

学 位 論 文 題 名

Evidence of dual function of macrophage migration
inhibitory factor relevant to tumor progression
and regression

(腫瘍増殖促進および抑制をきたす

マクロファージ遊走阻止因子の機能の2面性)

学位論文内容の要旨

【緒言】マクロファージ遊走阻止因子 (以下 MIF) は 1966 年に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、その結果炎症や免疫反応に重要な役割を果たすサイトカインとして報告された。その後ヒト T リンパ球から MIFcDNA がクローニングされ研究が進み、1996 年には前立腺癌、特に転移巣で MIF が高発現していることが報告され、細胞の分化増殖、癌の増殖、転移に関与していることが判明した。我々もマウス大腸癌細胞やメラノーマ細胞を用いた研究で MIF が腫瘍増殖や血管新生に重要な役割を果たすことを報告した。その一方で MIF は腫瘍細胞に対するマクロファージの殺細胞効果の活性化を促すとの報告もされている。そこで我々は MIF が腫瘍の増殖促進および増殖抑制の両面の働きを持つとの仮説のもとに、MIF 過剰発現する遺伝子組み換えマウスを作成しこれを用いて実験をおこなった。その結果 MIF は腫瘍増殖の早期段階では血管新生の亢進により腫瘍増殖を促進させる一方、後期段階では免疫応答を活性化により腫瘍増殖を抑制する二面性を持つことが判明した。【材料および方法】(材料)①腫瘍細胞:マウス sarcoma 細胞 S-180、白血病細胞 YAC-1②遺伝子組み換えマウス: β actin を promoter とした MIF Transgenic mouse (方法) ①腫瘍増殖実験: S-180(3×10^6 cells)を Tg mouse および non-Tg mouse の右背部皮下に移植、移植後 4 日目より隔日で腫瘍径を測定②re-challenge テスト: 初回移植後 28 日目に Tg mouse 左背部皮下に S-180(3×10^6 cells)を移植し 14 日間腫瘍の増殖を計測③血管新生実験: Tg mouse および non-Tg mouse の背部皮下に S-180 を 1.5×10^7 個充填した Millipore chamber を移植、5 日目の新生血管増生像を MCID にて撮影し NIH image analyzer にて解析 S-180(1.5×10^7 cells)④CTL assay: S-180(3×10^6 cells)を Tg mouse および non-Tg mouse の右背部皮下に移植、10 日目に脾臓を摘出、脾細胞(1.5×10^6 cells)と刺激細胞 S-180(5×10^5 cells)を 6 日間混合培養後、生細胞とクロミウム標識標的細胞

(S-180、YAC-1) を 4 時間混合培養し CTL assay を施行⑤negative selection: CTL assay に用いた生細胞を CD4 抗体、CD8 抗体および NK 抗体を付着させたマイクロビーズと混合しカラムを通過させて negative selection を行った後、CTL assay を施行⑥免疫染色: S-180(3×10^6 cells)を Tg mouse および non-Tg mouse の右背部皮下に移植、移植後 10 日目に腫瘍を摘出し、抗 F4/80 抗体を用いてマクロファージの免疫染色を施行【結果】①腫瘍増殖実験: 移植後 9 日目までの早期の段階では腫瘍は Tg mouse で有意に速く増殖したが、9 日目以降 Tg mouse で腫瘍は消退傾向を示し 21 日目には 10 例中 9 例で完全消失した。一方 non-Tg mouse では全例腫瘍は増殖し続け腫瘍死した。②re-challenge test: Tg mouse で初回移植時腫瘍の消退した 9 例では完全に拒絶された。③腫瘍血管新生: non-Tg mouse に比べ Tg mouse において coiling および微小血管の増生を伴う新生血管の増生が亢進して

