

HTLV-I 感染による HAM 感受性および 抵抗性ラットの脊髄における遺伝子発現の解析

学位論文内容の要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (human T-cell leukemia virus type-I; HTLV-I) は、成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスであるのみならず、HTLV-I 関連脊髄症/熱帯性痙性対麻痺 (HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; HAM/TSP)、HTLV-I 関連関節症、ぶどう膜炎、シェーグレン症候群類似の唾液腺炎など HTLV-I 関連疾患と総称される様々な疾患を引き起こすことが知られている。HTLV-I 産生ヒト T 細胞株 MT-2 を新生仔期の近交系 WKAH/Hkm (以下 WKAH) ラットに接種すると約 15~22 ヶ月の潜伏期を経てヒト HAM/TSP に類似する慢性進行性脊髄末梢神経症 (HAM ラット病) を発症する。WKAH 以外の 6 系統の近交系ラットに MT-2 を接種しても、血中に抗 HTLV-I 抗体を検出するが、HAM ラット病は発症しない。HAM ラット病の神経病理は、胸髄を中心とする白質変性、脱髄であるが、病変の進行を通じて有意なリンパ球浸潤は認められない。HTLV-I 感染後 3 ヶ月目以降から HAM 感受性、抵抗性に関わらずプロウイルスは全身臓器において検出されるが、HAM 感受性ラットの脊髄においてのみ、感染後 7 ヶ月をピークとして HTLV-I の主要な機能蛋白質である p40-Tax 蛋白をコードする pX 遺伝子の選択的発現が起こる。それと同時期からオリゴデンドロサイトのアポトーシスも確認される。

インターフェロン (IFN) γ は、免疫系のみならず種々の細胞の分化、増殖、活性化を調節し、生体の防衛機構に重要な働きを有するサイトカインである。IFN- γ の発現亢進は脳脊髄炎に対して有害な影響をもたらすものと考えられてきたが、近年、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症抑制や、ウイルスの中樞神経系からの排除に IFN- γ が関与しているという報告が相次いでいる。そこで本研究では、脊髄における pX の急激な発現増強を認める感染後 7 ヶ月目に着目し、HAM ラット病発症の有無に IFN- γ が関与しているのかどうかを HAM 感受性である WKAH ラットと HAM 抵抗性である ACI および LEW ラットとを比較することによって検討した。

リアルタイム RT-PCR 解析により、HTLV-I に感染してから 7 ヶ月後の HAM 抵抗性ラットである ACI および LEW の脊髄において、非感染時に比較して IFN- γ mRNA の有意な発現亢進 ($p < 0.05$) が認められたが、HAM 感受性ラットである WKAH では感染によって変化は認められなかった。さらに脊髄蛋白抽出液を用いた ELISA 法によっても、mRNA の発現で見られた変化と同様な抵抗性ラット

での IFN- γ 高発現の傾向が認められた。一方、感染後 7 ヶ月における末梢血単核球(PBMC)および脾臓においては有意な IFN- γ mRNA の発現変化はどの系統にも認められなかった。感染後 3 ヶ月、14 ヶ月での脊髄においてもこれら 3 系統いずれにおいても IFN- γ mRNA の亢進は認められなかった。また、IFN- γ に見られた変化と同様に、HTLV-I 感染 7 ヶ月後の ACI、LEW において脊髄における Interleukin-12 (IL-12) および Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) の mRNA の発現に有意な亢進 ($p < 0.05$) を認めたが、WKAH ではこのような変化は認められなかった。

