

学位論文題名

HTLV-I 感染ラットの病変脊髄における神経病理学的、
分子生物学的変化の経時的解析

学位論文内容の要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) はヒトで最初の病原性レトロウイルスとして分離同定された後、成人 T 細胞白血病をはじめとして HTLV-I 関連脊髄症/熱帯性進行性痙性麻痺 (HAM/TSP)、関節症、ぶどう膜炎、シェーグレン症候群等種々の疾患の病因ウイルスであることが明らかにされてきた。これらの疾患に関する研究は単にひとつのウイルスに起因する疾患群を対象としたものに止まらず、より普遍的な疾患群に共通する機序解明につながる可能性も秘めており、特に本邦において盛んな研究が行われている。しかしこれら HTLV-I 関連疾患の発症機序については依然不明な部分が多い。

著者らはヒト HTLV-I 関連疾患の病因と効果的な治療法の解明に用い得る疾患モデル動物の開発を目的として、近交系ラットを用いた HTLV-I 感染症モデル系の作製を試みてきた結果、WKAH ラットに HTLV-I 感染細胞を接種することにより、ヒト HAM/TSP 様の慢性進行性脊髄症を発症するラットモデル (HAM ラット病) の樹立に成功した。HAM ラットでは、(1)両後肢の痙性対麻痺、高度筋萎縮、尿失禁の出現、(2)胸髄を中心とした前側索周辺帯における左右対称性の白質変性、髄鞘の破壊と再生を伴う脱髄変性および空胞変性、(3)病変部位に一致したアポトーシス細胞の出現、(4)髄鞘断片を貪食したマクロファージの高度な浸潤、およびアストロサイトの増生 (アストログリオーシス) が観察されている。更に分子生物学的解析から、(1)全身諸臓器へのウイルス感染、(2)HTLV-I pX mRNA の限定された臓器 (神経系では病変を発症する脊髄や坐骨神経のみ) での発現、(3)脊髄での TNF- α の mRNA 発現及び髄液中の TNF- α の存在が示され、HAM ラット病における脱髄病変発症と HTLV-I プロウイルス DNA の mRNA 発現及び TNF- α の存在との関連性が示唆されている。

この様に HAM ラットの病変脊髄における神経病理学および分子生物学的変化は次第に明らかになりつつあるが、病変の主体である脱髄に対するこれらの諸変化の位置づけは明らかでない。すなわちこれらの変化が脱髄の原因として関与するのか、あるいは結果としてむしろ生体防御反応の一部として生ずるのかは不明である。そこで本研究では HAM ラット病に認められるこれら諸変化のうち、神経病理学的変化としてアポトーシス細胞の出現、マクロファージ浸潤およびアストロサイトの増生、分子生物学的変化として病変脊髄における HTLV-I pX プロウイルス DNA の出現、および HTLV-I pX と TNF- α の mRNA 発現に各々着目し、これら諸変化の発現を経時的に解析した。

材料及び方法

1. 動物：近交系 WKAH/Hkm ラット (雄性) を用いた。
2. 細胞株：HTLV-I 産生不死化ヒト T 細胞株である MT-2 細胞を用いた。
3. HAM ラット病の誘発：生後 24 時間以内の新生仔 WKAH ラットの腹腔内に 1×10^7

個の MT-2 細胞を接種し、抗体陰性の HTLV-I 感染ラットを作製した。感染後経時的に生食液で全身灌流を行ったラットから、DNA・RNA 抽出用および病理学的解析用に各臓器を分取した。

