Wnt10b* を過剰発現させると β-catenin タンパクの細胞内蓄積が観察され, その結果, 脂肪細胞への分化が抑制されるという報告がある[18]. また, *Wnt10b* ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の実験でも, 脂肪細胞関連遺伝子の高発現を認めたという報告もある[21, 50]. 本実験においても, 脂肪細胞分化誘導 5 日目において *Wnt10b* を含めた Wnt/β-catenin 経路に関わる分子の発現量が高かったのに対し, 15 日目では相反して発現量は低いことが確認された (図7) .

一方, Wnt5a は非古典的経路を活性化させる代表的な Wnt として知られており, これも脂肪細胞への分化が進むにつれて, 発現が低下していくと報告されている[51]. 本研究においても, 分化誘導 5 日目と比較して 15 日目において発現は低下するという実験結果が得られた (図7) . ただし, 非古典的経路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. Wnt5a については古典的経路の標的遺伝子であり, 転写された Wnt5a は, 古典的経路を

抑制することで，脂肪細胞への分化を促進するという報告がある[52, 53]．その一方で，ST2 細胞株を用いた実験では，Wnt5a を介した非古典的経路は，PPARγ の転写活性を抑制することで脂肪細胞への分化を抑制するとも報告されている[54]．Kennell ら[55]も同様に非古典的経路が脂肪細胞分化を抑制すると報告している．本研究の実験結果から，古典的経路，非古典的経路ともに脂肪細胞への分化を抑制する働きがある可能性が示唆された．そして LIF は，脂肪細胞分化後期において，その古典的経路と非古典的経路の双方を抑制することで積極的に脂肪細胞への分化を促進する働きがあるものと推察される．また，古典的経路のみならず，非古典的経路も分化初期段階に関与していることが示唆された．

今後，LIF シグナルと Wnt シグナル経路をつなぐメカニズムについてさらなる解析が必要と考えている．例えば，本研究では Wnt シグナル経路の活性化について，Wnt シグナル伝達分子の発現量の増減にて評価したが，β-catenin/TCF 複合体が実際に転写活性を誘導しているかどうかについて，ゲルシフトアッセイ等の機能解析によって評価する必要があると考えている．また，レトロウィルスによる遺伝子導入や sh-RNA によるノックダウンにより，LIF シグナルと Wnt シグナル経路をつなぐメカニズムをより明らかにできればと考えている．

結論

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するという時期特異的な分化制御機構を持つことが明らかとなった.

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う機会を与えて頂き，適切なる御指導と御高閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室) 林美加子教授に謹んで感謝の意を表します．また，本研究の遂行に際し，終始変わらぬ御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室) 伊藤祥作博士に深く感謝致します．最後に本研究に対して御理解，御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室) の諸先生方に心から感謝致します．

文献

1) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.

2) Meirelles Lda S, Nardi NB. 2009. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci.* 14: 4281-4298.

3) Ishizaka R, Iohara K, Murakami M, Fukuta O, Nakashima M. 2012. Regeneration of dental pulp following pulpectomy by fractionated stem/progenitor cells from bone marrow and adipose tissue. *Biomaterials* 33: 2109-2118.

4) Caplan AI. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 9: 641-650.

5) Meirelles Lda S, Nardi NB. 2003. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol.* 123: 702-711.

6) Meirelles Lda S, Chagastelles PC, Nardi NB. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 119: 2204-2213.

7) Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M. 2006. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ*. 48: 361-370.

8) Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. 1999. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem.* 72: 570-585.

9) Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. 2004. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 103: 1662-1668.

10) Watabe T, Miyazono K. 2009. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res.* 19: 103-115.

11) Tang QQ, Lane MD. 2012. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem.* 81: 715-736.

12) MacDougald OA, Lane MD. 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem.* 64: 345-373.

13) Mandrup S, Lane MD. 1997. Regulating adipogenesis. *J Biol Chem.* 272: 5367-5370.

14) Otto TC, Lane MD. 2005. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 40: 229-242.

15) Hong JH, Yaffe MB. 2006. TAZ: a beta-catenin-like molecule that regulates

mesenchymal stem cell differentiation. *Cell Cycle* 5: 176-179.

16) Nuttall ME, Gimble JM. 2004. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol.* 4: 290-294.

17) Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. 2009. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell. Mol. Life. Sci.* 66: 236-253.

18) Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA. 2000. Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling. *Science* 289: 950-953.

19) Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, Macdougald OA. 2007. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 282: 14515-14524.

20) Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. 2009. Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab.* 20: 16-24.

21) Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA. 2005. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3324-3329.

22) Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, Silva D, Park BH, Liu J, Farmer SR. 2003. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/ beta-catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J.* 376: 607-613.

23) Qiu W, Andersen TE, Bollerslev J, Mandrup S, Abdallah BM, Kassem M. 2007. Patients with high bone mass phenotype exhibit enhanced osteoblast differentiation and inhibition of adipogenesis of human mesenchymal stem cells. *J Bone Min Res.* 22: 1720-1731.

24) Rawadi G, Vayssière B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. 2003. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J. Bone Miner. Res.* 18: 1842-1853.

25) Bennett CN, Ross SE, Longo KA, Bajnok L, Hemati N, Johnson KW, Harrison SD, MacDougald OA. 2002. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem.* 277: 30998-31004.

26) Bowers RR, Lane MD. 2008. Wnt signaling and adipocyte lineage commitment. *Cell Cycle* 7: 1191-1196.

27) Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. 2004. Wnt3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 93: 1210-1230.

28) Cho HH, Kim YJ, Kim SJ, Kim JH, Bae YC, Ba B, Jung JS. 2006. Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells. *Tissue Eng.* 12: 111-121.

29) White UA, Stephens JM. 2011. The gp130 receptor cytokine family: regulators of adipocyte development and function. *Curr Pharm Des.* 17: 340-346.

30) Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE Jr, Yancopoulos GD. 1995. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267: 1349-1353.

31) Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S, et al. 1994. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 263: 92-95.

32) Segal RA, Greenberg ME. 1996. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci.* 19: 463-489.

33) Hirano T, Nakajima K, Hibi M. 1997. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8: 241-252.

34) Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation.

Biochem J. 374: 1-20.

35) Kimber SJ. 2005. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction* 130: 131-145.

36) Alonzi T, Middleton G, Wyatt S, Buchman V, Betz UA, Müller W, Musiani P, Poli V, Davies AM. 2001. Role of STAT3 and PI3-kinase/Akt in mediating the survival actions of cytokines on sensory neurons. *Mol Cell Neurosci.* 18: 270-282.

37) Itoh S, Udagawa N, Takahashi N, Yoshitake F, Narita H, Ebisu S, Ishihara K. 2006. A critical role for interleukin-6 family-mediated Stat3 activation in osteoblast differentiation and bone formation. *Bone* 39: 505-512.

38) Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S. 2008. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappaB signaling pathways. *J Biol Chem.* 283: 11535-11540.

39) Stephens JM, Lumpkin SJ, Fishman JB. 1998. Activation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 by leukemia inhibitory factor, oncostatin-M, and interferon-gamma in adipocytes. *J Biol Chem.* 273: 31408-31416.

40) Falconi D, Oizumi K, Aubin JE. 2007. Leukemia Inhibitory Factor Influences the Fate Choice of Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cells* 25: 305-312.

41) Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. 1992. Evidence for an

inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci.* 102: 341-351.

42) Gimble JM, Wanker F, Wang CS, Bass H, Wu X, Kelly K, Yancopoulos GD, Hill MR. 1994. Regulation of bone marrow stromal cell differentiation by cytokines whose receptors share the gp130 protein. *J Cell Biochem.* 54: 122-133.

43) Aubert J, Dessolin S, Belmonte N, Li M, McKenzie FR, Staccini L, Villageois P, Barhanin B, Vernallis A, Smith AG, Ailhaud G, Dani C. 1999. Leukemia Inhibitory Factor and Its Receptor Promote Adipocyte Differentiation via the Mitogen-activated Protein Kinase Cascade. *J Biol Chem.* 274: 24965-24972.

44) Hogan JC, Stephens JM. 2005. Effects of leukemia inhibitory factor on 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol.* 185: 485-496.

45) Itoh S, Aubin JE. 2009. A novel purification method for multipotential skeletal stem cells. *J Cell Biochem.* 108: 368-377.

46) Wang Y, Kim KA, Kim JH, Sul HS. 2006. Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis. *J Nutr.* 136: 2953-2956.

47) Mitterberger MC, Lechner S, Mattesich M, Kaiser A, Probst D, Wenger N, Pierer G, Zwerschke W. 2012. DLK1(PREF1) is a negative regulator of adipogenesis in $CD105^{+}/CD90^{+}/CD34^{+}/CD31^{-}/FABP4^{-}$ adipose-derived stromal cells from subcutaneous abdominal fat pats of adult women. *Stem Cell Res.* 9: 35-48.

48) Katoh M, Katoh M. 2007. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res.* 13: 4042-4045.

49) Bejsovec A. 2005. Wnt pathway activation: new relations and locations. *Cell* 120: 11-14.

50) Vertino AM, Taylor-Jones JM, Longo KA, Bearden ED, Lane TF, McGehee RE Jr, MacDougald OA, Peterson CA. 2005. Wnt10b deficiency promotes coexpression of myogenic and adipogenic programs in myoblasts. *Mol Biol Cell* 16: 2039-2048.

51) van Tienen FH, Laeremans H, van der Kallen CJ, Smeets HJ. 2009. Wnt5b stimulates adipogenesis by activating PPARgamma, and inhibiting the beta-catenin dependent Wnt signaling pathway together with Wnt5a. *Biochem Biophys Res Commun.* 387: 207-211.

52) Katoh M, Katoh M. 2007. STAT3-induced WNT5A signaling loop in embryonic stem cells, adult normal tissues, chronic persistent inflammation, rheumatoid arthritis and cancer (Review). *Int J Mol Med.* 19: 273-278.

53) Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y. 2003. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol.* 162: 899-908.

54) Takada I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, Igarashi M, Youn MY,

Takeyama K, Nakamura T, Mezaki Y, Takezawa S, Yogiashi Y, Kitagawa H, Yamada G, Takada S, Minami Y, Shibuya H, Matsumoto K, Kato S. 2007. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol.* 9: 1273-1285.

55) Kennell JA, MacDougald OA. 2005. Wnt signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem.* 280: 24004-24010.

表 1. リアルタイム PCR に使用した各種プライマー

Gene	Forward primer	Reverse primer
L32	CACAATGTCAAGGAGCTGGAAGT	TCTACAATGGCTTTTCGGTTCT
Dkk2	GGAATCTGCATCCCAGTCACTGAG	TGTGGCCTTCCTAGATTCTGCCAT
Sfrp1	TTCTACTGGCCCGAGATGCTCAA	GACTTCAACTCGTTGTCGCATGGA
Wnt5a	TCGCCATGAAGAAGCCCATTCGAA	TGTCCTTGAGAAAGTCCTGCCAGT
Wnt10b	GATACCCACAACCGCAACTC	GGGTCTCGCTCACAGAAGTC
β-catenin	ATGGCTACTCAAGCTGACCTG	GACAACTGCATGTTTCAACATC
Lrp5	CCCACTCACGGGTGTCAAA	TGCTCCACTGAGCTCCCATT
Lrp6	CTGGATTATTGTCCCCGGAT	GTGTGTATTCCAGTCAGTCC
Tcf7	CAGCTCCCCCATACTGTGAG	TGCTGTCTATATCCGCAGGAA
Tcf7l1(Tcf3)	ACGAGCTGATCCCCTTCCA	CAGGGACGACTTGACCTCAT
aP2	TCCAGTGAAAACTTCGATGATTACA	GGCCATGCCTGCCACTTT
PPARγ	GCCCACCAACTTCGGAATC	TGCGAGTGGTCTTCCATCAC
Pref1	TGACCAGTGCGTGACCTCT	GGCAGTCCTTTCCCGAAGTA

