

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590675

研究課題名（和文）食道の炎症と腫瘍におけるマクロファージ遊走阻止因子の役割の解析

研究課題名（英文）Role of macrophage migration inhibitory factor in esophagitis and esophageal tumor

研究代表者

大川原 辰也 (OHKAWARA TATSUYA)

北海道大学・大学院薬学研究院・研究員

研究者番号：00374257

研究成果の概要（和文）：上部消化管、特に食道疾患におけるマクロファージ遊走阻止因子(MIF)の役割について基礎的検討をした。ラット消化管においてMIFの発現は他の消化管とくらべ低い傾向を示した。新しいMIF活性阻害治療としてMIFDNAワクチンを開発し、下部消化管炎症において炎症の抑制効果を示した。MIFノックアウトマウスによる解析でMIFの欠落では無刺激または刺激下において胃酸分泌は野生型マウスと比べ有意な変化を示さなかったが、薬剤性の上部消化管炎症に対して抵抗性を示した。その抵抗性の機序の一つとして熱ショック蛋白の発現を介している可能性が示唆された。マウス好酸球性食道炎モデルにおいて、MIF活性阻害により好酸球浸潤が抑制される傾向を示した。

研究成果の概要（英文）：We basically investigated the role of macrophage migration inhibitory factor(MIF) in esophageal diseases. The expression of MIF protein in the esophagus of rats was less than that of stomach and intestine in rat. We developed MIF DNA vaccine, which is a novel MIF inhibitor, and this vaccine ameliorated the severity of intestinal inflammation in mice. In the study using MIF knockout mice, MIF did not affect the level of gastric acid-secretion in mice. MIF knockout mice were resistant to drug-induced gastrointestinal inflammation, partly via induction of heat shock protein. Treatment with MIF inhibitor suppressed eosinophil infiltrate in the esophagus of mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科

キーワード：好酸球性食道炎，マクロファージ遊走阻止因子

1. 研究開始当初の背景

マクロファージ遊走阻止因子(MIF)は活性Tリンパ球より分泌され遅延型アレルギー反応など細胞性免疫に関与する液性因子と

して発見され、様々な炎症性疾患でMIFの発現が増強し病態の増悪に関与する因子である。消化管の炎症性疾患や腫瘍性疾患におけるMIFの役割も徐々に証明されてきており、

病態形成において重要な役割を持ち、特に難治性疾患に対するターゲット分子として注目されている。マウスモデル消化管疾患においては抗MIF抗体投与による炎症の抑制や腫瘍増殖の抑制が確認され、MIF活性阻害による治療がヒトでも期待されている。

しかしながら食道疾患におけるMIFの研究は現在のところ充分には行われておらず、食道の炎症性疾患や腫瘍性疾患について炎症や細胞増殖に深く関与しているマクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage migration inhibitory factor: MIF) の役割を解析することはこれらの難治性疾患の患者に対する恩恵が大きいと思われる。

わが国では食道炎や食道癌患者は着実に増えておりプロトンポンプ阻害剤などの胃酸分泌抑制剤である程度食道炎の状態や症状を改善させることができるが、食道粘膜の炎症自体の本質や炎症から発癌へのステップの機序の解明は未だ十分に解明されていない。本研究課題でこれらの機序の解明を進めることで根治治療をふくめた治療应用到結びつく可能性がある。そこで消化管炎症モデルやさらに食道炎モデルなどを用いMIFの役割を探索する研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究によって食道におけるMIFの役割を研究することは、今後の食道疾患、特に難治性食道炎や食道腫瘍の発症メカニズムを理解することに寄与できるものと思われる。さらに様々な手法によってMIF活性の阻害を図ることで炎症抑制が可能かを検証するとともに、その際の他の因子への影響をみることで、MIF活性の調整による食道炎や発癌の治療のみならず長期予防をターゲットにした臨床応用の開発を目標とする。

3. 研究の方法

①薬剤性上部消化管炎症におけるMIFの役割についての検証

インドメタシンを投与し食道・胃・小腸などの上部消化管の粘膜障害を惹起させ、MIFの発現をELISA法や免疫染色法にて解析した。さらにMIFノックアウトマウスを用い消化管炎症の程度を炎症性細胞の浸潤や組織傷害を観察・評価(重症度のスコア化)し、これらの変化を組織学的・分子生物学的に解析し、野生型マウスを同様に治療した組織と比較した。同組織における炎症性サイトカイン産生誘導(TNF- α)をELISA法にて、熱ショックたんぱく発現をウェスタンブロット法にて解析した。胃酸分泌の程度を解析した。

