

学位論文題名

Role of macrophage migration inhibitory factor in ovalbumin-induced asthma in rats

(ラット喘息モデルにおけるマクロファージ遊走阻止因子の役割)

学位論文内容の要旨

【背景】 Macrophage migration inhibitory factor (MIF) は、マクロファージの遊走を阻止するT細胞由来のサイトカインとして、1960年代に報告された。1989年にMIF cDNAがクローニングされて以後、最近ではサイトカイン活性のほかホルモン、酵素としての働きを持つことが報告されている。肺疾患における役割に関しては、急性呼吸促迫症候群患者の気管支肺胞洗浄液中でMIF濃度が上昇するなどが報告されている。さらに、我々はラットLPS肺傷害モデルにおいて、抗MIF抗体投与が肺への好中球遊走を抑制すること、マウスbleomycin (BLM)肺傷害・線維症モデルにおいて、抗MIF抗体投与がBLMによる致死率と肺の急性炎症を抑制することを報告した。気管支喘息との関連では、喘息患者のBAL液中のMIF濃度が上昇することが報告されている。一方、抗MIF血清がマウス喘息モデルにおいて好酸球性気道炎症を抑制しなかったとする報告もあり、喘息におけるMIFの役割については解明されていない。

【目的】 ラット Ovalbumin (OA) 喘息モデルにおいて、病態への MIF の関与と抗 MIF 抗体の効果을明らかにすること。

【方法】 Brown Norway ラット (6週齢、♂) を Day0 に OA 1mg/body の皮下投与にて能動感作し、Day14 に 2%OA エロゾルを吸入させ、気道収縮を誘発した。

- ① 無処置群、OA感作群、抗MIF抗体群の3群 (n=6/群) に分ける。無処置群は全くの無処置、後2者はOAにて能動感作し、それぞれnonimmunized rabbit IgGまたはpolyclonalな抗MIF抗体 2mg/bodyをDay0~16に隔日腹腔内投与した。Day17に採血、全肺気管支肺胞洗浄を施行し、摘出肺をホルマリン固定した。気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数、細胞分面を測定し、気管支肺胞洗浄液中のMIF濃度、血清OA特異的IgEをELISA法で測定した。摘出肺組織に対し、抗MIF抗体を用いた免疫染色を行った。
- ② 上記の3群 (n=3) において、Day14のOA吸入の3日後 (Day17) にOA特異的気道反応、およびmethacholineによる非特異的気道過敏性を測定した。
- ③ 同様の3群 (n=3) において、Day14のOA吸入8時間後の気管支肺胞洗浄液のエオタキシン濃度をmouse eotaxin ELISA kitを用い、さらにIL-13濃度をrat ELISA kitを用いて測定した。
- ④ OA感作群、抗MIF抗体群の2群 (n=3) に対して、rabbit IgGまたは抗MIF抗体 2mg/bodyをDay14のOA吸入2時間前に一回のみ投与し、Day17に気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数を測定した。

【結果】 1) OA感作により気管支肺胞洗浄液中のMIF濃度は有意に上昇した。2) 抗MIF抗体を用いた免疫染色の結果、無処置群においてもMIFが気道上皮に発現していること、

さらに OA 感作によりその発現が著明に増強されることが明らかになった。3) 抗 MIF 抗体を感作時より OA 吸入後 (BAL 前日) まで投与することにより、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数、好中球数、好酸球数は OA 感作群に比べて有意に抑制された。4) 抗 MIF 抗体は、抗原特異的気道収縮および非特異的気道収縮を抑制した。5) 抗 MIF 抗体は、OA 特異的 IgE の産生を抑制しなかった。5) 気管支肺胞洗浄液中の eotaxin および IL-13 濃度は、無処置群に比較して OA 吸入 8 時間後に有意に上昇したが、抗 MIF 抗体は両者とも抑制しなかった。6) 抗 MIF 抗体の OA 吸入直前一回投与では、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数、好酸球数、好中球数は抑制されなかった。

【考察】今回我々は、ラット喘息モデルにおいて OA 感作により気管支肺胞洗浄液中の MIF 濃度が有意に上昇すること、気道上皮の MIF の発現が著明に増強することを示した。これは、喘息患者の気管支肺胞洗浄液中の MIF 濃度が上昇したとする報告に合致するものである。さらに、抗 MIF 抗体が気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞と抗原特異的および非特異的気道過敏性を抑制することを明らかにした。以上の結果より、MIF がラット喘息モデルの病態において重要な役割を果たしていること、抗 MIF 抗体が治療効果を有する可能性があることが示唆された。

マウス喘息モデルにおいて抗 MIF 抗体が好酸球気道炎症を抑制しなかったとする過去の報告と、今回の実験結果との相違については、いくつかの理由が挙げられる。一つは、我々のモデルと比較して、マウスのモデルでは気管支肺胞洗浄液中の好酸球比率が半分以下と低いことである。二つ目に、マウスの実験では、我々の実験より抗 MIF 抗体の投与量が少なく、効果をもたらすのに十分ではなかった可能性が考えられる。実際、我々が以前報告したラット LPS 肺障害モデルでは、抗 MIF 抗体が肺への好中球遊走を抑制したが、彼らのマウス LPS 肺傷害モデルにおいては、抗 MIF 血清投与は肺の好中球性炎症を抑制していない。