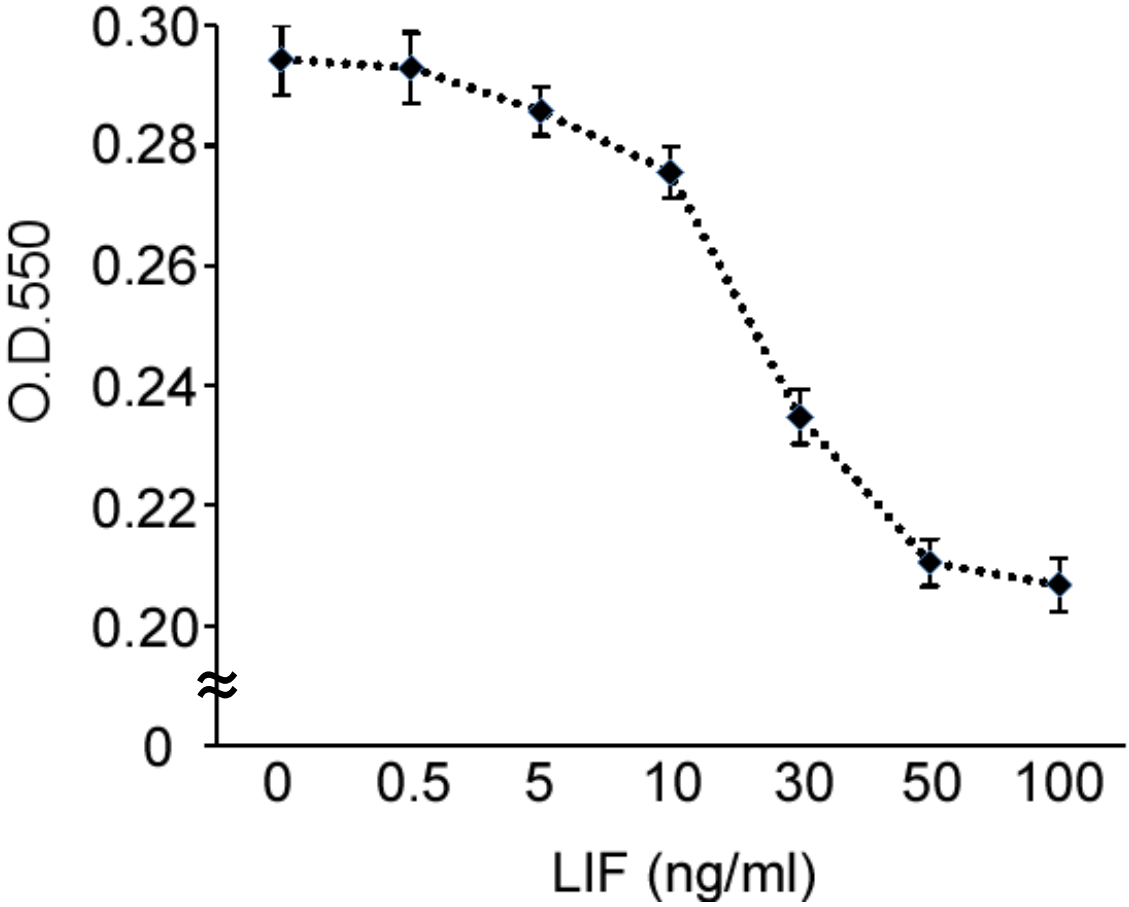

図 1. LIF の濃度設定

種々の濃度の LIF (0, 0.5, 5, 10, 30, 50, 100 ng/ml) を含む脂肪細胞分化誘導培地にて, 分化誘導後 5 日目の脂肪滴量. (n = 3)

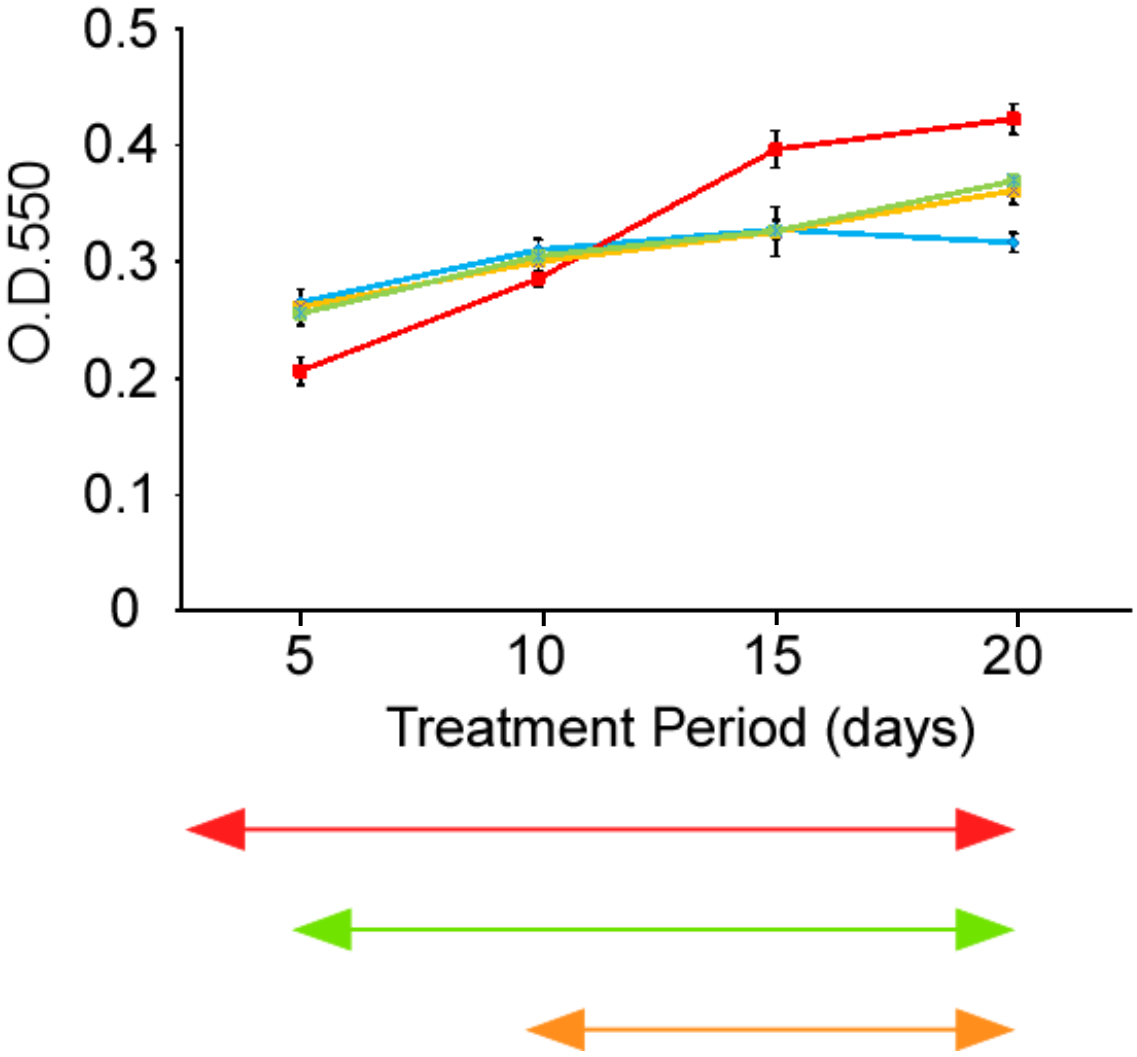

図 2. LIF を作用させる期間と脂肪滴形成量との関係

骨髄ストローマ細胞を脂肪細胞へと分化誘導を行う際に, LIF を継続的に添加した場合 (▬) , LIF を全く添加しない場合 (▬) , 分化誘導後 5 日目から LIF を添加した場合 (▬) , 分化誘導後 10 日目から LIF を添加した場合 (▬) の脂肪滴形成量. (n = 3)

