

学 位 論 文 題 名

Intracellular Distribution of Macrophage Migration
Inhibitory Factor Predicts the Prognosis
of Patients with Adenocarcinoma of the Lung.

(マクロファージ遊走阻止因子の細胞内分布が
肺腺癌患者の予後を規定する)

学位論文内容の要旨

I 研究目的

マクロファージ遊走阻止因子(macrophage migration inhibitory factor; MIF)は発見当初活性化 T リンパ球のみから産生されるサイトカインで、マクロファージの機能を調節する液性因子と考えられてきた。しかし、MIF の遺伝子や蛋白質の構造が解析されたことや、本因子がマクロファージや肺胞上皮細胞などでも発現することが明らかになるに伴い、新たな機能が次々と報告されてきた。炎症や免疫に関しては、MIF はエンドトキシンショックを増悪させ、またグルココルチコイドの機能を制御することにより炎症や免疫反応を助長することが知られている。一方、MIF は増殖の盛んな皮膚上皮基底細胞層や腫瘍組織(前立腺癌、乳癌、大腸癌など)で強く発現し、細胞分化・増殖にも関与することが示唆されてきた。

現在、MIF の腫瘍細胞への作用については相反する報告がなされている。即ち、MIF はマクロファージから産生される TNF- α や IL-1 β の細胞障害作用を促進し、腫瘍の増殖を抑制するが、一方で腫瘍細胞から産生される MIF は腫瘍血管の新生を促し、腫瘍の浸潤や転移を促進することも知られている。このように MIF の腫瘍組織における作用の詳細については不明な点が多い。本研究では肺腺癌組織における MIF の蛋白質と mRNA の発現を解析し、予後との関係について検討した。

II 対象と方法

組織中での MIF 蛋白質の発現は免疫組織化学染色法にて検討した。対象は 1975 年から 1995 年の間に北海道大学医学部附属病院で切除された肺腺癌 74 例(男性 33 例、女性 41 例、平均年齢 61 歳)から得られた腫瘍切片を使用した。術後病理学的 TNM 分類では stage I 34 例、stage II 8 例、stage IIIa 32 例であった。正常組織として、同時に切除された非癌組織を用いた。ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用いて、一次抗体として抗ヒト MIF ポリクローナル抗体を使用し、DAKO CSA System で免疫組織化学染色を行った。染色陽性細胞の割合を測定し、20%未満を negative staining (-)、20%以上 50%未満を weakly positive staining (\pm)、50%以上を strongly positive staining (+) とした。MIF の発現程度と臨床病理学的特性との関係をカイ二乗検定で解析した。また MIF の免疫染色性の強弱を指

標に、Kaplan-Meier 法で予後曲線を描き、Wilcoxon test にて検定を行った。MIF の mRNA の発現は *in situ* hybridization で検討した。4%パラホルムアルデヒド処理、パラフィン包埋した切除後の肺腺癌組織を用い、プローブとしてジゴキシゲニン標識 RNA を使用した。

III 結果

免疫組織化学染色法により、正常肺組織では気管上皮、肺胞上皮、肺動脈の血管平滑筋で MIF 蛋白質の発現が認められた。肺腺癌組織では正常肺の肺胞上皮よりも腫瘍細胞において MIF 蛋白質が強く発現していた。*In situ* hybridization について、正常肺組織では肺胞上皮細胞や血管内皮細胞、肺胞内マクロファージで MIF mRNA の発現を認めた。肺腺癌組織では正常肺の肺胞上皮細胞に比べて、腫瘍細胞でびまん性に強く MIF mRNA の発現を認め、腫瘍細胞自身が MIF を産生していることが明らかとなった。

次に、MIF 蛋白質の細胞質と核における細胞内分布の発現を免疫組織化学染色により検討した。正常肺組織の気管上皮細胞では、MIF 蛋白質は細胞質と核で認められ、その発現は細胞質では strongly positive、核では weakly positive であった。また、肺腺癌組織の大部分において MIF 蛋白質は細胞質でびまん性に強く発現していた。一方、59 例(79.7%)の肺腺癌において腫瘍細胞の核で MIF 蛋白質の発現を認めた。43 例(58.1%)は strongly positive、16 例(21.6%)は weakly positive であったが、15 例(20.2%)では核での発現を認めなかった。

核での MIF 蛋白質の発現を negative 群と weakly または strongly positive 群の 2 群に分け、臨床病理学的特性との関係を検討したが、年齢においてのみ有意差を認めた($P=0.02$)。同様の 2 群において Kaplan-Meier 法で生存曲線を描出したところ、核での発現が認められなかった患者群の 5 年生存率は 32%、発現が認められた群では 47%と、発現が認められなかった患者群が有意に生存期間の短縮を認めた($P=0.04$)。

IV 考察

前立腺癌や乳癌、結腸癌などの腫瘍組織で MIF が強く発現していることが報告されている。本研究では、免疫組織化学染色法および *in situ* hybridization 法により、肺腺癌において他の腫瘍組織と同様に MIF の蛋白質や mRNA の発現が増強していることを明らかにした。興味深いことに、肺腺癌組織における MIF 蛋白質は細胞質だけでなく、核にもその発現を認めた。さらに核に発現を認めない腫瘍をもつ患者群(20.2%)は核で発現している患者群に比して、有意に予後が短縮していた。従って MIF の細胞内分布が肺腺癌患者の予後決定に重要であることが考えられる。

