

学 位 論 文 題 名

Influence of macrophage migration inhibitory factor in signal transduction pathway of T cells

(T細胞シグナル伝達経路におけるマクロファージ遊走阻止因子の影響)

学位論文内容の要旨

マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は活性化 T 細胞より産生され、局所でのマクロファージ遊走を阻止する物質として報告された最初のリンフォカインである。近年 MIF 遺伝子がクローニングされ、副腎皮質ホルモンに対する拮抗作用、T 細胞活性化、細胞増殖への関与、酵素活性を有するなど多彩な生理活性が報告されている。

一方、実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (EAU) はベーチェット病などのヒト内因性ぶどう膜炎の動物実験モデルとされており、Lewis ラットにおいてはウシ視細胞間レチノイド結合蛋白 (IRBP) 由来ペプチドの一つである R16 で惹起することが可能である。また、その発症には Th1 細胞が重要な働きをしていると考えられている。

今回申請者は抗 MIF モノクローナル抗体 (2SC) を用いて、*in vitro* での抗原特異的 T 細胞増殖反応の抑制、ならびにマウスより樹立した T 細胞クローン増殖反応の抑制効果をマウスの系で検討した。さらにラットに、R16 ペプチド抗原免疫後 2SC を腹腔内投与することにより抗原特異的 T 細胞増殖反応抑制と EAU の制御を試みた。

はじめに *in vitro* での活性化 T 細胞における MIF mRNA の発現を RT-PCR で検討した。インターフェロン γ (IFN- γ) 産生 T 細胞クローン、IFN- γ -インターロイキン 4 (IL-4) 産生 T 細胞クローン、さらにマウス脾臓由来 NK1.1⁺ 細胞のいずれも、PMA とカルシウムイオノフォア刺激後に MIF mRNA 発現量が亢進した。また、ヒト MIF を腹腔内注射したマウスの脾細胞よりハイブリドーマを作成し、抗 MIF モノクローナル抗体を含む培養上清を得た。

次に抗原特異的 T 細胞増殖反応に対する抗 MIF 抗体の作用を検討した。C57/BL6 (B6) マウスを抗原ペプチド p43-58 で免疫し、10 日後所属リンパ節よりナイロンウールカラム

を用いて T 細胞を回収した。30GyX 線照射脾細胞を抗原提示細胞 (APC) とし、回収した T 細胞を抗原、抗 MIF 抗体とともに 3 日間培養して ^3H チミチンの取り込み量を測定した。抗原特異的 T 細胞増殖反応は抗体濃度依存的に抑制された。同様に IFN- γ 産生 T 細胞クローン、IFN- γ -IL-4 両方産生 T 細胞クローンをを用いた増殖反応においてもいずれも増殖反応は抑制された。

続いて抗 MIF 抗体の IL-2 レセプター(IL-2R)を介するシグナルへの影響を検討するため、T 細胞クローンに IL-2R を発現させた後に IL-2 と抗 MIF 抗体を加え培養したが、T 細胞増殖反応は抑制されなかった。したがって、抗 MIF 抗体は T 細胞の IL-2R ではなく、T 細胞レセプター (TCR) を介する経路に作用すると考えられた。

さらに TCR を介して NKT 細胞を刺激し、抗 MIF 抗体の作用を検討した。マウス脾臓より回収した NK1.1 $^{+}$ 細胞を抗 CD3 抗体で刺激し、抗 MIF 抗体を加え 24 時間後の IL-4 産生量を測定したが、抗 MIF 抗体により NK1.1 $^{+}$ 細胞活性化は抑制されなかった。

次に、抗 MIF 抗体ラット T 細胞増殖反応に対する効果を検討したが、マウス同様強い抑制効果がみられた。また、Lewis ラットを 50nmol の R16 ペプチドと完全フロイドアジュバンドのエマルジョンで免疫し、百日咳菌懸濁液を追加免疫して EAU を誘導した。免疫日より抗 MIF 抗体を免疫後 0, 2, 4, 8 日 (A 群)、10, 12, 14, 16 日 (B 群) の 2 群に分けて隔日腹腔内投与した。免疫日より臨床的重症度を経時的に観察し、免疫 18 日後に眼球摘出、組織学的重症度を検討した。EAU 発症日は A 群では免疫後 10.83 ± 0.16 (平均 $\pm$ 標準誤差) 日、B 群では 9.50 ± 0.50 日、対照群では 9.33 ± 0.21 日であり、A 群では対照群に比べ有意に発症日が遅延していた ($p < 0.01$)。組織学的重症度は A 群では 1.11 ± 0.11 、B 群は 1.29 ± 0.19 、対照群 1.67 ± 0.19 であり、A 群では対照群と比較し、有意に軽症化した ($p < 0.05$)。

ラット EAU において抗原免疫後 1 週間以内に抗 MIF 抗体投与した群では軽症化、発症遅延したが、免疫 8 日以降に投与した群では対照群に比較して EAU 抑制効果はみられなかった。このことは抗 MIF 抗体は免疫後の誘導期においてのみ有効であることを示している。また *in vitro* で活性化 T 細胞では MIF mRNA の発現が亢進しており、MIF は T 細胞活性化に何らかの重要な役割を果たしている可能性がある。さらに抗 MIF 抗体は T 細胞受容体 (TCR) を介するシグナル伝達経路に作用し、一方で IL-2 受容体を介する経路には作用せず、さらに NK-T 細胞においては TCR を介する経路に作用しなかった。これらの結

