

学位論文題名

# Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Bleomycin-Induced Lung Injury and Fibrosis in Mice

(マウスのブレオマイシン肺傷害・線維症モデルにおける  
マクロファージ遊走阻止因子の役割)

## 学位論文内容の要旨

### 【背景】

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) は 1960 年代に活性化 T 細胞が産生し、マクロファージの遊走を抑制するサイトカイン活性として報告された。しかし、1989 年に MIF cDNA がクローニングされて以後とくに 90 年代後半からは、種々の体細胞内に広範に存在する炎症性サイトカインとしての作用が注目されるようになった。肺疾患における役割に関しては、急性呼吸促進症候群患者の気管支肺胞洗浄液 (BAL 液) 中で MIF 濃度が上昇すること、肺胞マクロファージからの TNF- $\alpha$ , IL-8 の放出を rMIF が *in vitro* で増強し抗 MIF 抗体が抑制すること、マウスの lipopolysaccharide (LPS) によるショックモデルにおいて MIF が血液中に放出され炎症増悪因子になっていることなどが報告されている。さらに、我々はラット LPS 肺傷害モデルにおいて、MIF が気道上皮や肺胞マクロファージ中に存在すること、LPS 投与後肺組織由来の MIF mRNA が増加すること、抗 MIF 抗体投与が肺への好中球遊走を抑制し、その作用の一部は CXC chemokine である macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) の分泌抑制を介していることを報告した。

### 【目的】

マウス bleomycin (BLM) 肺傷害・線維症モデルにおいて、MIF が急性期肺傷害とそれに引き続いて起こる肺線維化に果たしている役割を明らかにする。

### 【方法】

雄 C57BL/6J マウス (8 週齢) を使用し以下の実験を行った。

1. 高用量の BLM (2.5 mg/kg) を気管内 1 回投与。投与前と投与後 1, 3, 5, 7, 10 日における肺組織、BAL 液中における MIF 濃度を ELISA 法で測定した。
2. BLM 気管内 1 回投与。その 2 時間前に抗 MIF 抗体 (MIF 抗体群) 又は非特異的ウサギ IgG (IgG 群) を腹腔内投与し、さらに 2~3 週間 (3 回/週) 投与を継続した。2 群間の致死率、体重減少とある一定時期における肺湿重量、BAL 液所見、組織学的肺傷害スコアと肺組織 cytokine 濃度を比較検討した。
3. 低用量の BLM (1.0 mg/kg) を気管内 1 回投与。投与 21 日後の組織学的肺線維化スコアと肺組織 hydroxyproline 量を 2 群間で比較検討した。

### 【結果】

1. MIF 濃度は BLM 投与 5-10 日後、前値と比較して BAL 液、肺組織中ともに上昇した。
2. 抗 MIF 抗体は、BLM 投与 14 日後までの致死率、10 日後までの体重減少を有意に改善した。また、7 日後の肺湿重量、3, 7 日後の BAL 液中総細胞数と好中球数、10 日後の病理組織学的肺傷害スコアで評価した肺の急性炎症を有意に改善し、7 日後の肺組織 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 濃度上昇を有意に抑制した。しかし、7, 10 日後の BAL 液中蛋白濃度、7 日後の肺組織

monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) 濃度と MIP-2 濃度には 2 群間で差がみられなかった。

3. BLM 投与 21 日後における組織学的肺線維化スコア、肺組織 hydroxyproline 量は 2 群間で差がみられなかった。

#### 【考察】

BLM 投与後のマウス肺組織と BAL 液中において MIF 濃度が BLM 投与 5-10 日後に上昇し、抗 MIF 抗体の投与により BLM による致死率と肺の急性炎症が抑制されたことより、BLM 肺傷害の急性炎症期における MIF の関与が示された。さらに、抗 MIF 抗体の投与は、BLM 投与後の肺胞への炎症細胞の集積と肺組織 TNF- $\alpha$ 濃度を抑制したが、組織学的肺線維化スコアと肺組織 hydroxyproline 量で評価した肺の線維化への影響は認めなかった。以上の結果から、MIF はこのモデルにおいて肺の急性炎症への関与はあるが、それに引き続いて起こる線維化への関与はないと考えられる。

これまで BLM による肺の線維化において TNF- $\alpha$ による急性炎症は重要な役割を果たすと考えられてきた。実際、抗 TNF- $\alpha$ 抗体や可溶性 TNF- $\alpha$ レセプターの投与が BLM による肺の線維化を抑制し、また TNF receptor 欠損マウスへの BLM 投与では肺の炎症や線維化が軽微であることから、肺の急性炎症期における TNF- $\alpha$ の抑制は、肺の急性炎症とその後の線維化を抑制すると考えられてきた。今回の実験で、抗 MIF 抗体により BLM 高用量投与モデルの肺組織中 TNF- $\alpha$ が抑制されたのにも関わらず、BLM 低用量モデルでは肺の線維化が抑制されなかった真の原因は不明である。しかし、肺の急性炎症の抑制が必ずしもその後の線維化を抑制しないという仮説が近年提唱されている。臨床的には、特発性肺線維症患者にステロイド治療をして肺の炎症を抑えても、線維化の抑制はできず予後も改善しない。また、動物実験においても、好中球を消失させて肺の炎症を軽減させた動物でも BLM 投与による肺の線維化は抑制されない。肺の線維化に重要な役割を果たす増殖因子 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) の活性調節因子である  $\alpha$ v $\beta$ 6 integrin の欠損マウスにおいても、BLM を投与すると肺の炎症は惹起されるが線維化は起こらない。これらの成績は抗 MIF 抗体によって急性炎症は抑えられてもその後の線維化には影響しなかった今回の実験結果と合致するものである。

