

学 位 論 文 題 名

Immunohistochemical localization of
macrophagemigration inhibitory factor(MIF) in human
gingival tissue and its pathophysiological functions

（ヒト歯肉におけるマクロファージ遊走阻止因子（MIF）の
免疫組織化学的局在とその病態への作用）

学位論文内容の要旨

緒言

口腔粘膜は複雑なサイトカインネットワークにより組織の恒常性が維持されている。歯周病は代表的な口腔疾患であるが、その発症と進展機構は未だ解明されていない。マクロファージ遊走阻止因子(MIF)は元来、活性化 T リンパ球より分泌され、無秩序なマクロファージの遊走を制御し、局所に集積させるリンホカインと考えられていた。しかし近年、マクロファージ、脳、腎臓、皮膚、卵巣等、多臓器に MIF の分布が報告され、その役割も炎症のみならず、組織修復や細胞の増殖、分化に関与する事が示唆されている。これまでに口腔領域において MIF に関する報告はないことから、本研究ではまずヒト歯肉における MIF の発現と局在を調査した。また歯肉線維芽細胞において FBS の条件を変えて培養し、さらに機械的刺激を加えて MIF の発現量の変化を検討した。これらの結果から歯肉における MIF の生理学的作用および歯周病への関与について検討した。

材料と方法

1. 試料（ヒト歯肉）：成人 25 名、40 部位から歯周外科手術、智歯抜歯時に炎症歯肉を、歯槽骨切除手術時に正常歯肉を採取し、液化窒素で凍結、-80℃で保存した。
2. Western blot 解析：試料から蛋白を抽出し定量化した後、SDS-PAGE にて分離し、ウサギポリクローナル抗ヒト MIF 抗体にて解析した。
3. 免疫組織化学染色：試料を 10%ホルマリンで 24 時間固定し、パラフィン包埋後、厚さ 4 μ m の連続切片を作成した。脱パラフィン後 10%正常ヤギ血清を含む PBS 溶液でブロッキングし、一次抗体としてウサギポリクローナル抗ヒト MIF 抗体（500 倍希釈）を 4℃、over night で反応させた。その後、ビオチン標識ヤギ抗ウサギ二次抗体と反応させ、DAB 溶液にて発色、核染、封入した。
4. 細胞培養：培養細胞は Gin-1 fibroblast を使用し、10%FBS を含む DMEM

を用いて 37°C、5%炭酸ガス気相下にて培養、コンフルエントに達した後、一部を 1%FBS に置き換えて培養した。

5. 伸展培養：1%FBS 含有下で FLEXERCELL STRAIN UNIT を用いて伸展した。培養プレートは底部がコラーゲンコーティングされたシリコン弾性膜を使用し、下面に陰圧を加えて伸展させ、最大伸展率 13%、一分間 60 回、48 時間伸展培養した。

6. RT-PCR 解析：Gin-1 fibroblast からトライゾルを用いて RNA を抽出、オリゴ DT プライマーとリバートラエイス逆転写酵素により cDNA を合成し PCR を行った。PCR はサーマルサイクラーを使用し、熱変性 94°C 1 分、アニーリング 53°C 2 分、伸長 72°C 1 分で 25 サイクルの増幅を行い、プラトーに達する前に終了した。プライマーは、MIF は 5'-CTCTCCGAGCTCACCCAGCAG-3' (forward), 5'-CGCGTTTCATGTCGTAATAGTT-3' (reverse), GAPDH は 5'-GCCTCCTGCACCACCAACTG-3' (forward), 5'-CGACGCCTGCTTCACCACCTTCT-3' (reverse) とした。

7. 発現量の解析：Gin-1 fibroblast の MIF 蛋白の発現を調べるために、抗 MIF 免疫染色を行い、mRNA の発現量を調べるために GAPDH の PCR 産物量に対する MIF の PCR 産物量の割合を解析した。PCR 後、電気泳動した画像は Kodak Didital Science IS440CF にて撮影し、1D Image Analysis Software にて解析した。比較は Mann-Whitney U-test を用いて検定し、 $p < 0.01$ をもって統計学的有意差とした。

結果

1. ヒト歯肉における MIF の発現：Western blot 解析よりいずれの歯肉にも MIF 抗原と同様の 12.5kDa 相当部に濃いバンドが検出された。正常、歯肉炎および智歯周囲炎歯肉において、炎症とバンドの濃さに相関はなかった。

