

# 血管平滑筋細胞の遊走における 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

マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) は活性化 T リンパ球より分泌され、遅延型アレルギー反応に密接に関与するサイトカインとして発見された。MIF はマクロファージでも産生され、炎症や敗血症のメディエーターとして注目されており、炎症反応の促進因子と考えられている。

マクロファージや T リンパ球は、動脈硬化巣に発現しており、動脈硬化の発症や進展に深く関与している。MIF は、高脂肪食を投与したラビットの動脈硬化巣でリンパ球やマクロファージに発現しており、一過性に血管内皮細胞、血管平滑筋細胞にも発現する。ヒトでは動脈硬化巣のマクロファージ集積部位に発現し、動脈硬化のステージが進行するほど、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞でも強く発現する。このように MIF は動脈硬化症への関与が示唆されている。MIF は培養血管平滑筋細胞、血管内皮細胞の遊走を促進すると報告されているが、血管平滑筋細胞の遊走には血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) や酸化低比重リポ蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) が重要な役割を果たす。PDGF は血管内皮が ox-LDL により傷害されることにより、血小板やマクロファージ、血管平滑筋細胞から放出され、血管平滑筋細胞を中膜から内膜へと遊走させる。また、ox-LDL も PDGF と同様に、血管平滑筋細胞を中膜から内膜へ遊走させることにより血管内腔の狭窄を生じさせる。本研究では ox-LDL や PDGF の細胞遊走能と MIF の作用との関連を明らかにするため、血管平滑筋細胞における MIF 蛋白の発現および分泌に対する ox-LDL と PDGF の影響を解析した。更に、MIF siRNA を血管平滑筋細胞に導入し、ox-LDL による血管平滑筋細胞の遊走に及ぼす影響を検討した。これらのことから動脈硬化症の発症、進展における MIF の役割について解析した。

ラット胎児大動脈由来血管平滑筋細胞株である A10 細胞に ox-LDL または PDGF を作用させた。培養上清中の MIF 濃度は ox-LDL の刺激で LDL と比較して 6 時間後より増加し、以後、時間依存性に増加した。また、ox-LDL は濃度依存性に培養上清中の MIF 濃度を増加させた。A10 細胞内での ox-LDL による MIF 蛋白の発現誘導は、LDL と比較して刺激開始後 6 時間後で著明に認められた。ox-LDL は 12 時間、24 時間においても細胞内の MIF 蛋白の発現を亢進させた。一方、PDGF 刺激により、培養上清中の MIF 濃度は 6 時間後より増加した。MIF 蛋白の発現誘導は PDGF 刺激後、12 時間で認められた。刺激開始後 6 時間、24 時間では MIF 蛋白の発現に差を認めなかった。

MIF は培養血管平滑筋細胞、血管内皮細胞の遊走を促進するとされているので、A10 細胞でも同様に MIF によって遊走能が亢進するか否かを検討した。リコンビナント MIF を A10 細胞に作用させたところ、MIF 濃度依存性に A10 細胞の遊走は亢進した。

更に MIF 発現抑制による A10 細胞の遊走能に与える影響を siRNA を用いて検討した。A10 細胞に MIF siRNA を導入し、48 時間後に ox-LDL を添加した。更に 12 時間後に、A10 細胞

の MIF 蛋白の発現と分泌を解析した。MIF siRNA 導入 A10 細胞は 50  $\mu\text{g/ml}$  の ox-LDL 刺激下でコントロール siRNA 導入 A10 細胞に比較し、MIF 蛋白の発現が抑制された。また MIF 蛋白の分泌は、ox-LDL 非存在下ではコントロール siRNA 導入 A10 細胞と MIF siRNA 導入 A10 細胞に有意差を認めなかったが、50  $\mu\text{g/ml}$  の ox-LDL 刺激下では MIF siRNA 導入 A10 細胞の MIF 蛋白の分泌が有意に抑制された。同様に処理した A10 細胞を用いてマイグレーションアッセイを行った。コントロール siRNA 導入 A10 細胞において ox-LDL により A10 細胞遊走能は亢進したが、MIF siRNA 導入 A10 細胞では、ox-LDL による A10 細胞遊走能亢進を認めなかった。

今回の検討において ox-LDL が動脈硬化における MIF の発現誘導に強く関与していることが示唆された。MIF が血管平滑筋細胞を濃度依存性に遊走させ、PDGF 依存性に MIF が分泌されることから、ox-LDL と同様に PDGF による血管平滑筋細胞の遊走にも MIF が関与している可能性があると考えられた。

過去の報告には、細胞外に分泌された MIF は自己分泌 (autocrine) /傍分泌 (paracrine) にマクロファージに作用し、MIF は ox-LDL の取込みと分解を促進させることが明らかにされている、今回の検討からもマクロファージと同様に血管平滑筋細胞に autocrine/paracrine に作用し、マクロファージから分泌される MIF と協調して血管平滑筋細胞の増殖や遊走に関与しているものと推測された。これらのことから MIF は動脈硬化を促進させ、心血管イベントを惹起する因子として重要であると考えられる。

