

学位論文題名

ケロイドにおけるマクロファージ遊走阻止因子の
過剰発現と病態に果たす役割

学位論文内容の要旨

【緒言】

ケロイドは外傷、熱傷、感染などを起因とする皮膚の隆起性腫瘍病変で、創傷治癒過程の何らかの異常によって生じると考えられているが、成因のメカニズムについては不明な点が多い。

マクロファージ遊走阻止因子 macrophage migration inhibitory factor (MIF) は、活性化T細胞から産生され、マクロファージの遊走を抑え活性化させる液性因子として発見された最初のサイトカインであり、近年、創傷治癒や組織修復、腫瘍増殖にも深く関わることなどが知られるようになった。ケロイドは創傷治癒機構の破綻によって細胞増殖期が遷延した状態とされ、かつ創傷の範囲を超えて周囲に浸潤・拡大する腫瘍ととらえ得ることを考え合わせると、MIFがケロイドの病態形成に深く関わっている可能性が示唆される。しかしこれまで、ケロイドにおけるMIFの発現や病態への関与についての報告はない。

本研究では、ケロイドにおけるMIFの発現ならびにその局在と、ケロイドの病態に果たすMIFの役割について解析を行った。

【材料と方法】

1. 検体及び細胞：ケロイド、成熟瘢痕ならびに正常皮膚の手術検体を用いた。培養線維芽細胞はケロイド及び正常皮膚より初代培養にて得た3～7継代のものを使用した。
2. rhMIFの精製：MIF cDNAを組み込んだタンパク質発現用プラスミドを大腸菌に導入し細胞破砕機で破砕し、アフィニティーカラムに吸着させ、透析、濃縮した。
3. 抗ヒトMIF抗体の精製：精製したrhMIFをNew Zealand white rabbitに免疫し、第5週目に血清よりProtein A sepharoseを用いてIgG fractionを精製した。
4. 免疫組織化学染色：厚さ3 μm の連続切片を作成し、脱パラフィンの後、10% 正常ヤギ血清を含むPBS溶液でブロッキングし、ウサギ抗ヒトMIF抗体 (500倍希釈)、次いでビオチン標識ヤギ抗ウサギ二次抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させた後、DAB溶液にて茶褐色に発色させた。
5. Northern blot解析：RNeasyあるいはIsogenを用いてtotal RNAを抽出し、10 μg をアガロースゲルにて電気泳動し、ナイロンフィルターに転写した。これを [α - ^{32}P] dCTPで標識したcDNAプローブでハイブリダイズし、オートラジオグラフィーでバンドを可視化し、MIFあるいはI型コラーゲンのmRNAの発現量を検出した。
6. Western blot解析：タンパクを抽出し定量化した後、SDS-PAGEにて分離し、抗MIF抗体、抗p-ERK抗体、抗p-JNK抗体にて発現量を検出した。
7. TGF- β 1の添加：TGF- β 1に対するMIF mRNAおよびI型コラーゲンmRNAの発現をNorthern blot法にて検出した。
8. rhMIFおよび抗MIF抗体の添加：rhMIF添加ならびに抗MIF抗体添加が細胞増殖およびI型コ

ラーゲンの発現に及ぼす影響を検証した。

9. siRNAによる細胞内MIFのknockdown：細胞内MIFの機能を検索するため、siRNAによるknockdownを行い、細胞増殖、I型コラーゲンの発現ならびにERK, JNKのリン酸化を調べた。

【結果と考察】

生体におけるケロイド組織中のMIFの発現は成熟癒痕組織の数倍と高く、その発現の局在が病態の主体である線維芽細胞にあり、正常皮膚および癒痕の線維芽細胞には認められなかった。さらにケロイドから得られた培養線維芽細胞 (KF) においても正常皮膚由来の培養線維芽細胞 (NF) より強いMIFの発現を認めた。これらの結果はケロイドの病態とMIFとの密接な関係を示唆するものである。

そこで線維芽細胞に対するMIFの刺激や抗MIF抗体による中和試験を行ったが、いずれも細胞増殖とコラーゲンの発現に変化が見られなかった。しかしRNAiを用いMIFの合成を抑制すると、細胞増殖およびコラーゲンの発現が抑制され、特にMIFを強発現しているKFにおいてその影響が強く現れた。これはKFの細胞活動がMIFに強く依存していることを伺わせるものであり、MIFはケロイドにおいてもその病態形成に重要な役割を果たしていること、また、その関与はMIFのautocrine作用によるものではなく、細胞内における働きによるものであることが明らかとなった。

次にケロイドの病態の中心的役割を果たすTGF- β とMIFの関連を検索するため、線維芽細胞をTGF- β 1で刺激し、MIF mRNAの発現をI型コラーゲンの発現とともにNorthern blot解析にて検討した。その結果、KFおよびNFにおけるTGF- β 1に対するMIFの発現はI型コラーゲンの発現と同様の反応を示した。すなわち、MIF mRNAの発現量はTGF- β 1の刺激に対し濃度依存性に増強し、KFではNFより強い反応性がみられた。さらに、TGF- β 1刺激によるコラーゲンの発現が抗MIF抗体では抑制されなかったが、RNAiによる細胞内MIFの合成阻害によって抑制されたことから、TGF- β の作用発現には細胞内MIFの発現と関与が重要であることが示された。I型コラーゲン発現の経路の一つにJNK, AP-1が考えられているが、MIF抑制時にJNKの活性化が低下したことから、MIFのこの経路への関与が推察される。

MIFはこれまでさまざまな免疫系細胞から産生されるサイトカインとして、また下垂体から産生されるホルモンとして機能することが知られてきたが、今回得られた知見は、MIFが細胞外への分泌を介さず、細胞内においてシグナル伝達などに関与するという、MIFの新たな作用を示すものである。特に細胞増殖への関与が示されたことから、細胞周期などの生命活動に関わる機能を有していると推察される。

また本研究で得られた結果は、細胞外基質産生への細胞内MIFの関与を初めて明かにしたものであり、ケロイド同様にTGF- β が中心的な役割を果たしている肺線維症や強皮症などの臓器線維化疾患においても、MIFが重要な役割を果たしている可能性も示唆され、分子機能の解明によってMIFを標的としたこれらの疾患の特異的な治療法の開発に結びつく可能性が期待される。

【結語】

ケロイドの線維芽細胞ではMIFが極めて強く発現していることをNorthern blot解析および免疫組織化学染色を用いて初めて明かにした。培養線維芽細胞においてもケロイドではMIF mRNAが強発現しており、TGF- β の刺激によって発現が亢進した。

siRNAによるRNAiを用いて細胞内MIFを抑制すると、細胞増殖ならびにI型コラーゲンのmRNA発現が顕著に抑制され、TGF- β 1の刺激に対する反応も低下した。またsiRNA導入により活性化JNKが低下したことから、MIFは細胞内においてJNKあるいはその上流のシグナル伝達系に作用している可能性が推察された。

以上よりMIFは細胞内においてシグナル伝達に関与し、線維芽細胞過剰増殖と細胞外基質過剰産生というケロイドの主要病態の成立に重要な役割を果たしていることが証明された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 原 平 樹
副 査 教 授 加 藤 紘 之
副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

ケロイドにおけるマクロファージ遊走阻止因子の 過剰発現と病態に果たす役割

本研究は、ケロイドにおけるマクロファージ遊走阻止因子 macrophage migration inhibitory factor (MIF) の発現ならびにその局在と、ケロイドの病態に果たすMIFの役割について解析を行ったものである。

ケロイドは外傷、熱傷、感染などを起因とする皮膚の隆起性腫瘍病変で、創傷治癒過程の何らかの異常によって生じると考えられているが、成因のメカニズムについては不明な点が多い。一方、MIFは、活性化T細胞から産生され、マクロファージの機能制御に関わる液性因子として最初に発見されたサイトカインであり、近年、創傷治癒や組織修復、腫瘍増殖にも深く関わることなどが知られるようになった。ケロイドは創傷治癒機構の破綻によって細胞増殖期が遷延した状態とされ、かつ周囲に浸潤・拡大する腫瘍ととらえ得ることを考え合わせると、MIFがケロイドの病態形成に深く関与している可能性が示唆される。しかしこれまで、ケロイドとMIFの関連を示す報告はない。

生体におけるケロイド組織中のMIFの発現をNorthern blot法ならびに免疫組織化学染色にて検索した結果、MIF mRNAの発現は成熟瘢痕組織の数倍と高く、発現の局在が病態の主体である線維芽細胞にあり、正常皮膚および瘢痕の線維芽細胞にはほとんど発現を認めなかった。また、ケロイドから得られた培養線維芽細胞 (KF) においても正常皮膚由来の培養線維芽細胞 (NF) より強いMIFの発現を認めた。これらの結果はケロイドの病態とMIFとの密接な関係を示唆するものである。

線維芽細胞に対するMIF刺激や抗MIF抗体による中和試験では、細胞増殖とコラーゲンの発現に変化が見られなかったが、siRNAを用いMIFの合成を抑制すると、細胞増殖およびコラーゲン発現のいずれも抑制された。これはMIFはケロイドの病態形成に重要な役割を果たしていること、また、その関与はMIFのautocrine作用によるものではなく、細胞内における働きによるものであることを示すものである。

ケロイドの病態の中心的役割を果たすTGF- β とMIFの関連を検索した結果、MIF mRNAの発現は、KFおよびNFいずれにおいても、TGF- β 1の刺激に対し濃度依存性に増強した。さらに、TGF- β 1刺激によるコラーゲンの発現が抗MIF抗体では抑制されなかったが、siRNAによるMIFの合成阻害によって抑制されたことから、TGF- β の作用発現にはMIFのde novo合成が重要であることが示された。I型コラ

一ゲン発現の経路の一つにJNK, AP-1が考えられているが, MIF抑制時にJNKの活性化が低下したことから, MIFのこの経路への関与が推察された。

公開發表にあたり、副査清水宏教授より、1) 正常皮膚由来線維芽細胞においてもsiRNAにより細胞増殖等が抑制された理由、2) siRNAにてMIFが完全に消失していない理由、3) 実験に用いたケロイド標本の採取部位について質問およびコメントがあった。次いで、副査加藤紘之教授より、1) MIFがケロイドの要因に占める程度、2) MIFの発現がケロイドを発症する患者に特異的なものか、否かについて質問があり、次に主査杉原平樹教授より、1) ケロイド由来線維芽細胞のapoptosis耐性にMIFが関与している可能性、2) ケロイドにおけるMIFの過剰発現の原因について質問があった。最後に、分子生化学講座西平順助教授より、外来性MIFが細胞増殖に作用する場合の機序について質問とコメントがあった。いずれの質問に対しても、申請者は学位論文の背景および本研究の経過と結果について詳細な説明を交え、最新の知見を引用し、妥当な回答をした。

この論文は、ケロイドの主体である線維芽細胞においてMIFが過剰に発現し、細胞内において機能を果たし、その病態に深く関与することを初めて明らかにした研究であり、ケロイドをはじめとする創傷治癒過程の異常によって生ずる病態に対するMIFの関与を示し、これらの病態の解明と治療に対する新たな知見を提供するものである。

審査員一同、これらの成果を高く評価し、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)の学位に受けるのに十分な資格を有するものと判定した。