

学 位 論 文 題 名

HTLV- I 感染に伴うラット慢性進行性
脊髄末梢神経症の脱髄機序の解析

— 脊髄病変部における microglia/macrophage の免疫組織学的解析 —

学位論文内容の要旨

HTLV-I(human T cell leukemia virus type I) は1980年代初頭にヒトに感染するレトロウイルスとして初めて分離同定され、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。HTLV-IIはATLの外に、下肢の対麻痺を主徴とする慢性脊髄症(HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, HAM/TSP)や慢性関節リウマチに類似した慢性関節症(HTLV-I associated arthropathy, HAAP), 更にはブドウ膜炎(HTLV-I uveitis), 細気管支肺炎(HTLV-I associated bronchiolo pneumonopathy, HAB), シェーグレン症候群の一部にも病因的役割を担うという証拠が蓄積されてきている。しかし、HTLV-I 関連疾患の発症機序に関しては不明な点が多く、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。

我々はHTLV-I関連疾患モデル動物の開発に向けてHTLV-I持続感染ラットを作製した。HTLV-I産生ヒトT細胞株MT-2を各系統ラットに接種するとHTLV-I持続感染ラットとなる。そのうちWKAH/Hkmラットに限り約15~22カ月の潜伏期を経てヒトHAM/TSPに類似する両下肢の麻痺、尿失禁が出現し、神経病理学的には脊髄の脱髄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) が発症することを既報した。脊髄の病変は胸髄を主体とした前索および側索周辺帯の脱髄、多数のmicroglia/macrophageの浸潤、空胞変性、アストログリオシスを認め、リンパ球の浸潤は認めない。またHTLV-I接種後、7カ月後頃から胸髄を中心に白質にアポトーシス細胞が出現し、病変の進行と共にその数が増加する。電顕にてoligodendrocyteのアポトーシスが確認されるとともに、免疫染色の結果よりTUNEL法で陽性を示すアポトーシス細胞の主体はoligodendrocyteであった。プロウイルスDNAはウイルス感染後、3カ月後にはすでに脊髄に検出され、中枢神経系では脊髄に選択的なHTLV-I pX mRNAの発現が認められる。また、病変脊髄でのサイトカインの発現を検討するとアポトーシスを誘導することで知られているTNF- α mRNAの発現亢進と髄液中のTNF- α の増加を認める。以上のことよりTNF- α 産生能を有し、病変脊髄に多数浸潤するmicroglia/macrophage系細胞がHAMラット病の病態形成に深くかかわっていると考えられる。本研究では、病変局所でのmicroglia/macrophageの病態形成への関与の可能性について、主に免疫組織化学的手法を用いて検討した。

