

Macrophage Migration Inhibitory Factor による 骨格筋の糖代謝調節

首都大学東京 藤井 宣晴
(共同研究者) 同 眞鍋 康子
同 古市 泰郎

Macrophage Migration Inhibitory Factor Regulates Glucose Metabolism in Skeletal Muscle

by

Nobuharu L Fujii, Yasuko Manabe, Yasuro Furuichi
*Department of Health Promotion Sciences,
Graduate School of Human Health Sciences, Tokyo Metropolitan University*

ABSTRACT

We have found that macrophage migration inhibitory factor (MIF) is secreted from C2C12 myotubes into culture media. In order to evaluate roles of MIF on glucose metabolism in skeletal muscle, extensor digitorum longus and soleus muscles were isolated from mice and treated with recombinant MIF in in vitro muscle incubation system. MIF itself did not affect to glucose transport in both type of muscles. However, glucose transport induced by half-max dose of insulin was diminished by co-existence of MIF in the buffer of soleus muscle incubation. These results suggest that MIF is a negative regulator of insulin-induced glucose transport in skeletal muscle. These results show that MIF is a novel myokine contributing to glucose metabolism and can be a new target molecule for prevention and treatment of diabetes.

要 旨

本研究では、Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) は骨格筋から分泌される新たなマイオカインで、骨格筋自身に作用して、インスリンによって誘発される糖の取り込みを抑制することを明らかにした。MIF は分子量が約 12kDa の低分子で、これまでは骨格筋に発現することは知られていなかったが、マウスの異なる種類の下肢骨格筋に発現することをウェスタンブロッティング法で確認した。つぎに、*in vivo* エレクトロポレーション法で、マウス下肢骨格筋にタグを付した MIF を発現させたところ、血液中にそれが検出され、骨格筋から分泌されることが示された。MIF は単独では骨格筋の糖輸送に影響を与えなかったが、インスリン刺激で生じる糖輸送を抑制した。これらの結果は、MIF が骨格筋の糖代謝調節に関わるマイオカインの 1 つであることを示すとともに、糖尿病の予防・治療の新たな標的分子となる可能性を示唆する。

緒 言

我々はこれまでに、骨格筋から分泌される新規ホルモン様タンパク質（総称してマイオカイン、*myo* = 筋、*kine* = 作動物質）の探索を行ってきた^{1, 2)}。その過程で、マウス骨格筋細胞から培養液中に Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) が浸出する可能性を、質量分析によって突き止めた。MIF は本来、マクロファージの遊走を止めるサイトカインとして、T 細胞で発見された因子である。したがって、生体防御機能を多様に(免疫・炎症・解毒など) 調節する T 細胞由来因子 MIF が、骨格筋からも分泌されることを示した結果であった。そもそもこれまでは、骨格筋はホルモン様タンパク質等を分泌する臓器とはみなされてこなかった。しかし我々の所見は、骨格筋が内分泌器官である可能性を示す。2008 年に Miller ら

は、MIF は心臓から分泌されて自己分泌的に心臓自身に作用し、AMP キナーゼを介して心臓保護作用を発揮することを報告している³⁾。骨格筋では AMP キナーゼの発現量が比較的多く、糖輸送促進調節を含んだ多彩な生理機能を担っている⁴⁾。したがって、マイオカインとしての MIF は、やはりオートクライン的に骨格筋自身に作用し何らかの生理機能を調節している可能性が考えられる。そこで本研究では、骨格筋が内分泌器官として担う未知の機能の証明に挑戦した。具体的には、(1) MIF が骨格筋から分泌されるマイオカインかどうかを検証する、(2) MIF が糖代謝調節に関連する新規因子であるかどうかを検証する、の 2 つの課題に取り組んだ。

1. 研究方法

1.1 細胞培養および培養液の回収

マウス由来筋芽細胞株 C2C12 (ATCC) を、10% ウシ胎児血清と 1% Antibiotic Antimycotic (Invitrogen) を添加した DMEM 増殖培地 (Invitrogen) 3ml の入った 4well デイッシュ (Nunc) に播種し、5% CO₂・37℃ でインキュベーションした。デイッシュには細胞がよく接着・分化するように BD matrigelTM マトリックス (BD Biosciences) のコートを施した。播種から 2 - 3 日後、細胞がコンフルエントになった時点で、2% 仔ウシ血清 (Invitrogen)、1% Antibiotic-Antimycotic、1% MEM 非必須アミノ酸 (Sigma) を添加した DMEM (分化培地) に培地を交換し、分化を誘導した。分化培地は毎日交換した。MIF の分泌は *microvesicle* と呼ばれる微小胞に含有された状態で行われると考えられることから、それを上清に残存させるために以下の分画を行った。細胞を培養した液を 1,000g で 5min 遠心し、一旦液を回収してからさらに 15,000g で 15min 遠心した。回収した培養液中のタンパク濃度を、後のウェスタンブロッティング用に最適な濃度にするた

