

博士（医学）外丸詩野

学位論文題名

HTLV-1感染に伴うラット慢性進行性脊髄末梢神経症(HAMラット病)
の脱髓機序に関する研究

学位論文内容の要旨

HTLV-I(human T lymphocyte virus type I)は1980年代初頭にヒトに感染する最初のレトロウイルスとして分離同定され、その後成人T細胞白血病(adult T cell leukemia、ATL)の原因ウイルスとして確立された。本ウイルスはATL以外にも慢性進行性脊髄症(HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis、HAM/TSP)、関節症(HTLV-I associated arthropathy、HAAP)、ブドウ膜炎(HTLV-I uveitis)、細気管支肺胞炎(HTLV-I associated bronchopneumonopathy、HAB)、シェーグレン症候群などにも病因論的関係が明らかにされてきているが、未だこれらHTLV-I関連疾患の発症機序には不明な点が多い。HTLV-I感染による脊髄障害を主体とした神経疾患であるHAM/TSPについてもその発見以来広範な基礎研究および臨床研究が行われてきたが、その発症機序については依然不明の部分が多く、病因解明の突破口として動物モデルの開発が強く望まれてきた。

HTLV-I産生T細胞株をラットに接種すると、HTLV-Iはラットに感染し、持続感染系が成立する。我々は1992年にHTLV-I持続感染WKAHラットに脊髄の脱髓性病変を主体とする慢性進行性脊髄末梢神経症(HAMラット病)を誘導させることに成功し、ヒトHAM/TSPのモデル動物としてその解析を行っている。HAMラット病は、近交系ラットのうち、WKAH系持続感染ラットにのみ約16ヶ月の潜伏期をもって発症し、後肢の対麻痺、筋萎縮、排尿排便障害を認める。神経病理学的に病変の主座は脊髄白質にあり、側索・前索周辺帯に左右対称性の白質変性、脱髓を認める。病変の進んだラット脊髄ではミエリンの変性、ミエリン断片を貪食したマクロファージの高度の浸潤、グリオーシスを認めるが、これらの病変部にヒトHAM/TSPで多数認められるリンパ球の浸潤は認められない。また、現在までの詳細な病理学的検索でHAMラット病の病態には密接にオリゴデンドロサイトのアポトーシスが関連していることが解っている。本研究はこれらの病理組織学的検討をふまえ、主に分子生物学的手法を用いて、HAMラット病における脱髓機序を明らかにする目的で行われた。

初めに、ウイルス感染とHAMラット病発症の関連を明らかにするためにHAMラット組織におけるプロウイルスDNAの局在とHTLV-Iの遺伝子領域のなかでもウイルス遺伝子の転写活性化因子であり細胞遺伝子トランス活性化作用があることでも知られるTax蛋白をコードするpX領域のmRNA発現についてpolymerase chain reaction(PCR)法、reverse transcriptase(RT)-PCR法により検討を行った。その結果、プロウイルスDNAは脊髄を含めたラット組織に広範囲に感染が確認され、HTLV-I感染細胞の局在は病変脊髄に特異的なものではないと考えられた。一方、HTLV-I pXメッセージは、HAMラットの脊髄、末梢神経で選択的な発現が確認され、HAMラット病発症にpXメッセージの発現が密接に関わっている可能性が考えられた。

続いて、HAMラット病変脊髄および坐骨神経におけるTNF- α を含む6種のサイトカイン発現について実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）ラットでの発現との比較も含め検討した。IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6についてはHAMラット病で有意な変化は認められなかつたが、TNF- α についてはメッセージ、蛋白レベルにおいて発現誘導を明らかに認めた。TNF- α はマクロファージやアストロサイトから產生され、アポトーシスを誘導することが知られており、HTLV-I感染によるマクロファージ/ミクログリアあるいはアストロサイトの活性化とそれに続くTNF- α などのneurotoxinの放出とオリゴデンドロサイトのアポトーシスといった一連のプロセスがHAMラット病の主病因である可能性が考えられた。また、比較検討したEAEでは病変部に多数のリンパ球浸潤が存在し細胞性免疫が病態の主体をなすことが報告されており、IL-2の発現も全例で確認された。しかし、HAMラット病では病変脊髄に経時的観察においても病期にかかわらずリンパ球浸潤は認められず、IL-2の発現も一部のラットに認めるのみで、EAEのように細胞性免疫の存在が必須条件とはなつていなかつた。すなわち、HAMラット病の発症にとって最も本質的なプロセスは、EAEと異なり、特異的な細胞性免疫以外の機序に基づくものであることを裏付けているものと考えられた。