はじめにHAMラットと正常ラット間での胸髄における免疫組織化学的検索を行い、各種細胞表面分子の胸髄1横断面あたりの陽性細胞数およびその分布を比較し

た. OX-42 (CD11b/c) 陽性で表わされるmicroglia/macrophage系細胞は、正常ラットでは7カ月齢の時点で白質を中心に胸髄に広く分布し、以後漸増を示した. HAMラットでは7カ月齢で正常ラットとの差を認めなかったが、生後12カ月頃より増加傾向を示し、生後15カ月齢以後で正常ラットに比し有意に増加していた. 12カ月以降におけるmicroglia/macrophage系細胞の増加は脊髄前索に最も強く現われ、側索および楔状側にも認めた. ミクロトームを用いた60 μ m切片でのOX-42陽性細胞は、正常ラットおよびHAMラットとも脊髄白質で桿状を示すresting microgliaとして瀰漫性に分布するほか、HAMラット脊髄には、短い突起を持つアメーバ様の形態や肥大化して不規則な多数の分枝した突起を持っているactivated microglia、あるいは円形で突起を欠くbrain macrophage等様々の形態を示すOX-42陽性のmicroglia/macrophageを多数認めた. 免疫電顕による観察では、細胞表面に一致してOX-42陽性反応を認めるresting microgliaに加えて、大量の変性産物を細胞体内に取り込んでいるOX-42陽性細胞を認めた. また20カ月齢のHAMラットの胸髄では細胞膜に一致してOX-42が陽性反応を示すアポトーシス細胞も確認された. 次にこれらmicroglia/macrophage系細胞を中心にその活性化で発現亢進するといわれているMHC class IIや細胞接着分子であるLFA-1、ICAM-1さらに増殖期の細胞で発現するPCNAについて検討した. MHC class II陽性細胞は正常ラットにおいても7カ月齢の時点で楔状側にわずかに認めた. 一方、HAMラットでは7カ月齢の時点で正常ラットとの差は認めないが、12カ月齢より増加を示し、OX-42の分布にほぼ一致して脊髄前索、側索および楔状側に陽性細胞を認めた. 12カ月以後の観察ではHAMラットにおけるMHC class II 陽性細胞は、正常ラットに比べ優位に増加していた. ミクロトームを用いた60 μ m切片ではこれらMHC class II陽性細胞は、形態学的にmicroglia/macrophageに類似する. 免疫電顕においてこれら細胞体内に変性産物の蓄積を認めないほか、グリア細線維もみない. LFA-1陽性細胞は12カ月齢以降のHAMラットで正常ラットに比べ優位に増加し、その分布はOX-42やMHC class IIのそれにほぼ一致していた. ICAM-1はHAMラットおよび正常ラットともに一部の血管内皮に一致して陽性であり、12カ月齢以降ではHAMラットに増加している傾向を認めたが、統計学的に有意ではなかった. PCNA陽性細胞は、正常ラットで白質を中心にして12カ月齢時に増加を示すがその後、その数はほぼ一定数で推移した. 一方、HAMラットにおいては12カ月齢より増加傾向を示し、15カ月齢以降では主に胸髄の前索、側索の病変部でOX-42陽性細胞の分布に一致してPCNA陽性細胞の顕著な増加を認めた. 2重染色による解析でPCNA陽性細胞の多くはmicroglia/macrophageであることが確認された.

次に、HAMラット脊髄で増加するこれらmicroglia/macrophage系細胞がresident microglia由来か或いは血液由来のmacrophageかを検討するため、OX-42陽性細胞中のCD45分子の発現レベルについてflow cytometryで検討した. その結果、7ヶ月齢、12ヶ月齢のHAMラットならびに同月齢正常ラット間では、CD45 highで表わされる血液由来のmacrophageの割合はいずれも10%前後で差は認めらず、約90%はCD45 lowで表わされるresident microgliaであった. 18カ月齢では、正常ラットのCD45 highは10パーセント前後と7カ月齢、12カ月齢のそれとほぼ同様であったが、HAMラットでは約16%とやや増加傾向を示した. しかし、EAEラットの約30%と比較してその増加は軽微であった. したがって、HAMラットで増加するmicroglia/macrophage系細胞のほとんどはCD45 lowで表わされるresident microgliaであると考えられた.

本研究では、HAMラット脊髄のmicroglia/macrophageは病変の進行に伴い、組織学的

に様々な形態を示すとともに活性化の指標となる細胞表面分子を発現し、局所で増殖していること、また、一部はアポトーシスに至ることを示した。さらに、これらの microglia/macrophage の大部分は resident microglia であり、血液からの macrophage 浸潤は少数であることを明らかにした。したがって、HAM ラット病の病態形成には HTLV-I 感染に伴う resident microglia の活性化、増殖が深く関与していると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

