

博士（医 学） 牧 田 比呂仁

学 位 論 文 題 名

Effect of anti-macrophage migration
inhibitory factor antibody on LPS-induced
pulmonary neutrophil accumulation

(LPS による肺への好中球集積効果に対する
抗マクロファージ遊走阻止因子抗体の影響)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

研究目的

急性呼吸促迫症候群（以下 ARDS と略す）は、急性炎症により引き起こされる肺血管透過性亢進と肺血管外水分量の増加を病態の特徴とする症候群で、致死率が極めて高く、新しい治療法の開発が望まれている。これまでにも、種々の蛋白分解酵素、炎症性サイトカイン、接着因子などの ARDSへの関与が報告され、その治療への応用が模索されてきたが未だ決定的なものはない。一方、Macrophage Migration Inhibitory Factor(MIF)は古くから活性 T リンパ球由来のマクロファージ遊走阻止因子として知られてきたが、近年、内因性グルチコルチコイドの抗炎症作用に拮抗するユニークな機能が解明されたことから、新しいタイプの炎症性サイトカインとして脚光を浴びている。肺疾患に関しては、最近、急性肺損傷動物モデルにおける MIF の関与が示唆され、ARDS 患者の気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中 MIF 濃度の上昇が報告された。そこで本研究では、急性肺損傷モデルラットを用いて MIF の関与をさらに詳細に明らかにし、加えて、抗 MIF 抗体の急性肺損傷に対する防御効果とその機序の一端を明らかにすることを目的とした。

対象と方法

Sprague-Dawley ラット（雄、6 週齢、200g）。急性肺損傷作成のためにエンドトキシン (LPS) (*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma) を用いて、7 mg/kg を腹腔内投与した。抗 MIF 抗体は大腸菌に発現させた rMIF でウサギを免疫し得られたポリクローナル抗体(3.9~8.6 mg/kg)を用いた。対照には非免疫ウサギ IgG を用いた。

実験 1. 急性肺損傷における MIF の発現と局在：血清と BAL 液中の MIF 濃度を ELISA で測定した（検出限界は 1.5ng/ml）。免疫染色は 4% パラホルムアルデヒドで伸展固定した肺組織と 95% エタノールで固定した BAL 細胞を用い、ABC 法により行った。また LPS 投与前と投与後 24 時間の全肺組織より RNA を抽出して、ノーザンプロット法で MIF m-RNA の発現を比較検討した。

実験 2. 急性肺損傷に対する抗 MIF 抗体の防御効果：ラットを対照群(n=8)、非免疫ウサギ IgG + LPS 群(LPS 投与群, n=20)、抗 MIF 抗体+LPS 群(抗体投与群, n=20)の 3 群に分けて実験

を行った。抗 MIF 抗体または非免疫ウサギ IgG を LPS 投与 2 時間前に腹腔内投与した。LPS 投与後 4 時間と 24 時間に、動脈血好中球数、血小板数、肺湿・乾重量比、肺組織の好中球数と好中球ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性を測定した。また、BAL をペントバルビタール麻酔下で行ない (1 回に生理食塩水 8 ml を用いて合計 5 回洗浄、回収率 95%)、BAL 液中の好中球数、アルブミン濃度を測定した。更に、LPS 投与後 4 時間の BAL 液中 macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) 濃度を ELISA で測定し、LPS 投与群と抗体投与群で比較した。ELISA の検出限界は 50 pg/ml で、コントロール群では検出されなかった。統計は群間比較に ANOVA (Scheffe F test) を、2 群間の比較には Students' *t*-test を用い、*p* < 0.05 を用いた。

結 果

MIF 濃度は BAL 液中では検出できなかったが、血清では LPS 投与前 13.9 ± 3.1 ng/ml (mean \pm SE) から、投与後 4 時間で 121.4 ± 25.3 ng/ml、24 時間で 37.7 ± 9.4 ng/ml と有意に上昇した。免疫染色では、気道上皮細胞と肺胞マクロファージの細胞質に MIF 蛋白の存在を確認した。LPS 投与後 24 時間の全肺組織では、MIF mRNA の発現増加が認められた。肺血管外水分量の変化の指標である肺湿・乾重量比と BAL 液中アルブミン濃度は、LPS 投与群でも増加しなかったが、投与後 24 時間の血小板数は LPS 投与群で著しく減少し (*p* < 0.05)、抗体投与群ではその減少が有意に抑制された (*p* < 0.05)。