次に HTLV-I 感染による IFN- γ の発現亢進が著明であった HAM 抵抗性ラット系統である LEW と HAM 感受性 WKAH ラットを用いて、*ex vivo* によるラット脊髄での IFN- γ 産生細胞の同定を行った。本実験では、IFN- γ を産生するとの報告があるニューロンとアストロサイトに注目した。HTLV-I 感染 7 ヶ月後のラット脊髄より分離したニューロン・グリア共培養系細胞を 5 日間培養し、抗 IFN- γ 抗体との蛍光抗体二重染色を行い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察した。なお、ニューロンに対しては抗 Neurofilament 抗体、アストロサイトに対しては抗 GFAP 抗体を使用した。その結果、HTLV-I 非感染のラットにおいて、HAM 抵抗性、感受性に関わらずニューロンの約 20%、アストロサイトの約 10% に IFN- γ 陽性像を認めた。一方、HTLV-I 感染 LEW においては、ニューロンの 60.8% が IFN- γ 陽性像を示した。感染により陽性率が増加したばかりでなく、非感染時に見られたよりも強い陽性像が認められた。それは、ニューロンの細胞質部分のみならず、伸長した軸索における IFN- γ 強陽性像により示されている。一方で、アストロサイトにはニューロンで見られたような感染による IFN- γ 陽性細胞の増加、強陽性像は観察されなかった。以上より、HTLV-I 感染後 7 ヶ月の HAM 抵抗性ラット脊髄における IFN- γ の主要な産生細胞はニューロンであることが明らかとなった。HAM 感受性の WKAH では LEW で見られたような感染によるニューロンでの IFN- γ 産生亢進は確認されなかった。また、ニューロンのうち 300 μ m 以上の神経軸索伸長を示した細胞の割合を算定した結果、HTLV-I 感染 LEW では非感染 LEW に比較して神経軸索伸長を示した割合が 2.25 倍に増加していた。このような変化は HAM 感受性である WKAH には認められなかった。IFN- γ および IL-12 は神経軸索伸長を亢進することが報告されており、HTLV-I 感染 HAM 抵抗性ラットの脊髄で認められた IFN- γ および IL-12 mRNA の発現の亢進が神経軸索伸長に直接または間接的に作用し、HTLV-I 感染 LEW のニューロンの分化誘導の要因となっているのではないかと思われた。

末梢血において IFN- γ の発現の強力な誘導には IL-12 が関与し、中枢神経系においても IL-12 はミクログリアが産生しているとされている。WKAH の脊髄で IFN- γ が発現しない原因として IL-12 の低発現を考え、培養神経系細胞をリコンビナント IL-12 で刺激し、IFN- γ の産生が誘導されるか検討した。その結果、HAM 抵抗性 LEW ラットでは IL-12 の添加または HTLV-I の感染により IFN- γ 産生が亢進するのに対し、HAM 感受性 WKAH ではその応答がないことが明らかとなった。さらに、その原因として IL-12 のシグナル伝達に重要な IL-12R β 2 鎖の発現不応答性が確認された。したがって、HAM 感受性 WKAH の脊髄における IFN- γ の低発現には IL-12 の低産生のみならず、IL-12 とそのレセプターを介したシグナル伝達系の異常が関与していることが示唆された。

今後、HAM 感受性ラットに認められた脊髄における HTLV-I に対する IFN- γ の反応性の欠如が HTLV-I 特異的なものなのか、他のウイルス感染時にも共通して認められるものなのかを確認する必要がある。そして、WKAH ラットに認める IL-12 を介した IFN- γ シグナル伝達系の分子機構に存在すると思われる何らかの障害をさらなる検討によって解明することが、ヒト HAM/TSP に対しても病因解明の一助になることと考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典

副 査 教 授 佐々木 秀 直

副 査 教 授 瀬 谷 司

学 位 論 文 題 名

HTLV-I 感染による HAM 感受性および 抵抗性ラットの脊髄における遺伝子発現の解析

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) は、成人 T 細胞白血病の原因ウイルスであるのみならず、HAM/TSP、慢性関節炎など、HTLV-I 関連疾患と総称される自己免疫疾患に類似した様々な疾患を引き起こすことが知られている。当教室では、特定のラット系統、WKAH ラットに HTLV-I を持続感染させることにより、15~22 ヶ月の潜伏期間を経て、ヒト HAM/TSP に類似する両後肢の対麻痺、尿失禁を特徴とする脊髄症を誘導させることに成功し、HAM/TSP の動物モデル、HAM ラット病と命名し、研究を行ってきた。HAM ラットにおける神経病理学的所見は、胸髄を中心とする白質変性、脱髄であるが、有意なリンパ球浸潤はない。HTLV-I 感染後 3 ヶ月目以降から HAM 感受性、抵抗性に関わらずプロウイルスは全身臓器において検出されるが、HAM 感受性ラットの脊髄においてのみ、感染後 7 ヶ月をピークとして HTLV-I の主要な機能蛋白質である p40-Tax 蛋白をコードする pX 遺伝子の選択的発現が起こることが明らかとなっている。一方、インターフェロン (IFN)- γ の発現亢進は脳脊髄炎に対して有害な影響をもたらすものと考えられてきたが、近年、IFN- γ の脳神経炎に対するプロテクティブな作用についての報告が相次いでいる。

