

## 学 位 論 文 題 名

## ラット脊髄におけるMacrophage Migration Inhibitory Factor(MIF)の

## 発現及び脊髄損傷後急性期のMIF動態

## 学位論文内容の要旨

【緒言】 現在、脊髄損傷においては、直接外力による非可逆的な神経細胞並びに神経伝導路の裂傷、挫滅、過進展、血管障害（一次的損傷）よりも、サイトカインネットワークの活性化、神経伝達物質の放出、フリーラジカルの形成、カルシウムイオンのneuron内流入等の、可逆的な二次的損傷の進展の防止が治療の主たる目標であり、数多くの実験研究がなされている。二次的脊髄損傷のなかでも、炎症反応（inflammatory response）は、「局所を犠牲にして生体を防御する反応」と考えられ、最も重要なカスケードの一つである。

MIF (macrophage migration inhibitory factor) は、リンパ球及びマクロファージから産生される炎症性サイトカインとして歴史的に古くから知られてきた。最近、MIFの精製、クローニングが成されたことに加え、MIFがリンパ球、マクロファージのみならず、脳、心臓、角膜、皮膚上皮、子宮、卵巣、骨芽細胞等生体内に広範に存在することが明らかにされた。更にその機能においてもマクロファージの遊走を阻止し、炎症に関与するという文字通りの機能に加えて、他の炎症性サイトカインを誘導するproinflammatory cytokineとしての役割、グルココルチコイドの生体に対する作用を制御する作用、損傷修復、細胞増殖、分化、homeostasisの維持等の多くの機能に関与することが示されており、再評価されているサイトカインである。以上のことから、脊髄損傷においても、特に二次的損傷においてMIFが深く関与する可能性があるが、脊髄組織におけるMIFの発現は未だ証明されておらず、その作用も不明である。

【目的】 正常ラット脊髄におけるMIFの存在を確認し、さらに脊髄損傷後のMIFの動態及び役割について検討することを目的とした。

【対象及び方法】 実験動物には雌のWistar rat（体重 280-300 g）を用いた。脊髄損傷はmodified aneurysmal clipによる硬膜外圧迫により作成した。（損傷レベル；C7/Th1, クリップ圧；56 g, 1分間）。MIFの発現は免疫組織染色(immunohistochemistry)、及びノーザン分析にて検討した。実験群として、control群の他に、損傷後1, 3, 6, 24時間を設定した。さらに脳脊髄液中のMIF濃度の経時的変動をELISA(enzyme-linked immunosorbent assays)を用いて検討した。さらにMIFとの関連で注目されている炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ の脳脊髄液中の濃度を同時に測定した。また、MIFの神経細胞系に及ぼす機能を評価するために、in vitroでPC12（褐色細胞腫）、LN444（膠芽腫）

両培養細胞を用いて、抗MIFモノクローナル抗体存下に細胞増殖試験(MTS法)を施行した。

**【結果】** 免疫組織染色では、正常脊髄白質表層にMIFの発現を認めた。灰白質にはMIFの存在は認めなかった。脊髄損傷後1, 3, 6時間でMIF発現の減少を示したが、24時間後には形態が若干異なるものの再び白質にMIFの発現を認めた。ノーザン分析では、MIF mRNAの脊髄損傷後の動態は、免疫組織染色のそれと異なり、損傷後1, 3, 6時間の時点で発現の増加を示し、24時間後には正常時の値近くにまで減少した。脳脊髄液中のMIF濃度は損傷後早期(1時間後)に上昇を示し、その後もcontrol群に比較すると上昇する傾向が認められた。TNF- $\alpha$ の脳脊髄液中の濃度は損傷後3時間で上昇し、6時間で一旦減少し、24時間後に再び著明な上昇を示した。細胞増殖抑制試験では、添加した抗MIFモノクローナル抗体の濃度依存性に培養細胞の増殖抑制が示された。

**【考察】** 本研究での免疫組織染色、ノーザン分析、脳脊髄液中のMIF濃度測定の結果から、正常脊髄組織においては、白質細胞内に貯蔵されており、物理的侵襲により、細胞外(脳脊髄液中)に放出された後、再合成される動態をとることが示された。MIFの機能に関しては、MIFがTNF- $\alpha$ 、IL-1等他の炎症性サイトカインを刺激し、炎症反応を進展させることが報告されている。また、グルココルチコイド投与時に、グルココルチコイドの抗炎症作用によってTNF- $\alpha$ 、IL-1等の産生が抑制された状態でMIFの産生が促進することが報告されている。以上の結果は、現在、脊髄損傷急性期の薬物治療の主体を成すステロイドで、至適濃度を超えた大量投与では損傷回復効果がむしろ減弱するという報告の機序を考える上で非常に興味深い。つまり、MIFにステロイドの抗炎症作用に拮抗する働きがあり、炎症反応全体を制御することが考えられる訳である。また、MIFの神経細胞に及ぼす機能を検討する目的で行った細胞増殖試験で、抗MIFモノクローナル抗体投与により、細胞増殖が濃度依存性に抑制されることを示した。このことは、MIFが、損傷によって破壊された組織の再構築、修復に関与する可能性のあることを示している。