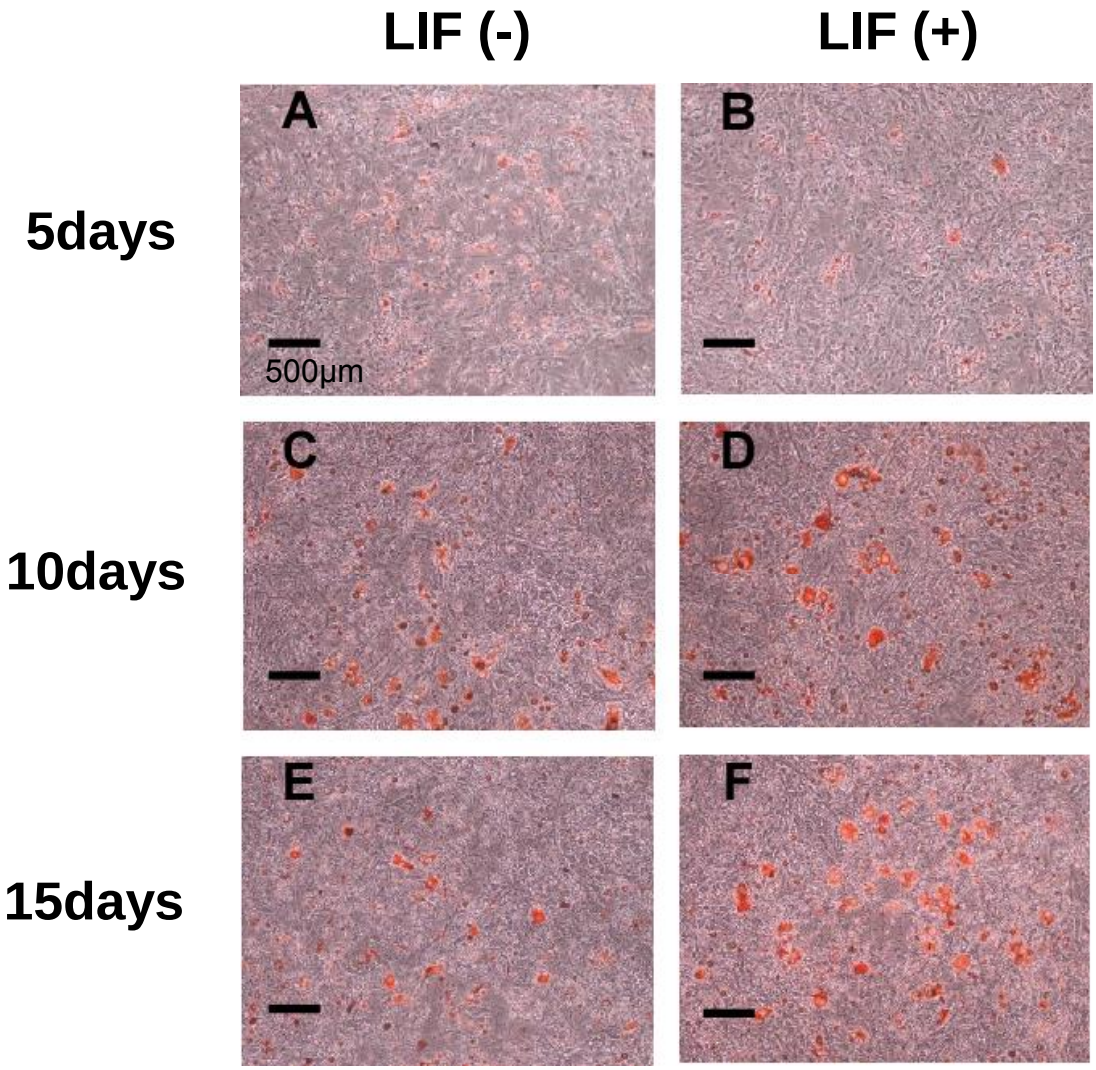

図 3. LIF が Oil red O 陽性細胞形成に及ぼす影響

LIF 非添加 (A, C, E) もしくは添加 (B, D, F) 脂肪細胞分化誘導培地中で骨髄ストローマ細胞を, 5 日間 (A, B) , 10 日間 (C, D) , 15 日間 (E, F) 培養した後の Oil red O 染色像.

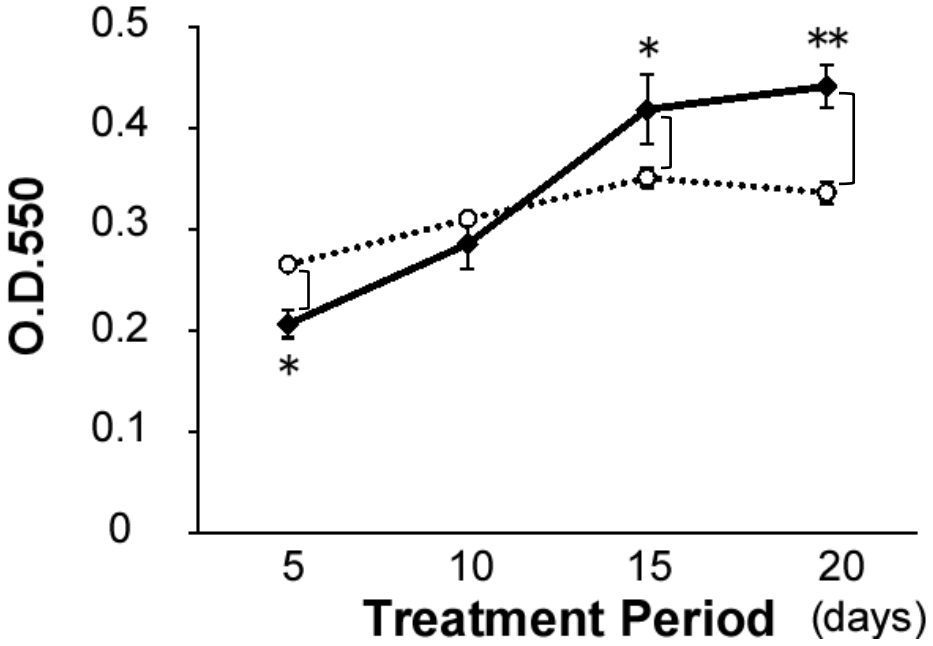

図 4. LIF が骨髄ストローマ細胞の脂肪細胞分化に及ぼす影響

骨髄ストローマ細胞を, LIF 添加 (◆) ならびに非添加 (○) 脂肪細胞分化誘導培地中で, 一定期間 (5, 10, 15, 20 日間) 培養した時の脂肪滴形成量. (n = 3), Student's *t*-test, $p < 0.05$ (*), $p < 0.005$ (**)

