

学位論文題名

# Involvement of Macrophage Migration Inhibitory Factor(MIF) in the Mechanism of Tumor Cell Growth

(腫瘍細胞の増殖機構におけるマクロファージ  
遊走阻止因子の関与についての研究)

## 学位論文内容の要旨

### I. 目的

マクロファージ遊走阻止因子(以下MIF)は1966年、活性型T細胞より分泌されるサイトカインとして発見された。この蛋白質はマクロファージを集積させ、炎症の場において種々の免疫反応を惹起する。1989年、ヒトT細胞からのMIF cDNAをWeiserらが単離して以来、この蛋白質の特性としてMIFは様々な組織(脳、肝臓、腎臓など)に広く分布し、炎症反応や免疫応答に関与していることが報告されてきた。一方MIFは、胎生期の鶏のレンズ、ヒトの皮膚や角膜上皮などの研究によって細胞増殖や分化を促す機能が見いだされ、また増殖因子によって誘導される因子の一つであることも報告された。さらに1996年、前立腺癌の研究において、MIF mRNAが原発巣より転移巣により強く発現していることが報告され、MIFが炎症反応や免疫応答のみならず腫瘍細胞の増殖に関与していることが示唆された。

進行あるいは転移性大腸癌患者の治療法はいまだ確立されてはいない。癌患者の治療法や予後については、癌細胞の増殖能や転移能を決定する細胞学的研究が広く行われてきた。大腸癌細胞はその細胞増殖に関して、様々な増殖因子と深く関与していることが報告されている。

本研究では、今回腫瘍細胞の増殖とMIFとの関連について、マウス大腸癌細胞 colon26 を用いてMIFの働きについて検討した。

### II. 方法

#### 1) MIF蛋白質の同定

ウエスタンブロット法を用いて、マウス大腸癌細胞 colon26 ( $5 \times 10^6$ 個)におけるMIF蛋白質の発現を同定した。

#### 2) 免疫組織化学的染色法によるMIFの細胞内局在

colon26におけるMIFの発現を、免疫染色法を用いてその局在を同定した。

#### 3) 増殖因子によるMIFの誘導試験

各増殖因子(transforming growth factor (TGF)  $\beta$ , basic fibroblast growth factor (b-FGF)、platelet-derived growth factor (PDGF))を colon26 培養液中に添加し、MIF mRNAの発現に対する影響をノーザンブロット法にて検討した。各増殖因子の濃度は0-100ng/mlとし、24時間培養後の colon26 細胞内のMIF mRNAを測定した。

#### 4) 細胞増殖試験

MIF アンチセンスプラスミドを colon26 にエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、細胞増殖能を MTS Assay にて解析した。遺伝子導入細胞の確認はウエスタンブロット法にておこない、またコントロールとして pBK ベクターのみを導入した細胞を使用し、96 時間後の細胞増殖能を比較検討した。

### III. 結果

#### 1) MIF 蛋白の同定

MIF 蛋白質の発現をウエスタンブロット法にて検討すると、colon26 細胞に MIF 蛋白質が強く発現していた。

#### 2) 免疫染色による MIF の局在

colon26 における MIF の細胞内局在については、本蛋白質は細胞質内に主に局在し、また核内にもその存在が確認された。

#### 3) 増殖因子による MIF mRNA の発現に対する影響

TGF  $\beta$  による MIF mRNA の発現は、1ng/ml で最も発現が強く、無刺激をコントロールとすると 1.4 倍の発現増加であった。b-FGF および PDGF による MIF mRNA の発現は、濃度依存性に増加し、100ng/ml の濃度でそれぞれコントロールの 1.6 倍、1.7 倍と増加していた。

#### 4) MIF アンチセンス遺伝子導入による細胞増殖抑制効果

MIF アンチセンス遺伝子導入細胞では、colon26 親株細胞や pBK ベクターのみを導入したコントロール細胞と比較して細胞増殖率がそれぞれ 61.1%、85.8%と、有意に細胞増殖が抑制された。

### IV. 考察

MIF 蛋白質および mRNA が colon26 おいてその細胞質内に強く発現していることが確認された。このことは Meyer-Siegler らが前立腺癌および癌転移巣において MIF mRNA の存在を報告したと同様に大腸癌においても MIF が発現していることを示している。細胞増殖における MIF の関与に関するいくつかの報告はあるが、細胞増殖と MIF の直接的な関係を明らかに証明したものはない。今回の研究では、MIF アンチセンスの遺伝子導入により細胞増殖が有意に抑制されることを明らかにした。この事実は細胞内の MIF が腫瘍細胞の増殖に深く関与していることを強く示唆している。

