博士（理　学）　鈴　木　知　晴

学位論文題名

The Histochemical Study of Macrophage Migration Inhibitory Factor(MIF) in the Central Nervous System

（中枢神経系におけるマクロファージ遊走阻止因子に関する組織化学的研究）

学位論文内容の要旨

マクロファージ遊走阻止因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)は、1966年にマクロファージの挙動を制御するリンパ球由来の蛋白質として発見されたサイトカインである。1989年にヒトMIF cDNAがクローニングされ、1次構造が決定された。また、MIFは活性化したT細胞だけが産生すると考えられてきたが、グラム陰性細菌の内毒素であるlipopolysaccharide (LPS)に対する免疫反応の過程で、下垂体やマクロファージからも産生されることが明らかにされた。一方、我々はラットMIF cDNAを単離し、ノーザンブロット解析により、脳、腎臓、肝臓などの組織がMIF mRNAを発現していることを明らかにした。元来、サイトカインは、免疫系や造血系における発生、分化、増殖に関わる因子として発見された生理活性物質であるが、血液脳関門の存在から「免疫学的特権部位」であった脳においても、多くのサイトカインが存在し、機能することが近年明らかにされている。本研究では、脳におけるMIFの機能を解明することを目的とし、常態及びウィルス性脳炎を起こした動物を用いて、分子生物学的及び組織化学的な手法による解析を行い、検討した。

常態の脳については、成熟及び発生段階のラットを用いて解析を行った。成熟ラットにおいて、免疫組織化学法による解析を行ったところ、MIF は脳室周囲の上衣細胞層及び脈絡叢の上皮層に認められた。脈絡叢は脳脊髄液を分泌する器官であるが、ELISA (enzyme-linked immunoadsorbent assay)法による分析から、脳脊髄液中のMIF濃度が血清中の濃度と同等の値であることがわかり、産生されたMIFが、脳脊髄液中に分泌されている可能性が示唆された。また、グリア線維性酸性蛋白(GFAP)と二重染色の結果から、脳室周囲で陽性であったグリア様細胞はアストログリアであると考えられる。一方、ノーザン・ブロット法により、ラットの各組織におけるMIF mRNAの発現量を調べたところ、すでに報告された結果と同様に、脳及び腎臓で強い発現がみられた。さらに、in situ ハイブリダイゼーションの結果から、MIF mRNAは、免疫組織化学法によって得られた知見と一致する部位に加え、広範囲の神経細胞においても発現していることがわかった。この結果から、MIF はアストログリアだけでなく神経細胞においても重要な機能を果たしていることが考えられる。また、発生段階のラットを用いて、同様の手法による解析を行ったところ、胎生16日で、MIF蛋白質の発現が終脳脳室周囲で検出され、MIF mRNAは同じ領域で非常に強い発現がみられた。胎生13、19日においては、mRNA の弱い発現がみられたが、蛋白質は検出されなかった。一方、新生ラットにおいては、生後5日目において、脳室及び大脳皮質（I, II, III 層）に明確なMIF mRNAの発現がみとめられ、10日目にはすべての層で弱い発現が検出された。MIF 蛋白質の発現も同様な傾向を示したが、その強度はmRNAより弱いものであった。胎生期の終脳の周囲領域は、神経細胞をはじめとして脳内の様々な細胞の前駆細胞が増殖する部位であり、幼若期の脳では主として神経細胞の成

熟やグリア細胞の分化・増殖が起こっていることから、発達段階の脳における MIF の高発現は、その細胞分化・増殖への関与又は神経栄養因子的な機能を強く示唆するものである。

また、中枢神経系の免疫応答と MIF の関連を検討するために、神経親和性ウィルスの一つである日本脳炎ウィルス(JEV)を接種したマウスを用い、実験を行った。近年、ウィルス性脳炎の過程でアポトーシスによる細胞死が引き起こされることが、培養細胞及び実験動物を用いた系で報告されている。JEV についても、培養細胞の系で同様の報告があるものの、実験動物による研究はなされていない。このようなことから、我々はまず、JEV 感染マウス脳における細胞死の形態を明らかにするために、アポトーシスの指標の一つである DNA 断片化の有無を TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling)法により調べた。その結果、JEV 接種後 4 日から顕著に TUNEL 陽性細胞がみられ、接種後 6 日目にはさらにその数が増加していた。TUNEL 陽性細胞はほぼ脳全域でみられ、その増殖様式及び領域が JEV とよく一致していた。また、ウィルス接種後 4 日のマウス脳から低分子量の DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動により解析したところ、およそ 180nbp の位置にいわゆる DNA ladder が検出された。これらの結果は、JEV 感染によりマウスの脳内でアポトーシスが引き起こされることを示すものである。次に、同じ JEV 感染マウスの脳における MIF の発現動態を調べた。in situ hybridization の結果、偽感染マウス脳における MIF mRNA の発現様式は、ラットとよく一致しており、グリア細胞のみならず神経細胞においてもその発現がみられたが、感染後 2 日から 4 日にかけて発現強度の増加が観察された。ウィルス接種後 2 日及び 4 日のマウス脳組織に対してノーザンブロット解析を行ったところ、同様の結果が得られた。一方、JEV 抗原と MIF mRNA の二重染色の結果から、ウィルスは接種後 2 日以降に増殖すること、接種後初期（2 日目）には MIF mRNA を発現している感染細胞がみられるものの、接種後 4 日目には感染細胞の大半が MIFmRNA を発現していないことがわかった。この結果は、MIF mRNA はウィルス接種後 2 日までに発現が増加し、その後の上昇はウィルスに比較して緩やかであること、個々の細胞においては、MIF mRNA の発現の上昇と減少がウィルス増殖の前に起こっている可能性を示唆している。

