

学 位 論 文 題 名

In Vitro Analysis of Cell Death of Spinal
Oligodendrocytes in a Rat Model for HTLV-I Infection

(HTLV-I 感染に伴うラットにおける

脊髄オリゴデンドロサイト細胞死の in vitro 解析)

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)の原因ウイルスあることが確認された。HTLV-I は ATL 以外にも、下肢の対麻痺を主徴とする慢性脊髄症 (HTLV-I associated myelopathy/tropic spastic paraparesis, HAM/TSP)や慢性関節症、ブドウ膜炎、細気管支肺炎さらに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。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 については広範な基礎及び臨床研究が行われてきたが、その発症機構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 産生ヒト T 細胞株 MT-2 をラットに接種し HTLV-I 持続感染ラットを作製、7 系統のラットのうち WKAH 系ラットに約 15 ヶ月の潜伏期を経てヒト HAM/TSP に類似する下肢の対麻痺を主症状とする脊髄症を発症するラット (HAM ラット) を樹立した。神経病理学的には胸髄主体の前側索周辺帯の髄鞘破壊、microglia/macrophage の浸潤、空胞変性、アストログリオシスで、リンパ球の浸潤はほとんど認めなかった。経時的病理所見では、HTLV-I 接種後 7 ヶ月頃から胸髄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した。電顕にて oligodendrocyte のアポトーシスが確認されるとともに、TUNEL 法と免疫染色によりアポトーシス細胞の多くは oligodendrocyte であった。プロウイルス DNA は感染後 3 ヶ月で脊髄に検出され、感染後 7 ヶ月に急激に増加する脊髄に選択的な HTLV-I pX mRNA の発現が認められた。また、この時期から TNF- α の発現亢進も認めるほか、アポトーシス抑制因子である bcl-2 の強い発現抑制が確認された。PCR 増幅後の in situ hybridization と免疫染色では、脊髄での HTLV-I プロウイルスは少なくとも microglia/macrophage 系の細胞に存在することが確認された。以上より、HAM ラット病の発症機構として、TNF- α などへのトランス活性化能を持ち HTLV-I pX 領域にコードされる p40Tax の局所での発現増強とそれに伴い産生される TNF- α 、さらに bcl-2 の抑制による oligodendrocyte のアポトーシス誘導が重要であると想定された。本研究ではこの機構の可能性を証明するため、HTLV-I 感染ラット脊髄から microglia や oligodendrocyte を分離培養し、microglia での TNF- α 産生や oligodendrocyte の TNF- α