抗 MIF 抗体は、BLM による BAL 液中の炎症細胞、特に好中球の集積を抑制したが、BAL 液中蛋白濃度は抑制しなかった。肺胞への過剰な蛋白の漏出が、肺の線維化に結びつくことから、これが抗 MIF 抗体が BLM による線維化を抑制しなかった原因のひとつである可能性もある。抗 MIF 抗体が BAL 液中炎症細胞の集積を抑制した機序について、今回の実験では LPS 肺傷害モデルとは違って MIP-2 の関与を証明できなかった。今後、MIF の肺における急性炎症抑制機序をさらに明らかにして線維化における役割と比較検討することは、肺の急性炎症と線維化との関連や病態の解明に有用であると考えられる。

#### 【結語】

MIF はマウス BLM 肺傷害・線維症モデルにおいて、肺の急性炎症には関与しているが、その後起こる線維化には関与していない。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 丸 藤 哲

副 査 教 授 西 村 正 治

学 位 論 文 題 名

## Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Bleomycin-Induced Lung Injury and Fibrosis in Mice

(マウスのブレオマイシン肺傷害・線維症モデルにおける  
マクロファージ遊走阻止因子の役割)

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) は 1960 年代に活性化 T 細胞が産生し、マクロファージの遊走を抑制するサイトカイン活性として報告された。しかし、1989 年に MIF cDNA がクローニングされて以後とくに 90 年代後半からは、種々の体細胞内に広範に存在する炎症性サイトカインとしての作用が注目されるようになった。肺疾患における役割に関しては、急性呼吸促進症候群患者の気管支肺胞洗浄液 (BAL 液) 中で MIF 濃度が上昇すること、肺胞マクロファージからの TNF- $\alpha$ 、IL-8 の放出を rMIF が *in vitro* で増強し抗 MIF 抗体が抑制すること、マウスの lipopolysaccharide (LPS) によるショックモデルにおいて MIF が血液中に放出され炎症増悪因子になっていることなどが報告されている。さらに、我々はラット LPS 肺傷害モデルにおいて、MIF が気道上皮や肺胞マクロファージ中に存在すること、抗 MIF 抗体投与が肺への好中球遊走を抑制することを報告した。今回はマウス bleomycin (BLM) 肺傷害・線維症モデルを用いて MIF の急性期肺傷害とそれに引き続いて起こる肺線維化への関与について検討した。

8 週齢の雄 C57BL/6J マウス (n=180) を用い、高用量の BLM (2.5 mg/kg) を気管内 1 回投与。投与前と投与後 1, 3, 5, 7, 10 日における肺組織、BAL 液中における MIF 濃度を ELISA 法で測定した。次に、急性期肺傷害への MIF の関与を検討するために、BLM 気管内投与 2 時間前に抗 MIF 抗体 (MIF 抗体群) 又は非特異的ウサギ IgG (IgG 群) を腹腔内投与し、BLM 投与後さらに 2~3 週間 (3 回/週) 投与を継続、2 群間の致死率、体重減少とある一定時期における肺湿重量、BAL 液所見、組織学的肺傷害スコアと肺組織サイトカイン量を比較検討した。さらに、肺線維化への MIF の関与を検討するために、低用量の BLM (1.0 mg/kg) を気管内 1 回投与 (n=34)。投与 21 日後の組織学的肺線維化スコアと肺組織ヒドロキシプロリン量を 2 群間で比較検討した。

MIF 濃度は BLM 投与 5-10 日後、前値と比較して BAL 液、肺組織中ともに上昇し、抗 MIF 抗体は、BLM 投与 14 日後までの致死率、10 日後までの体重減少を有意に改善した。また、7 日後の肺湿重量、3, 7 日後の BAL 液中総細胞数と好中球数、10 日後の病理組織学的肺傷害スコアで評価した肺の急性炎症を有意に改善し、7 日後の肺組織 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 量上昇を有意に抑制した。しかし、BLM 投与 21 日後における組織学的肺線維化スコア、肺組織ヒドロキシプロリン量は 2 群間で差がみられなかった。

今回の検討より、MIF はマウス BLM 肺傷害・線維症モデルにおいて、肺の急性炎症には関与しているが、その後起こる線維化には関与していないと考えられた。これまで、肺線維化は

肺の急性炎症に引き続く一連の組織変化と考えられていたが、最近、炎症機転と線維化の機序は独立しているのではないかとの仮説が提示されており、今回の結果は、これを支持する結果と考えられた。今後、肺の急性炎症と線維化の機序を更に明らかにすることにより、特発性肺線維症などの肺の線維化疾患の発症機序解明ならびに治療法の確立につながる可能性があり、更なる研究が期待される。

審査にあたり、副査丸藤教授より、1) 肺における MIF の上昇時期と抗 MIF 抗体の急性炎症抑制時期、2) 抗 MIF 抗体の効果が内因性ステロイド作用の増強を介している可能性、3) 急性肺傷害に対する抗サイトカイン療法の可能性についての質問があり、副査西村教授より 1) MIF の肺の急性炎症と線維化への関与の相異の機序、2) 肺線維化に関わる種々のメディエーターの作用、3) BLM 投与後のマウス死亡の原因についての質問があった。主査上出教授からは、1) 肺の急性炎症と線維化それぞれに関与する細胞、メディエーター、2) BAL 液中総蛋白濃度と好中球遊走に対する抗 MIF 抗体の効果の相異、3) BLM 肺傷害・線維症モデル作成における BLM 投与方法についての質問があった。申請者はこれらの質問に対して、自験データと文献を引用して概ね適切な解答を行った。

審査員一同は、本研究が MIF の急性期肺傷害への関与を証明する一方で、それに引き続いて起こる肺線維化への関与がないことを初めて明らかにした研究として高く評価し、大学院課程における研鑽や取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と判定した。