

学位論文題名

Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)
Promotes Tumor Invasion and Metastasis via the
Rho-Dependent Pathway

(マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は Rho シグナル伝達経路を介し
腫瘍浸潤転移を促進する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 腫瘍細胞の浸潤や転移に関わる過程は多段階で未解明の部分が多いが、基本的な特徴として、細胞外基質 (ECM) を破壊し癌細胞が原発巣より離脱し、浸潤転移を起こすことがある。一方、癌細胞はこの運動性を獲得するには細胞骨格を構築しなおす必要がある。Rho ファミリー-GTP 結合蛋白質は、細胞骨格系の再構成を介して接着、運動、形態などを制御していることが知られている。マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor MIF) は、活性化 T リンパ球から分泌され遅延型アレルギー反応に密接に関与するサイトカインとして発見された。1989 年、ヒト MIF cDNA がクローニングされて以来、本分子が炎症・免疫応答のみならず生体の恒常性の維持など幅広い生理的役割を担うことが報告されている。一方、Meyer-Siegler らは、前立腺の腺癌およびその転移の腫瘍中の MIF mRNA レベルが正常な前立腺の組織によりその発現が上昇していることを報告した。我々は、細胞の発生や分化、腫瘍増殖、血管新生に MIF が重要な役割を担うことを報告してきた。しかしながら、MIF の腫瘍浸潤転移における機能とその作用機序については未だ不明な点が多い。本研究では、RNA 干渉法により、MIF mRNA を knockdown することにより、腫瘍浸潤転移における MIF の機能とその作用機序について検討した。

【材料】 細胞はマウス大腸癌由来の colon26 細胞を用いた。10%ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 で継代培養し、刺激前 24 時間より無血清で培養後、以下の実験に用いた。

【RNAi 法】 MIF の機能を検討するため、RNA interference (RNAi) 法を用いた。21 塩基の 2 本鎖 RNA (siRNA) を調製し、Lipofection 法により細胞内に導入した。

【方法と結果】

1. リンフォスファチジン酸 (LPA) 刺激による MIF の発現に対する MIF siRNA の効果: colon26 細胞の MIF mRNA また蛋白質の発現レベルを、RT-PCR および Western blot 法にて検討した。MIF mRNA、蛋白質の発現は LPA (20 μ M) 添加により上昇し、MIF siRNA 48 時間前処理によりその発現の上昇はそれぞれ抑制された。

2. Colon 26 細胞の *in vitro* 浸潤に対する MIF の機能: *in vitro* transwell 浸潤分析法を用いて検討した。LPA 刺激により colon26 細胞の浸潤は無刺激群に比べ有意に増加された。一方、MIF siRNA 導入することによりその浸潤の抑制が認められた。

3. colon26 細胞の肝転移における MIF siRNA の効果: マウス肝転移モデルを用いて、大腸癌の肝転移における MIF siRNA の治療効果の有用性を検討した。Colon26 細胞を MIF siRNA あるいはコントロール siRNA で 48 時間処理後、細胞をマウス門脈から注入し 14 日後に肝転移巣の数および肝湿重量を測定した。MIF siRNA 処理により肝転移巣の数は比較群に比べ顕著に減少し、肝湿重量も有意に減少した。

4. 免疫組織染色: H-E 染色法により、前処理のない colon26 細胞のみを門脈から注入した肝転移組織では、正常な組織と腫瘍組織の境界でいくつかの単核細胞および新生血管が観察された。同

様に、コントロール siRNA で前処理された肝転移組織でも、新生血管の形成が転移巣の周囲で確認された。一方、MIF siRNA 前処理により、正常組織と腫瘍組織の境界で血管新生は、対照群に比べ著しく抑制された。新生血管を確認するために、抗 CD31 抗体を使用して、免疫組織化学染色を行った。対照群では、転移巣の周囲で顕著な CD31 染色の陽性が認められた。一方、MIF siRNA 処理した群では、CD31 染色陽性の比率が顕著に減少した。

5. LPA 刺激による Rho 蛋白質の活性化における MIF の機能：Rho effector タンパク質の一つ、Rhotekin の Rho 結合領域を利用して細胞抽出液から GTP-Rho を特異的に分離し検出した。活性化型 GTP-Rho は LPA 刺激後 30 分で著明に上昇し、60 分まで持続した。一方、LPA 刺激後 30 分で活性化された Rho 蛋白質は MIF siRNA 前処理によって強く抑制され、60 分では殆んど認められなかった。