めに、5kDa以上のタンパク質を透過しないフィルター Vivaspin20 (Sartorius stedim biotech) を使用し濃縮した。濃縮液の回収時にはピペットを用いて液量を測定した。

1. 2 マウス下肢への MIF の強制発現

HA タグで標識した MIF の cDNA を pCAGGS 発現ベクターに組み込み込んだ。これを麻酔下のマウス前頸骨筋および腓腹筋に、*in vivo* エレクトロポレーション法⁵⁾を用いて強制発現させた。4日後に再びマウスに麻酔して、腹膜を切開し、心臓から直接血液を採取した。血液は30分以上氷上に静置し、3,000gで10min遠心して、上清の血清を回収した。血液採取後、マウスの両脚の前脛骨筋および腓腹筋を回収し、lysis bufferを加えてホモジェナイズした。その後、チューブを遠心し、上清の可溶化液を回収した。全ての動物実験および遺伝子組み換え実験は首都大学東京研究倫理委員会の審査を受け承認されたうえで行った。

1. 3 MIF による骨格筋培養細胞の刺激

分化5日目のC2C12細胞に培養液1mlあたりそれぞれ0, 10, 100, 1000ng/mlになるようにPBSで希釈したりコンビナントMIF (R&D Systems)を全量が300 μ lになるように添加して5% CO₂・37℃で2時間インキュベーションした後、Dish 1レーンごとにlysis bufferによって細胞を回収した。

1. 4 ウェスタンブロッティング

濃縮液中のMIFをウェスタンブロッティングで定量した。回収した上清濃縮液を同液量16% Tris-Tricine ポリアクリルアミドゲルにロードし、電気泳動した。泳動したタンパク質はPVDF膜に転写し、ブロッキング液(5% スキムミルクを添加したTBST)を用いて室温で1時間ブロッキングした。その後、ヤギ由来マウスMIF一次抗体(R&D Systems)、ウサギ由来HA-タグ一次抗体

(Clontech)、ウサギ由来マウスリン酸化Akt一次抗体(Thr308, Cell Signaling)、あるいはウサギ由来マウスリン酸化c-Jun一次抗体(Cell Signaling)を1000倍希釈して4℃で8時間インキュベーションした。二次抗体にはHorseradish Peroxidase (HP)を結合させたヤギIgG抗体(Millipore)を用い、1,000倍希釈して常温で1時間インキュベーションした。その後、Enhanced chemiluminescence (ECL) (PerkinElmer)を反応させ、暗室でフィルムにタンパク質のバンドを現像した。

1. 5 骨格筋組織への糖取込み量の測定

マウス下肢のヒラメ筋を摘出し、試験管内の培養液に酸素供給下で浸した。20分間の安定化後に一度培養液を新たなものに交換したうえで、無刺激、MIF刺激、インスリン刺激、あるいはMIF+インスリン刺激の4条件を設定しそれぞれ20時間インキュベーションした。その後の10分間のインキュベーションにより、ヒラメ筋への糖取込みを測定した⁶⁾。

2. 研究結果

代表的な培養骨格筋細胞であるC2C12細胞を筋管に分化させて培養したところ、培養時間に依存して、培養液のMIF含有量が増加することがウェスタンブロットの結果によって明らかになった(図1)。この結果は、骨格筋細胞からMIFが分泌されていることを示す。

そこで、実際に生体内でも同様に骨格筋からMIFが分泌されているかを明らかにするために、*in vivo* エレクトロポレーション法を用いてMIFをマウスの前頸骨筋および腓腹筋に強制発現させた。この方法では、外来性の遺伝子を骨格筋に高率で取り込ませ、数日内でタンパク質を発現させることができる⁵⁾。MIFはT細胞などからも分泌されることから、血液中に骨格筋由来のMIF

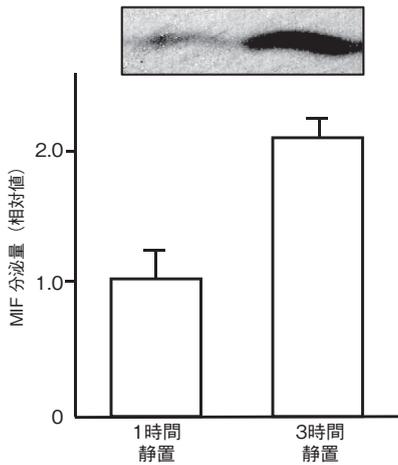
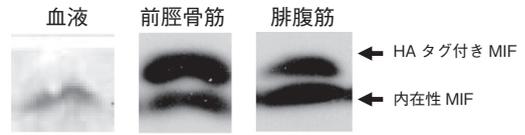


