

学位論文題名

An Antibody for Macrophage  
Migration Inhibitory Factor(MIF) Suppresses Tumor  
Growth and Inhibits Tumor-Associated Angiogenesis

(抗 MIF (マクロファージ遊走阻止因子) 抗体による  
腫瘍増殖抑制効果と腫瘍血管新生阻害)

学位論文内容の要旨

I. 目的

Macrophage Migration Inhibitory Factor (以下 MIF) は、1966 年活性化 T リンパ球より分泌されるサイトカインとして発見され、マクロファージの無秩序な遊走を制御して炎症部位に集積させ、炎症反応、免疫応答を惹起する物質と考えられていた。しかし、1989 年に David らによりヒト T リンパ球から MIF cDNA がクローニングされて以降研究は進み、MIF が敗血症の主要な原因物質であること、組織の修復に関与すること、脳、腎臓、肝臓、心臓など身体の組織中に広く分布し細胞の分化増殖を促す因子であることが報告された。腫瘍と MIF との関連については、1996 年に前立腺癌の原発巣とリンパ節転移巣との比較において MIF は転移巣により強く発現しており、転移・増殖に関与していることが示唆された。

一方、腫瘍増殖には血管新生が不可欠であることより、腫瘍の血管新生を抑えることは有力な癌治療と考えられ、近年血管新生阻害による抗腫瘍効果の報告が相次いでいる。

本研究では、腫瘍増殖における MIF の役割を明らかにするため、特に MIF の腫瘍血管新生への関与について、抗 MIF 抗体投与による腫瘍増殖と腫瘍血管新生を検討した。

II. 方法

1) 皮下移植腫瘍増殖試験 (1)

マウス大腸癌細胞 colon 26 ( $1 \times 10^6$  個) を雌性 BALB/c マウスの背部皮下に移植し、Day 9 より抗 MIF polyclonal 抗体 ( $200 \mu\text{g}/\text{body}/\text{day}$ ) を隔日腹腔内投与して、Day 22 に犠牲死させるまでの腫瘍体積の推移を測定した。

2) 皮下移植腫瘍増殖試験 (2)

前述の実験と同様に colon 26 ( $1 \times 10^6$  個) を雌性 BALB/c マウスの背部皮下に移植し、Day 9 より recombinant MIF (rMIF) ( $50 \mu\text{g}/\text{body}/\text{day}$ ) を隔日尾静脈内投与して、Day 22 までの腫瘍体積の推移を測定した。

3) 腫瘍血管新生試験

colon 26 ( $1 \times 10^7$  個) を注入した Millipore chamber を雌性 BALB/c マウスの背部皮下に移植し、Day 1, 3, 5 に抗 MIF polyclonal 抗体 ( $200 \mu\text{g}/\text{body}/\text{day}$ ) を腹腔内投

与し、Day 6 における皮下の腫瘍血管新生を MCID Image Analyzer を用いて血管の面積を数値化し測定した。

#### 4) 血管内皮細胞 [<sup>3</sup>H] Thymidine (Thd) 取り込み活性試験

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC を 96 well の microtiter plate で培養し、抗 MIF monoclonal 抗体 (50 $\mu$ g/ml)、rMIF (500ng/ml)、vascular endothelial growth factor (VEGF) (100ng/ml) 投与における [<sup>3</sup>H] Thd (10<sup>6</sup>cpm/well 4 時間接触) の取り込み活性を Microbeta scintillation counter で測定した。

### III. 結果

#### 1) 皮下移植腫瘍増殖における抗 MIF 抗体の効果

抗 MIF 抗体投与群は対照群 (control IgG 投与) に比べ、Day 15 から Day 22 まで有意に腫瘍増殖が抑制された。最小の treatment/control 体積比は、Day 19 の 0.46 であった。

#### 2) 皮下移植腫瘍増殖における rMIF の効果

rMIF 投与群と対照群 (生理食塩水投与) の腫瘍体積は、観察期間を通して有意差を認めなかった。

#### 3) 腫瘍血管新生における抗 MIF 抗体の効果

抗 MIF 抗体投与群は対照群 (control IgG 投与) に比べ、colon 26 によって誘導される血管新生が有意に抑制された。

#### 4) 血管内皮細胞増殖における抗 MIF 抗体、rMIF、VEGF の効果

[<sup>3</sup>H] Thd 取り込み活性 (すなわち HUVEC の増殖) は、対照群に比べ抗 MIF 抗体投与群で有意に抑制された。この抗 MIF 抗体の増殖抑制効果は、rMIF の同時投与により中和されたが、rMIF の単独投与では HUVEC の増殖に有意差を認めなかった。VEGF 投与群では有意に HUVEC の増殖が促進されたが、抗 MIF 抗体の同時投与により VEGF の増殖促進効果は中和された。

### IV. 考察

抗 MIF 抗体により *in vivo* で腫瘍増殖及び腫瘍血管新生が抑制され、*in vitro* で HUVEC の増殖が抑制されたことより、MIF は腫瘍増殖において血管新生の誘導に関与することが示唆された。我々は以前、transforming growth factor (TGF) - $\beta$ 、platelet-derived growth factor (PDGF)、basic fibroblast growth factor (b-FGF) などの増殖因子により、colon 26 細胞内の MIF mRNA 発現が増強されることを報告しているが、VEGF によって誘導された MIF が VEGF と共に血管新生を促進することが示唆され、抗 MIF 抗体により VEGF の作用が中和されたことはこれらの結果と矛盾しない。

rMIF 投与で *in vivo* での腫瘍増殖及び *in vitro* での HUVEC の増殖に影響が見られなかったことは、腫瘍環境あるいは培養液中の MIF により、血管内皮細胞が増殖するための十分な刺激を受けていたためと推測された。一方、以前の MIF anti-sense plasmid transfection を用いた実験から、細胞増殖には細胞内 MIF 濃度が細胞外 MIF 濃度より重要であることが明らかにされており、このことも rMIF 投与で影響が見られなかったことの理由と考えられた。