いた。chamberの接触面積に占める血管占有面積比は non-Tg mouse で 17.7%であったのに対し Tg mouse では 30.7%と有意に血管占有面積が大きく Tg mouse では腫瘍血管新生が亢進していた。④CTL assay: 40:1の比率で標的細胞に刺激細胞を添加したときのクロミウム遊離の割合は、標的細胞が S180 の場合、non-Tg mouse では 2.3%だったのに対し Tg mouse では 21.3%と高い CTL 活性を認めた。また標的細胞を YAC-1 とした場合も non-Tg mouse では 3.6%であったのに対し Tg mouse では 23.3%と高い NK 活性も認めた。⑤negative selection: CD4+ T cell を除いた群では CTL 活性の低下は認めなかったが、CD8+ T cell を除いた群では有意に CTL 活性の低下を認めた。また NK cell を除いた群でも有意に活性の低下を認めた。⑤移植腫瘍内マクロファージ浸潤: Tg mouse で有意にマクロファージが増殖していた。【考察】MIF は炎症性サイトカインとしてのみならず、細胞の分化、増殖においても重要な役割を果たすことが明らかになっているが、腫瘍の増殖や血管新生に果たす役割は解明されていない。今回の研究で MIF は腫瘍の増殖および血管新生を亢進する側面と、免疫応答を介して腫瘍増殖を抑制する二面性を持つことが判明した。腫瘍移植初期の段階では腫瘍増殖および血管新生は Tg mouse において活性化されていたが、後期の段階では Tg mouse では腫瘍は消退した。さらに免疫された Tg mouse に腫瘍を再移植すると完全に拒絶された。MIF はメラノーマ細胞、大腸癌細胞、肺癌細胞などでの高発現が報告されており転移、増殖に関与していることが判明している。また大腸癌細胞や前立腺癌細胞と抗 MIF 抗体を用いた研究で抗 MIF 抗体を投与すると腫瘍増殖および血管新生が抑制されたことより MIF は腫瘍増殖に促進的に働くことが示唆されている。一方で MIF の殺腫瘍効果の報告もされており Tg mouse において移植後期の段階で腫瘍が消失、拒絶されたことより免疫応答に関する実験をおこなった。免疫染色で移植腫瘍内では CD4+ T cell および CD8+ T cell が高発現しており、特に Tg mouse では non-Tg mouse に比べ CD8+ T cell が高発現していた。このことより cytotoxic T cell が腫瘍の消退に関与していると考え、CD4+ T cell および CD8+ T cell を除いた negative selection による CTL を行ったところ、CD8+ T cell を除いた群で有意に CTL 活性が低下した。これより MIF Tg mouse では CD8+ T cell が活性化され免疫応答が腫瘍消退に大きく関与していると考えられた。今回の研究で MIF は腫瘍増殖において促進および抑制の両面で重要な役割を果たすことが判明した。このことより MIF の調整が新たな癌治療の手段となりえると考ええる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

Evidence of dual function of macrophage migration inhibitory factor relevant to tumor progression and regression

(腫瘍増殖促進および抑制をきたす

マクロファージ遊走阻止因子の機能の2面性)

マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は細胞の分化増殖、癌の増殖、転移に関与していることが報告されているが腫瘍増殖に果たす役割は十分に解明されていない。その解明のため申請者は MIF Transgenic mouse(Tgm)を用いて腫瘍増殖実験、血管新生実験、CTL assay、免疫染色を行った。

腫瘍増殖実験では Sarcoma180(S180)を皮下移植し腫瘍径の推移を測定、血管新生実験では S180 を充填した Millipore chamber を移植し新生血管を観察、CTL assay では免疫した mouse の脾細胞で S180 を標的細胞として施行、免疫染色では移植腫瘍のマクロファージを抗 F4/80 抗体を用いて染色した。