本研究は、MIF の細胞内局在に着目し、細胞内局在の差異と肺腺癌患者の予後との関係を検討した初めての報告である。これまで MIF の腫瘍における機能と役割については明確な結論が得られていない。MIF はマクロファージ由来の様々なサイトカインを通して腫瘍の増殖を抑制することが知られている。一方、抗 MIF 抗体は腫瘍細胞の増殖や血管新生を抑制することから、MIF は腫瘍の増殖を促進する方向に働く。従って、MIF は腫瘍細胞の増殖や血管新生を促進すると考えられる。これらの結果は、MIF がその蛋白質の細胞内局在に依存して、異なる作用を果たす可能性を示唆している。以上のことから、MIF の細胞内局在と肺腺癌患者の予後を比較した今回の臨床病理学的研究は癌における MIF の生物学的作用の解明への重要な糸口になると思われる。今後、肺腺癌組織での MIF の定量化や細胞内分布の解析から、肺腺癌患者の予後を検討することがその治療方針の確立に役立つものと思われる。

V 結語

MIF は肺腺癌細胞の細胞質および核に局在し、その細胞内分布は肺腺癌患者の予後を規定する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 加 藤 紘 之
副 査 教 授 細 川 眞 澄 男

学 位 論 文 題 名

Intracellular Distribution of Macrophage Migration Inhibitory Factor Predicts the Prognosis of Patients with Adenocarcinoma of the Lung.

(マクロファージ遊走阻止因子の細胞内分布が
肺腺癌患者の予後を規定する)

マクロファージ遊走阻止因子(macrophage migration inhibitory factor; MIF)は炎症性サイトカインであり、グルココルチコイド誘因性免疫調節因子としても知られている。また、腫瘍細胞の増殖においては MIF の促進的もしくは抑制的作用が報告されていて、現在のところその正確な役割は不明である。そこで申請者は肺腺癌組織における MIF の蛋白や mRNA の発現とその細胞内局在を検討し、予後との関係を明らかにした。

原発性肺腺癌患者 74 人 (病理学的ステージは I, II, IIIa) から外科的に切除された肺腺癌組織切片で免疫組織学的解析を行った。さらに MIF の mRNA の発現は in situ hybridization を用いて検討した。MIF の発現度とその細胞内局在に応じて肺腺癌患者の予後が評価し、Kaplan-Meier 法で予後曲線を描出して、Wilcoxon test で検定を行った。

MIF の mRNA と蛋白は正常肺組織において気管上皮や肺胞上皮、血管平滑筋、肺胞内マクロファージに発現していた。肺腺癌組織では MIF の mRNA と蛋白の両方が正常気管上皮よりも強く発現しており、腫瘍細胞自身が MIF を産生していることが明らかになった。MIF の細胞内局在に注目したところ、肺腺癌組織の大部分において MIF 蛋白は腫瘍細胞の細胞質でびまん性に強く発現していた。59 例(79.7%)の肺腺癌において核で MIF 蛋白の発現を認めたが、15 例(20.2%)では核での発現を認めなかった。核での MIF 蛋白の発現度に応じて、陰性群と陽性群の 2 群に分け、Kaplan-Meier 法で予後曲線を描出し、Wilcoxon test で検定を行った。核での発現度が陰性群の 5 年生存率は 32%、陽性群では 47%と、陰性群の患者が P 値 0.04 と有意に生存期間の短縮を認めた。

結論として MIF は肺腺癌患者の細胞質および核に存在し、その核内における存在の有無は肺腺癌患者の予後を規定することが考えられた。

MIF が腫瘍に対して促進的あるいは抑制的に作用することがいわれているが、肺腺癌において MIF は蛋白の細胞内局在に依存して、異なる作用を果たす可能性が示唆される。今後、肺腺癌組織での MIF の定量化や細胞内分布の解析から、肺腺癌患者の予後を検討することがその治療方針の確立に役立つものと思われる。

審査にあたり、副査加藤教授より免疫染色方法の客観性についての質問があった。申請者は今回の免疫染色は増幅法を使用しており、わずかの発現でも認識できる。また、染色にむらが出ることがあるが、間質や癌細胞の辺縁は除き、中心部は染色の均一性は保持されていたと回答した。次に癌細胞の核で発現していないことに関する生物学的意義について質問があった。最近 MIF の cell cycle との関連が報告されており、cell cycle の異常が MIF の核での発現を低下させ、予後の悪化を起していることも推測されると回答した。次に MIF の核内分布の差は肺腺癌患者において独立した予後因子に成りうるかについて質問があった。今回の臨床病理学的検討では年齢以外に有意な差はなく、予後因子になる可能性があるかと回答した。次に副査細川教授からは、MIF のどの機能が肺癌患者の予後に関与しているかという質問があった。MIF は細胞内外に存在していて、細胞内では細胞質と核に局在している。その各々の存在部位で作用に違いがあり、核内における MIF の機能（例えば転写調節など）が予後悪化に関係していることが推測されると回答した。最後に主査西村教授からは、肺腺癌以外に肺扁平上皮癌などで免疫染色等の検討したかについて質問があった。肺扁平上皮癌で免疫染色を行い、細胞質で発現を認めたが、細胞内分布など詳しい検討はしていないと回答した。次に細胞質と核内の染色態度は関連していたかについての質問があった。細胞内と核内の染色態度は関連していないと回答した。

審査員一同は本研究を、肺腺癌における MIF の役割について検討した研究として高く評価し、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。