動物実験において、抗 MIF 抗体による副作用がほとんど見られなかったことは臨床応用の可能性を示し、抗 MIF 抗体は腫瘍血管新生阻害による新しい抗腫瘍薬として臨床応用さ

れることが期待される。

#### V. 結語

1. MIF は腫瘍増殖において血管新生の誘導に関与することが示唆された。
2. 抗 MIF 抗体は腫瘍血管新生阻害による新しい抗腫瘍薬として期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 教 授 藤 堂 省

副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

## An Antibody for Macrophage Migration Inhibitory Factor(MIF) Suppresses Tumor Growth and Inhibits Tumor-Associated Angiogenesis

(抗 MIF (マクロファージ遊走阻止因子) 抗体による  
腫瘍増殖抑制効果と腫瘍血管新生阻害)

Macrophage Migration Inhibitory Factor (以下 MIF) は炎症性サイトカインとして知られていたが、近年の研究により生体内に広く分布し細胞の分化増殖に関わることが明らかになった。申請者は血管内皮細胞にも MIF が発現していること及び腫瘍増殖に血管新生が不可欠なことから、「腫瘍増殖において MIF は血管新生の誘導に関与し、抗 MIF 抗体は腫瘍血管新生阻害による抗腫瘍効果をもつ」という仮説を検証した。実験は抗 MIF 抗体または recombinant MIF (rMIF) 投与によるマウス背部皮下移植腫瘍 (大腸癌細胞 colon 26) の増殖の変化、抗 MIF 抗体投与による腫瘍血管新生の変化、及び *in vitro* で抗 MIF 抗体、rMIF、血管内皮細胞増殖因子 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) 投与による血管内皮細胞 HUVEC の増殖の変化を検討した。その結果、抗 MIF 抗体により *in vivo* で腫瘍体積の増加及び腫瘍血管新生の程度が抑制され、*in vitro* で血管内皮細胞の増殖 ([<sup>3</sup>H] Thd 取り込み活性) が抑制された。rMIF の投与は *in vivo* での腫瘍増殖及び *in vitro* での血管内皮細胞の増殖に影響を与えなかった。これらの実験事実は MIF が腫瘍増殖において血管新生の誘導に関与すること、及び腫瘍環境または培養液中の MIF により血管内皮細胞が増殖するための十分な刺激を受けていたことを示唆し、抗 MIF 抗体は腫瘍血管新生阻害による新しい抗腫瘍薬として期待されると考えられた。

審査にあたって、加藤教授から抗 MIF 抗体について組織損傷における炎症と腫瘍増殖に対する作用の共通点、他の腫瘍細胞種での検討、化学療法との併用、また MIF と VEGF の相互作用について質問があった。申請者は抗 MIF 抗体に関する文献、VEGF に関する文献、血管新生阻害剤に関する文献、申請者自身の実験データを用いて、抗 MIF 抗体が *in vitro* で direct な腫瘍増殖抑制効果をもたないデータがあり *in vivo* における腫瘍増殖抑制は血

管新生阻害を介している点で組織損傷における血管新生抑制と共通すること、抗MIF抗体による lymphoma の増殖抑制の報告があるのみということ、作用機序の異なる化学療法との併用により相乗効果と抗癌剤の減量が期待できること、VEGFによって誘導されたMIFが細胞内から核内に移動し作用したり、細胞外で autocrine 的に作用したりすることを回答した。次いで、藤堂教授より抗MIF抗体が polyclonal 抗体かどうか、サイトカインの中におけるケモカインの定義とMIFがケモカインに属するのかどうか、抗MIF抗体がVEGFのHUVECへの増殖因子としての作用を減弱させているがVEGF receptorへ作用するかどうか、VEGF投与におけるHUVEC培養液中のMIF濃度についての質問があった。申請者はケモカインに関する文献、申請者自身の実験データを用いて、in vivo では polyclonal 抗体、in vitro では monoclonal 抗体を使用したこと、ケモカインは白血球の走化、活性能を持つサイトカインで構造式から4つのサブグループに分類されるが、MIFはそのどの構造式とも異なり、ケモカイン的な作用を持つがケモカインではないこと、抗MIFのVEGF receptorへの作用は今後の検討が必要なこと、VEGFによってHUVEC培養液中のMIF濃度が上昇するデータがあることを回答した。最後に、石橋教授から抗MIF抗体の作用のメカニズムについて、抗MIF抗体治療の今後の展望についてはどうか質問があった。申請者は抗MIF抗体に関する文献、血管新生阻害剤に関する文献、申請者自身の実験データを用いて、抗MIF抗体は細胞外のMIFの作用を抑えると考えられるが、詳細なメカニズムは今後の検討が必要なこと、他の血管新生阻害剤と同様に確立された腫瘍塊よりも micro metastasis への効果が期待され、投与時期や多剤との併用は今後の検討が必要なことを回答した。

この論文は独創的で、MIFが血管新生に関与し抗MIF抗体によって腫瘍増殖が抑制されるという新しい概念を示唆したことで高く評価され、今後抗MIF抗体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が血管新生に関与するという新しい知見を明らかにした本研究の成果を高く評価し、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。