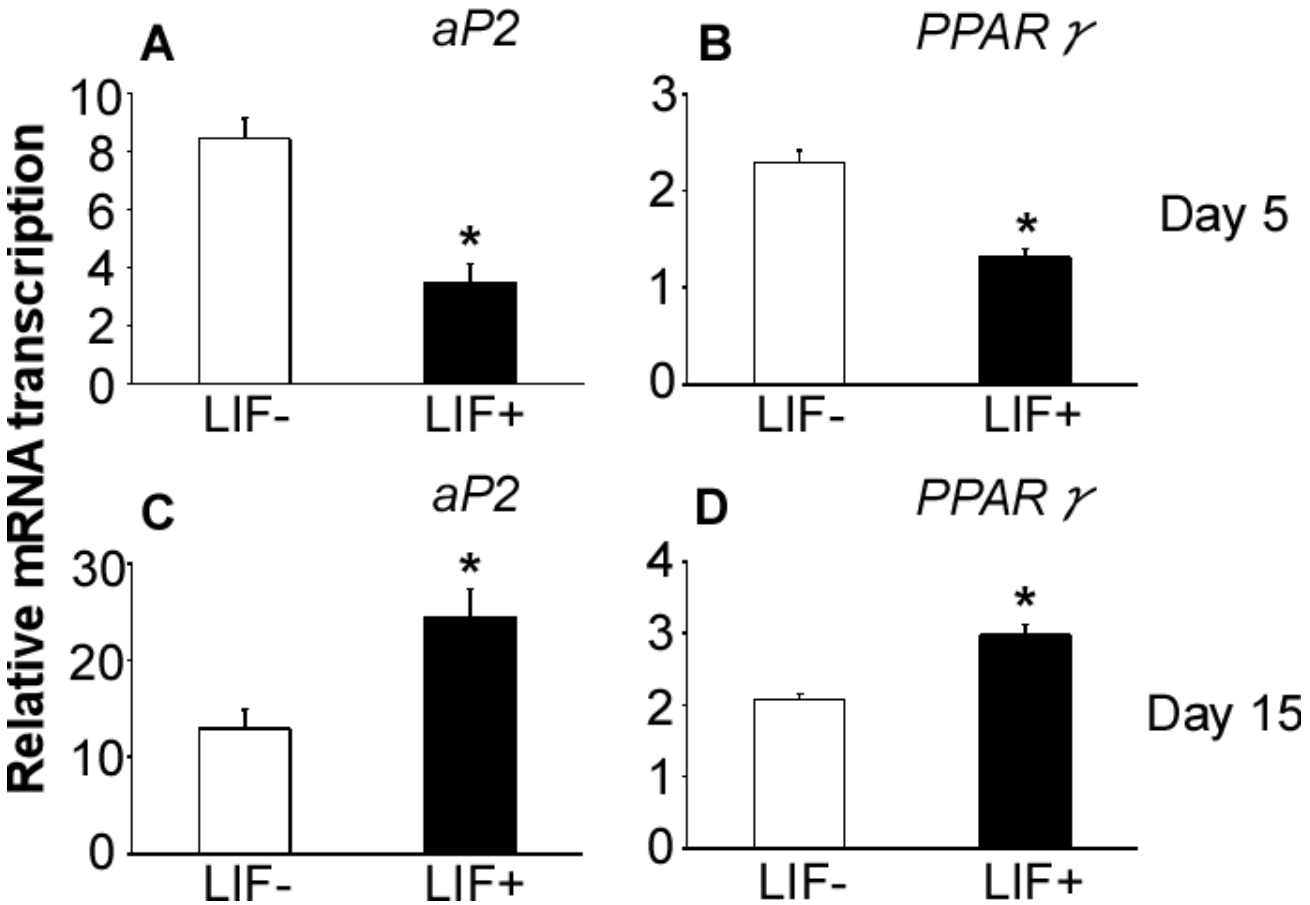

図 5. 脂肪細胞分化マーカー発現量の解析

骨髄ストローマ細胞を，LIF 添加，非添加脂肪細胞分化誘導培地中で，5 日間 (A, B) および 15 日間 (C, D) 培養した時の *aP2* (A, C) もしくは *PPARγ* (B, D) の mRNA 発現量. なお, mRNA の発現量は *L32* を用いて補正した. (n = 3), Student's *t*-test, $p < 0.05$ (*)

