

学位論文題名

ラットの消化管における Macrophage Migration
Inhibitory Factor (MIF) の発現および胃における
MIF の生理的意義について

学位論文内容の要旨

〔緒言〕 MIF (macrophage migration inhibitory factor) は、1966年に活性化Tリンパ球より分泌される最初のリンフォカインとして報告され、その名の通りマクロファージの遊走を抑制し炎症部位にマクロファージを集め、炎症や免疫反応を惹起することが明らかになった。しかし物質として同定されたのはごく最近であり、1989年にヒトMIF cDNA、1995年にラットMIF cDNAがクローニングされ、ともに114個のアミノ酸からなることが明らかにされた。MIFの組織分布については、長らく活性化Tリンパ球のみに存在すると考えられてきたが、最近では、脳、心臓、腎臓、角膜、皮膚上皮、子宮、卵巣、骨芽細胞など広範囲の組織において発現することが示されている。また、MIFが胎生早期のニワトリの水晶体の分化増殖過程と一致して発現することから、細胞の分化増殖を促す因子であることが示唆されている。MIFの機能については、glucocorticoidの刺激によりMIFが誘導されるが、いったん誘導されるとそのMIFがglucocorticoidによる過剰な抗炎症作用に拮抗する作用を持つことや、マウスにendotoxin(LPS)を投与すると、下垂体前葉よりMIFが放出されること、endotoxin shockによる致死率が抗MIF抗体により著明に改善することなどが報告されており、敗血症の病態におけるMIFの重要性が示唆されている。このように、多様な働きを持ち合わせているMIFであるが、消化管における存在は証明されていない。そこで本研究では、ラットの消化管におけるMIFの発現を検討し、あわせて胃におけるMIFの生理的意義について検討したので報告する。

〔方法および結果〕 まず、ウェスタンブロット法にてラットの消化管におけるMIF蛋白の発現について検討した。食道、胃、小腸、大腸のいずれにも、MIF蛋白の発現を認め、その中でも、胃において最も強いMIF蛋白の発現を認めた。次にMIF mRNAの発現についてノーザンブロット法を用いて検討した。食道、胃、小腸、大腸のいずれにも、MIF mRNAの発現を認めたが、胃において、ほかの消化管に比べより強いMIF mRNAの発現を認めた。さらに免疫組織染色による検討を行ったところ、弱拡大では、胃粘膜中層に強いMIFの染色が認められた。強拡大ではMIF陽性細胞は、胃粘膜の細胞のなかでも、大型で多角型の、細胞質に富む細胞であり、形態学的には壁細胞であった。被蓋上皮や主細胞、粘液頸細胞、内分泌細胞および筋層や漿膜層には染色を認めなかった。壁細胞でのMIFの局在を更に明らかにするため、共焦点レーザー顕微鏡を用いた。FITC

標識のMIFの染色は、壁細胞の細胞質にのみ認められ、核には染まりを認めなかった。ラットの胃粘膜の壁細胞に強くMIFの存在が認められたため、MIFが壁細胞において生理的機能を持つ可能性について検討した。ガストリン刺激後のMIF mRNAの変化についてノーザンブロット法を用いて検討したところ、ガストリン刺激1時間後には正常コントロールに比べ、いったんMIF mRNAの発現の減少が認められたが、6時間後には正常コントロールの発現レベルまで上昇する傾向が認められた。Relative intensityでは、ガストリン刺激1時間後に正常コントロールに比べ、およそ半分までMIF mRNAの発現が減少し、その後、正常コントロールの発現レベルまで上昇する傾向が認められた。

