

論文の内容の要旨

氏名：柴田 知佳

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：炎症性サイトカインが脂肪細胞の血管新生因子とタンパク分解関連因子の発現に及ぼす影響

脂肪組織の血管網と細胞外基質の継続的なリモデリングは、酸素と栄養素の適切な供給と十分な空隙を脂肪細胞にもたらす。一方、血管形成の相対的な減少と細胞外基質タンパクの代謝回転の遅延は、脂肪組織の代謝能力を低下させ、糖尿病や動脈硬化性疾患のリスクにつながる有害因子の増加を招くと考えられている。脂肪細胞は、vascular endothelial cell growth factor (VEGF) A や hepatocyte growth factor (HGF) などの血管新生因子を産生し、脂肪組織の血管形成に関与する。また、脂肪細胞は I 型コラーゲンをはじめとする細胞外基質タンパクとともに、タンパク分解酵素 matrix metalloproteinases (MMPs) とその内因性阻害因子 tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs) を発現し、細胞外基質のリモデリングを調節している。

慢性歯周炎やリウマチ性疾患などの局所または全身的な炎症性疾患が、心血管疾患、肥満、および代謝異常の発症と関連し、また、これらの炎症性疾患を有する患者は健常者に比べ、血中の interleukin (IL)-6 と tumor necrosis factor (TNF)- α のレベルが高いことが知られている。すなわち、局所または全身的に増加する炎症性サイトカインが、脂肪組織の増大化や機能不全に影響することが示唆される。そこで本研究では、肥満の進行の初期と後期のそれぞれの段階を想定し、含有する脂肪滴が小さい未成熟脂肪細胞と、大滴化した脂肪を有する成熟脂肪細胞を IL-6 または TNF- α で刺激し、血管新生因子、I 型コラーゲン、MMPs および TIMPs の発現を調べた。また、脂肪細胞由来の培養上清を含む conditioned medium がヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) による管様構造形成に及ぼす影響についても検討した。

脂肪前駆細胞である 3T3-L1 を分化誘導した初期 (4~5 日目) と後期 (14~15 日目) にそれぞれ認められる未成熟脂肪細胞と成熟脂肪細胞を 0.01 ng/mL の IL-6 または TNF- α で 12 時間刺激した。血管新生因子である VEGFA, HGF, angiopoietin (ANG)-1 および ANG-2, ならびに I 型コラーゲン, MMP-13, MMP-14, TIMP-1 および TIMP-2 の遺伝子発現を real-time PCR 法で調べた。また、脂肪細胞の培養上清中の VEGFA, HGF, ANG-1 および ANG-2 のタンパクを ELISA 法で調べた。さらに、脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium で HUVEC を培養後、管様構造の形成を顕微鏡で観察し、管の長さを計測した。

血管新生因子の遺伝子発現を調べた結果、未成熟脂肪細胞の VEGFA, HGF, および ANG-2 の遺伝子発現は、未刺激に比べて IL-6 または TNF- α の刺激で増加し、ANG-1 の発現は減少した。一方、成熟脂肪細胞の VEGFA, HGF, および ANG-2 の遺伝子発現は、これらの炎症性サイトカインの刺激で減少した。また、成熟脂肪細胞の ANG-1 の遺伝子発現は、IL-6 の刺激で有意に増加したが、TNF- α の刺激の影響は認められなかった。次に、これら血管新生因子のタンパク発現を調べた結果、HGF のタンパク発現は、未成熟脂肪細胞では IL-6 または TNF- α の刺激で増加し、成熟脂肪細胞では減少した。VEGFA のタンパク発現は、未成熟脂肪細胞では IL-6 または TNF- α の刺激で増加し、成熟脂肪細胞では IL-6 の刺激でのみ減少した。ANG-2 のタンパク発現は、未成熟脂肪細胞では IL-6 と TNF- α の刺激で増加したが、成熟脂肪細胞ではこれらのサイトカイン刺激の影響は認められなかった。ANG-1 のタンパク発現は、未成熟脂肪細胞では IL-6 と TNF- α の刺激で減少したが、成熟脂肪細胞では刺激の影響は認められなかった。

さらに、HUVEC による管様構造の形成を調べた結果、未刺激に比べて IL-6 または TNF- α で刺激した未成熟脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium で培養した HUVEC で、より多くの管様構造が認められた。顕微鏡視野中の管の長さの平均は、IL-6 または TNF- α で刺激した未成熟脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium で増加した。一方、成熟脂肪細胞の培養上清を含む conditioned medium で培養した HUVEC の管様構造の形成には、脂肪細胞への炎症性サイトカインの刺激の影響は認められなかった。

次に、脂肪細胞のI型コラーゲン、MMP-13、MMP-14、TIMP-1およびTIMP-2の遺伝子発現を調べた。その結果、未成熟脂肪細胞と成熟脂肪細胞のI型コラーゲンの遺伝子発現に、IL-6とTNF- α の刺激の影響は認められなかった。一方、MMP-13の遺伝子発現は、未成熟脂肪細胞では刺激の影響は認められず、成熟脂肪細胞ではIL-6とTNF- α の刺激で減少した。MMP-14の遺伝子発現は、未成熟脂肪細胞ではIL-6とTNF- α の刺激で増加し、成熟脂肪細胞では刺激の影響は認められなかった。また、TIMP-1とTIMP-2の遺伝子発現は、未成熟脂肪細胞ではIL-6とTNF- α の刺激で減少した一方で、成熟脂肪細胞では刺激の影響は認められなかった。

以上の結果から、IL-6とTNF- α は未成熟脂肪細胞における血管新生因子の発現を増加させ、血管形成を誘導することが明らかとなった。また、未成熟脂肪細胞へのIL-6とTNF- α の刺激は細胞外基質タンパク分解を促進し、成熟脂肪細胞への刺激はこれを抑制すると考えられた。すなわち、これらの炎症性サイトカインは、脂肪細胞を介した血管新生と細胞外基質タンパクの分解バランスを変化させて、脂肪組織の過度な増大化と機能不全を惹起する可能性が示唆された。