本研究では、HAM/TSP の発症と IFN- γ の関連を解明するために、HTLV-I 感染によってウイルスメッセージの急激な発現亢進が起こる感染後 7 ヶ月目の脊髄を使用し、HTLV-I 感染に対する IFN- γ の関与を HAM 感受性および抵抗性ラットとを比較することによって検討した。その結果、HAM 抵抗性ラットでは脊髄での IFN- γ の発現亢進を認めたが HAM 感受性ラットでは認めなかった。そして、HAM 抵抗性ラット脊髄において感染により IFN- γ の産生が誘導される細胞は、主にニューロンであった。さらに、HAM 感受性の WKAH ラットでは IL-12 レセプター $\beta 2$ 鎖の IL-12 に対する不応答性が認められ、これが HAM ラット病感受性の一因となっていることが示唆され、ヒト HAM/TSP 発症に関しても HTLV-I 感染者の脊髄局所での抗ウイルス性 IFN- γ 発現応答の個体間差が発症に関わる重要な因子になっている可能性が考えられた。

公開発表において、副査の佐々木 秀直教授より、神経細胞のように分化した細胞からの IFN- γ の発現機序は既知の発現と同じであるのか、IL-12、IL-12 レセプターの発現の産生性を決定しているものは何か、ヒト HAM/TSP においても今回の結果と同様のことが言えるかについて質問があった。これらの質問に対して申請者は、ニューロンからの IFN- γ の産生の機序についての報告がまだされていないこと、IL-12 の低発現の原因に関しては、

IFN- γ による IL-12 産生の誘導の経路も存在するので結果的に IFN- γ の HAM/TSP 低産生が IL-12 の低産生性を引き起こすと考えていること、ヒト HAM/TSP においても IL-12 レセプター β 2 鎖の応答異常が存在する可能性があるということについてなど概ね適切に回答した。次いで、副査の瀬谷 司教授より、ヒト HAM/TSP において IFN- γ の報告はあるのか、HAM ラット病の発症の決定的要因が IFN- γ であると考えているのか、ラットの系統差における遺伝子的背景はわかっているのか、脾細胞において IL-12 の刺激に対して IL-12 レセプター β 2 鎖の発現の系統差が生じているが、脾臓では IL-12 の発現の系統差は認められていなかったがそれはどう考えているのかという質問があった。これらの質問に対しても、ヒト HAM/TSP に関しては、現在のところ IFN- γ の悪影響に関する報告が多く、プロテクト作用に関しては未だ報告がなされてはいないこと、ラットの系統別による遺伝子的背景はまだ不明であること、感染による脾臓での IFN- γ の発現に変化が確認できなかったのは、脊髄よりも発現量が脾臓では高いためとし、逆に脊髄での発現量が微量であったため感染による微妙な変化を検出できたのではないかということなどほぼ妥当な回答をした。最後に、主査の笠原正典教授より、IL-12 に対する IL-12 レセプター β 2 の不応答性に関する解析の今後の方向性とこの実験動物の解析を進めていくことが HAM/TSP の発症のメカニズムの解明に重要であるとの助言を受けた。

この論文は、HAM/TSP の発症と IFN- γ の関連について、HTLV-I 感染による HAM 抵抗性ラット脊髄におけるニューロンでの IFN- γ の誘導による保護作用、HAM 感受性ラットにおける IL-12 レセプター β 2 鎖の IL-12 に対する不応答性を明らかにしたことで高く評価され、今後の IL-12 レセプター β 2 鎖の不応答性とヒト HAM/TSP 発症との関連性の究明が期待される。

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。