〔考察〕 これまでの報告では、MIFは免疫担当細胞以外では、皮膚基底層細胞、眼レンズ細胞、骨芽細胞、ヒト白血病細胞(HL-60)のように増殖能を有する未分化な細胞や、下垂体前葉細胞、膵β細胞のような内分泌細胞に発現していることが明らかにされている。今回の検討では胃におけるMIFの局在は、粘膜細胞の中でも未分化な粘液頸細胞や内分泌細胞ではなく、高度に分化し増殖能をほとんど持たない壁細胞に強い染色を認めた。壁細胞に存在するMIFの生理的意義は不明であるが、いくつかの可能性が考えられる。すなわち、壁細胞の最も重要な生理的機能は塩酸分泌であり、壁細胞の細胞質に分布する分泌細管膜上の $H^+/K^+ATPase$ により能動的に塩酸の分泌が行われている。今回の検討から、このミトコンドリアに富み、血流の豊富な壁細胞の細胞質にMIF蛋白が多量に存在し、そのメッセージの恒常的な発現も見られることがわかった。このことはMIFが、壁細胞における塩酸の合成分泌に促進的あるいは抑制的に関与をしている可能性、もしくは壁細胞の生理的機能を維持する上で必要とされるエネルギー代謝に関わっている可能性を示唆するものである。

壁細胞からの酸分泌は、主に迷走神経、ガストリン、ヒスタミンによりコントロールされている。最近ではサイトカインも胃酸分泌に影響を及ぼすことが明らかにされてきている。例えば、中枢および末梢から投与した $IL-1\beta$ が胃酸分泌を抑制することや、 $IL-1\beta$ や $TNF-\alpha$ がウサギ単離壁細胞に対し直接の分泌抑制作用を示すことが報告されている。臨床的には、 $IL-1\beta$ や $TNF-\alpha$ などのpro inflammatory cytokineの壁細胞に対する抑制作用が、*Helicobacter pylori*感染時に見られる酸分泌低下の原因のひとつと考えられている。 $TNF-\alpha$ がMIFの発現を誘導し、逆にMIFが $TNF-\alpha$ や $IL-1\beta$ の発現を誘導することが明らかにされている。この点を考慮すると、壁細胞に存在するMIFが、直接あるいは間接的にこれらのpro inflammatory cytokineの発現調節を介して、酸分泌をはじめとする胃の生理機能や胃粘膜の免疫反応に関与している可能性が考えられる。

壁細胞の組織特異的遺伝子である $H^+/K^+ATPase$ α サブユニットやcarbonic anhydrase IIは、生理的な酸分泌刺激物質であるガストリンによりその発現が増強すると報告されている。今回、壁細胞に存在するMIFも同様にガストリンによる調節を受けているか否かを検討したところ、ガストリンで刺激後の胃の組織について行った免疫組織染色ではMIF蛋白の明らかな変動は見られなかったが、MIFのメッセージレベルはガストリン投与後いったん低下し、ふたたび元のレベルに戻る傾向を見せた。ガストリン投与後に認められた一過性のMIF mRNAの低下の意義についての解釈は困難であるが、 $H^+/K^+ATPase$ α サブユニットやcarbonic anhydrase IIの発現の増強に加え、MIFの発現調節を通して、ガストリンが酸分泌反応を長期的に制御している可能性が示唆される。

- [結語] 1. ラットの食道, 胃, 小腸, 大腸においてMIF蛋白およびMIF mRNAの発現を認めた.
2. 免疫組織学的検討から, 胃粘膜中の特に壁細胞に強い発現を認めた.
3. ガストリン投与によるMIFのmRNAの変動から, MIFが壁細胞の生理的機能に関わっていることが示唆された.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

ラットの消化管における Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) の発現および胃における MIF の生理的意義について

