

学 位 論 文 題 名

Enhancement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in injured epidermis and cultured fibroblasts

(創傷部表皮および線維芽細胞における
マクロファージ遊走阻止因子の発現増強)

学位論文内容の要旨

背景と目的

ヒトマクロファージ遊走阻止因子(macrophage migration inhibitory factor : MIF)の cDNA が 1989 年にクローニングされ、その後の研究により MIF は炎症性サイトカイン、下垂体ホルモン、グルチコルチコイド誘導性免疫調節蛋白として再評価されている。皮膚において MIF は表皮基底層に強く発現しており、アトピー性皮膚炎の重症度と MIF の血中濃度が相関することも明らかになった。しかし、皮膚における MIF の生理学的役割は未だ充分解明されていない。

一方創傷治癒過程において、様々なサイトカインが発現時期および発現量を複雑に調節しながら治癒を促進することが知られている。このような経緯から MIF はサイトカインとしても、この創傷治癒過程において何らかの役割を果たしている可能性が示唆される。

本研究の目的はラットを用いて皮膚創傷治癒における MIF の関与を明らかにすることである。

方法

ウイスターラットを用い、背部皮膚に切傷を作成し継時的に創傷部皮膚を採取し、Reverse transcription-polymerase chain reaction/Southern blot (RT-PCR/Southern)を用いて mRNA の発現を検討した。同時に血清を採取し血清中の MIF 濃度を ELISA で計測し、創傷部位で MIF 蛋白の発現を免疫組織学的に検討した。また Boyden chamber を用いて MIF の表皮細胞遊走能に対する影響を検討し、さらに皮下に埋めたスポンジから分離、培養した線維芽細胞、いわゆる‘創傷部線維芽細胞’における MIF の産生能を測定した。またマウス背部

皮膚に切傷を作成した皮膚創傷モデルにおいて、MIF に対し中和作用を持つポリクローナル抗体投与の創傷治癒に対する効果をみた。

結果

創傷部皮膚において MIF mRNA は増加し、創傷後 3 時間と 12 時間で二相性にピークがみられた。同様に血清中の MIF 濃度も創傷後 3 時間、12 時間でピークがみられた。創傷後 12 時間後の免疫組織染色では MIF 蛋白の発現は創傷部位の表皮全層にみられた。Boyden chamber を用いた遊走能の検討では MIF は表皮細胞の遊走能を有意に亢進した。加えて創傷部位から分離、培養した線維芽細胞においては、LPS 刺激により、MIF の産生能が有意に増加した。さらにマウス皮膚創傷モデルにおいて、MIF 中和抗体投与群はコントロール群に比べ有意に創傷治癒を遷延させた。

これらの結果より、MIF は皮膚創傷治癒促進に対して重要な役割を果たしていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 清 水 宏
副 査 教 授 杉 原 平 樹
副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

学 位 論 文 題 名

Enhancement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in injured epidermis and cultured fibroblasts

(創傷部表皮および線維芽細胞における
マクロファージ遊走阻止因子の発現増強)

ヒトマクロファージ遊走阻止因子(**macrophage migration inhibitory factor : MIF**)の cDNA が 1989 年にクローニングされ、その後の研究により MIF は炎症性サイトカイン、下垂体ホルモン、グルチコルチコイド誘導性免疫調節蛋白として再評価されている。我々は皮膚において MIF は表皮基底層に強く発現していることを報告している。しかし、皮膚における MIF の生理学的役割は未だ充分解明されていない。一方創傷治癒過程において、様々なサイトカインが発現時期および発現量を複雑に調節しながら治癒を促進することが知られている。そこでサイトカインとしての MIF も創傷治癒に関与していることが予測される。本研究の目的はラットを用いて皮膚創傷治癒における MIF の関与を明らかにすることである。

ウイスターラットを用い、背部皮膚に切傷を作成し継時的に創傷部皮膚を採取し、**Reverse transcription-polymerase chain reaction/Southern blot** を用いて mRNA の発現を検討した。同時に血清を採取し血清中の MIF 濃度を **ELISA** で計測した。あわせて創傷部位で MIF 蛋白の免疫組織染色を行った。**Boyden chamber** を用いて MIF の表皮細胞遊走能に対する影響を検討した。さらに皮下に埋めたスポンジから分離、培養した線維芽細胞、いわゆる‘創傷部線維芽細胞’において MIF の産生能についても検討した。またマウス背部皮膚に切傷を作成した皮膚創傷モデルにおいて、抗 MIF 抗体投与の創傷治癒に対する効果を

みた。創傷部皮膚において MIF mRNA は増加し、創傷後 3 時間と 12 時間で二相性にピークがみられた。同様に血清中の MIF 濃度も創傷後 3 時間、24 時間とでピークがみられた。創傷後 12 時間後の免疫組織染色で MIF 蛋白は創傷部位の表皮全層にみられた。Boyden chamber を用いた遊走能の検討では MIF は表皮細胞の遊走能を著明に亢進した。加えて創傷部位から分離、培養した線維芽細胞において、LPS 刺激により、正常皮膚から分離した線維芽細胞に比べ有意に MIF の産生能が増加していた。さらにマウス皮膚創傷モデルにおいて、抗 MIF 中和抗体投与群はコントロール群に比べ有意に創傷治癒を遷延させた。これらの結果より、MIF は皮膚創傷治癒促進に対して重要な役割を果たしていると考えられた。

公開発表に際し、副査の渡辺雅彦教授から、血清中 MIF 濃度の上昇はどの細胞から産生され、どの細胞に作用するのかとの質問、また副査の杉原教授から、MIF は表皮全層に発現がみられるが炎症における特有の現象なのかとの質問、主査の清水教授から今後の臨床応用に際して、MIF の局所投与で創傷治癒を促進できるのではないかと質問、その他多くの質問があったが、申請者は最新の情報を混じえ、大概適切な解答をなした。

この論文は、サイトカインの一つである MIF が創傷部位で強く発現し、同時に表皮細胞の遊走能を増強させることで再上皮化を促進し、創傷治癒全体においても、治癒を促進させていることを明らかにした点で高く評価され、今後の、臨床応用に対する取り組みが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。