6. FAK のリン酸化、integrin $\beta 1$ の発現と MMP-13 の生産に対する MIF siRNA の効果を Western blot 法にて検討した。予備実験では、LPA 刺激によって惹起する FAK のリン酸化のタイムコースを検討した。LPA 刺激 (20 μ M) 30min 後に FAK のチロシンリン酸化が著しく上昇された。また、48h の MIF siRNA 前処理によって、LPA による FAK のチロシンリン酸化が強く抑えられた。LPA 刺激後 24 時間 integrin $\beta 1$ の発現は著しい上昇され、MIF siRNA 処理により、その発現の上昇が対照群にくらべ強く抑制された。LPA 刺激前 48h の MIF siRNA 処理によって MMP-13 の生産が著しく抑えられた。

〔考察〕 細胞の癌化に伴い増殖制御の異常とともに細胞間接着能が消失し、運動性が亢進する。細胞運動を引き起こす刺激は細胞の種類により異なるものの、細胞内でのシグナル伝達経路は共通していると考えられる。活性リン脂質であるリゾフォスファチジン酸 (LPA) は特異的受容体を介し、細胞内にシグナルを伝えることにより Rho を活性化させ細胞運動を惹起することが知られている。一方、MIF は炎症性サイトカインあるいは細胞増殖因子として、autocrin あるいは paracrin に作用し炎症や腫瘍増殖血管新生を促していると考えられる。MIF の作用機序については、細胞内にエンドサイトーシスの機序により入り込み Jab1 を介する経路と CD74 を MIF のリセプターとする経路が報告されているが、詳細は明らかではない。

浸潤や転移先端部構造 (invadopodia) で起こっている基底膜溶解と接着・離脱の繰り返しによる癌細胞の浸潤性の Rho 細胞運動シグナルがその下流の FAK、MMP、Integrin など接着分子の相互作用により腫瘍浸潤転移を制御していると思われる。同様に本研究では、LPA 刺激により Rho 情報伝達経路が活性化され、したがって、MIF siRNA 処理によりこれらの発現の上昇は全て抑えられ、細胞浸潤また肝転移の抑制も認められた。このことから、MIF siRNA は Rho シグナル経路の上流に作用を有し、この経路を阻害することにより、浸潤・転移を阻止しているものと推測される。

癌組織あるいは癌細胞内で MIF 蛋白質が貯蔵されていること、また増殖因子など刺激により、癌細胞内で MIF の発現が上昇することが MIF の生理的役割を考える上で重要であると思われる。LPA 刺激後 MIF の発現が上昇し、Rho 蛋白質も活性化され、細胞浸潤の促進も見られたことは Rho シグナル経路に MIF が重要な役割を担っていることが強く示唆された。結果に示した通り、MIF siRNA は細胞内 MIF の蓄積を制御することにより Rho また、その下流に作用する接着分子の活性化を抑制し、さらに細胞浸潤や転移が抑制されていることが示された。この結果は MIF が Rho 蛋白質の活性化経路に依存する極めて重要な因子として、その浸潤・転移を促しているものと考えられる。細胞内 MIF を Knockdown することにより in vitro での colon26 細胞の運動性、また in vivo マウス肝転移モデルでは肝転移が抑制されたことは、今後、癌の浸潤、転移の抑制に結びつく基礎データになると考えられる。将来、MIF が腫瘍に有効な治療薬の開発のターゲットになることが期待される。

浸潤・転移は癌の転帰を決定するもっとも大きな因子である。筆者らは、標的遺伝子を knockdown させる RNAi 法を用いて MIF の大腸癌の浸潤・転移の Rho シグナル伝達経路における機能とその作用機序について解明した。癌細胞と運動の情報伝達経路が細胞内で密接にリンクして、これには Rho であることが知られている。また、細胞運動のシグナル伝達経路の解明は、癌細胞の浸潤転移を阻止する方法の確立につながると考えられる。本研究では、低分子量 G 蛋白質 Rho の活性化および接着因子の解析から、MIF が Rho シグナル伝達経路を介し腫瘍浸潤転移を促進していることを明らかにした。Rho の活性化は癌細胞の浸潤転移と相関することから、MIF siRNA などの MIF 活性阻害剤が大腸癌の浸潤転移の抑制剤として臨床応用されることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Promotes Tumor Invasion and Metastasis via the Rho-Dependent Pathway

(マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は Rho シグナル伝達経路を介し
腫瘍浸潤転移を促進する)

腫瘍細胞の浸潤や転移に関わる過程は多段階で未解明の部分が多いが、最も基本的な特徴は、癌細胞が細胞外基質 (ECM) を介し原発巣より離脱し、浸潤転移を起こすことである。一方、Rho ファミリーGTP 結合蛋白質は、細胞接着、運動、形態などを制御する分子スイッチとして腫瘍浸潤転移のシグナル経路に中心的な役割を担っていることが知られている。マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は、活性化 T リンパ球より分泌され、炎症・免疫応答のみならず生体の恒常性の維持などに密接に関与する多機能サイトカインとして機能する。最近、MIF は細胞の発生や分化、腫瘍増殖、血管新生にも重要な役割りを担っていることが報告され注目を集めている。申請者は、標的遺伝子を抑制する技術である RNAi 法を用いて大腸癌の浸潤・転移における MIF の機能とその作用機序について検討した。マウス大腸がん由来 colon26 細胞をもちいて、*in vitro* 浸潤法やマウス肝転移モデル法を施行した。更に、その作用機序を解明するために、Rho シグナル伝達経路における MIF の機能についても検討した。

