

学位論文題名

マクロファージ遊走阻止因子の制御による  
組織因子発現の抑制

学位論文内容の要旨

血栓傾向は、動脈硬化に合併する心血管疾患や脳血管疾患、感染症や悪性腫瘍に伴う播種性血管内凝固 (DIC) などの病態で重要であるばかりでなく、全身性エリテマトーデスや抗リン脂質抗体症候群などの自己免疫疾患の予後を規定する重要な因子である。血栓傾向の制御は自己免疫性疾患の治療においても重要な役割を果たすと考えられる。血栓形成疾患では、不適切な細胞活性化に伴う単球系細胞や血管内皮細胞に発現する組織因子と第 VII 因子の相互作用からはじまる外因系凝固の活性化が、病態の中心のひとつである。

マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は、1966 年に *in vitro* でマクロファージの動員を抑制する活性化 T 細胞由来のリンホカインとして報告された。当初 MIF は遅延型アレルギー反応や細胞性免疫に関わるリンホカインとされたが、MIF の生体内外での詳細な生理活性は不明であった。1989 年に MIF の cDNA がクローニングされ、1993 年に MIF の立体構造が解析され、生理的な意義が明らかになってきた。すなわち MIF はエンドトキシンショックを仲介したり、免疫細胞の活性化やサイトカイン産生を促し、向炎症作用を有する。また、サイトカインネットワークにおいて TNF $\alpha$  や IFN $\gamma$  より上流に位置し、その産生を促す。また、MIF はグルコルチコイドの作用に拮抗して炎症を惹起すること、T 細胞の活性化に必須な因子であることなどから、感染症や組織障害などの種々のストレスによる細胞の増殖や活性化にとって MIF は必須の分子であることが認識されるようになってきた。これらの事実は、MIF は細菌感染症における免疫応答や炎症反応の主たるメディエーターであることを示唆し、炎症性疾患の抗サイトカイン療法のターゲットとして注目されている。

本研究は、MIF の制御が組織因子を産生する単球系細胞や血管内皮細胞の不適切な活性化を抑制し、抗 MIF 抗体療法が血栓傾向の治療戦略のひとつとなる可能性を示すことを目的とした。

組織因子産生細胞として LPS 刺激により組織因子を発現する単球系細胞と血管内皮細胞を用いた。単球系細胞として U937 および正常末梢血単核球 (PBMC) を、内皮細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を使用した。MIF の生理活性を抑制するモノクローナル抗ヒト MIF 抗体産生ハイブリドーマをプリスタン処理した Balb/c ノードマウスの腹腔内に接種し腹水を得た。腹水からプロテイン G カラムを用いてモノクローナル抗 MIF 抗体 (anti-MIFmAb) を精製し、ELISA にて活性を確認した。組織因子産生細胞を 0-100 $\mu$ g/ml の anti-MIFmAb にて 1 時間処理し、その後 LPS を添加し 6 時間インキュベートした。組織因子は他の酵素を必要せずに、細胞表面に発現した段階で向凝固活性をもつので、その発現の評価を、活性化凝固因子 VII, 活性化凝固因子 V, 凝固因子 X, プロトロンビン, カルシウムを加え、

トロンビン産生を検出する合成基質法により測定した。

anti-MIFmAb の U937 における組織因子発現に対する効果を検討した。U937 において、LPS 刺激により強い組織因子の発現を認めたが、anti-MIFmAb にて処理された細胞では組織因子の発現は殆ど認められなかった。anti-MIFmAb による組織因子発現抑制効果は抗体濃度 20  $\mu\text{g/ml}$  で最大限に達した。同様の検討を PBMC および HUVEC においても行い、anti-MIFmAb により有意に細胞からの組織因子発現が抑制された。

以上の結果より、anti-MIFmAb は LPS 刺激による単球系細胞および血管内皮細胞の組織因子発現を抑制することが示された。

次に anti-MIFmAb による PBMC の組織因子発現抑制効果について転写レベルでの検討を行った。anti-MIFmAb が同様に処理した PBMC を LPS で刺激し、RNA を抽出後、逆転写酵素により cDNA を作成した。すべての cDNA サンプルに対してサイクル数と cDNA 濃度を変えて PCR を行い、PCR 産物が linear phase にあることを確認した。組織因子の mRNA 発現は抗体非添加細胞およびマウス正常 IgG 添加細胞と比較し、anti-MIFmAb 50  $\mu\text{g/ml}$  を添加した細胞では LPS 刺激後 30 分後、2 時間後の組織因子 mRNA 発現が低下していた。MIF の mRNA 発現を測定し、LPS 刺激後直後、30 分後、2 時間後の MIF の mRNA 発現は、抗体非添加細胞、マウス正常 IgG 添加細胞、anti-MIFmAb 50  $\mu\text{g/ml}$  添加細胞の 3 群間で明らかな差はなかった。

上記 RT-PCR 産物を定量化するため Real time PCR を行い、組織因子の cDNA の発現量を  $\beta$ -アクチン cDNA 量で補正し、RT-PCR で検討した時と同じサイクルでの real time PCR の蛍光度を比較すると、抗体非添加細胞 : anti-MIFmAb : マウス正常 IgG 抗体 =  $0.448 \pm 0.073$  :  $0.140 \pm 0.012$  :  $0.314 \pm 0.016$  (抗体非添加細胞 vs anti-MIFmAb :  $p=0.037$ , マウス正常 IgG 抗体 vs anti-MIFmAb :  $p=0.0039$ ) と anti-MIFmAb 添加細胞にて有意に組織因子の蛍光強度は有意に低かった。