図1 C2C12細胞から培養液中に分泌されたMIF

が分泌されるかを見分けるために、HA タグで標識した MIF を発現させた。MIF 抗体を用いてタンパク質の発現状態を確認したところ (図 2)、前頸骨筋でも腓腹筋でも、HA タグ標識された MIF (図 2A の上のバンド) が内在性の MIF (図 2A の下のバンド) と同程度に発現していることが確認された。しかし血液中には内在性の MIF のみが検出され、HA タグ付加のためにやや上方にシフトしている MIF は検出できなかった (図 2A)。MIF 抗体よりも感度の高い HA 抗体でウェスタンブロッティングを行うと、HA タグ標識された MIF が血液でも確かに検出された (図 2B)。

A. MIF 抗体の結果



B. HA タグ抗体の結果

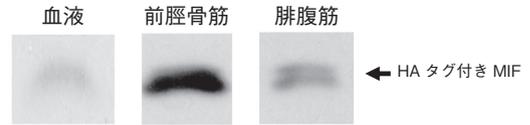


図2 内在性MIFとHA タグを付けたMIFの発現量の比較

この事は、骨格筋からは血液に MIF が分泌されているが、血液中に占める大部分の MIF の由来は骨格筋以外であることを示唆している。したがって、骨格筋から分泌される MIF は、内分泌的に遠隔の臓器を標的に作用しているのではなく、自己・傍分泌的に骨格筋細胞自身かその近傍の組織に作用している可能性が示唆される。

そこで、MIF によって骨格筋の細胞内情報伝達に変化し得るかどうかを、その活性化レベルの指標となるタンパク質のリン酸化を指標にして、主な細胞内分子を精査した。その結果、MIF の添加によって Akt のリン酸化は抑制され (図 3A)、c-Jun のリン酸化は促進された (図 3B)。いずれ

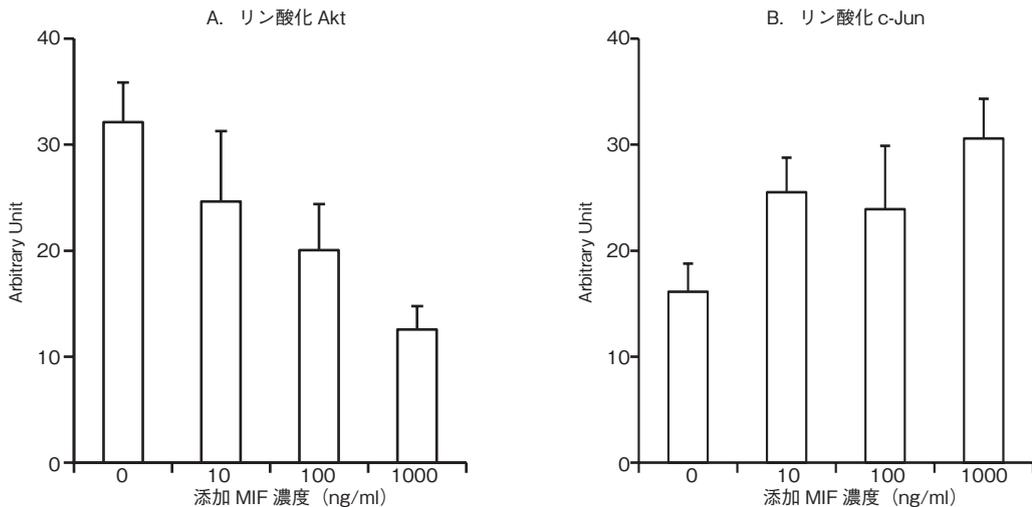


図3 MIF 刺激による C2C12 細胞の情報伝達物質の活性変化

のタンパク質もリン酸化されることで活性が上昇することから、MIFは前者を含む経路を抑制し、後者を含む経路を促進することが明らかとなった。

骨格筋は血糖値の調節に主要な臓器で、糖の約7割を使用する⁷⁾。Aktは、細胞内情報伝達経路のインスリン受容体の下流で糖取り込みを調節する鍵となる分子である。図3に示された結果は、MIFがインスリン刺激によって惹起される骨格筋の糖取り込みを抑制する可能性を示唆している。そこで我々が開発した*in vitro*糖取り込み測定法を用いて⁶⁾、マウス・ヒラメ筋への効果を検証した。その結果、MIFは単独では糖の取り込みに影響を与えないが、インスリンによって促進した糖取り込みを抑制することが明らかになった(図4)。