②健常ラットの消化管組織におけるMIF発現

ラットの食道粘膜におけるMIFの発現を免疫染色・ウェスタンブロット法にて解析した。

③消化管炎症におけるMIFDNAワクチンの抑

制効果の解析

デキストラン硫酸誘導大腸炎はMIF抗体で抑制されMIFノックアウトマウスでは殆ど発病しない(Ohkawara et al. Gastroenterology 2002, Ohkawara et al. Immunol Lett 2006)そこで、MIFDNAワクチンを開発しMIF活性阻害の効果判定に判断しやすいデキストラン硫酸誘導大腸炎を用い消化管の炎症に対する抑制効果を検証した。組織学的評価やサイトカイン産生の程度をELISA法で解析した。

④好酸球性食道炎モデルの作製とその評価およびMIF発現の解析

Zhuらの方法(Gastroenterology 2010;139:182-193)を用い好酸球性食道炎モデルマウスを作成した。マウスにアスペルギルス抗原100 μ g/匹を鼻孔または口腔に週3回3週間投与した。最終投与後の18~20時間後に組織を採取した。その食道炎の好酸球浸潤をルナ染色で確認した。またMIF免疫染色にてMIF陽性細胞を同定した。さらにこのマウス食道炎モデル用いMIF活性阻害による炎症抑制を組織学的に解析した。

4. 研究成果

①MIFノックアウトマウスは薬剤(インドメタシン)性消化管粘膜障害(特に胃粘膜)に対して粘膜障害の程度が損傷スコアで約1/3と低下し、炎症細胞の浸潤などは炎症スコアで1/4ほどまで抑制され(損傷スコア: 0.74 ± 0.21 および 2.00 ± 0.26 , $P < 0.01$; 炎症スコア: 0.60 ± 0.27 および 2.3 ± 0.26 , $P < 0.01$)、MIF非存在下においてインドメタシン薬剤性消化管炎症に抵抗性を示した。同様な傾向が食道粘膜にも見られたが、食道粘膜の障害程度は野生型マウス群でも軽微なためMIFノックアウトマウスとの差を示さなかった。

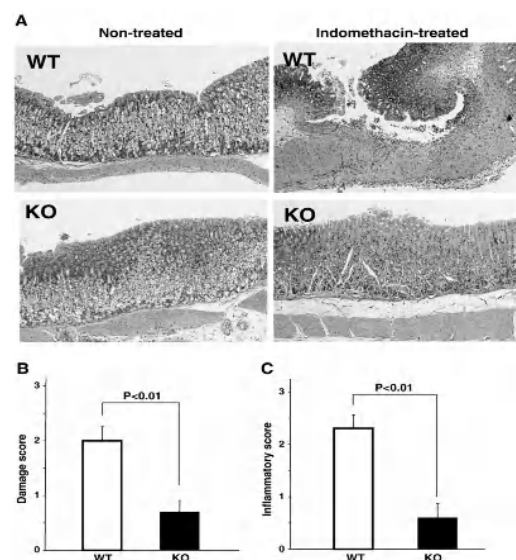
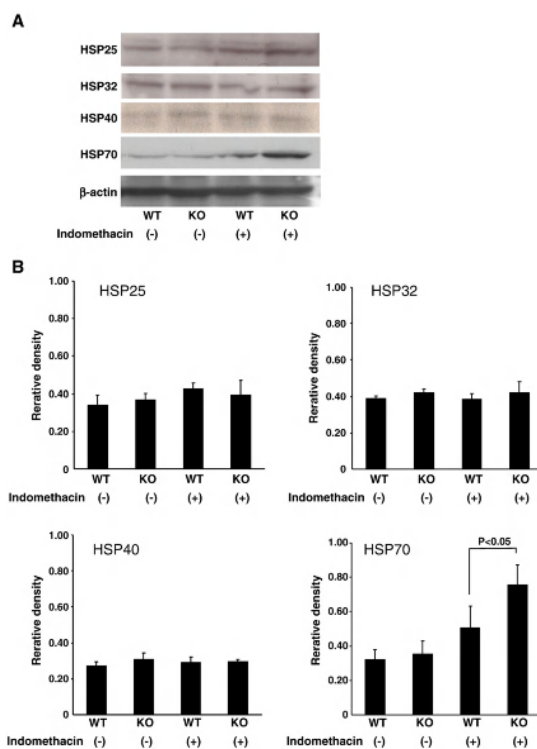