腫瘍増殖実験では移植後 9 日目までの早期の段階では腫瘍は Tgm で有意に速く増殖したが、9 日目以降腫瘍は消退傾向を示し 21 日目には 10 例中 9 例で完全消失した。一方 non-Tgm では全例腫瘍は増殖し続け腫瘍死した。免疫された Tgm に S180 を再移植したところ全例で拒絶された。腫瘍血管新生では Tgm で新生血管の増生が亢進していた。CTL assay では Tgm で高い CTL 活性、NK 活性を認めた。免疫染色では Tgm で腫瘍内マクロファージ浸潤が高度であった。

この結果より宿主 MIF 発現の上昇は腫瘍細胞移植初期には血管新生誘導効果により腫瘍増殖に促進的に作用するが、その後 T cell、NK cell および macrophage の活性化を促し抗腫瘍効果をもたらすものと考えられた。

公開発表後、副査の上出教授より 1)宿主の MIF と腫瘍細胞の MIF のどちらが重要か、2)ヒトの腫瘍細胞ではどうか、3)MIF が細胞に作用する際のレセプターはなにか、4)移植初期の段階での血管新生亢進は宿主の MIF と腫瘍細胞の MIF のどちらが関与しているのか、などの質問があった。それに対して、1)腫瘍細胞にもよるが強い腫瘍抗原性を提示するも

のでは宿主の MIF が重要である。2)ヒトメラノーマ細胞を用いた実験で MIF がマクロファージの活性化を促し、殺細胞効果を増強するとの報告がある。3)MIF は MAPK を介して腫瘍に作用するとの報告がある。4)初期の段階での血管新生は宿主の MIF が強く関与している、などの回答があった。副査の藤堂教授より、1)MIF が CTL 活性を高める具体的な機序はなにか、2)S180 は化学発癌剤にて人工的に誘発された抗原性の強い細胞なのか、3)他の腫瘍細胞での再現性はどうか、4)Knock out mouse を用いた裏の実験を行ってみる必要はないか、などの質問があった。それに対して、1)今回の実験では具体的な機序ははっきりしないがマクロファージの活性化が CTL 活性を高めたと考えられる。2)S180 は人工的に誘発された腫瘍ではなく自然発生肉腫である。3) ICR mouse で使用できる腫瘍が S180 しかないため他の細胞での実験は行っていない。現在 B6 mouse でも Tgm を作成しており将来的には別の腫瘍で追加実験も可能である。4) Knock out mouse を用いた実験も予定したが飼育がうまくいかず n が少ないため十分な実験結果が得られなかった、などの回答があった。次に主査の畠山教授より 1) S180 は ICR 由来で rejection は受けないのか、2)血中と組織中の MIF のどちらが重要なのかを調べるため rMIF を用いた実験をしてみてもどうか、3)Tgm で MHC class I の発現量が上がるという現象はないか、4)骨髄移植を用いた実験系で免疫担当細胞をはっきりさせられないか、などの質問があった。それに対して、1)S180 はもともとは CFW mouse 由来の肉腫だが ICR mouse でも rejection は受けない。2) Tgm では組織中に蛋白量で 10~20 倍の MIF が発現しており、それを凌駕するだけの量の r MIF や抗 MIF 抗体を用いる実験は困難である。3) MHC class I 発現量の測定は行っていない。4) 骨髄移植モデルを作ろうとしたがうまく作成できなかった、などの回答があった。最後に副査の上出教授より suppressor macrophage の産生が Tgm では減少している可能性もあるのでその観点からも実験を進めてみるとよいとの追加発言があった。

本論文は宿主 MIF 発現の上昇は血管新生誘導効果により腫瘍増殖に促進的に作用する面と、T cell、NK cell および macrophage の活性化を促し抗腫瘍効果をもたらす 2 面性を持つことを明らかにした。従来、MIF は腫瘍増殖に促進的に作用すると考えられていたが、本研究により免疫応答にも重要な役割を果たすことが判明した。本論文は MIF をターゲットとした癌治療戦略が多様な広がりをもたせる可能性を持つことを期待させる。

審査員一同は、これら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。