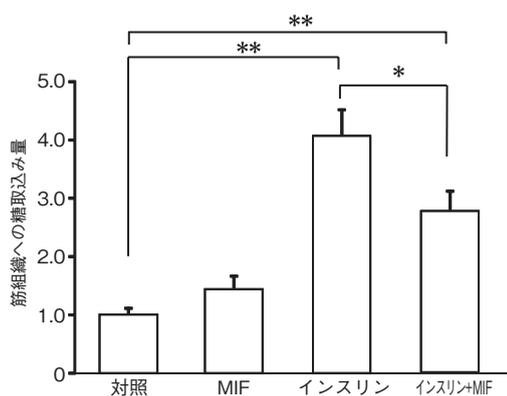


図4 骨格筋に及ぼすMIFの影響
* p < 0.05, ** p < 0.01

3. 考察

本研究における主な新規発見は以下の4つである。(1) MIFは骨格筋から分泌される新たなマイオカインである。(2) 骨格筋から分泌されたMIFは循環血液中にも入るがその量は少なく、自己・傍分泌的な働きを持つ。(3) 実際にMIFは骨格筋自身に作用し、Aktのリン酸化を抑制し、c-Junのリン酸化を促進する。(4) MIFはインスリンによる糖取り込みを抑制する。これらの結果を

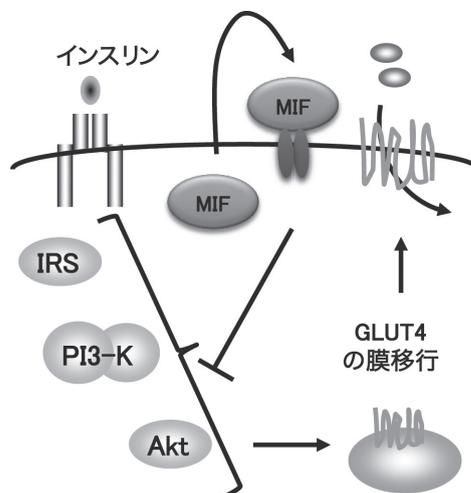


図5 骨格筋におけるMIFの新たな機能

まとめたのが図5である。すなわち、MIFはインスリンによって促進される糖の取り込みを抑制する因子であり、糖尿病の治療および薬の開発の新たな標的分子となる可能性を持つ。そもそもMIFに関してこれまで分かっている事は少なく(表1)、骨格筋における発現は知られていなかったし、もちろんそのマイオカインとしての機能も不明であった。本研究の成果はその一端を明らかにできたことである。

表1 これまでに知られていたMIFの情報

- MIFはT細胞から分泌されるサイトカインとして発見された
- 12 kDaの小さな分子
- ヒトの血中濃度は0.2-0.5 nmol/l.
- 骨格筋から分泌されることは知られていなかった

本研究の次の課題の1つは、AMPキナーゼを介した糖取り込み調節に対しても、MIFが作用を有するかどうかである。これに関してはプレリナリーではあるが、一部示唆的な結果を得ている。筋収縮はインスリンと同様に、糖取り込みを促進させる強力な刺激であり、AMPキナーゼがその調節に関わっていると考えられている⁴⁾。MIFの遺伝子を削除したノックアウトマウスの骨格筋では、筋収縮によって生じる糖取り込みが、正常マウスのそれと比較して高い傾向を示す結果を得て

いる（データ未掲載）。これは、骨格筋が MIF を分泌しなくなったために抑制が解除され、糖の取り込みがより促進されたことを示唆している。このように、通常は骨格筋細胞の機能を抑制的に調節しているマイオカインとして、マイオスタチンが知られている。マイオスタチンは骨格筋の肥大を抑制する因子であるため、そのノックアウトマウスでは、著しい筋肥大が生じる。そのため、その受容体の抑制剤はカヘキシアやサルコペニアといった筋萎縮に伴う生理機能の低下を改善するための手法として注目を浴びている⁹⁾。したがって、MIF の糖取込み抑制効果を担っている受容体に関しても注目される場所である。残念ながら MIF の受容体については未だ不明な点が多いが、CD74 の 2 つのアイソフォーム（P31, P41）がその候補として推察されている^{10, 11)}。今後の全容解明が待たれるところである。