HTLV- I 感染に伴うラット慢性進行性 脊髄末梢神経症の脱髄機序の解析

－ 脊髄病変部における microglia/macrophage の免疫組織学的解析 －

HTLV-I 関連疾患の発症機序に関しては不明な点が多く、 病因解明の突破口としてHTLV-I関連疾患モデル動物の開発を目指し、HTLV-I持続感染ラットを作製し、解析を行った。 HTLV-I産生ヒトT細胞株MT-2をWKAH/Hkmラットに接種するとHTLV-I持続感染ラットとなり、約15～22カ月の潜伏期を経てヒトHAM/TSPに類似する両下肢の麻痺、 尿失禁が出現し、 神経病理学的には脊髄の脱髄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）が発症する。 脊髄の病変は胸髄を主体とした前索および側索周辺帯の脱髄、 多数のmicroglia/macrophageの浸潤、 空胞変性を認める。 またHTLV-I接種後、 7カ月後頃から胸髄を中心に白質にアポトーシス細胞が出現し、 病変の進行と共にその数が増加する。 電顕にてoligodendrocyteのアポトーシスが確認される。プロウイルスDNAはウイルス感染後、3カ月後にはすでに脊髄に検出され、 中枢神経系では脊髄に選択的なHTLV-I pX mRNAの発現が認められる。 また、 病変脊髄でのサイトカインの発現を検討するとアポトーシスを誘導することで知られているTNF- α mRNAの発現亢進と髄液中のTNF- α の増加を認める。以上のことより本研究では、 TNF- α 産生能を有し、 病変脊髄に多数浸潤するmicroglia/macrophage系細胞がHAMラット病の病態形成に深くかかわっていると考えられ、 病変局所でのmicroglia/macrophageの病態形成への関与の可能性について、 主に免疫組織化学的手法を用いて検討した。

その結果、 HAMラット脊髄のmicroglia/macrophageは病変の進行に伴い、 組織学

的に様々の形態を示すとともに活性化の指標となる細胞表面分子を発現し、局所で増殖していること、また、一部はアポトーシスに至ることを示した。さらに、分離した脊髄のグリア細胞のフローサイトメトリーの解析により、これらのmicroglia/macrophageの大部分は、resident microgliaであり、血液からのmacrophage浸潤は少数であることを明らかにした。したがって、HAMラット病の病態形成にはHTLV-I感染に伴うresident microgliaの活性化、増殖が深く関与していると考えられ、この動物モデルはヒトHAM/TSPをはじめ、HIV脳症等の脱髄性疾患の病態解明に有用であることが示唆された。

公開発表は約30名の聴衆の前で行われ、副査の小林教授から病変部に認める活性化microglia/macrophageの出現はoligodendrocyteのapoptosisより遅いことからみて、apoptosisをおこした細胞のscavengerとして存在しているのではないかとの質問があった。これに対し、発表者はその可能性を認めたが、HTLV-IプロウイルスDNAは7ヶ月齢の時点でmicroglia/macrophageの一部に存在すること、同時にpX mRNA およびTNF- α mRNAの発現をみることから、microglia/macrophage系細胞がpX遺伝子を発現し、TNF- α の発現を誘導する可能性は否定されないことを述べた。次いで副査の長島教授からin situ PCR でmicroglia/macrophageにウイルスゲノムを認めているが、病期のいつ頃認めているのかとの質問があった。これに対し脱髄病変のない7カ月齢および病変の進行しているもののいずれにもmicroglia/macrophageの一部に認めると回答した。また白質だけでなく灰白質のresting microglia に変化はないのか、との質問に対しmicroglia/macrophageの活性化は白質の脱髄病変部に一致して認め、灰白質にはほとんど変化を認めないことを述べた。また、7カ月齢から認めるoligodendrocyteのapoptosisはcontinuousなのか、HIV脳症と類似していると考えていいのか、また、ウイルスのreservoirとしてmicrogliaを考えていいかとの質問があった。これら質問に対し申請者は概ね妥当な回答を行った。

本研究は、ヒトHAM/TSPモデルとなりうるHTLV-I持続感染ラットの病態形成にresident microgliaの活性化、増殖が大きく関与しているという所見を提供した点で高く評価され、今後、HTLV-I感染における脊髄グリア細胞特にmicrogliaの役割の解明など、さらなる発展が期待される。

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。