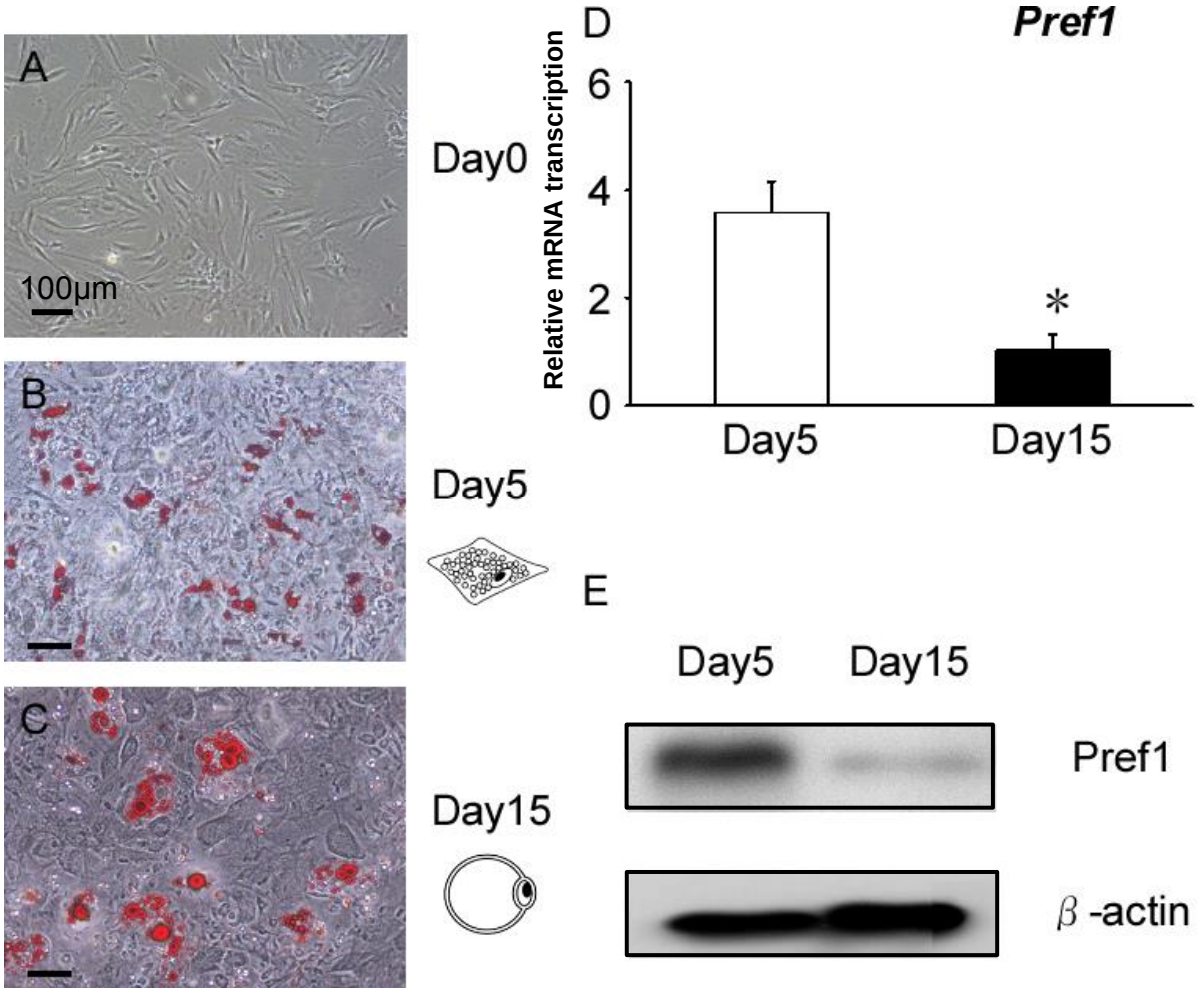

図 6. 脂肪細胞分化誘導 5 日目と 15 日目の
骨髄ストローマ細胞に対する分化段階の評価

骨髄ストローマ細胞を, 0 日間 (A) , 5 日間 (B) , 15 日間 (C) 分化誘導行った後の Oil red O 染色像.
(D) 骨髄ストローマ細胞を, 脂肪細胞分化誘導培地中で, 5 日間および 15 日間培養した時の *Pref1* の mRNA 発現量. なお, mRNA 発現量は *L32* を用いて補正した. (n = 3), Student's *t*-test, $p < 0.05$ (*)
(E) 骨髄ストローマ細胞を 5 日間ならびに 15 日間脂肪細胞分化誘導培地中にて培養した時の Pref1 タンパク発現量.

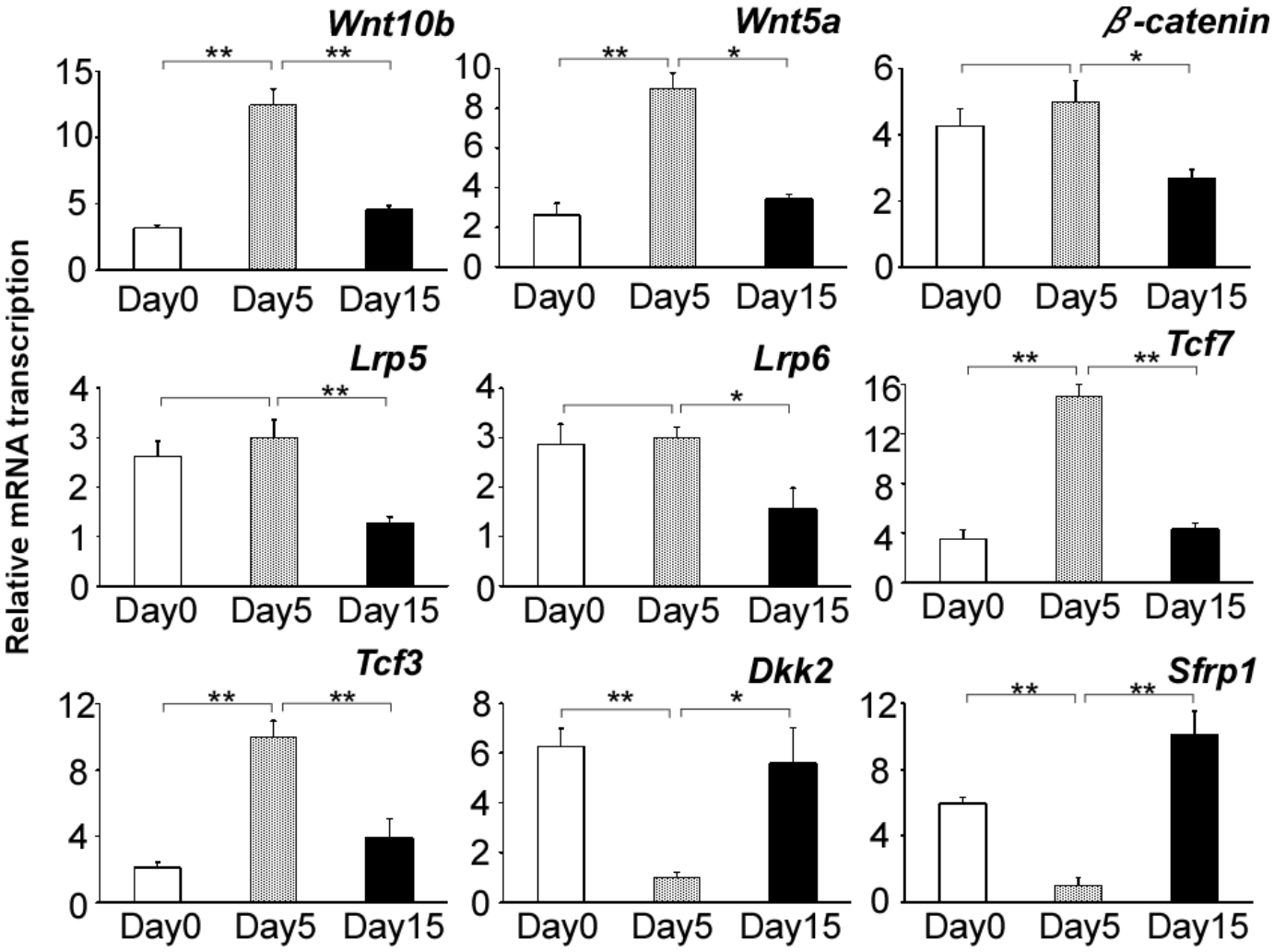

図 7. Wnt シグナル経路関連分子発現量の解析

骨髄ストローマ細胞を, 脂肪細胞分化誘導培地中にて, 培養 0 日目 (□) , 5 日目 (▩) , 15 日目 (■) の *Wnt10b, Wnt5a, β-catenin, Lrp5, Lrp6, Tcf7, Tcf3, Dkk2, Sfrp1* の mRNA 発現量. mRNA の発現量は, *L32* を用いて補正した. (n = 3), One-way ANOVA および Fisher's LSD test, $p < 0.05$ (*), $p < 0.005$ (**)