さらに詳細な検討を進めるべく、PCR法、定量的RT-PCR法を用いて病変脊髄におけるプロウイルスDNAの存在およびHTLV-I pX、TNF- α mRNAの発現の変化を経時的に観察した。定量的RT-PCR法としてはPCRプラトー効果の影響を受けない競合PCR法を選択した。競合PCR法とは、目的のmRNAを検出するためのプライマーと相補的な配列を有し、分子量あるいは制限酵素部位が目的のmRNAとは異なる既知量の鑄型（競合鑄型）を段階的に希釈したものと試料中に加え、目的のmRNAからの增幅産物と競合鑄型由来の增幅産物量を比較することにより、目的のmRNA量を測定する方法である。解析の結果、ウイルス感染3~4ヶ月後には、既にプロウイルスDNAが検出されたが、HTLV-I pX mRNAは検討した4ヶ月齢までのラットではメッセージの発現を認めなかつた。しかし、オリゴデンドロサイトのアポトーシスを組織学的に認める7ヶ月齢より急激な発現増強を認め、15~18ヶ月齢ころまで発現を定量できた。一方、20ヶ月齢以降のラットでは定性的なRT-PCR法ではmRNAの発現を確認できるものの、ごく微量で、競合PCR法で正確な値を測定するのは困難なレベルであった（9.3molecules以下）。TNF- α mRNAも同様に7ヶ月齢以降に徐々にメッセージ発現の増強を認め、9~11ヶ月齢頃より比較的高い発現量で経過した。この結果から、HAMラット病発症におけるfirst event である髓鞘形成オリゴデンドロサイトのアポトーシス死の機序として、局所に感染したウイルスによる直接的な作用、あるいはマクロファージやアストロサイトから產生されるTNF- α を介した間接的な作用が推察された。

また、オリゴデンドロサイトのアポトーシス死に伴い脊髄におけるアポトーシス関連因子の変化、特にアポトーシス抑制因子bcl-2に着目して定量的RT-PCR法により解析を行つた。その結果、HAM発症WKAHラットでは組織学的にオリゴデンドロサイトのアポトーシス死が観察される7ヶ月齢より、正常対照に比べ著しいbcl-2mRNAの減少を認め、15ヶ月齢頃から徐々に発現量は回復し、20ヶ月齢以降ではbcl-2mRNAの発現量は正常値と変わらなくなつた。HAMラット病におけるbcl-2発現抑制がウイルス感染に伴う直接的なものなのか、あるいは生体防御によるものか議論の余地があるが、病変発症のfirst eventであるオリゴデンドロサイトのアポトーシスにbcl-2抑制が密接に関与している可能性が考えられた。

最後にHAMラット病を発症するWKAHキャリアーラットと他系統キャリアーラットの系統差を検討した。脊髄のウイルス感染の有無についてはいずれの系統にも差は認めなかつたが、pXメッセージの発現にはHAMラット病発症WKAHラットに有意な発現誘導を認め、感染の有無よりはpXメッセージの発現の有無の方が、HAMラット病発症に重要であるということが明

らかになった。TNF- α については脱髓、多数のマクロファージ浸潤を認めるHAMラットにおいて高い発現量を観察し、ACI、LEWラットとの間に有意差を見た。

以上の本研究により、HAMラット病の脱髓機構としてbcl-2の抑制とHTLV-I Taxの発現を介するオリゴデンドロサイトのアポトーシスあるいはHTLV-I感染細胞から產生されるTNF- α を介する間接的なオリゴデンドロサイトのアポトーシス誘導がHAMラット病の病態として重要であることが示唆された。これら一連のHAMラット病に関する研究はヒトHAM/TSPのみならず、HIV脳症、MSを含む原因不明な脱髓性疾患の発症機序解明に大きく寄与するものと期待される。

