

学 位 論 文 題 名

Expression of macrophage migration inhibitory
factor in corneal wound healing in rats.

(ラット角膜創傷治癒におけるマクロファージ遊走阻止因子の発現)

学位論文内容の要旨

はじめに

我々はこれまでに Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)が角膜上皮基底細胞, 角膜内皮細胞および虹彩毛様体上皮細胞に発現していることを報告した。角膜は血管を欠き, 形態学的にも上皮, 実質, 内皮からなる明らかな3層構造をとる組織であり, 細胞増殖因子またはサイトカインの発現を In Vivo で検討するために適した組織と考えられる。そこで我々はラット角膜の穿孔性外傷モデルを作成し MIF の創傷角膜及び前房水中の発現を検討した。

方法

ラットの右眼角膜中央に 2 mm の線状の穿孔創を作成し, 3, 6, 24, 48, 72 時間後の損傷角膜における MIF 発現の経時的変化を (1) 抗 MIF 抗体を用いた免疫染色, (2) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) および Southern blot 法を用いて解析した。また受傷眼および僚眼の前房水中の MIF 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法を用いて定量した。

結果

免疫染色の結果, 正常ラット角膜では角膜上皮基底細胞, 内皮細胞に MIF 発現が見られた。受傷後 3 時間では受傷角膜の中央部の上皮で MIF 染色性が消失したが, 僚眼の角膜における MIF 染色性には変化はなかった。6 時間後には創傷部位周囲の角膜上皮の MIF 染色性は回復した。24 時間後以降では創傷部位をおおう角膜上皮及び内皮さらに定常状態ではほとんど MIF 染色性を認めない角膜実質細胞にも MIF 発現を認めた。また受傷角膜から RNA を抽出し, MIF mRNA の発現量を Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) および Southern blot 法を用いて半定量的に解析したところ, 受傷後 6 時間より 48 時間までの間 MIF mRNA の発現が亢進していた。一方, 前房水中には受傷眼のみならずその僚眼にも MIF 蛋白濃度の上昇を認め, どちらの眼においても受傷 6 時間後にその濃度が最高に達した。その間の血清中の MIF 濃度は 48 時間後まで緩やかに上昇した。

結論

以上の結果より、(1) 角膜の外傷において受傷後3時間以内に角膜上皮から MIF が分泌されている可能性が示唆された。これは好中球およびマクロファージといった創傷治癒に必須の炎症性細胞の創傷部位への浸潤時期に一致する。(2) 角膜外傷より6時間後以降には mRNA および蛋白レベルで創傷局所における MIF 発現が亢進しており、細胞増殖を伴う創傷治癒に MIF が関与している可能性が考えられた。(3) 受傷後24時間後以降では創傷部位の角膜実質細胞に MIF 発現をみた。このことは、外傷等の外界からの刺激に伴って角膜実質細胞が活性化される時期に一致している。(4) 片眼性の角膜外傷によって僚眼の前房水中にも MIF 発現の亢進をみとめた。また、血清中の MIF 濃度の上昇に比べ 僚眼前房水中の MIF 濃度の上昇は量的にも速度的にも大きく、このことは、血清以外の情報伝達因子が MIF 発現を制御している可能性を示唆するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 教 授 井 上 芳 郎

副 査 教 授 松 田 英 彦

学 位 論 文 題 名

Expression of macrophage migration inhibitory factor in corneal wound healing in rats.

(ラット角膜創傷治癒におけるマクロファージ遊走阻止因子の発現)

Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)は遅延型過敏反応が成立したモルモットの感作マクロファージの毛細管からの遊走を阻止する因子として1966年に報告された。1989年にヒトTリンパ球からMIFのcDNAがクローニングされ分子レベルでの研究が始まった。私はこれまでMIFが角膜上皮基底細胞、角膜内皮細胞および虹彩毛様体上皮細胞に発現していることを報告した。角膜は血管を欠き、形態学的にも上皮、実質、内皮からなる明らかな3層構造をとる組織であり、細胞増殖因子またはサイトカインの発現をIn Vivoで検討するために適した組織と考えられる。そこでラット角膜の穿孔性外傷モデルを作成しMIFの創傷角膜及び前房水中の発現を検討した。ラットの右眼角膜中央に線状の穿孔創を作成し、3、6、24、48、72時間後の損傷角膜におけるMIF発現の経時的変化を(1)抗MIF抗体を用いた免疫染色、(2)Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) およびSouthern blot法を用いて解析した。また受傷眼および僚眼の前房水中のMIF濃度をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法を用いて定量した。免疫染色の結果、正常ラット角膜では角膜上皮基底細胞、内皮細胞にMIF発現が見られた。受傷後3時間では受傷角膜の中央部の上皮でMIF染色性が消失したが、僚眼の角膜におけるMIF染色性には変化は見られなかった。6時間後には創傷部位周囲の角膜上皮のMIF染色性は回復した。24時間後以降では創傷部位をおおう角膜上皮及び内皮、さらに定常状態ではほとんどMIF染色性を認めない角膜実質細胞にもMIF発現を認めた。また受傷角膜からRNAを抽出し、MIF mRNAの発現量

を RT-PCR および Southern blot 法を用いて解析したところ、受傷後 6 時間より 48 時間までの間 MIF mRNA の発現が亢進していた。一方、前房水中には受傷眼のみならずその僚眼にも MIF 蛋白濃度の上昇を認め、どちらの眼においても受傷 6 時間後にその濃度が最高に達した。その間の血清中の MIF 濃度は 48 時間後まで緩やかに上昇した。以上の結果より、(1) 角膜の外傷において受傷後 3 時間以内に角膜上皮から MIF が分泌されている可能性が示唆された。(2) 角膜外傷より 6 時間後以降には mRNA および蛋白レベルで創傷局所における MIF 発現が亢進しており、細胞増殖を伴う創傷治癒に MIF が関与している可能性が考えられた。(3) 片眼性の角膜外傷によって僚眼の前房水中にも MIF 発現の亢進をみとめた。また、血清中の MIF 濃度の上昇に比べ僚眼前房水中の MIF 濃度の上昇は量的にも速度的にも大きく、このことは、血清以外の情報伝達因子が MIF 発現を制御している可能性を示唆するものである。

公開発表に際し、副査の井上教授より MIF 発現細胞の局在、および僚眼での MIF 発現の機序について、副査の松田教授より一過性の MIF 発現の低下が細胞死によるものである可能性について、また僚眼での MIF 発現機序を調べるための方法論について質問があった。主査の石橋教授からは受傷眼と僚眼の MIF 発現に時間差がみられない理由などについての質問があった。申請者は MIF 発現細胞は基底膜と接しているという局在の共通性を持つこと、僚眼での MIF 発現は substance-P 等の神経伝達物質が誘導している可能性が考えられ、その検証のために capsaicin 投与による neuroparalytic rat を使った実験を施行中であり、また僚眼との時間差がみられないことも MIF 発現が神経支配を受けている可能性を示唆する一つの傍証であることを述べた。

本論文は、マクロファージ遊走阻止因子が角膜創傷治癒と交感性反応の重要な因子であることを明らかにしたものであり、眼科臨床応用へと発展させることのできる研究と期待される。

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。