

学位論文題名

デキストラン硫酸誘発腸炎マウスにおける
Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) の
発現と役割について

学位論文内容の要旨

[緒言] 炎症性腸疾患は、潰瘍性大腸炎とCrohn病が代表的であり緩解、再燃を繰り返しながら慢性に経過する。その病因は未だ不明であるが、異常な免疫応答の関与が明らかになってきている。特にサイトカインの関与が注目されており、その制御による病状の改善が報告されている。MIFは、無秩序なマクロファージの遊走を阻止する作用を有し活性化Tリンパ球より分泌されるリンホカインとして発見された。MIFのcDNAは1989年にヒト、1995年にラットがクローニングされ、ともに114個のアミノ酸からなることが明らかにされた。MIFの分布は、マクロファージ、脳、腎臓、皮膚、卵巣他、多臓器に存在し、その役割も、endotoxin shockの際、下垂体前葉より血中にMIFが放出され、抗MIF抗体によりその致死率が改善すること、MIFが低濃度のglucocorticoid刺激で誘導され、いったん誘導されるとそのMIFがglucocorticoidによる過剰な抗炎症作用に拮抗する作用を有することなどが報告されている。抗MIF抗体の投与によりLPS刺激肺損傷やLPS-BCG刺激肝炎が軽減したことも明らかにされ、さらに炎症性サイトカインの機能以外にも細胞増殖因子、分化増殖因子の可能性も指摘されている。消化管では胃壁細胞でMIFの存在が確認されたが、消化管の炎症におけるMIFの関与は検討されていない。そこで本研究では、炎症性腸疾患モデルとしてデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)腸炎マウスを用いMIFの発現やその制御による腸炎の変化を検討した。

[方法および結果] DSS腸炎は4%DSSを飲水させ作成した。ノーザンブロット法にてDSS投与直前、投与1, 3, 5, 7日後の盲腸と結腸組織のMIFmRNAを検討した。盲腸ではDSS投与前より発現を認め、投与3日後に発現のピークを呈し、その後発現は減弱した。結腸ではDSS投与前には殆ど発現を認めず、DSS投与後7日後まで経時的に発現が増強した。免疫組織染色による検討では、盲腸のDSS投与前ではリンパ球の集積に染色を認めた。DSS投与7日後では腸管上皮細胞にも発現していた。結腸ではDSS投与前には染色は認められず、DSS投与7日後に腸管上皮細胞で発現し、粘膜固有層に浸潤するマクロファージやリンパ球も染色された。

次にマウスを抗MIF抗体投与群とnon-immune IgG投与群に分け、DSS投与開始前と投与2, 4, 6日後に腹腔内投与した。抗MIF抗体、non-immune IgG投与両群についてDSS投与7日後まで体重、下痢、血便の有無を確認し、DSS投与7日後に結腸を採取し腸管の長軸方向の長さを測定した。盲腸と結腸を組織学的に炎症の程度と病変範囲につき検討した。DSS投与7日後では投与前と比較して、抗MIF抗体投与群はコントロール群と比較し体重の増加 ($p < 0.05$) も良好で、下痢 ($p < 0.01$) や血便の頻度 ($p < 0.05$)、腸

管の短縮は有意に抑制された ($p < 0.05$). 盲腸の病変はnon-immune IgG投与群では炎症細胞の浸潤, Cryptの消失, 上皮細胞の破壊を認めたが, 抗MIF抗体投与により何れの障害も軽微になり, 炎症の程度を有意に抑制した($p < 0.01$). また盲腸と結腸の病変範囲は有意に縮小することが確認された(盲腸 ; $p < 0.001$. 結腸 ; $p < 0.05$).