近年、動脈硬化症の血管平滑筋細胞を標的とする遺伝子治療として血管壁への遺伝子導入が研究されている。遺伝子治療は血管平滑筋細胞の遊走や増殖抑制、分化および細胞死の誘導を目的としている。経皮的冠動脈形成術 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA), 経皮的血管形成術 (percutaneous transluminal angioplasty, PTA) 後の再狭窄などの病巣ではマクロファージの関与は少なく、血管平滑筋細胞の集積が主体で、血管平滑筋細胞の遊走や増殖が重要である。このことから血管平滑筋細胞の遊走を抑制することが遺伝子治療の標的となり得る。今回の実験から、MIF siRNA を用いることは PTCA や PTA 後の血管平滑筋細胞の遊走を抑制すると考えられ、MIF siRNA を遺伝子治療に応用できる可能性があると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫  
副 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 畠 山 鎮 次

学 位 論 文 題 名

## 血管平滑筋細胞の遊走における マクロファージ遊走阻止因子の役割

マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) は活性化 T リンパ球やマクロファージで産生され、炎症や敗血症のメディエーターとして注目されており、炎症反応の促進因子と考えられている。

マクロファージや T リンパ球は、動脈硬化巣に発現しており、動脈硬化の発症や進展に深く関与している。MIF は高脂肪食を投与したラビットの動脈硬化巣でリンパ球やマクロファージに発現しており、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞にも発現する。ヒトにおいても動脈硬化巣のマクロファージ集積部位に発現し、動脈硬化のステージが進行するほど、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞でも強く発現する。このように MIF は動脈硬化症への関与が示唆されている。動脈硬化において血管平滑筋細胞の遊走には血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) や酸化低比重リポ蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) が重要な役割を果たす。

本研究では PDGF や ox-LDL の細胞遊走能と MIF の作用との関連を明らかにするため、血管平滑筋細胞における MIF 蛋白の発現および分泌に対する ox-LDL と PDGF の影響を解析した。更に、MIF siRNA を血管平滑筋細胞に導入し、ox-LDL による血管平滑筋細胞の遊走に及ぼす影響を検討した。これらのことから動脈硬化症の発症、進展における MIF の役割について解析し、以下の事実を明らかにした。

ox-LDL が動脈硬化における MIF の発現誘導に強く関与していることが示唆された。MIF が血管平滑筋細胞を濃度依存性に遊走させ、PDGF 依存性に MIF が分泌されることから、ox-LDL と同様に PDGF による血管平滑筋細胞の遊走にも MIF が関与している可能性があると考えられた。細胞外に分泌された MIF は自己分泌 (autocrine) /傍分泌 (paracrine) にマクロファージに作用し、ox-LDL の取込みと分解を促進させることが明らかにされている。今回の検討からもマクロファージと同様に血管平滑筋細胞に autocrine/paracrine に作用し、マクロファージから分泌される MIF と協調して血管平滑筋細胞の増殖や遊走に関与しているものと推測された。これらのことから MIF は動脈硬化を促進させ、心血管イベントを惹起する因子として重要であると考えられる。今回の実験から、MIF siRNA を用いることは PTCA や PTA 後の血管平滑筋細胞の遊走を抑制すると考えられ、MIF siRNA を遺伝子治療に応用できる可能性があると考えられる。

質疑応答では血管平滑筋細胞のトランスフェクション効率について、 $\beta$ -gal 遺伝子を用いた検討ではごく一部の細胞にのみ陽性染色を認め効率は低いことが予想されると解答した。

遊走アッセイについて陽性細胞のみ解析すれば、さらにより結果が期待されるというコメントをいただいた。PDGF, ox-LDL のレセプター以後のシグナルの相違に関して転写因子 AP-1 を共有する可能性があるかと解答した。

MIF の刺激で平滑筋細胞は形態学的に変化するかという質問には、特に変化はなく遊走機序については低分子蛋白である Rho が関与していることが考えられることを述べた。

臨床応用としては、MIF 中和抗体は投与のタイミングが難しいと思われるが、MIFsiRNA は冠動脈に抗癌剤を塗布したステントと共に相加効果が期待できるものと思われる。ただし、細胞に導入するデリバリーシステムの確立も重要であると考えられると解答した。

この論文は血管平滑筋細胞の遊走におけるマクロファージ遊走阻止因子の役割について解明し、高く評価され、動脈硬化における血管平滑筋細胞の遊走の重要性を MIF と酸化 LDL の関わりの観点から再確認し、今後、動脈硬化において MIF が新たな治療の助勢となる可能性がある点で、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。