これらの結果により、anti-MIFmAb による組織因子発現抑制効果は、組織因子の転写レベルで抑制されていることが示された。

以上のように anti-MIFmAb は、産生された MIF を制御しトロンビン活性を抑制した。更に RT-PCR により組織因子の発現が転写レベルで抑制されていることも示された。これらの知見により、組織因子発現の維持には MIF のオートクリン、パラクリン作用による持続的な刺激が必要であることが新たに示された。また、抗 MIF 抗体による治療は、組織因子を発現する単球系細胞や血管内皮細胞の不適切な活性化を抑制するため、単純に過凝固を非特異的に抑制するばかりではなく、血栓を形成する病態の中心である血管内皮細胞や単球系細胞の機能分子をターゲットにしており、病態の根本から疾患を改善しているという点で、これまで治療困難とされた難治性の DIC や劇症抗リン脂質抗体症候群などに対する新しい治療法として期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 吉 木 敬

学 位 論 文 題 名

## マクロファージ遊走阻止因子の制御による 組織因子発現の抑制

血栓傾向は、動脈硬化に合併する心血管疾患や脳血管疾患、感染症や悪性腫瘍に伴う播種性血管内凝固 (DIC) などの病態で重要であるばかりでなく、全身性エリテマトーデスや抗リン脂質抗体症候群などの自己免疫疾患の予後を規定する重要な因子である。血栓傾向の制御は自己免疫性疾患の治療においても重要な役割を果たすと考えられる。血栓形成疾患では、不適切な細胞活性化に伴う単球系細胞や血管内皮細胞に発現する組織因子と第 VII 因子の相互作用からはじまる外因系凝固の活性化が病態の中心のひとつである。

マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は、*in vitro* でマクロファージの動員を抑制する活性化 T 細胞由来のリンホカインとして報告された。当初 MIF は遅延型アレルギー反応や細胞性免疫に関わるリンホカインとされたが、その後 MIF の cDNA がクローニングされ、さらに立体構造が解析されて、生理的な意義が明らかになってきた。すなわち MIF はエンドトキシンショックを仲介したり、免疫細胞活性化やサイトカイン産生を促し、グルココルチコイドの作用に拮抗して炎症を惹起すること、T 細胞の活性化に必須な因子であることなどから、感染症や組織障害などの種々のストレスによる細胞の増殖や活性化にとって MIF は必須の分子であることが認識されるようになってきた。

本研究は、MIF の制御が組織因子を産生する単球系細胞や血管内皮細胞の不適切な活性化を抑制し、抗 MIF 抗体療法が血栓傾向の治療戦略のひとつとなる可能性を示すことを目的とした。

組織因子産生細胞として LPS 刺激により組織因子を発現する単球系細胞と血管内皮細胞を用いた。単球系細胞として U937 および正常末梢血単核球(PBMC)を、内皮細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を使用した。組織因子産生細胞を 0-100 $\mu$ g/ml の抗 MIF 抗体にて 1 時間処理し、その後 LPS を添加して 6 時間インキュベートした。組織因子発現を、活性化凝固因子 VII, V, X, プロトロンビン, カルシウムを加え、トロンビン産生能として合成基質法により測定した。

U937 において、LPS 刺激により強い組織因子の発現を認めたが、抗 MIF 抗体にて処理された細胞では組織因子の発現は殆ど認められなかった。抗 MIF 抗体による組織因子発現抑制効果は抗体濃度 20  $\mu$ g/ml で最大限に達した。同様の検討を PBMC および HUVEC においても行い、抗 MIF 抗体により有意に細胞からの組織因子発現が抑制された。

次に抗 MIF 抗体による PBMC の組織因子発現抑制効果について転写レベルでの検討を行った。抗 MIF 抗体で同様に処理した PBMC を LPS で刺激し、RNA を抽出後、逆転写酵素により cDNA を作成した。組織因子の mRNA 発現は抗体非添加細胞およびマウス正常 IgG 添加細胞と比較し、抗 MIF 抗体 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を添加した細胞では LPS 刺激後 30 分後、2 時間後の組織因子 mRNA 発現が低下していた。一方、LPS 刺激後直後、30 分後、2 時間後の MIF の mRNA 発現は、抗体非添加細胞、マウス正常 IgG 添加細胞、抗 MIF 抗体 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加細胞の 3 群間で明らかな差はなかった。

上記 RT-PCR 産物を定量化するため Real time PCR を行い、組織因子の cDNA の発現量を・アクチン cDNA 量で補正し、定量比較すると、抗体非添加細胞およびマウス正常 IgG 添加細胞と比較し、抗 MIF 抗体添加細胞にて有意に組織因子の蛍光強度は有意に低かった。

これらの結果により、抗 MIF 抗体は LPS 刺激による単球系細胞および血管内皮細胞の組織因子発現が低下しトロンビン産生能を抑制することが示された。また、その効果は組織因子の転写レベルで抑制されていることが示された。

これらの知見により、組織因子発現の維持には MIF のオートクリン、パラクリン作用による持続的な刺激が必要であることが新たに示された。また、抗 MIF 抗体による治療は、組織因子を発現する単球系細胞や血管内皮細胞の不適切な活性化を抑制し、血栓を形成する病態のより中心である血管内皮細胞や単球系細胞の機能分子をターゲットにしており、病態の根本から疾患を改善しているという点で、これまで治療困難とされた難治性の DIC や劇症抗リン脂質抗体症候群などに対する新しい治療法として期待される。

この発表に対し、今回使用した抗 MIF 抗体の性質や効果について質問があった。それに対し申請者は概ね適切に解答した。審査委員からは、抗 MIF 抗体は抗血栓療法に対し期待されるが、抗体の質の向上や *in vivo* での実験系の確立が必要であることなどのコメントがあった。

この論文は、北海道医学雑誌にて高く評価され、今後の難治性血栓性疾患の治療に対し期待される。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ものと判定した。