2. ヒト歯肉における MIF の局在：免疫組織化学染色より広い範囲で歯肉上皮ケラチノサイトに MIF 陽性細胞が発現した。付着歯肉上皮と接合上皮で角質層以外全層に発現し、遊離歯肉上皮では正常時には基底層のみに発現したが智歯周囲炎歯肉弁には全層に発現した。また結合組織では血管内皮細胞と基底層直下の fibroblast に MIF 陽性細胞が発現した。

3. Gin-1 fibroblast の MIF 発現量の変化と機械的刺激による影響：Gin1 fibroblast の MIF mRNA の発現量は、10%FBS で培養したサンプルに比べ、1%FBS で培養したサンプルでは有為 ($p < 0.01$) に減少した。伸展刺激を加えたサンプルでは有為 ($p < 0.01$) に増加し、最も多い傾向を示した。しかし MIF 蛋白の発現は MIF mRNA の発現量が変化しても差異は認められなかった。

考察

本研究においてヒト歯肉に MIF が発現していることを初めて明らかにした。皮膚や角膜では基底膜細胞に特異的に MIF の発現が報告されているが、ヒト歯肉上皮では他の組織と比べ、発現量が顕著に多いことが分かった。その発現量は炎症の程度とは関係なく、上皮の広い範囲のケラチノサイトに局在し、特に付着歯肉上皮と接合上皮で顕著であった。遊離歯肉上皮では、智歯周囲炎歯肉弁に MIF の発現量が増加していた。これら部位のケラチンパターンは

turn over が早く、増殖活性が高いことから、MIFが上皮細胞の分化、増殖に関与する可能性が示唆された。さらに、Gin-1 fibroblastの培養実験でFBSの量を減らすとMIF mRNAの発現量が減少した結果も、MIFが増殖因子と関係していることを裏付けている。以上のことから、MIFが歯肉や口腔粘膜病変の病態の成立に重要な役割を果たしていると考えられた。

また、常に圧刺激が加わる血管内皮細胞や基底層直下のfibroblastにMIFが発現していた結果と、MIFの発現量が多かった歯肉上皮は皮膚より角化が弱く、様々な刺激を受けやすいことから、MIFは機械的刺激に関与していると考えられた。Gin-1 fibroblastを伸展培養した実験において、増殖していないGin-1 fibroblastを伸展した場合にもMIF mRNAの発現量が顕著に増加したことから、MIFが機械的な刺激で発現が促進されることが明らかになった。さらにMIFはレンズ修復時、分化増殖と一致して発現すると報告されている。初期の歯周炎はブラッシング等の刺激により改善されるが、以上のことから、機械的な刺激がMIFを産生させ、分化、増殖因子として治癒に関与している可能性が考えられた。

培養細胞で、MIF mRNA が減少しても MIF 蛋白が細胞質に維持されていたことは、MIF が細胞外への分泌を介さずに細胞内においてシグナル伝達などに関与しているか、またはオートクラインとして働く恒常性維持の重要なメディエーターである可能性が示唆された。

これらから MIF は正常時、局所において自己の細胞の増殖と分化に関与し、恒常性維持の役割をしていると考えられた。さらに MIF は $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1, IL-6, IL-8 などの炎症性サイトカインの産生を誘導するイニシエータであるという報告と、正常歯肉においてケラチノサイト細胞質内に多くの MIF 蛋白が蓄えられている本研究の結果から、MIF が歯周病におけるサイトカインネットワークにも関与することが示唆された。しかし、上皮細胞内の MIF 蛋白がどのように細胞外に放出されるか、また、その後の動向については不明であり、今後の検討を必要とする。歯周病および口腔粘膜疾患における MIF の検討をさらに進めることにより、これら疾患の発症と進展機構が解明され、新たな治療法への応用が期待された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 向 後 隆 男
副 査 教 授 川 浪 雅 光
副 査 教 授 柴 田 健一郎

学 位 論 文 題 名

Immunohistochemical localization of macrophagemigration inhibitory factor(MIF) in human gingival tissue and its pathophysiological functions

(ヒト歯肉におけるマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) の
免疫組織化学的局在とその病態への作用)

審査担当者全員が一堂に会して、口頭にて審査を行った。
最初に、論文提出者より研究内容の説明を受けた。

本研究は、ヒト歯肉におけるマクロファージ遊走阻止因子(MIF)の発現ならびにその局在と、MIF の生理学的作用および歯周病への関与について検討したものである。

歯肉は複雑なサイトカインネットワークにより組織の恒常性が維持されていると考えられるが、歯周病における発症と進展機構は未だ解明されていない。マクロファージ遊走阻止因子(MIF)は活性化 T リンパ球から産生され、マクロファージの遊走制御に関わるリンホカインとして発見されたが、近年、脳、腎臓、皮膚、卵巣等、多臓器に MIF の分布が報告され、その役割も炎症のみならず、組織修復や細胞の増殖、分化に関与する事が示唆されている。しかしこれまでに歯科、口腔領域において MIF に関する報告はない。