肺組織への好中球集積は、対照群に比較して LPS 投与群では肺胞 1 個当たりの好中球数でみても肺組織 MPO 活性でみても有意に増加した (*p* < 0.05 for both)。抗 MIF 抗体前投与により、前者では 4 時間で 54%、24 時間で 44% 抑制し (*p* < 0.05 for both)、後者ではそれぞれ 35%、46% 抑制した (*p* < 0.05 for both)。BAL 液中好中球数比率も LPS 投与後 24 時間では約 10 倍に有意に上昇したが、抗 MIF 抗体前投与はこの上昇を抑えた (*p* < 0.05)。LPS 投与後 4 時間の BAL 液中 MIP-2 濃度は抗体投与群では LPS 投与群に比べて有意に減少していた (*p* < 0.01)。

考 案

本研究では、MIF が気道上皮細胞と肺胞マクロファージに存在すること、急性肺損傷時に肺組織で MIF mRNA の発現が増加し急性肺損傷の進展に MIF が関与することを示すとともに、抗 MIF 抗体前投与が肺への好中球集積を有意に抑制することを示した。また、抗 MIF 抗体は強力な好中球遊走因子である MIP-2 の BAL 液中濃度上昇も有意に抑えたことから、抗 MIF 抗体による白血球集積抑制効果の少なくとも一部はケモカイン抑制機序を介することを示した。

MIF は 1989 年にクローニングされて以来分子生化学的研究が可能となり、元々知られていた機能とは異なる新しいタイプの炎症性サイトカインの 1 つであることが明らかとなってきた。特に、広く抗炎症作用を発揮する内因性グルココルチコイド作用に拮抗することから、これまでの多くのサイトカインとは異なる機序で炎症に関与している可能性が示唆されている。

今回の実験では、LPS 7 mg/kg と比較的充分量を投与したにも拘らず、肺損傷は軽度で肺水腫を惹起することはできなかった。しかし、急性肺損傷の進展に中心的役割を果たすと考えられる好中球の肺への集積を著明に抑制したことは、抗 MIF 抗体がより重篤な病態に対しても効果を期待できるかもしれない。

抗 MIF 抗体が肺への好中球集積を抑制した機序としては、直接あるいは間接的に好中球遊走因子を抑制した可能性がある。MIP-2 は強力な好中球遊走性ケモカインの 1 つであり、今回の研究では LPS 投与後 4 時間の BAL 液中で著明に上昇し、それを抗 MIF 抗体が抑制することを示した。しかし、この抗 MIF 抗体の好中球遊走性ケモカインに対する効果が内因性グルココ

ルチコイドを介した間接効果なのか、あるいは MIP-2 放出に対する MIF の直接効果を抑制したのかを明らかにすることは今後の課題である。また、IL-1 や TNF α など他の炎症性サイトカインに影響を与えていた可能性があり、MIF は単なる炎症性サイトカインの 1 つではなく、LPS 急性肺損傷モデルにおいても炎症早期から病態に広く関与し、抗 MIF 抗体は ARDS に対する新たな治療戦略となりうる可能性がある。

結 語

LPS 急性肺損傷モデルラットにおいて MIF はその病態に関与し、抗 MIF 抗体前投与は肺への好中球集積を抑制する。この作用機序の少なくとも一部は、好中球遊走性ケモカインである MIP-2 を介する。

学位論文審査の要旨

主査教授 北島顕

副査教授 西信三

副査教授 川上義和

学位論文題名

Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on LPS-induced pulmonary neutrophil accumulation

(LPSによる肺への好中球集積効果に対する
抗マクロファージ遊走阻止因子抗体の影響)

急性呼吸促迫症候群（以下 ARDS と略す）は、急性炎症により引き起こされる肺血管透過性亢進と肺血管外水分量の増加を病態の特徴とする症候群で、致死率が極めて高く、新しい治療法の開発が望まれているが未だ決定的なものはない。一方、Macrophage Migration Inhibitory Factor(MIF)は活性 T リンパ球由来のマクロファージ遊走阻止因子として知られてきたが、近年、内因性グルチコルチコイドの抗炎症作用に拮抗するユニークな機能が解明された。また、'97 年には初めて急性肺損傷動物モデルにおける MIF の関与が示唆され、ARDS 患者の気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中 MIF 濃度の上昇が報告された。そこで本研究では、急性肺損傷モデルラットを用いて MIF の関与を明らかにし、抗 MIF 抗体の急性肺損傷に対する防御効果とその機序の一端を明らかにすることを目的とした。SD ラットを用い（雄、200g）、エンドトキシン (LPS) 7 mg/kg を腹腔内投与し実験的急性肺障害モデルを作成した。研究 1 では、急性肺損傷における MIF の発現と局在を検討するため、血清と BAL 液中の MIF 濃度、MIF 免疫染色、LPS 投与前と投与後 24 時間で、肺組織での MIF m-RNA の発現を比較検討した。研究 2 では、ラットを非免疫ウサギ IgG+LPS 群 (LPS 投与群) と抗 MIF 抗体+LPS 群 (抗体投与群) に分けて、LPS 投与後 4 時間と 24 時間の、抗 MIF 抗体の急性肺損傷に対する防御効果を検討した。研究 3 では、抗 MIF 抗体の効果の作用機序を明らかにするため、LPS 投与後 4 時間の BAL 液中 macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) 濃度を測定した。