本研究において、元来免疫系で発見された MIF が脳内に広範囲に渡って存在することを示し、MIF mRNA が神経細胞で発現していること、及び中枢神経系の発生において重要な領域で顕著に発現が上昇していることを初めて明らかにした。また、JEV 感染マウスを用いた実験から、感染脳内においてアポトーシスによる細胞死が引き起こされること、及び感染細胞ではウィルス増殖より早い時期に MIF mRNA の発現上昇がみられることを示した。これらの知見は、常態における脳内での MIF の神経栄養因子様機能に加え、病原体に対する中枢神経系の免疫応答に対する MIF の関与を強く示唆するものであり、中枢神経系における他の生理活性物質の機能や、脳全体の機能の理解に寄与することが期待される。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　田　村　　守

副　査　　教　授　　谷　口　和　弥

副　査　　教　授　　矢　澤　道　生

副　査　　教　授　　菊　池　九二三

副　査　　助教授　　西　平　　順（北海道大学大学院医学研究科）

学位論文題名

The Histochemical Study of Macrophage Migration Inhibitory Factor(MIF) in the Central Nervous System

（中枢神経系におけるマクロファージ遊走阻止因子に関する組織化学的研究）

本学位論文は、マクロファージ遊走阻止因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)の脳における機能を解明することを目的とし、常態及びウィルス性脳炎を起こした動物を用いて、分子生物学的及び組織化学的な手法による解析を行い、検討したものである。成熟ラットにおいて、免疫組織化学法による解析を行ったところ、MIF は主に脳室周囲の上衣細胞層及び脈絡叢の上皮層に認められた。グリア線維性酸性蛋白(GFAP)との二重染色の結果から、脳室周囲で陽性であったグリア様細胞はアストログリアであった。また、ノーザン・ブロット法により、ラットの各組織における MIF mRNA の発現量を調べたところ、すでに報告された結果と同様に、脳及び腎臓で強い発現がみられた。'in situ ハイブリダイゼーションの結果から、MIF mRNA は、免疫組織化学法によって得られた知見と一致する部位に加え、広範囲の神経細胞においても発現していることがわかった。一方、発達段階では、胎生 16 日で、MIF 蛋白質の発現が終脳脳室周囲で検出され、MIF mRNA は同じ領域で非常に強い発現がみられた。胎生 13、19 日においては、mRNA の弱い発現がみられたが、蛋白質は検出されなかった。また、生後 5 日目において、脳室及び大脳皮質（I, II, III 層）に明確な MIF mRNA の発現が認められ、10 日目にはすべての層で弱い発現が検出された。胎生期の終脳の周囲領域は、神経細胞をはじめとして脳内の様々な細胞の前駆細胞が増殖する部位であり、幼若期の脳では主として神経細胞の成熟やグリア細胞の分化・増殖が起こっていることから、発達段階の脳における MIF の高発現は、その細胞分化・増殖への関与又は神経栄養因子的な機能を強く示唆するものである。

また、中枢神経系の免疫応答と MIF の関連を検討した。まず、日本脳炎ウィルス(JEV)を接種し、ウィルス性脳炎を起こしたマウス脳で、細胞死の形態を解析した。TUNEL[terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling]法及び JEV 抗原の分布の解析の結果から、TUNEL 陽性細胞はほぼ脳全域でみられ、その増殖様式及び領域が JEV とよく一致していた。また、脳炎を起こしたマウス脳から、いわゆる DNA ladder が検出された。これらの結果は、JEV 感染によりマウス

の脳内でアポトーシスが引き起こされることを示すものであった。次に、このウィルス性脳炎マウス脳のMIF mRNAの発現動態を、 in situ ハイブリダイゼーション及びノーザン・ブロット法で解析した結果、ウィルス接種後初期にほぼ脳全域で発現が上昇し、その後も高レベルの発現を維持していた。 これらは、常態における脳内でのMIFの神経栄養因子様機能に加え、病原体に対する中枢神経系の免疫応答への関与を強く示唆するもので、中枢神経系におけるMIFの役割に新しい知見を与えるものである。
よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。