果より、抗 MIF 抗体は免疫後早期の誘導期に TCR を介した T 細胞活性化を抑制することにより EAU を抑制すると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 英 彦

副 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 吉 木 敬

学 位 論 文 題 名

Influence of macrophage migration inhibitory factor in signal transduction pathway of T cells

(T細胞シグナル伝達経路におけるマクロファージ遊走阻止因子の影響)

マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は近年遺伝子が同定され、多彩な生理活性が報告されている。

一方、実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎 (EAU) はヒト内因性ぶどう膜炎の動物実験モデルとされており、ルイスラットにおいてはウシ視細胞間レチノイド結合蛋白 (IRBP) 由来ペプチド(R16)で惹起することが可能である。また、その発症には Th1 細胞が重要な働きをしていると考えられている。

今回申請者は抗 MIF モノクローナル抗体 (2SC) を用いて、*in vitro* での抗原特異的 T 細胞増殖反応の抑制、ならびにマウスより樹立した T 細胞クローン増殖反応の抑制効果を検討した。さらにラットに R16 免疫後 2SC を腹腔内投与することにより EAU の制御を試みた。

はじめに *in vitro* での活性化 T 細胞における MIFmRNA の発現を RT-PCR で検討した。IFN- γ 産生 T 細胞クローン、IFN- γ -IL-4 産生 T 細胞クローン、さらにマウス脾臓由来 NK-T 細胞のいずれも、活性化状態で MIFmRNA 発現量が亢進した。

次に抗原特異的 T 細胞増殖反応に対する抗 MIF 抗体の作用を検討した。B6 マウスを抗原で免疫し、所属リンパ節より T 細胞を回収した。抗原特異的 T 細胞増殖反応は抗体濃度依存的に抑制された。同様にすべての T 細胞クローンにおいて増殖反応は抑制された。

続いて抗 MIF 抗体の IL-2 レセプター(IL-2R)を介するシグナルへの影響を検討するため、活性化 T 細胞クローンに IL-2 と抗 MIF 抗体を加えたが、T 細胞増殖反応は抑制されなかった。したがって、抗 MIF 抗体は T 細胞の IL-2R ではなく、T 細胞レセプター (TCR) を介する経路に作用すると考えられた。

続いて TCR を介して NKT 細胞を刺激した。マウス脾臓より回収した NK-T 細胞を抗 CD3 抗体で刺激し、24 時間後の IL-4 産生量を測定したが、抗 MIF 抗体添加により NK-T 細胞の IL-4 産生は抑制されなかった。さらに、抗 MIF 抗体は *in vivo* においても強い T 細胞増殖抑制効果を示した。

最後に、ルイスラットを R16 で免疫して EAU を誘導した。抗 MIF 抗体を免疫後 0, 2, 4, 8 日 (A 群)、10, 12, 14, 16 日 (B 群) の 2 群に分けて隔日腹腔内投与した。抗原免疫後 1 週間以内に抗 MIF 抗体投与した A 群では軽症化、発症遅延したが、免疫 8 日以降に投与した B 群では対照群に比較して EAU 抑制効果はみられなかった。これらの結果により、抗 MIF 抗体は免疫後早期の誘導期に TCR を介した T 細胞活性化を抑制し、EAU を抑制すると考えられた。

公開発表に際し、副査の吉木教授より MIF の標的分子、今回用いた抗体、将来の臨床応用の可能性、眼内 MIF 動態に関して質問があった。申請者は未だ MIF 標的分子は不明であること、今回用いた抗体はヒト MIF に対する抗体だが、マウスへの交差反応性を確認していること、将来眼発作を頻発する症例に抗体の眼局所投与の可能性を探ること、動物モデルでぶどう膜炎発症時に眼内で MIF が高値であることを確認している旨回答した。

続いて副査の小野江教授より抗 MIF 抗体の効果が T 細胞と NK-T 細胞で異なること、抗 MIF 抗体による *in vivo*, *in vitro* での T 細胞反応抑制効果に比較し、EAU 抑制効果が弱いこと、投与抗体の眼局所への到達について、ベーチェット病患者血清中 MIF 濃度が他疾患に比較して高値であることに関して質問があった。申請者は T 細胞と NKT 細胞は TCR 複合体の構造はわずかに異なり、T 細胞と NKT 細胞では TCR からのシグナル伝達経路に違いがあると考えられていること、T 細胞増殖反応の抑制は EAU 抑制の必要条件であるが十分条件ではないこと、投与抗体は眼組織に到達していると推定されるが現在直接的に確認する方法が存在しないこと、また、ベーチェット病では全身血管炎が惹起され、血管内皮細胞の破壊により多量の MIF が放出された可能性がある旨回答した。

さらに主査の松田教授より抗 MIF 抗体の投与時期により EAU への効果に差が生じたことに関して質問があった。申請者は抗 MIF 抗体は誘導相に作用すること、長期に渡る抗体投与はマウス抗体に対する中和抗体を誘導する可能性がある旨を回答した。

本研究は、免疫の中心的役割を果たす T 細胞に対する抗 MIF 抗体の作用を明らかにし、抗体による EAU の抑制に成功した。

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）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。