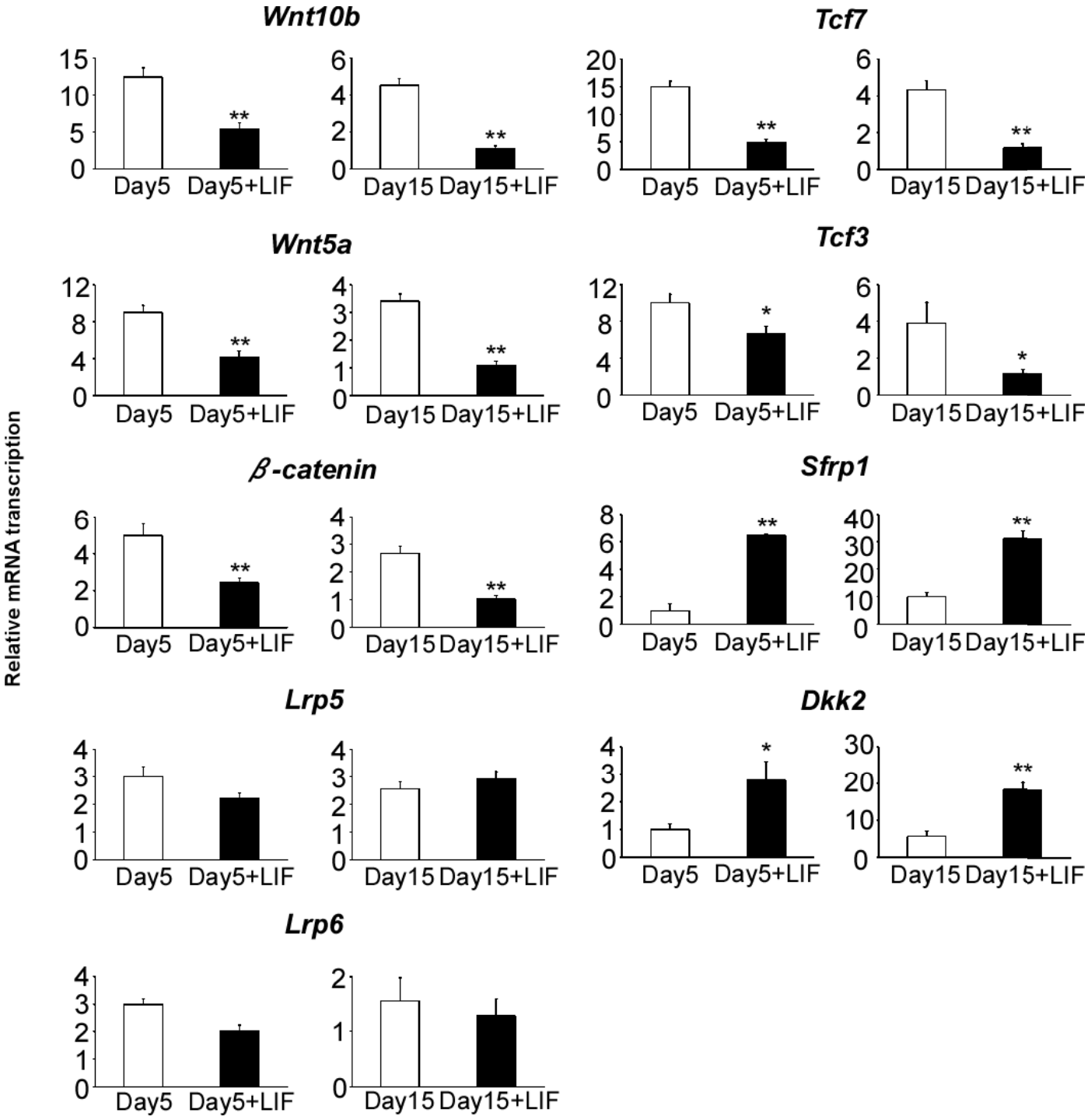

図 8. LIF が Wnt シグナル経路関連分子発現量に及ぼす影響の解析

骨髄ストローマ細胞を，LIF 添加，非添加脂肪細胞分化誘導培地中で，5 日間および 15 日間培養した時の *Wnt10b, Wnt5a, β-catenin, Lrp5, Lrp6, Tcf7, Tcf3, Dkk2, Sfrp1* の mRNA 発現量. mRNA の発現量は, *L32* を用いて補正した. (n = 3), Student's *t*-test, $p < 0.05$ (*), $p < 0.005$ (**)

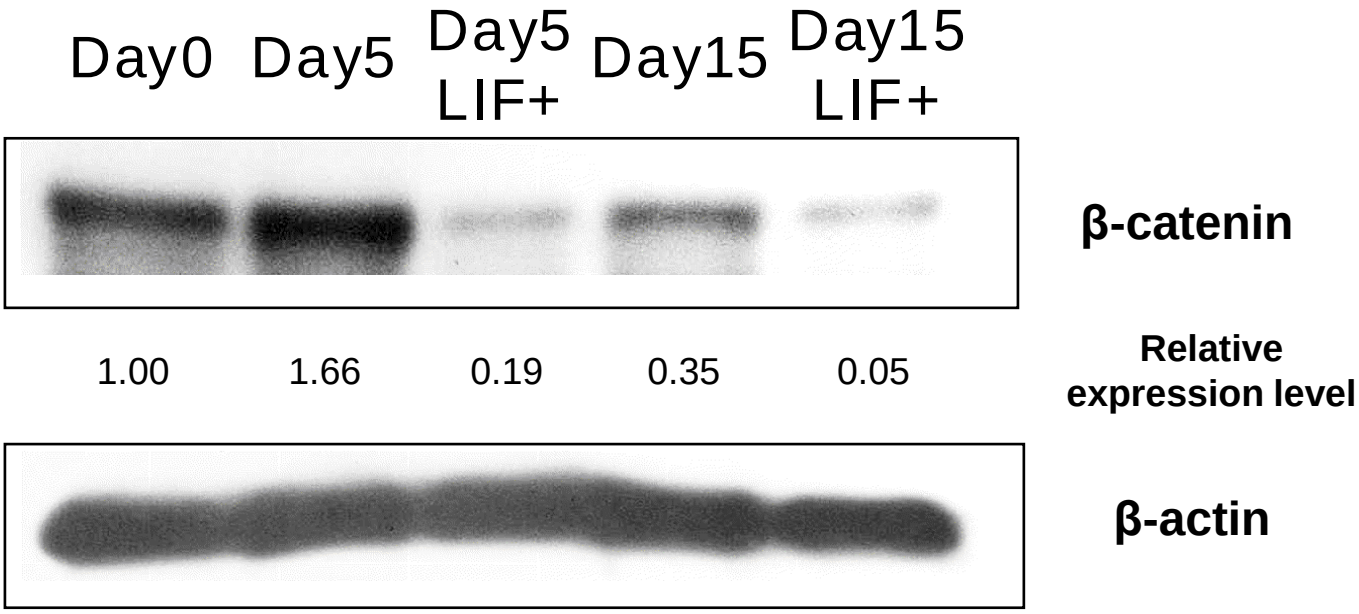

図 9. LIF の細胞質内 β-catenin タンパク発現に及ぼす影響

骨髄ストローマ細胞を，LIF 添加，非添加脂肪細胞分化誘導培地中にて 5 日間および 15 日間培養した時の β-catenin タンパク発現量. 数値は，脂肪細胞へと分化誘導する前の β-catenin タンパク発現量 / β-actin タンパク発現量を 1 とした時の相対的発現量.