MIF の分泌機構もまた今後明らかにされるのが待たれる。特に筋収縮が MIF 分泌のトリガーとなっているかどうかは興味の持たれるところである。単球において MIF は主に細胞膜上の ATP 結合カセットトランスポーター A1（ABCA1）を介して細胞外へ分泌されることが報告されている¹²⁾。また MIF は、細胞内ゴルジ装置関連タンパク質の p115 と結合し細胞外に分泌される可能性も推察されている。さらに単球やマクロファージで p115 を欠損させると MIF の分泌が減少するとの報告がある¹³⁾。したがって、骨格筋からの MIF 分泌と p115 および ABCA1 との関連についても今後検討する必要性がある。

4. 結 論

本研究では、MIF は骨格筋から分泌される新たなマイオカインであることを明らかにした。その機能は自己・傍分泌によって骨格筋を標的とし、インスリンによる糖取込みを抑制する。MIF の作用の抑制は、インスリン抵抗性を改善させる方

策の一つとして応用可能である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました石本記念デサントスポーツ科学振興財団に心から感謝いたします。

MIF に関する実験の多くを担当してくれた、当時大学院生であった宮武正太博士（現在、国立精神・神経医療研究センター神経研究所）に感謝いたします。また、MIF ノックアウトマウスを譲渡してくださった、北海道大学医学部の安田和則博士、および北海道情報大学医療情報学部の西平順博士に感謝いたします。

文 献

- 1) Manabe Y., Takagi M., Nakamura-Yamada M., Goto-Inoue N., Taoka M., Isobe T., Fujii N.L., Redox proteins are constitutively secreted by skeletal muscle. *J. Physiol. Sci.*, **64** (6) :401-9 (2014)
- 2) Goto-Inoue N., Tamura K., Motai F., Ito M., Miyata K., Manabe Y., Fujii N.L., A fragmented form of annexin A1 is secreted from C2C12 myotubes by electric pulse-induced contraction., *Mol. Cell. Biochem.*, in press (2015)
- 3) Miller E.J., Li J., Leng L., McDonald C., Atsumi T., Bucala R., Young L.H., Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart., *Nature.*, **451** (7178) :578-82 (2008)
- 4) Fujii N., Jessen N., Goodyear L.J., AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **291** (5) :E867-77 (2006)
- 5) Fujii N., Boppart M.D., Dufresne S.D., Crowley P.F., Jozsi A.C., Sakamoto K., Yu H., Aschenbach W.G., Kim S., Miyazaki H., Rui L., White M.F., Hirshman M.F., Goodyear L.J., Overexpression or ablation of JNK in skeletal muscle has no effect on glycogen synthase activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* **287** (1) :C200-8 (2004)
- 6) Fujii N., Hirshman M.F., Kane E.M., Ho R.C., Peter L.E., Seifert M.M., Goodyear L.J., AMP-activated protein kinase alpha2 activity is not essential for

- contraction- and hyperosmolarity-induced glucose transport in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **280**(47) :39033-41 (2005)
- 7) DeFronzo R.A., Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes.*, **37**(6) :667-87(1988)
 - 8) McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J., Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member., *Nature.*, **387**(6628) :83-90 (1997)
 - 9) Zhou X., Wang J.L., Lu J., Song Y., Kwak K.S., Jiao Q., Rosenfeld R., Chen Q., Boone T., Simonet W.S., Lacey D.L., Goldberg A.L., Han H.Q., Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival., *Cell.*, **142** (4) :531-43(2010)
 - 10) Herrero L.J., Sheng K.C., Jian P., Taylor A., Her Z., Herring B.L., Chow A., Leo Y.S., Hickey M.J., Morand E.F., Ng L.F., Bucala R., Mahalingam S., Macrophage migration inhibitory factor receptor CD74 mediates alphavirus-induced arthritis and myositis in murine models of alphavirus infection., *Arthritis. Rheum.*, **65**(10) :2724-36(2013)
 - 11) Fan C., Rajasekaran D., Syed M.A., Leng L., Loria J.P., Bhandari V., Bucala R., Lolis E.J., MIF intersubunit disulfide mutant antagonist supports activation of CD74 by endogenous MIF trimer at physiologic concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **110**(27) :10994-9(2013)
 - 12) Flieger O., Engling A., Bucala R., Lue H., Nickel W., Bernhagen J., Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter., *FEBS Lett.*, **551** (1-3) :78-86(2003)
 - 13) Merk M., Baugh J., Zierow S., Leng L., Pal U., Lee S.J., Ebert A.D., Mizue Y., Trent J.O., Mitchell R., Nickel W., Kavathas P.B., Bernhagen J., Bucala R., The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor., *J. Immunol.*, **182**(11) :6896-906(2009)