学位論文審査の要旨

主査 教授 吉木 敬
副査 教授 長嶋 和郎
副査 教授 有川 二郎

学位論文題名

HTLV-1感染に伴うラット慢性進行性脊髄末梢神経症(HAMラット病) の脱髓機序に関する研究

本研究は、HTLV-I(human T lymphocyte virus type I)の中枢神経系への障害機序を解明する目的で、ヒトHAM/TSPモデルであるHTLV-I持続感染ラットの慢性進行性脊髄末梢神経症(HAMラット病)の脱髓機序を解析した。ラットにHTLV-I産生T細胞株を接種すると持続感染系が成立するが、HAMラット病は、近交系ラットのうちWKAHラットにのみ約16ヶ月の潜伏期を経て発症し、後肢の対麻痺、筋萎縮、排尿排便障害を認める。神経病理学的に脊髄の前側索周辺帯に白質変性、脱髓を認め、病変の進行に伴いマクロファージの浸潤、グリオーシスを認めるが、ヒトHAM/TSPで見られるようなリンパ球浸潤は見られない。また、詳細な検討によりHAMラット病の病態にオリゴデンドロサイトのアポトーシスが関連していることが解っている。本実験はHAMラット病の脱髓機序を明らかにするために、プロウイルスDNAの局在、HTLV-I pX mRNAの発現、サイトカインの発現、アポトーシス関連因子bcl-2の変化に着目し、脊髄における各因子の変化および発症の系統差について検討を行った。実験にはpolymerase chain reaction(PCR)法、reverse transcriptase(RT)-PCR法、競合PCR法等を用いた。

その結果、プロウイルスDNAは脊髄を含めたラット組織に広範囲に検出されたが、HTLV-I pXメッセージは脊髄、末梢神経に選択性的発現を認めた。サイトカインの検討では、TNF- α のメッセージ、蛋白レベルでの有意な発現を認めた。また、競合PCR法を用いた定量的、経時的検索では、HTLV-I pX、TNF- α mRNAとも7ヶ月齢より発現の増強を認め、比較的感染早期でのウイルスあるいはTNF- α による作用が病変発症に重要であると考えられた。アポトーシス抑制因子bcl-2 mRNAは、7~12ヶ月齢にかけて一過性に発現の減少を認めた。さらに、系統差の検討ではpX、TNF- α とともにWKAH持続感染ラットで有意な発現を認めた。以上の研究より、HAMラット病の脱髓機序としてbcl-2の抑制とHTLV-I Taxの発現を介する、あるいは感染細胞から產生されるTNF- α によるオリゴデンドロサイトのアポトーシス誘導が重要であることが明らかとなり、ウイルス感染と疾患発症の関連について興味ある結果を得た。

上記の主旨の発表が公開発表の場で約20名の聴衆を前にして行われた。最初に副査の長嶋教授から脊髄におけるウイルス感染細胞について、pXメッセージ発現の選択性的発現機構について、オリゴデンドロサイトのアポトーシス誘導に関して軸索障害等による二次的変化の可能性

の有無について質問があった。申請者は共同研究者による細胞分離培養実験、In Situ PCRによる実験結果を挙げ、オリゴデンドロサイトのアポトーシスはウイルス感染による可能性が強いこと示した。また、ウイルス粒子が脊髄を含めた各組織に見られないという主査の指摘、pX以外のHTLV-I領域、env mRNAの発現を認めないとする実験結果をあわせ、病変と関連したpX mRNAの選択的発現の可能性を示した。次いで同副査の有川教授より、実験に使用したラットのHTLV-I産生T細胞株接種時期について、持続感染系の誘導時期における抗体産生の違いについて、抗体産生ラットにおける細胞性免疫の有無、抗体産生の違いと各持続感染ラットの病態の差異について、本モデル動物における脊髄病変以外の病変の有無について、発症を促進する因子の有無について質問があった。申請者は持続感染の誘導時期による抗体産生の違いはトランスによっており、また、抗体産生ラットにおいても非産生ラット同様に脊髄にリンパ球浸潤を見ないことから、新生仔期および成熟ラットともに病態に細胞性免疫は関わっておらず、両者の病態は共通であることを示した。一方、脊髄および坐骨神経以外の病変については詳細な検討によっても確認されないこと、発症促進については様々な試みによっても有効な方法が得られないことを回答し、以上、いずれの質問に対しても概ね妥当と思われる回答を示した。

本研究はラットモデル動物をもとに、HTLV-I感染と疾患発症の関連について新たな事実を示した点で学術的価値が高く、一連のHAMラット病に関する研究はヒトHAM/TSPのみならず、HIV脳症、MSを含む原因不明な脱髓性疾患の発症機序解明に大きく寄与するものと期待される。したがって審査員一同は、本研究を博士（医学）の学位に値するものと判定した。