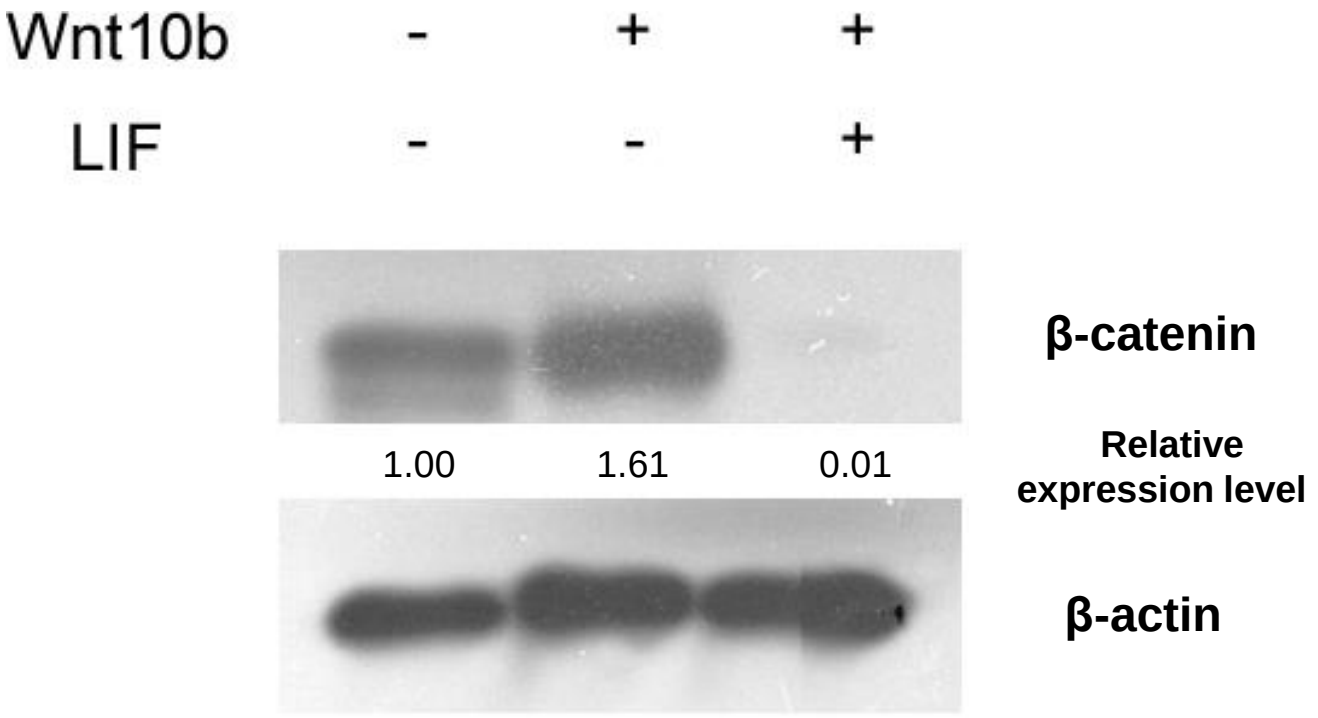

図 10. Wnt10b と LIF の共刺激における β-catenin タンパク発現量の解析

骨髄ストローマ細胞を, Wnt10b 存在下, ならびに Wnt10b と LIF 共存在下にて培養した時の β-catenin タンパク発現量. 数値は, Wnt10b および LIF 非存在下で培養した時の β-catenin タンパク発現量 / β-actin タンパク発現量を 1 とした時の相対的発現量.

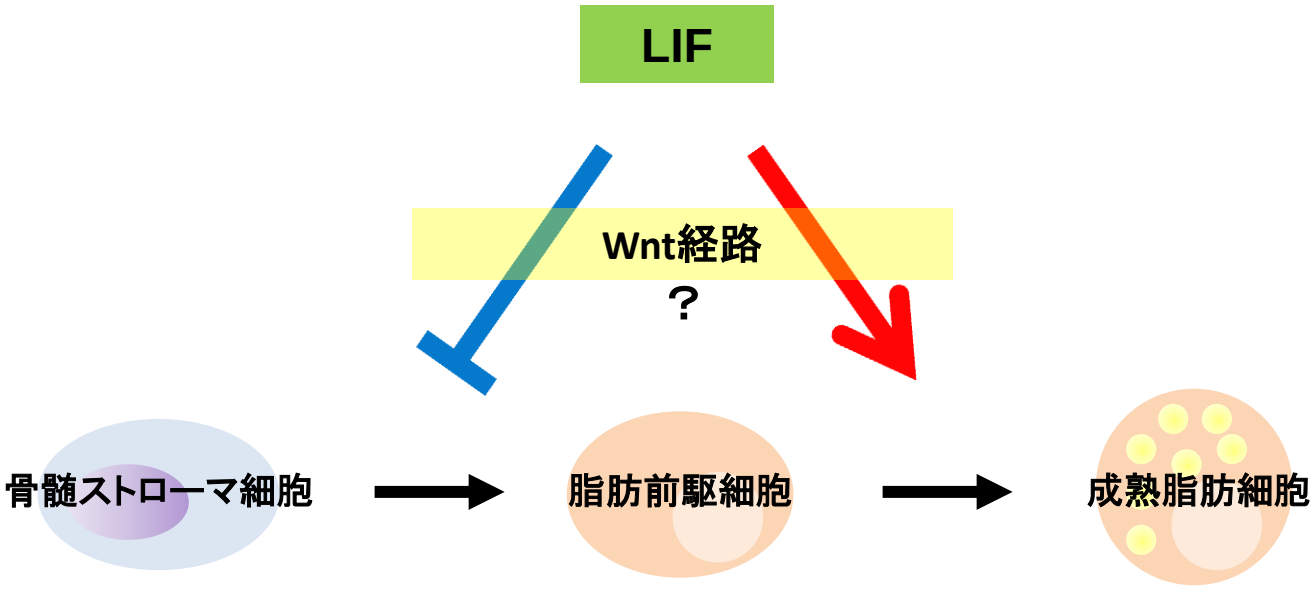

図 11. LIF が脂肪細胞分化に及ぼす影響の概念図

マウス骨髄ストローマ細胞において，LIF は Wnt シグナル経路を調節することによって，分化初期には脂肪前駆細胞への分化を抑制し，分化後期には成熟脂肪細胞への分化を促進している可能性がある.