など細胞傷害因子に対する感受性を検討した。

抗 p40Tax 抗体を用いた HAM ラット病脊髄の免疫染色では、白質や灰白質に p40Tax 蛋白の発現細胞を証明した。さらに、HAM ラット病を発症する WKAH 系感染ラットでの p40Tax 蛋白発現細胞数は非発症系 2 系統の感染ラットに比べ、多数存在することを確認した。oligodendrocyte と microglia の分離はパーコール密度勾配法で行い、約 95% の純度でそれぞれの分離細胞を得た。この分離細胞を用いて HTLV-I pX mRNA の発現を RT-PCR 法で検索すると、コントロールとして β -actin の発現を基準にしたとき、pX mRNA の発現は相対的に oligodendrocyte より microglia で高い傾向にあった。TNF- α の産生については中枢神経系でその代表的産生細胞である microglia の分離培養細胞を用いて検討をした。感染後 10 ヶ月では感染ラットと同月齢の非感染ラットから分離した microglia 細胞培養上清中の TNF- α 産生に差はなかったが、18 ヶ月では感染ラットに有意な産生量の増加を認めた。次に、分離した脊髄の oligodendrocyte の TNF- α に対する感受性を検討した。その結果、TNF- α の添加は HTLV-I の感染の有無に関わらず、また HAM 発症系 WKAH 系ラットのみならず非発症系である ACI や LEW 系ラットでも濃度依存性に死細胞数の増加を誘導した。その中でも特に WKAH 系ラットの oligodendrocyte は他系統ラットに比べてその感受性は高く、HTLV-I 感染はさらにその感度を増加させた。TNF- α によるアポトーシス細胞死には TNFR1 を介したシグナルが重要であることが知られており、TNFR1 の mRNA 発現を RT-PCR 法で検索した。その結果、分離 oligodendrocyte および microglia の両方で確認された。一方、以前から知られている血清中に含まれる細胞傷害因子に対する HTLV-I 感染ラットの oligodendrocyte への効果を検討した。5% FCS 添加培養液と無血清培養液を用いて、oligodendrocyte の細胞死を比較した結果、血清の存在下で oligodendrocyte に多数の細胞死を認めた。特に WKAH 系は非発症系より死細胞数が多く、HTLV-I 感染はこの細胞死も増加させた。さらに、正常ラット血清でも FCS と同レベルの oligodendrocyte の細胞死を誘導した。このラット血清の細胞傷害因子は IgG 除去しても、あるいは 56°C 30 分で非動化しても、その効果に変化はなかった。このラット血清を分子量で分画すると、その細胞障害活性は約 100~300Kda の分画に確認された。この細胞傷害因子は TNF- α による oligodendrocyte 傷害に加え、HAM ラット病変の進行に伴い血液脳関門の破壊が生じた場合には血清成分とともに流入し、oligodendrocyte の傷害を増強し、病変をさらに進行させる可能性があると考えられた。一方、中枢神経のグリア細胞系で重要なアポトーシス抑制因子として働き、且つ HAM ラット脊髄でその発現抑制が確認されている bcl-2 の発現について、分離細胞を用いて半定量的競合 RT-PCR 法で検討した。HTLV-I 感染 WKAH ラットの oligodendrocyte では感染後 7、9、12 ヶ月でほとんど完全に発現の抑制を認めた。18 ヶ月で発現量の回復傾向を見たが、9 ヶ月齢の正常ラットの半分以下であった。一方、この感染ラットの microglia では発現の低下は認めなかった。

本研究の結果から、HTLV-I 感染 WKAH ラットの脊髄では感染 microglia での pX の発現増強に伴う TNF- α の産生やその他の細胞傷害因子の発現が、bcl-2 の発現抑制によりアポトーシス細胞死への抵抗性の低下した oligodendrocyte にアポトーシスを誘導し、HAM ラット病の発症へと進行していく可能性が考えられる。さらに、この研究成果はヒト HAM/TSP の発症機構の解析モデルとなるのみならず、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染による AIDS 脳症や HAM/TSP 類似の髄鞘の破壊を主体とする病理像を示すその他の中枢神経傷害の発症機構解析にも役立つものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

In Vitro Analysis of Cell Death of Spinal Oligodendrocytes in a Rat Model for HTLV-I Infection

(HTLV-I 感染に伴うラットにおける

脊髄オリゴデンドロサイト細胞死の in vitro 解析)

HTLV-I (human T cell leukemia virus type I)は成人 T 細胞白血病(adult T cell leukemia, ATL)の原因ウイルスであるほか、下肢の対麻痺を主徴とする慢性脊髄症 (HTLV-I associated myelopathy/tropic spastic paraparesis, HAM/TSP)や慢性関節症などの病因としても注目されてきている。しかし、その発症機構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。申請者の教室では 1992 年に HTLV-I 感染ラットを作製し、WKAH 系ラットのみにヒト HAM/TSP に類似する脊髄の脱髄性病変を主体とする慢性進行性脊髄症 (HAM ラット病)を発症させることに成功した。一連の研究により HAM ラット病の脱髄機構として脊髄での bcl-2 の強い発現抑制と HTLV-I Tax の発現による直接的、あるいは間接的に HTLV-I 感染細胞から産生される TNF- α を介した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を示唆してきた。本研究は HTLV-I 感染ラット脊髄でのオリゴデンドロサイトの細胞死の機序解明を目指し、HTLV-I 感染ラット脊髄からオリゴデンドロサイトやミクログリアを高純度分離培養し、免疫染色や分子生物学的手法及び TNF- α や血清に対する感受性などを検討した。

