

学 位 論 文 題 名

Prevention of Lethal Acute Hepatic Failure
by Antimacrophage Migration Inhibitory Factor
Antibody in Mice Treated with
Bacille Calmette-Guerin and Lipopolysaccharide

(マウスの BCG-LPS 急性肝不全モデルにおける抗 MIF 抗体の効果)

学位論文内容の要旨

1. 研究背景と目的

劇症肝炎は重篤な疾患であるがその詳細なメカニズムにはいまだ不明な点もある。BCG、LPS によるマウスの劇症肝炎モデルには炎症性サイトカイン (TNF α)、接着分子 (ICAM-1)、T リンパ球などが関与している。MIF は活性化 T リンパ球から分泌されマクロファージの遊走を抑制する因子として発見された。近年 MIF が T リンパ球以外の様々な細胞、組織で発現され多様な機能を有することが報告されている。敗血症の際には、下垂体前葉から放出され敗血症を増悪させ、糖質コルチコイドに拮抗して免疫細胞の活性化やサイトカインの生産を抑制する。サイトカインネットワークにおいて炎症性サイトカインは MIF の産生を増大させ、逆に MIF は炎症性サイトカインの産生を誘導する。われわれの研究室ではラット MIF の cDNA をクローニングし MIF mRNA が脳、腎、肝など様々な臓器で発現していることを証明してきた。さらに抗 MIF 抗体がエンドトキシンによる肺障害、人の ARDS に対して有効であることを示してきた。本実験では同劇症肝炎モデルにおける MIF の機能について検討した。

2. 方法と結果

ICR マウス (6-7 週齢) に BCG1mg を静注し、さらに 7 日後に LPS10 μ g を静注した。対照群では nonimmune rabbit IgG を 0.3mg/mouse、治療群では抗 MIF 抗体を 0.3mg/mouse 各々 LPS 投与 2-3 時間前に腹腔内投与した。抗 MIF 抗体はウサギに recombinant rat MIF を免疫して、血清の IgG 分画を抽出したポリクローナル抗体で北海道大学医学部中央研究部で作製した。対照群では LPS 静注後 48 時間以内に 11 匹中 8 匹が死亡した (生存率 27%) が治療群では、10 匹中 9 匹生存した (生存率 90%) ($P < 0.01$)。LPS 静注 6 時間後に犠死させ血清 ALT/AST を測定すると、血清 ALT/AST は対照群では著明に上昇していたが治療群では有意に改善された ($P < 0.01$)。BCG 静注単独または LPS 静注単独では ALT/AST の上昇は軽度であった。対照群で LPS を静注後、定期的に犠死させ血清 MIF、肝 MIF を各々 ELISA 法にて測定した。肝 MIF は肝組織をホモジェナイズした後遠心した上清を用いて測定した。血清 MIF は LPS 静注 30 分後から有意に増加し ($P < 0.01$)、1 時間後に最高値となった。その後減少して 6 時間後には元の値に戻った。それに対して肝 MIF は LPS 静注 30 分後から減少し 24 時間後に元の値に戻った。Northern blot 解析では肝 MIF mRNA は BCG 静注 7 日後に増加し、LPS 静注 3 時間後さらに増加した。対照群では血清 TNF α は LPS 静注 1 時間後に有意に増加し ($P < 0.01$)、

3 時間後には元の値に戻った。治療群では血清 $\text{TNF}\alpha$ の増加が有意に抑制された ($P<0.01$)。組織学的には BCG 静注 7 日後、肝において単核細胞の浸潤を認めた。対照群では LPS 静注 24 時間後、広範な肝細胞壊死を認めた。治療群では肝細胞壊死は有意に抑制された ($P<0.01$)。免疫組織染色では BCG 静注によって誘導された単核細胞の浸潤は主として Kupffer 細胞、マクロファージであったが少数ながら T リンパ球も存在した。Kupffer 細胞、マクロファージは対照群、治療群ともに LPS 静注による有意な増減はなかった。T リンパ球は対照群では LPS 静注によって有意に増加した ($P<0.01$)。治療群ではこの T リンパ球の浸潤は有意に抑制された ($P<0.01$)。