抗 MIF 抗体を用いた肺組織の免疫染色の結果、MIF が気道上皮に感作前から存在することを確認し、さらにラット喘息モデルにおいて今回初めて気道上皮が MIF の産生源であることを明らかにした。好酸球が MIF の産生源でありうるとの報告があること、また今回のモデルにおいて気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞の多くが好酸球であることから、気管支肺胞洗浄液中の MIF 濃度の上昇は、気道上皮および好酸球由来と推定される。

抗 MIF 抗体の好酸球抑制の機序として、強力な好酸球遊走因子であるエオタキシン、および動物喘息モデルにおいて気道過敏性と好酸球性気道炎症を誘発することが報告されている IL-13 について検討したが、いずれも抑制効果を認めなかった。今回の検討では、抗 MIF 抗体の好酸球抑制の機序については明らかにはならなかった。

ステロイド薬は、気管支喘息における気道炎症を抑制する最も強力な薬剤である。しかし、喘息患者の中にはステロイド抵抗性を示す症例が少数存在する。MIF は内因性および外因性のステロイドの機能を抑制する可能性が報告されており、抗 MIF 抗体は、それ自体の抗炎症作用だけでなく、ステロイドの機能を回復させることにより、効果を発揮する可能性も考えられる。

【結語】ラット喘息モデルにおいて、MIF は重要な役割を果たしている。したがって、抗 MIF 抗体は治療薬としての可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 有 賀 正
副 査 教 授 西 村 正 治

学 位 論 文 題 名

Role of macrophage migration inhibitory factor in ovalbumin-induced asthma in rats

(ラット喘息モデルにおけるマクロファージ遊走阻止因子の役割)

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) は、マクロファージの遊走を阻止するT細胞由来のサイトカインとして1960年代に報告され、最近ではサイトカイン活性のほか、ホルモン、酵素としての働きを持つことが報告されている。気管支喘息との関連では、喘息患者の気管支肺胞洗浄(BAL)液中のMIF濃度が上昇することが報告されているが、喘息におけるMIFの役割については解明されていない。そこで、ラットOvalbumin (OA) 喘息モデルにおいて、病態へのMIFの関与と抗MIF抗体の効果を明らかにすることを目的に研究を行った。

Brown Norwayラット(6週齢, ♂)をDay0にOA 1mg/匹の皮下投与にて能動感作し、Day14に2%OAエアロゾルを吸入させ、気道収縮を誘発した。無処置群、OA感作群、抗MIF抗体群の3群(6匹/群)に分け、後2者はOAにて能動感作し、それぞれ非特異的IgGまたは抗MIF抗体2mg/匹をDay0~16に隔日腹腔内投与。Day17にBAL液中の炎症細胞、MIF濃度、血清OA-specific IgEを測定し、肺組織をホルマリン固定した。また、同様の3群(3匹/群)にてOA特異的および非特異的気道過敏性を測定した。上記の3群において、Day14のOA吸入8時間後のBAL液におけるeotaxinおよびIL-13濃度を測定した。さらに、OA感作群および抗MIF抗体群の2群において、非特異的IgGまたは抗MIF抗体2mg/匹をDay14のOA吸入2時間前一回のみ投与し、Day17にBAL液中の炎症細胞を測定した。

その結果、OA感作によりBAL液中のMIF濃度は有意に上昇した。また抗MIF抗体を用いた免疫染色の結果、無処置群においてもMIFが気道上皮に発現していること、さらにOA感作によりその発現が著明に増強されることが明らかになった。抗MIF抗体を感作時よりOA吸入後まで投与することにより、BAL液中の総細胞数、好中球数、好酸球数はOA感作群に比べて有意に抑制され、抗原特異的気道収縮および非特異的気道収縮も抑制された。しかし、抗MIF抗体はOA特異的IgEの産生を抑制せず、BAL液中のeotaxinおよびIL-13濃度を抑制しなかった。抗MIF抗体のOA吸入直前一回投与では、BAL液中の炎症細胞は抑制されなかった。

我々は、ラット喘息モデルにおいてOA感作によりBAL液中のMIF濃度が有意に上昇すること、気道上皮のMIFの発現が著明に増強することを示した。これは、喘息患者のBAL液中のMIF濃度が上昇したとする報告に合致するものである。さらに、抗MIF抗体がBAL

液中の炎症細胞と抗原特異的および非特異的気道過敏性を抑制することを明らかにした。以上の結果より、MIF がラット喘息モデルの病態において重要な役割を果たしていること、抗 MIF 抗体が治療効果を有する可能性があることが示唆された。

審査にあたり、副査有賀教授から 1) 抗 MIF 抗体投与時の組織の変化、2) 抗 MIF 抗体と同様の変化をもたらすような薬剤の有無についての質問があった。次いで主査上出教授から 1) 今回の喘息モデルでの goblet cell 増生の有無、2) 抗原吸入 3 日後以降の BAL 液における炎症細胞の経過、3) 喘息モデルに対する抗好中球抗体の影響についての質問があった。最後に副査西村教授から 1) 好酸球抑制の機序が明らかにならなかった理由として、抗 MIF 抗体の投与量が不十分であった可能性、2) 好酸球性炎症抑制の程度と気道過敏性抑制の程度の乖離についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自験データや過去の文献を引用し、概ね適切に解答した。質疑応答の時間は約 15 分であった。

この論文は、ラット喘息モデルにおいて抗 MIF 抗体が治療効果を有する可能性について世界で初めて明らかにした研究として高く評価され、今後気管支喘息の新たな治療薬開発につながることを期待される。

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。