結果は、血清 MIF 濃度が LPS 投与後 4 時間で有意に上昇した。気道上皮細胞と肺胞マクロファージの細胞質に MIF の陽性染色を確認した。LPS 投与後 24 時間で、全肺組織の MIF mRNA の発現増加が認められた。研究 2 では、LPS 投与後 24 時間の血小板数の減少を、抗 MIF 抗体前投与は有意に抑制した ($p < 0.05$)。肺湿・乾重量比は、LPS 投与群で増加しなかったので、この実験モデルでは明らかな肺水腫は作成できなかった。しかし、肺組織への好中

球集積は、対照群に比較して LPS 投与群では肺胞 1 個当たりの好中球数、肺組織 MPO 活性ともに有意に増加し、抗 MIF 抗体前投与により、4 時間、24 時間ともに抑制した($p<0.05$ for both)。BAL 液中好中球数比率は LPS 投与後 24 時間では約 10 倍に有意に上昇したが、抗 MIF 抗体前投与はこの上昇を抑えた ($p<0.05$)。研究 3 の結果は LPS 投与後 4 時間の BAL 液中 MIP-2 濃度は LPS 投与群により上昇し、抗体投与群では有意に減少していた ($p<0.01$)。

本研究では、MIF が気道上皮細胞と肺胞マクロファージに存在すること、急性肺損傷時に肺組織で MIF mRNA の発現が増加し急性肺損傷の進展に MIF が関与することを示すとともに、抗 MIF 抗体前投与が肺への好中球集積を有意に抑制することを示した。また、抗 MIF 抗体の前投与は、好中球遊走因子である MIP-2 の BAL 液中濃度上昇をも有意に抑えたことから、抗 MIF 抗体による白血球集積抑制効果の少なくとも一部は好中球遊走性ケモカイン抑制機序を介することを示した。しかし、この効果が従来報告されているような内因性グルココルチコイドを介した間接効果なのか、あるいは MIF の直接効果であるのかを明らかにすることは今後の課題である。MIF は、内因性グルココルチコイド作用に拮抗するユニークな機能を有し、LPS 急性肺損傷モデルにおいても炎症早期から病態に関与する可能性があることから、抗 MIF 抗体は ARDS に対する新たな治療戦略となりうるものと期待される。

発表後、主査および副査から MIF の生物学的活性や機能と、抗 MIF 抗体の治療効果または臨床応用への可能性に関する質疑があった。まず、MIF の生物学的活性について、特に recombinant MIF (rMIF) のマクロファージに対する活性と、抗 MIF 抗体のマクロファージへの影響について、また MIF とグルタチオンが結合した際の MIF の機能について質疑があった。これらの質疑に対して、申請者は証明されている rMIF の生物学的活性を、自験例の結果を交えて述べ、その結果から、高濃度では MIF が生物学的活性をもつが、*in vivo* では内因性ステロイドを介する効果である可能性を考察した。また、主査より健常時の気道上皮細胞に発現している MIF の機能について質疑があった。申請者は、現時点で解明されていないとした上で、MIF のグルココルチコイドに拮抗する機能からサイトカインの分泌や細胞のさまざまな機能を調節している可能性があると考察した。臨床応用への可能性に関する質疑では、LPS 急性肺損傷モデルの妥当性と ARDS にも抗 MIF 抗体の効果が期待できる根拠、また、ヒトに使用した際の予想される副作用について質疑があった。これらの質疑に対して申請者は、本実験の結果から、ARDS に限らず好中球の関わるさまざまな病態で、効果を発揮する可能性がある。また、ステロイド難治性の病態への応用も考慮できるとした。更に抗 MIF 抗体はステロイドを必要としている病態において、その減量効果にも期待できると回答した。予想される副作用については、好中球集積抑制が生体にとって不利益を生じる可能性を指摘した。それは、好中球が炎症を惹起する一方、組織修復にも関与し、常に二面性をもって局所における炎症や免疫を調節していると考えられており、一概には評価できないと説明した。

この論文は急性肺損傷の好中球の集積機構での MIF の関与を初めて証明した点で高く評価され、今後、抗 MIF 抗体は ARDS に対する新たな治療戦略として期待される。

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充分な資格を有するものと判定した。