3. 考察

本実験では BCG-LPS による致死的肝障害が抗 MIF 抗体によって改善されることが証明された。この BCG-LPS 肝障害モデルではまず BCG によって単核細胞の肝への浸潤が起こり、その後の LPS 投与によってその単核細胞が活性化されて致死的な肝障害をひき起こすとされている。活性化された単核細胞から炎症性サイトカイン ($\text{TNF}\alpha$ など) が放出されること、T リンパ球が活性化されることが肝障害を惹起すると言われている。糖質コルチコイドには免疫細胞の活性化やサイトカインの産生を抑制する作用があるが、MIF にはこれに拮抗する作用があることが近年報告された。これらの事実から BCG-LPS 肝障害モデルにおいては、MIF が肝に浸潤した単核細胞を活性化して炎症性サイトカインを産生させ、また T リンパ球を活性化して肝障害をひき起こすという仮説をたてた。BCG-LPS によって肝における MIF の mRNA の産生が増加するが、免疫染色の結果からこの増加は主に Kupffer 細胞、マクロファージに由来すると推測された。血清 MIF は肝 mRNA よりも早く増加するが、それは LPS の刺激によってまず肝に貯蔵されていた MIF が血清中に放出され、その後肝での MIF の産生が始まるからと考えられた。LPS 投与後、まず血清 MIF の増加が起こりその後血清 $\text{TNF}\alpha$ が増加した。さらに抗 MIF 抗体によって血清 $\text{TNF}\alpha$ の増加が抑制されたことから、MIF が血清 $\text{TNF}\alpha$ の増加をひき起こすことが考えられた。さらに免疫染色の結果から MIF が T リンパ球の肝への浸潤をもたらすと示唆された。MIF に関しては様々な炎症性疾患においてその生物学的機能が研究され報告されている。敗血症の際には下垂体前葉から放出され重要な役割を果たす。大量の LPS 投与による敗血症の実験モデルでは、MIF を投与すると生存率が悪化するが抗 MIF 抗体を投与すると劇的に改善する。ARDS (成人呼吸窮迫症候群) では肺胞洗浄液中の MIF が増加するが肺胞マクロファージ由来と考えられている。抗 MIF 抗体によってこの肺胞マクロファージによる炎症性サイトカイン ($\text{TNF}\alpha$ など) の産生が抑制される。ARDS の実験モデルにおいても抗 MIF 抗体によってその病態が改善されるがこの際も炎症性サイトカインの産生は抑制される。BCG-LPS 肝障害モデルでは単核細胞の浸潤が主であったが、ARDS の実験モデルでは肺胞への細胞浸潤は好中球が主である。したがって浸潤する細胞の種類にかかわらず MIF は炎症に対する作用を及ぼし得るといえる。免疫学的機序による腎炎モデルにおいても抗 MIF 抗体によってその病態が改善される。敗血症のモデルのような全身的な炎症でも肝障害、腎炎モデルのような局所的な炎症でも抗 MIF 抗体が有効といえる。

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

Prevention of Lethal Acute Hepatic Failure by Antimacrophage Migration Inhibitory Factor Antibody in Mice Treated with Bacille Calmette-Guerin and Lipopolysaccharide

(マウスの BCG-LPS 急性肝不全モデルにおける抗 MIF 抗体の効果)

MIF は元来活性化 T リンパ球から分泌され、マクロファージの遊走を抑制する因子として発見された。近年 MIF が T リンパ球以外の様々な細胞、組織で発現され、糖質コルチコイドの抗炎症作用に拮抗して、炎症性サイトカインの産生を促進し T リンパ球を活性化することが報告された。申請者は BCG、LPS によるマウスの劇症肝炎モデルにおける MIF の関与について検討した。この BCG-LPS 肝障害モデルではまず BCG によって単核細胞の肝への浸潤が起こり、その後の LPS 投与によってその単核細胞が活性化されて致死的な肝障害をひき起こすとされている。活性化された単核細胞から炎症性サイトカイン (TNF α など) が放出されることや T リンパ球が活性化されることが肝障害を惹起するといわれている。実験では ICR マウス (6-7 週齢) に BCG1mg を静注し、さらに 7 日後に LPS10 μ g を静注した。LPS 静注後 48 時間以内に 11 匹中 8 匹が死亡した (生存率 27%)。組織学的には単核細胞の浸潤を伴う広範な肝細胞壊死を認め、免疫組織染色の結果からこの単核細胞の浸潤は主として Kupffer 細胞、マクロファージであり、少数ながら T リンパ球も存在した。血清 ALT/AST、血清 TNF α も増加した。抗 MIF 抗体を 0.3mg/mouse 腹腔内投与すると 10 匹中 9 匹生存し (生存率 90%)、肝細胞壊死、血清 ALT/AST の増加も抑制された。抗 MIF 抗体により血清 TNF α の増加と T リンパ球の浸潤も抑制された。これらの結果から抗 MIF 抗体は炎症性サイトカインの産生と T

リンパ球の浸潤を抑制することによって BCG-LPS による致死的肝障害を抑制することが示唆された。

審査にあたって加藤教授から LPS を大量投与した場合との相違、他臓器の変化、抗 MIF 抗体を投与する時期、実験モデルとヒトの劇症肝炎との組織上の違い、MIF と $\text{TNF}\alpha$ との関連についての質問があった。申請者は MIF に関する文献、BCG-LPS 肝障害モデルについての文献、申請者自身の実験データを用いて、LPS を大量投与した場合でも抗 MIF 抗体が有効であること、他臓器では肺、脾臓などに軽度な変化があること、抗体を投与する時期を遅くした場合抗体の肝障害抑制効果が落ちる可能性があること、モデルではヒトと比べて壊死面積が少ないこと、MIF が $\text{TNF}\alpha$ の上流にあり MIF によって $\text{TNF}\alpha$ が誘導されたと思われることを回答した。次いで藤堂教授からポリクローナル抗体使用の妥当性、MIF 自体が肝障害を起こすのかどうか、他の劇症肝炎モデルを使った場合についての質問があった。申請者は MIF に関する文献、BCG-LPS 肝障害モデルについての文献、申請者自身の実験データを用いて、モノクローナル抗体は入手困難であること、LPS の存在下で MIF が肝障害を起こすこと、D-Galactosamine と LPS を用いる劇症肝炎モデルでも抗 MIF 抗体が有効であることを回答した。最後に石橋教授から MIF と $\text{TNF}\alpha$ のどちらが先に増加するのか、単球に MIF のレセプターが存在するのかどうかについての質問があった。申請者は MIF に関する文献、BCG-LPS 肝障害モデルについての文献、申請者自身の実験データを用いて、MIF の方が $\text{TNF}\alpha$ よりも早期に増加すること、MIF のレセプターはまだ発見されていないが他の実験結果から恐らく単球上に存在することを回答した。

この論文は肝臓の炎症、障害と MIF についての初めての報告で高く評価され、今後研究が進み抗 MIF 抗体が劇症肝炎を抑制する可能性が期待される。

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。