免疫組織化学的検索により、HAM ラット病変脊髄の白質や灰白質で Tax 蛋白の発現細胞を確認した。さらに、この Tax 陽性細胞数は HAM 発症系 WKAH ラットで HAM 非発症系の LEW や ACI のラットに比べ多数を認めた。次に、HAM 発症に密接に関わっている HTLV-I pX mRNA 発現について、分離したミクログリアとオリゴデンドロサイトについて RT-PCR 法により検討を行った。その結果、相対的にミクログリアに強い発現を認めた。

ELISA 法により HTLV-I 感染ラットと正常ラットのミクログリア培養上清における TNF- α の産生を検討すると、10 ヶ月齢から 14 ヶ月齢では HTLV-I 感染ラットと正常ラット間で有意な差は認められなかったが、17 ヶ月齢から感染ラットで有意な高産生を認めた。培養脊髄オリゴデンドロサイトの TNF- α に対する細胞傷害感受性を検討した。TNF- α の添加は HTLV-I の感染の有無にかか

わらず全ての系統に濃度依存性に死細胞数が増加を誘導した。さらに HAM 発症 WKAH 系ラットのオリゴデンドロサイトは他系統ラットに比べその傷害感受性は高く、HTLV-I 感染はその感受性を亢進した。TNF receptor 1 のメッセージは HTLV-I 感染の有無を問わずオリゴデンドロサイトとミクログリア両方に確認された。一方、FCS やラット血清によるオリゴデンドロサイトへの細胞傷害性について検討すると、血清の存在はオリゴデンドロサイトに細胞死を誘導した。なかでも WKAH 系は非発症系より死細胞数の割合が多く、HTLV-I 感染はこの細胞死も増加させた。ラット血清を用いて血清内の細胞傷害因子を検討した結果、IgG や補体で代表される熱不安定の因子と細胞死の関係を認めなかった。また、その細胞障害因子の蛋白サイズは約 100~300kDa であると想定された。最後に、中枢神経で重要なアポトーシス抑制因子である bcl-2 の発現の変化について検討した。HTLV-I 感染 WKAH ラットのオリゴデンドロサイトでは 7~12 ヶ月齢で高度な bcl-2 発現抑制を認めた。18 ヶ月齢では発現量の回復傾向を見たが、9 ヶ月齢の正常ラットの半分以上であった。一方、この感染 WKAH ラットのミクログリアでは正常 WKAH ラットに比べは有意な低下は認めなかった。

以上、HAM ラット病発症には pX や TNF- α の発現のほかオリゴデンドロサイトの bcl-2 の発現抑制が深く関わっていることを示した。

申請者の学位論文内容の発表後、副査の上出利光教授からミクログリア細胞同定法や TNF- α に対する細胞感受性の系統差についての質問があった。また、なぜ脊髄のオリゴデンドロサイトだけ特異的に傷害されるのかについて質問があった。次いで、副査の長嶋和郎教授から大脳のオリゴデンドロサイトとの比較や感染細胞の同定について in situ PCR での結果と分離したミクログリアとオリゴデンドロサイトの RT-PCR による検出結果の相違について質問があった。また、bcl-x, bax や caspase など最近の研究動向について質問があった。最後、この実験のモデルから、ヒトの HAM の発症機構に対して、どのようなことがわかったかと質問があった。最後に、主査の吉木からこの動物モデルの今後の研究や応用について質問、助言があった。

申請者は自分の実験結果や過去の文献を引用し適切に回答した。

この研究は今後、ヒト HAM/TSP のもならず HIV 脳症や MS を含む原因不明の脱髄性疾患の発症機構の解明や新しい治療法の開発に貢献すると期待される。

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。