4. 免疫組織化学：4～25 月齢の感染ラット（計 25 頭）、および対応する月齢の正常対照ラット（計 12 頭）の脊髄胸索のパラフィン切片を作成し、(1)ED-1 抗体（マクロファージ及び活性化ミクログリア）、(2)抗 GFAP（Grial fibrillary acidic protein）抗体（アストロサイト）、(3)抗 MOG（Myelin oligodendrocyte glycoprotein）抗体（オリゴデンドロサイト）による免疫染色を施した。またアポトーシス細胞の検出には TUNEL 法を用いた。各染色に対する陽性細胞数の定量的解析には、各ラット胸髄から少なくとも 3 切片の染色標本を作成し、標本の全領域中に存在する陽性細胞数を計測して平均値を算出した。更にアポトーシス細胞の同定のために、成熟（9～12 箇月齢、5 頭）および老齢（21～26 箇月齢、4 頭）の感染ラット胸髄から切片を作製し、異なる発色基質を用いた免疫染色及び TUNEL 法の二重染色を行った。
5. HTLV-I プロウイルスゲノムの検出：病理組織学的解析に用いたのと同個体の HTLV-I 感染ラットから採取した脊髄組織から DNA を単離後、HTLV-I-pX 領域のプライマーを用いた PCR 法によりプロウイルスゲノムを検出した。
6. HTLV-I pX および TNF- α mRNA の検出：HTLV-I 感染ラット脊髄から総 RNA を抽出した後、RT-PCR 法により HTLV-I pX 及び TNF- α の mRNA を検出した。

結果及び考察

1. HTLV-I 感染ラットの脊髄における神経病理学的変化の経時的解析から、アポトーシス細胞の出現（感染 7 箇月後）が、脱髄性変化（感染 12 箇月後）や ED-1 陽性細胞（浸潤マクロファージ/活性化ミクログリア）の著明な増加（感染 15 箇月後）、アストロサイトの活性化（感染 20 箇月後）に先行して起こることを明らかにした。
2. HAM ラット病脊髄に認められるアポトーシス細胞は、成熟（9～12 箇月齢）ラットではほとんどがオリゴデンドロサイトであったのに対して、老齢（21～26 箇月齢）ラットでは 60%がオリゴデンドロサイト、30%が ED-1 陽性細胞であった。
3. 分子生物学的解析から、HTLV-I ウイルスの病変脊髄への感染（感染 4 箇月後以前）、および HTLV-I pX ならび TNF- α の mRNA 発現（感染 7 箇月後）が、すべての病理学的変化に先行することが示された。
4. 以上の結果から HAM ラット脊髄においては、HTLV-I pX 発現に伴う TNF- α 等の傷害性因子の産生を介した間接的な、あるいは HTLV-I 感染による直接的な機序によりオリゴデンドロサイトのアポトーシスが first event として生じ、これに続いて脱髄性変化が開始され、更に著明なマクロファージの浸潤やアストロサイトの活性化、および後肢麻痺等の臨床症状へと進展する一連の機構が推察された。

結語

HTLV-I 感染による神経病変の発症機構に関する知見は、従来からの神経病理学的解析に加えて近年の分子生物学的解析により飛躍的に増加したものの、未だ不明な点も多く、今後の基礎的、臨床的研究の成果が待たれる。基礎的研究の材料としてわれわれが樹立した HAM ラット病モデルは、ヒト HAM/TSP のモデルとしてばかりでなく、HIV-I 感染による空胞性脊髄症や多発性硬化症等の発症機構を解析するうえで貴重なモデルになるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 田 代 邦 雄