Colon26 細胞を MIF siRNA あるいはコントロール siRNA で 48 時間処理後、マウス門脈から注入し肝転移モデルを作成した。14 日後に肝転移巣の数および肝湿重量を測定した。MIF siRNA 処理により肝転移巣の数はコントロールに比べ著明に減少し、肝湿重量も有意に減少した。リゾフォスファチジン酸 (LPA) 刺激による癌細胞浸潤における MIF の役割を検討するために、*in vitro* 浸潤分析法を用いた。LPA 刺激による colon26 細胞の浸潤は無刺激群に比べ有意に増加した。一方、MIF siRNA 処理することにより明らかな浸潤の抑制が認められた。これらのデータから、MIF が腫瘍浸潤転移を促進する機能を持っていることが示唆された。

浸潤や転移先端部構造 (invadopodia) で起こっている基底膜溶解と接着・離脱の繰り返

しによる癌細胞の浸潤性の Rho 細胞運動シグナルがその下流の Focal adhesion kinase (FAK)、Integrin など接着分子の相互作用により腫瘍浸潤転移を制御していると考えられる。活性化型 GTP-Rho は LPA 刺激後 30 分で顕著に上昇し、60 分まで持続した、一方、活性化された Rho 蛋白は MIF siRNA 前処理によって強く抑制され、さらに 60 分で殆んど認められなかった。LPA 添加により FAK のチロシンリン酸化、integrin $\beta 1$ の発現の上昇、また Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) の発現の増加が、MIF siRNA 処理により有意に抑制された。このことから、MIF は Rho シグナル経路を介し腫瘍浸潤転移を促進していることが示唆され、MIF siRNA などの MIF 活性阻害剤が大腸癌の浸潤転移の抑制剤として臨床応用されることが期待されると考えられた。

審査にあたっては、畠山教授から siRNA の導入効率、細胞内効果持続時間、siRNA による細胞形態の変化の検討、また MIF の癌の進行への関与、臨床応用の可能性などについて質問があった。申請者は自身の実験データ、siRNA に関する文献、MIF に関する文献を用いて siRNA の導入効率か細胞と導入試薬により異なるが、数 10~80% までの導入が可能であり、導入 2 日から 10 日間効果持続と報告されていること、明らかな細胞形態の変化が認められなかったということ述べた。一方、MIF の大腸癌について臨床データがまた報告されていないが、肺がんについては幾つかの報告があり、病理組織所見と予後の解析から MIF を高発現する患者群の予後は悪いことを紹介した。最近、MIF siRNA の将来臨床応用可能について、siRNA の *in vivo* におけるドラッグデリバリーが問題になっている。このことに関し、コレステロール標識 siRNA が、*in vivo* で効果を発揮し、肝臓また小腸で標的 apoB の発現が 50% ぐらい抑制されることから (2004 年 12 月 Nature)、siRNA の臨床への使用の可能性が示唆され、今後 MIF siRNA を用いた *in vivo* への検討が必要と考えられた。次に、浅香教授より MIF-KO マウスを用いた腫瘍の研究について報告があるかどうか、siRNA が MIF の発現を完全に抑えてないのに腫瘍浸潤転移が抑制されたことについてどう考えるかなどについての質問があった。申請者は MIF-KO マウスに関する文献、自身の実験データを用いて、MIF-KO マウスと腫瘍の研究がまだ報告されておらず、dextran sulfate sodium (DSS)、lipopolysaccharide (LPS) などの炎症モデル実験においては MIF-KO マウスで DSS 腸炎が殆ど認められないこと、また MIF は colon26 細胞質中高発現し、血清なしの培地でも 3 日間以上培養しても MIF の発現は完全に消えないことなどから、刺激による新しい産生する MIF を抑制することにより siRNA が機能していると考えられるが、今後の検討が必要であると解答した。最後に藤堂教授より Rho と血管新生は関与があるかどうかについての質問があった。申請者は Rho と血管新生に関する文献を引用し、Rho が細胞膜の VEGF2 レセプタの発現を制御している報告があると解答した。

この論文は独創的で、MIF が腫瘍浸潤転移の Rho シグナル経路に関与するという新しい概念を示唆したことで高く評価され、今後更なる機序の解明、及びこの経路をブロックする MIF siRNA などの臨床応用に向けての更なる研究が期待される。

審査員一同は、MIF が Rho シグナル経路を介し腫瘍浸潤転移を促進するという新しい知見を明らかかなにした本研究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。