ヒト歯肉における MIF の発現を Western blot 解析にて検索した結果、正常、歯肉炎および智歯周囲炎において、いずれの歯肉にも 12.5kDa 相当部に濃いバンドが検出され、炎症とバンドの濃さに相関はなかった。また、局在を免疫組織化学染色にて検索すると、角質層以外全層の上皮ケラチノサイトに MIF が強く発現した。しかし、遊離歯肉上皮ではその発現は少ない傾向にあった。また結合組織において血管内皮細胞と基底膜直下の線維芽細胞にも MIF が発現した。これら MIF の発現部位はサイトケラチン 6 および PCNA の発現部位と一致していた。

MIF の生理学的作用を検討するために、歯肉線維芽細胞を FBS の条件を変

えて培養し、さらに伸展刺激を加え MIF mRNA の発現量の変化を RT-PCR 解析にて調べた。MIF mRNA 発現量は、伸展刺激を加え 1%FBS で培養したサンプルで最も多く、伸展刺激のない 10%FBS で培養したサンプル、1%FBS で培養したサンプルの順に減少した。しかし MIF 蛋白の発現は MIF mRNA の発現量に変化しても差は認められなかった。

皮膚や角膜では基底膜細胞に特異的にMIFの発現が報告されているが、ヒト歯肉上皮では他の組織と比べ発現量が顕著に多く、炎症の程度とは関係ないことを本研究で初めて明らかにした。歯肉上皮は皮膚より角化が弱く、様々な刺激を受けやすいこと、常に圧刺激が加わる組織の細胞にMIFが発現していたこと、さらに伸展刺激を加えた培養実験の結果から、MIFは機械的な刺激で発現が増加することが示唆された。さらにMIFはturn over が早く、増殖活性が高い部位に発現していたことから、細胞の分化、増殖に関与する可能性も示唆された。

また、培養細胞で MIF mRNAが減少してもMIF蛋白が細胞質に維持されていたことは、通常MIFは細胞外への分泌を介さずに細胞内においてシグナル伝達などに関与し、細胞の分化、増殖または、恒常性維持の役割をしていると考えられた。

MIFはTNF- α , IL-1, IL-6, IL-8などの炎症性サイトカインの産生を誘導するイニシエータであるという報告と、LPSを投与したマウスの下垂体前葉よりMIFが放出されるという報告、および本研究の正常歯肉においてケラチノサイトに多くのMIF蛋白が蓄えられている結果から、歯肉溝の細菌のLPSが上皮細胞に対してMIFを細胞外に放出させ、歯周病を惹起させる可能性が示唆された。このように何らかの誘導物質により放出されたMIFは歯肉や口腔粘膜の様々な病変の病態成立に重要な役割を果たすと考えられた。

歯周病および口腔粘膜疾患における MIF の検討をさらに進めることにより、これら疾患の発症と進展機構が解明され、新たな治療法の応用が期待された。以上が研究内容の要旨であった。

続いて、各審査担当者は、提出論文の内容および文献に関する詳細について以下の口頭試問により審査を行った。

- 1) MIF の発現部位の増殖活性、ケラチンパターンの検索の意義。
- 2) 遊離歯肉で MIF の発現が少ない理由とその意義。
- 3) 歯肉以外の口腔粘膜および粘膜病変における MIF の発現動態。
- 4) LPS の刺激と MIF 産生の関係、また歯周病への関与。
- 5) MIF レセプターと LPS レセプターを利用した実験系の可能性について。
- 6) MIF と癌細胞および細胞のアポトーシスとの関係について。

論文提出者からこれらの質問に対して適切かつ明快な解答ならびに説明が得られた。

本論文提出者は、長年にわたり歯周病に深い関心を持ち続け、多くの症例を注意深く観察し、その病態および病因に関する基礎的裏付けを究明することを考えてきたことが、本論文と研究歴および質問に対する回答からうかがわれた。

審査担当者一同は本論文の研究内容を高く評価するとともに、本論文提出者が研究者として誠実かつ熱心であり、本研究以外にも広い学識を有していることを認め、さらに今後研究を発展させていく可能性が高いと判断し、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと判定した。