[考察] 本研究によってDSS腸炎の発症に伴いMIFの発現の増強が明らかになった. 炎症性疾患ではこれまでに慢性関節リウマチ, 腎炎などでMIFの発現の増強を認めている. DSS腸炎ではMIF mRNAの発現は結腸がDSS投与前では発現を認めないが, DSS投与後, 経時的に発現が増強した. これはDSS刺激が持続したことがMIFの発現に影響したと思われる. 盲腸はDSS投与前より発現が認められ, DSS投与後は早期に発現のピークを迎え, その後発現が減弱した. MIF免疫染色でDSS投与前は結腸では染色を認めず, DSS投与7日後には腸管上皮細胞にMIFの強い発現を認めた. 盲腸ではDSS投与前にも粘膜固有層内のマクロファージやリンパ球が陽性に染まり, DSS投与7日後には結腸と同様に腸管上皮細胞が強く染色された. 盲腸でのMIF mRNA, MIFの変化は, DSS投与前でも固有粘膜層にリンパ球, マクロファージなどの集積がみられ, それらに起因するMIFが発現を呈し, DSS投与後の発現の変化は腸管上皮細胞の発現の増強に由来していると考えられた.

MIF免疫染色においては結腸, 盲腸ともにDSS投与7日後でも強い染色を認めるが, 盲腸に関してMIF mRNA発現の消失を認めるDSS投与7日後のMIF免疫染色が強陽性であることは, TNF- α で刺激された脂肪細胞がMIF mRNAとMIF蛋白が相関せず解離したとの報告もあるが, 蛋白の定量を検討する必要がある.

これまでの報告でMIFは免疫担当細胞以外には皮膚基底層細胞, 眼レンズ細胞, 骨芽細胞, ヒト白血球細胞(HL-60)のように増殖能を持つ未分化細胞や, 下垂体前葉細胞, 膵 β 細胞のような内分泌細胞, 高分化で増殖能を殆ど持たない胃壁細胞に発現していることが明らかになっている. 本病態においてはDSSの刺激により上皮細胞が反応しMIFを産生したと思われる. さらにその後の催炎症作用または生体防御反応に関与している可能性も考えられる.

臨床所見, 腸管の長さや組織学的検討において抗MIF抗体の投与によりDSS腸炎の軽症化が図られることが確認された. これによりMIFがDSS腸炎の発症に関与していることが証明された. その機序は明らかではないが, LPS刺激肺損傷において報告されたMIFの上昇による好中球や単球の肺胞への浸潤や気管支肺胞洗浄中への誘導, 白血球遊走因子の一つであるmacrophage inflammatory protein (MIP)-2の産生によるものや, LPS-BCG刺激肝炎で報告されたMIFの増加の後, TNF α が増加しTリンパ球の肝組織への浸潤が起き, MIFがTNF α を介したサイトカインネットワークを活性化したことが本病態にも関与していると思われる. さらにMIFがmatrix metalloproteinases分泌を刺激することで組織障害を来すことも明らかになっており, MIFのDSS腸炎における炎症のメカニズムについて同様の機序の関与も考えられる.

[結語]

1. DSS腸炎マウスのMIF mRNAの発現は盲腸では投与3日後に発現のピークを呈し, その後減弱した. 結腸にはDSS投与7日後まで発現の増強を認めた.
2. 免疫組織学的検討で盲腸の粘膜固有層のリンパ球やマクロファージにMIFの発現を認めた. DSS腸炎マウスでは盲腸, 結腸共に腸管上皮細胞, リンパ球やマクロファージに強い発現を認めた.
3. 抗MIF抗体投与でDSS腸炎の軽減が認められた. DSS腸炎においてMIFが炎症惹起に関与していること, 又その制御により治療効果が得られる可能性が示唆された.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

デキストラン硫酸誘発腸炎マウスにおける Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) の 発現と役割について

炎症性腸疾患の病因は未だ不明であるが、異常な免疫応答の関与が報告されている。その一つにサイトカインの関与が注目されており、特にTNF α 、IL-6などの関与やその制御による病状の改善が報告されている。Macrophage migration inhibitory factor (MIF)は活性化Tリンパ球、マクロファージ、脳、腎臓の他、多臓器に存在し、その役割も多機能にわたっているが、特に免疫や炎症への関与が明らかになっている。しかし腸管の免疫や炎症におけるMIFの関与は未だ検討されていない。そこで本研究では、炎症性腸疾患モデルとして認められているデキストラン硫酸誘発腸炎（DSS腸炎）マウスを用いMIFの発現やその制御による腸炎の変化を検討した。