以上から、MIFは脊髄損傷の二次的損傷の、特に炎症反応において重要な役割を果たしていることが示唆され、二次的損傷の病態をさらに解明することが出来ると期待される。

MIFの臨床応用という観点から今後の展望を考察すると、MIF、或いは抗MIF抗体の投与等によって、過度な炎症反応を制御抑制し、かつMIFの細胞修復、増殖等、損傷回復にとって有益な機能を促進する生体内、及び損傷局所の至適MIF濃度を調節、維持することにより、特に二次的損傷抑制の面から、脊髄損傷の治療に大きく貢献することが期待される。

**【結語】** ①ラット脊髄白質におけるMIF(macrophage migration inhibitory factor)の発現の証明、並びに脊髄損傷後のMIFの動態について検討した。②正常脊髄白質表層においてMIF蛋白の発現を認めた。一方正常脊髄灰白質に於いてはMIF蛋白の発現は認められなかった。③MIFは脊髄損傷後、早期に細胞外に放出され、損傷24時間後に再び合成されるという動態を示した。④MIFは神経系細胞に対して増殖に関与する可能性が示唆された。⑤MIFは脊髄損傷、特に二次的損傷において極めて重要な役割を果たすと考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘

副 査 教 授 井 上 芳 郎

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

## ラット脊髄におけるMacrophage Migration Inhibitory Factor(MIF)の 発現及び脊髄損傷後急性期のMIF動態

脊髄損傷の病態のなかでも、現在、二次的損傷の病態解明、およびその進展防止が治療上の大きな課題である。なかでも炎症反応(inflammatory process)はフリーラジカル反応、サイトカインネットワークにも関与する重要な過程である。MIF (macrophage migration inhibitory factor)は、最近、TNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカインを誘導するproinflammatory cytokineとしての役割や、細胞分化、増殖に関与することが証明される等その多機能性が再評価されているサイトカインである。しかしながら、脊髄におけるMIFの存在は証明されておらず、その機能も不明である。本研究では、正常ラット脊髄におけるMIFの存在を確認し、さらに脊髄損傷後のMIFの役割及び動態について検討することを目的とした。対象は雌Wistar ratを用いた。脊髄損傷はクリップによる圧迫により作成した。MIF蛋白の正常脊髄における発現、並びに脊髄損傷後の動態を免疫組織染色、ノーザン解析を用いて検討した。また、脳脊髄液中MIF濃度の動態をELISAにより検討した。さらに、PC12 (pheochromocytoma)、及びLN444 (glioblastoma) 培養細胞を用いて、MIFが神経系細胞に及ぼす作用について検討した (MTS試験を用いた絵 l c m e だ t c o m p)。

MIFの免疫組織染色では、正常脊髄白質にMIF蛋白の発現が、確認された。脊髄損傷後、1, 3, 6時間後で、MIF蛋白の発現が、減弱、消失し、24時間後、形態を異にしたMIF蛋白の発現を認めた。ノーザン解析では、MIFmRNAが損傷後、1, 3, 6時間後に増加し、12, 24時間後では、正常に近く減少する傾向を示した。脊髄損傷後の脳脊髄液中のMIF濃度は、損傷後1時間後著明に上昇し、その後も正常に比較すると高値の傾向を認めた。以上の結

果より、MIFは正常脊髄白質に存在し、損傷後数時間で、おそらくは損傷軟膜を介してくも膜下腔に放出され、同時にMIFmRNAが上昇し、再合成されるという動態を示すものと考えられた。培養細胞を用いた実験では、抗MIFモノクローナル抗体存在下で、濃度依存性に細胞増殖が抑制された。以上よりMIFが本来神経系細胞に対して神経栄養因子として作用する可能性が示唆された。脊髄損傷におけるMIFの役割について考察すると、今回の結果より、MIFが神経栄養因子として作用する可能性が示唆された一方で、MIFがproinflammatory cytokineとして作用し、炎症反応を過剰に促進することも報告されており、MIFはその濃度により様々な機能を有するものと考えられた。

公開発表において、井上芳郎教授よりMIFの白質における細胞局在、並びに灰白質に存在しない理由について質問があった。続いて石橋輝雄教授より脊髄損傷後のMIFの免疫組織染色とノーザン解析との動態のdiscrepancyの解釈について等の質問があった。最後に、阿部 弘教授より今後のMIFの脊髄損傷における研究の方向性、臨床応用の可能性についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自らの研究に基づく経験や過去の論文の結果を引用し、豊富な知識に基づいて明解に回答した。

本研究により、脊髄組織にMIFが存在することが初めて明らかになり、神経栄養因子としてMIFが作用する可能性が示唆された。MIFの脊髄組織に及ぼす機能解明により脊髄損傷急性期の、特に二次的損傷の進展の防止、ひいては治療に寄与するものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、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。