MIF (macrophage migration inhibitory factor) は、1966年に活性化Tリンパ球より分泌される最初のリンフォカインとして報告され、その名の通りマクロファージの遊走を抑制し炎症部位にマクロファージを集め、炎症や免疫反応を惹起することが明らかになった。しかし物質として同定されたのはごく最近であり、1989年にヒトMIF cDNA、1995年にラットMIF cDNAがクローニングされ、ともに114個のアミノ酸からなることが明らかにされた。MIFの組織分布については、長らく活性化Tリンパ球のみに存在すると考えられてきたが、最近では、脳、心臓、腎臓、角膜、皮膚上皮、子宮、卵巣、骨芽細胞など広範囲の組織において発現することが示されている。MIFの機能については、glucocorticoidの刺激によりMIFが誘導されるが、いったん誘導されるとそのMIFがglucocorticoidによる過剰な抗炎症作用に拮抗する作用を持つことや、マウスにendotoxin(LPS)を投与すると、下垂体前葉よりMIFが放出されること、endotoxin shockによる致死率が抗MIF抗体により著明に改善することなどが報告されており、敗血症の病態におけるMIFの重要性が示唆されている。このように、多様な働きを持ち合わせているMIFであるが、消化管における存在は証明されていない。そこで学位申請者は、ラットの消化管におけるMIFの発現を検討し、あわせて胃におけるMIFの生理的意義について検討し、その成果をまとめたのが本研究である。

はじめに、ウエスタンブロット法によって、ラットの消化管におけるMIF蛋白の発現について検討し、食道、胃、小腸、大腸のいずれにもMIF蛋白の発現が認められること

を示した。次に、ノーザンブロット法を用いて、ラットの消化管におけるMIF mRNAの発現について検討を行い、食道、胃、小腸、大腸のいずれにもMIF mRNAの発現が認められることを示した。MIF蛋白およびMIF mRNAのいずれも、胃において他の消化管(食道、小腸、大腸)の2倍から3倍という強い発現を認めたため、胃における局在を明らかにするために、免疫組織学的検討を行った。弱拡大では、胃粘膜の中層から下層にかけてMIF蛋白の染色が認められること、強拡大では、大型で、多角形の、細胞質に富む、いわゆる壁細胞にMIF蛋白の染色が認められることを示した。さらに細胞内の局在を明らかにするために、蛍光抗体を用いた免疫組織学的検討を行った。MIF蛋白の染色は、細胞質のみに認められ、核には染色を認めないことが明らかになった。最後に、壁細胞の細胞質に多量に存在するMIFが、壁細胞の生理的機能、とくに酸分泌に関与している可能性を検討するために、ガストリン刺激後の胃粘膜におけるMIF mRNAの発現の経時的变化を、ノーザンブロット法を用いて検討した。その結果、ガストリン投与1時間後には、投与前に比べ、いったんMIF mRNAの発現レベルがおおよそ半分にまで低下し、その後次第にMIF mRNAの発現レベルが増加し、ガストリン投与6時間後には、ほぼ投与前のレベルに戻ることを明らかにした。

口頭発表に際し、副査の小林教授より、MIFの仕事としては興味深いものであるとのコメントの後、ウエスタンブロット法に用いたりコンビナントMIFの分子量が若干大きいのではないか、疾患モデルでの検討はどうか、腸管におけるMIFの染色はどうか、およびMIFのレセプターについて質問があった。次に、副査の長嶋教授より、絶食の有無の影響はどうか、壁細胞のみを集めて検討できるのか、実際に酸分泌の変化を測定できるのかについて質問があった。細川教授より、興味深い発表であり、よくまとまっていたとのコメントの後、MIFは何かに反応して発現しているのか、消化管におけるMIFの役割についての質問があり、主査の浅香教授より、ヘリコバクター・ピロリとMIFに関連する質問があった。申請者は、いずれの質問にも概ね妥当な回答をおこなった。最後に、主査の浅香教授より、レセプターも含めMIFの今後の研究の発展を期待しますとのコメントがあった。

この研究は、消化管におけるMIFの発現ならびに胃におけるMIFの生理的意義について、世界ではじめて報告したという点で高く評価され、今後は、胃潰瘍や炎症性腸疾患などの動物モデルを用いて研究を進めることにより、病因の解明や治療への応用が期待

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。