DSS腸炎は4% DSS水溶液を飲水させ作成した。ノーザンブロット法にてDSS投与直前、投与1, 3, 5, 7日後の盲腸と結腸組織のMIF mRNAを検討した。盲腸ではDSS投与前より発現を認め、投与3日後に発現のピークを呈した。結腸ではDSS投与後7日後まで経時的に発現が増強した。MIF免疫組織染色による検討では、結腸、盲腸ともDSS投与後に腸管上皮細胞と粘膜固有層に浸潤したマクロファージやリンパ球に染色を認めた。次にDSS腸炎マウスに抗MIF抗体を投与し臨床症状と組織学的所見を検討した。マウスを抗MIF抗体投与群とnon-immune IgG投与群に分け、DSS投与開始前と投与2, 4, 6日後に腹腔内投与した。抗MIF抗体、non-immune IgG投与両群についてDSS投与7日後まで体重、下痢、血便の有無を確認し、DSS投与7日後に結腸を採取し腸管の長軸方向の長さを

測定した。また盲腸と結腸を組織学的に炎症の程度と病変範囲につき検討した。抗MIF抗体投与群は体重の増加も良好で、下痢や血便の頻度、腸管の短縮は有意に抑制された。結腸、盲腸の病変はnon-immune IgG投与群では炎症細胞の浸潤、Cryptの消失、上皮細胞の破壊を認めたが、抗MIF抗体投与により何れの障害も軽微になり、炎症や組織障害の程度を抑制することが証明された。また盲腸と結腸の病変範囲は有意に縮小することが明らかになった。

口頭発表に際し、副査の藤堂教授より、炎症性腸疾患とMIFとの関係に着目しそのモデルであるDSS腸炎でMIFの関与をみた仕事として興味深いものであるとのコメントの後、この動物モデルにおけるMIFと催炎症性サイトカインとの、特にTNF α との関与について、また結腸と異なり盲腸においてMIFmRNAとMIF蛋白の解離が起こる機序について質問があったが、申請者はMIFがTNF α などのサイトカインネットワークを制御している可能性と盲腸においてネガティブフィードバックが起こった可能性を回答した。次に、副査の吉木教授より、DSS腸炎は薬剤により誘発される腸炎であるが、このモデルがヒトの炎症性腸疾患のモデルとしての妥当といえるのか、DSS腸炎が起こる病変は大腸以外の消化管には認めないのか、また抗MIF抗体投与量や投与時期を換えた検討についての質問があり、申請者はDSS腸炎の形態学的特徴が潰瘍性大腸炎極めて類似しており実験モデルとしてよく利用されていること、病変は大腸に限局すること、今後投与量や方法を変えて検討する予定であると回答した。さらに副査の吉木教授からはDSS腸炎以外の、遺伝子操作マウスを使用しMIFを検討する実験を組んだ検討や他の腸炎モデルの検討も必要となろうとのコメントがあった。また、主査の浅香教授より、DSS腸炎の発症メカニズムにおけるMIFの関与とTNF α などのサイトカインネットワークにおける位置付けについて、MIFノックアウトモデルでの腸炎の検討について、さらに最近抗TNF α 抗体がヒト炎症性腸疾患に臨床応用されたが、MIFの制御による炎症性腸疾患治療への可能性はどうかについての質問があり、申請者はMIFのTNF α などのイニシエーターや増強因子としての可能性を示し、またMIFノックアウトモデルの検討を進めていること、ヒトへの臨床応用の可能性が高いことを回答した。

本研究は、デキストラン硫酸誘発腸炎におけるMIFの発現ならびにその制御による腸炎の抑制について、はじめて科学的に報告したという点で高く評価され、今後は他の動物モデルやヒト炎症性腸疾患でのMIFの検討の研究を進めることにより、病因の解明や治療への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や所得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。