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

HTLV-I 感染ラットの病変脊髄における神経病理学的、 分子生物学的変化の経時的解析

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) はヒトで最初の病原性レトロウイルスとして分離同定された後, 成人 T 細胞白血病をはじめとして HTLV-I 関連脊髄症/熱帯性進行性痙性麻痺 (HAM/TSP), 関節症, ぶどう膜炎等種々の疾患の病因ウイルスであることが明らかにされが, これら疾患の発症機序については依然不明な部分が多い. 申請者らはヒト HTLV-I 関連疾患の病因と効果的な治療法の解明に向け, ヒト HAM/TSP 様の慢性脊髄症を発症するモデルラット (HAM ラット病) を樹立, 解析してきた. これまでに HAM ラットの病態として, (1)両後肢の痙性対麻痺, 筋萎縮, 尿失禁等の臨床症状発症, (2)胸髄前側索周辺帯における左右対称性の白質脱髄変性, (3)病変部位に一致したオリゴデンドロサイトのアポトーシス死, マクロファージの浸潤, 及びアストログリオシスを明らかにしてきた. また分子生物学的解析から, (1)全身諸臓器へのウイルス感染, (2)HTLV-I pX mRNA の限定された臓器 (神経系では脊髄や坐骨神経のみ) での発現, (3)脊髄での TNF- α の mRNA 発現及び髄液中の TNF- α の産生を証明してきた. これらの結果から, HAM ラット病における脱髄病変発症には HTLV-I pX mRNA 発現及び TNF- α の産生が密に関連することが示された. そこで本研究では HAM ラット病に認められるこれら諸変化の関連性を明らかにする目的で, 各々の発現を経時的に解析した. 研究に用いた HAM ラットは既報に従い, 生後 24 時間以内の新生仔 WKAH ラットの腹腔内に 1×10^7 個の MT-2 細胞 (HTLV-I 産生不死化ヒト T 細胞株) を接種して作成した. 4~26 月齢の感染ラット及び対応月齢の無処置対照ラットから経時的に胸髄パラフィン切片を作成し, ED-1 抗体 (マクロファージ及び活性化ミクログリア), 抗 GFAP (Grial fibrillary acidic protein) 抗体 (アストロサイト), 抗 MOG (Myelin oligodendrocyte glycoprotein) 抗体 (オリゴデンドロサイト) による免疫染色, 及び TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出を行い, 陽性細胞数を計測した. 更にアポトーシス細胞の同定のために, 各月齢の感染ラット胸髄切片に免疫染色及び TUNEL 法の二重染色を施した. 一方病理組織学的解析と同一個体の感染ラット脊髄組織から抽出した DNA 及び RNA を用いて, HTLV-I プロウイルスゲノム (pX 領域) の

検出 (PCR 法) 及び HTLV-I pX, TNF- α mRNA の検出 (RT-PCR 法) を行った。

HTLV-I 感染ラット脊髄における神経病理学的変化として、アポトーシス細胞の出現 (感染 7 箇月後) が、脱髄性変化 (感染 12 箇月後) や ED-1 陽性細胞 (浸潤マクロファージ/活性化ミクログリア) の著明な増加 (感染 15 箇月後), アストロサイトの活性化 (感染 20 箇月後) に先行することを明らかにした。これらのアポトーシス細胞は、成熟 (9~12 箇月齢) ラットではほとんどがオリゴデンドロサイトであったのに対して、老齢 (21~26 箇月齢) ラットでは 60% がオリゴデンドロサイト, 30% が ED-1 陽性細胞であった。更に感染ラット脊髄の分子生物学的解析から、HTLV-I ウイルスの病変脊髄への感染 (感染 4 箇月後以前), 及び HTLV-I pX ならび TNF- α の mRNA 発現 (感染 7 箇月後) が、すべての病理学的変化に先行することが示された。以上の結果から HAM ラット脊髄においては、HTLV-I pX 発現に伴う TNF- α 等の傷害性因子の産生を介した間接的な、あるいは HTLV-I 感染による直接的な機序によりオリゴデンドロサイトのアポトーシスが初期病変として生じ、これに続いて脱髄性変化が開始され、更に著明なマクロファージの浸潤やアストロサイトの活性化、および後肢麻痺等の臨床症状へと進展する一連の機構が推察された。

申請者の学位論文内容の発表後、副査の田代邦雄教授から、脱髄が胸髄に生ずる理由、後肢麻痺の性質 (痙性が弛緩性か), axon 破壊の有無についての質問があった。

次いで副査の長嶋和郎教授から、伝導路と病変部位との関係、脳での TNF- α の発現、各臓器での pX 以外の mRNA の発現、アポトーシスと caspase の関連性、オリゴデンドロサイトの同定に用いた抗体の選択理由についての質問があった。

最後に主査から、ヒト HAM モデルとしての妥当性、pX-トランスジェニックマウスに関する最新情報、今後の検討項目 (感染経路, caspase との関連, ヒト疾患治療への応用) についてのコメントがなされた。

申請者はいずれの質問にも過去の文献や実験結果等を引用しつつ適切に回答した。

HAM ラット病モデルは、ヒト HAM/TSP のモデルとしてばかりでなく、HIV-I 感染による空胞性脊髄症や多発性硬化症等の発症機構を解析するうえで貴重なモデルになるものと考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。