マクロファージから分泌される増殖因子やサイトカインは、癌に対する宿主の反応として重要である。この研究において、colon26 細胞の MIF mRNA の発現は、これらの増殖因子により明らかに誘導されることを示した。このことから、これらの増殖因子が細胞内 MIF の増加を引き起こすことにより、腫瘍細胞の増殖を誘導すると考えられた。一方、培養液中に recombinant MIF を加えても細胞増殖率に影響がないことを確認した。よって細胞外より細胞内 MIF の量が増加することが細胞増殖にとって重要と推測される。このことは MIF アンチセンスを遺伝子導入した細胞の結果と一致する。即ち、MIF が他の増殖因子と協調して腫瘍細胞の増殖を誘導している可能性が示唆された。

以上の結果から抗 MIF 抗体や MIF アンチセンス遺伝子導入法などを使うことによる新しい癌治療法の確立の可能性が期待される。

### V. 結語

1. MIF が大腸癌細胞の増殖能に深く関与していることが明らかとなった。
2. MIF アンチセンス遺伝子導入法による腫瘍増殖抑制効果が期待される。

# 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

## Involvement of Macrophage Migration Inhibitory Factor(MIF) in the Mechanism of Tumor Cell Growth

(腫瘍細胞の増殖機構におけるマクロファージ  
遊走阻止因子の関与についての研究)

マクロファージ遊走阻止因子（以下 MIF）は、活性型T細胞より分泌されるサイトカインとして発見され、炎症の場においてマクロファージを集積させ、いろいろな免疫反応を惹起する物質と考えられている。この MIF の特性としては様々な生体内組織（脳、肝臓、腎臓など）に広く分布し、炎症反応や免疫応答に関与していることが報告されてきた。一方 MIF は、鶏のレンズ、ヒトの皮膚や角膜上皮などの研究や、増殖因子によって誘導される因子であることなどが報告され、細胞増殖や分化を促す働きが注目されてきている。また前立腺癌の研究において、MIF mRNA が原発巣より転移巣により強く発現していることが報告され、MIF が炎症反応や免疫応答のみならず腫瘍細胞の増殖に関与していることが示唆された。ここで、今回腫瘍細胞の増殖と MIF との関連について、マウス大腸癌細胞 colon26 を用いて MIF の働きについて検討した。MIF 蛋白質の発現をウエスタンブロット法・免疫染色法にて検討すると、colon26 細胞に MIF 蛋白質が細胞質内に強く発現していた。しかし培養液中に recombinant MIF・抗 MIF 抗体を加えても細胞増殖率に影響がなかった。増殖因子による MIF mRNA の発現に対する研究では、b-FGF および PDGF による MIF mRNA の発現は、濃度依存性に増加し、100ng/ml の濃度でそれぞれコントロールの 1.6 倍、1.7 倍と増加していた。TGF- $\beta$  による MIF mRNA の発現は、1ng/ml で最も発現が強く、無刺激をコントロールとすると 1.4 倍の発現増加であった。MIF アンチセンス遺伝子導入による細胞増殖抑制効果の検討では、MIF アンチセンス遺伝子導入細胞では、colon26 親株細胞やコントロール細胞と比較して細胞増殖率が有意に抑制された。このことより細胞外より細胞内 MIF の量が増加することが細胞増殖にとって重要と推測された。この事実は増殖因子などが細胞内 MIF の増加を引き起こすことにより、腫瘍細胞の増殖を誘導すると考えられ、MIF が腫瘍細胞の増殖に深く関与していることを強く示唆した。

審査にあたって、藤堂教授から TGF- $\beta$  の刺激による MIF mRNA の発現の意義、腫瘍細

胞内での MIF の機能と役割についての質問があった。申請者は増殖因子と腫瘍細胞に関する文献、MIF と細胞増殖に関する文献を引用し、TGF- $\beta$  が細胞増殖と抑制の 2 面性の機能を持っていること、そしてその働きを反映した結果であることや、細胞内での MIF は p53 の細胞増殖抑制作用に拮抗する報告があることを回答した。次いで、加藤教授から他の細胞種での検討とその可能性、高増殖能を有する高肝転移株についての現在までの研究状況、腫瘍の発生から転移までの多段階における MIF の働きについての質問があった。申請者は MIF と細胞増殖に関する文献、申請者自身の実験データなどを引用し、他の細胞種については今後検討が必要なこと、癌細胞の増殖を MIF が促進したこと、高転移株では MIF の発現が高くなっていること、細胞内の MIF が重要な働きを果していること、さらに今後腫瘍の増殖と MIF について検討が必要なことを回答した。最後に、石橋教授より *in vitro* の結果と *in vivo* の関連についての質問があった。申請者は受容体の未解決なこと、生体内におけるさまざまな中間産物の関与の可能性などについて明快に答えた。また中央研究部の西平先生より癌と MIF に関する研究の今後の展望についての説明がなされた。

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）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。