図1. インドメタシン投与によるMIFノックアウトマウスの抵抗性(組織所見)

また、MIF ノックアウトマウスは無刺激状態や刺激物質による胃酸分泌は野生型マウスと比べ有意な変化を来さなかった。(無刺激状態 0.772 ± 0.033 および $0.774 \pm 0.033 \mu\text{EqH}^+$)、胃酸分泌刺激剤 (ベタネコール) を投与しても、MIF ノックアウトマウスと野生型マウスでは差を認めなかった。(0.742 ± 0.063 および $0.802 \pm 0.032 \mu\text{EqH}^+$)

胃組織の TNF- α 産生は薬剤性刺激によって増加するが、MIF ノックアウトマウスではそれが抑制されていた。(31.30 ± 7.64 および $3.24 \pm 0.91 \text{ pg/mg protein}$, $P < 0.01$) MIF ノックアウトマウスは薬剤 (インドメタシン) 投与で消化管粘膜に熱ショック蛋白 (HSP) (特に HSP70) を強く誘導した。



②マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) の発現は免疫染色法では食道粘膜において MIF は扁平上皮細胞に弱く発現していた。他の消化管臓器とウエスタンブロット法にて発現を比較すると無刺激状態ではその発現は弱く MIF の発現が良く見られる胃・大腸と比べ低かった。

③MIF 活性阻害の方法の一つとして MIF Th-epitope DNA ワクチンを開発した。ワクチンの効果を確認するため、我々の実験系で安定しているデキストラン硫酸誘導大腸炎で効果を検証したところ、臨床症状スコアは半分以下に、組織学的評価 (スコア) も約 1/2 に下がり、炎症性サイトカイン産生も抑制された。

④好酸球性食道炎モデルマウスにおける MIF

の解析を行った。

複数回のアスペルギルス抗原投与によりマウスに好酸球性食道炎が誘導されることが報告されている。我々はこれにならい、同様の手法で食道炎の誘発を試みた。さらにそのマウスの食道組織の好酸球浸潤を様々な染色法を用い組織学的に評価した。週 3 回で 3 週間にわたり 1 回当たり $100 \mu\text{g}$ /匹の量のアスペルギルス抗原をマウス鼻孔または口腔に投与後、最終投与約 18 時間後にマウスから食道組織を採取し、それらを HE 染色, MIF 免疫染色, 好酸球の確認のためルナ染色で評価した。アスペルギルス抗原投与マウス食道粘膜および粘膜下層に MIF 陽性の細胞が未治療マウスの食道組織と比べ 2-3 倍程度に増えていた。ルナ染色ではアスペルギルス抗原投与マウスの食道組織標本で未治療マウスの食道組織と比べ好酸球浸潤の有意な増加を確認した。これらの食道炎モデルマウスに対して MIF DNA ワクチンを用い MIF 活性阻害を試みたところ、アスペルギルス抗原投与による好酸球浸潤の程度 (ルナ染色にて確認) は低下傾向であった。しかしながら HE 染色標本を用いて粘膜傷害の程度やその他の炎症細胞浸潤の程度について解析したが、食道粘膜の破壊などの粘膜傷害はコントロール群にも見られなかった上、食道炎モデルマウスで MIF DNA ワクチン投与によってもこの粘膜傷害は有意な変化を確認することは出来なかった。リンパ球などの他の免疫細胞の浸潤程度は若干ワクチン治療群が抑制されていた。臨床所見としては両群のマウスとも異変は見られず、またアスペルギルス抗原投与およびワクチン投与後に死亡したマウスも無かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Ohkawara T, Koyama Y, Onodera S, Takeda H, Kato M, Asaka M, Nishihira J. DNA vaccination targeting macrophage migration inhibitory factor prevents murine experimental colitis. Clin Exp Immunol. 2011;163:113-22. 査読あり
2. Ohkawara T, Takeda H, Ohnishi S, Kato M, Nishihira J, Asaka M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to development of nonsteroidal anti-

inflammatory drugs-induced gastric
injury in mice.
IntImmunopharmacol.2011
;11:418-23. 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

1. 大川原辰也, 中川宏治, 大西礼造, 大西俊介, 西平順, 浅香正博, 武田宏司. 消化管炎症における Heat shock protein と macrophage migration inhibitory factor の関係. 第13回 GGA-HSP 勉強会 2012.8.4. 東京 丸ビルホール&コンファレンススクエア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大川原 辰也 (OHKAWARA TATSUYA)
北海道大学・大学院薬学研究院・研究員
研究者番号：00374257

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし