

論文の内容の要旨

論文題目 ビンスワンガー型白質脳症モデル動物の作出
と病理学的解析

氏名 升村 誠

脳血管性痴呆はアルツハイマー病と並び高齢者の痴呆の主要な原因となる疾患である。中でも大脳深部白質の広汎な慢性虚血性病変により、認知機能障害、歩行障害、発動性の低下などを生じる、ビンスワンガー病型白質脳症 (BD)は、脳血管性痴呆の代表的な一病型であるが、その病態をよく再現する実験モデルの欠如が病態解析と治療法開発に向けての障害となってきた。近年、虚血性大脳白質病変の実験モデルとしては、砂ネズミやラットを用いた慢性低灌流モデルが報告され、実験的に白質病変が作出可能であることが示されはじめている。しかしながら、BDを含むヒトの慢性的な脳虚血では、高血圧や糖尿病などに起因する血管病変が重要な危険因子となっており、若齢の正常動物に慢性脳虚血を誘発するだけでは、ヒトと同様の大脳白質病変を再現することは困難と考えられる。

本研究では、加齢に伴って高血圧を自然発症する spontaneously hypertensive rats (SHR)を用い、高血圧を発症後に総頸動脈結紮を施行することにより BD に類似した虚血性大脳白質病変を生じる実験動物モデルの作出を試み、またその病態について詳細に解析した。

1. SHR の両側総頸動脈結紮による虚血性大脳白質病変モデル動物の作出

実験動物として 20 週齢の SHR、対照として Wistar Kyoto rats (WKY)を用いた。ラットの右総頸動脈を絹糸で二重結紮した 7 日後に、左総頸動脈を同様に二重結紮し、血圧および屠殺後の神経病理学的変化を経時的に検討した。SHR および WKY 共に、両側総頸動脈結紮 (BCAL)後各偽手術群に比して 15~25%の血圧上昇が見られ、4 週後の実験終了日まで維持された。病理学的には、SHR および WKY 共に、BCAL 1~2 週後から脳梁、内包、視索等の白質領域において髄鞘染色性の淡明化が観察された。髄鞘そのものを染色する Klüver-Barrera (K-B)染色では、髄鞘染色性の淡明化には両系統間で明らかな差は認められなかった。しかし、BCAL 後の SHR では WKY に比べて脳梁、内包、視索において、アポトーシス細胞を反映する TUNEL 陽性反応やミクログリアの活性化が顕著に観察された。この TUNEL 陽性細胞は形態学的にオリゴデンドロサイト (OLG)であると考えられた。また髄鞘淡明化部位に TNF- α および TNF 受容体 I (p55)陽性細胞が多数観察され、これらはそれぞれミクログリアと OLG と考えられた。SHR の白質領域における TUNEL 陽性反応、ミクログリアの活性化および TNF- α 陽性反応は、BCAL 後の時間経過とともに増強した。断片化 DNA 量を ELISA 法により定量化すると、SHR では WKY に比べて BCAL 後の前脳における DNA 断片化が顕著に増強していた。断片化は約 1 週間でピークとなり、その後徐々に低下した。BCAL 4 週間後の SHR の脳梁を電子顕微鏡的に観察すると、クロマチンが凝集したアポトーシス様の像を示す OLG が観察された。BCAL 後の脳弓海馬采、視索に形成された空胞の数は、SHR において 1~2 週後以降有意な増加が認められた。次に RT-PCR 法を用いてアポトーシス関連分子の mRNA 発現を評価した。BCAL 後 4 週間後の SHR および WKY ラット脳では、TNF- α 、Ich-1(カスパーゼ-2)、CPP32 (カスパーゼ-3) mRNAs の発現増強、および TNF 受容体 I mRNA の発現が認められた。免疫組織化学的にも BCAL 後 4 週間後の SHR 白質領域では OLG のマーカー蛋白である *Adenomatous polyposis coli* (APC)陽性細胞に Ich-1、CPP32 および TNF 受容体 I の免疫反応性が観察された。前脳溶解液を用いたカスパーゼ-2 & -3 酵素アッセイでは、共に BCAL 後の明瞭な酵素活性の上昇は認められなかった。Fas (CD95) mRNA および Fas 免疫陽性が共に検出できなかったことを考え合わせると、白質障害に伴う OLG の細胞死が TNF 受容体 I \rightarrow カスパーゼ-2 or -3 の経路を介したアポトーシスである可能性が示唆された。更に OLG 細胞死の経時変化を定量化することを目的に、OLG に特異的な細胞マーカーである proteolipid protein (PLP) mRNA の発現を *in situ* hybridization 法により検出し、上記白質領域における PLP mRNA 陽性 OLG 密度を評価した。SHR、WKY 共に各白質部位において OLG 数は経時的に軽度の減少を示したが、細胞数の変化に有意差は見られなかった。OLG が再生・修復されているか、

または TUNEL 陽性を示す細胞障害を生じているが細胞死には至らない可能性が示唆された。

以上、SHR の両側総頸動脈を結紮することにより、病理学的に髄鞘淡明化を伴う BD 様の病変を示す実験モデルを作出した。

2. ビンスワンガー型白質脳症 (BD)患者大脳白質の病理組織学的検討

BD の病理学的変化との異同を検討するため、臨床例の剖検脳組織について、特に DNA 断片化を伴う OLG の細胞障害が観察されるか否かに着目して比較検討した。BD 5 例および痴呆症状のない対照高齢者 5 例の大脳前頭葉白質のパラフィン切片を組織学的に検討した。

BD 全例において、大脳白質における TUNEL 陽性細胞数が対照例に比べて増加していた (生理的加齢 : $10.6 \pm 8.7 / \text{mm}^2$, BD : $150.9 \pm 102.7 / \text{mm}^2$, $p < 0.01$)。また、BD 白質では PLP mRNA 陽性 OLG が対照例に比べて僅かに減少していたが、その差は僅かであった (生理的加齢 : $973.8 \pm 97.3 / \text{mm}^2$, BD : $923.5 \pm 99.9 / \text{mm}^2$)。GFAP 陽性 astrocyte の密度は、対照例で $187.0 \pm 26.1 / \text{mm}^2$ に対し BD で $137.4 \pm 49.1 / \text{mm}^2$ と有意な減少を認めた ($p < 0.05$)。BD 患者大脳白質の TUNEL 陽性および APC 陽性 OLG 様細胞の一部は、活性型カスパーゼ-3 (p20/17)特異抗体で陽性に染色された。しかしこの陽性反応が認められたのは、BD 5 例中 2 例にとどまり、対照例のうち 1 例にも僅かに陽性反応が観察されたため、OLG におけるカスパーゼ-3 の活性化は BD に特異的な現象とは断定できないと考えられた。

以上のように、BD 患者大脳白質においても DNA 断片化を伴う OLG の細胞障害が観察されたが、モデル動物同様細胞脱落は顕著ではなく、典型的なアポトーシスによる細胞死が進行しているのではない可能性が示唆された。

3. ラット慢性脳低灌流モデルの脳梁白質グリア細胞に対するアデノウイルスを用いた外来遺伝子導入の試み

SHR の BCAL による虚血性大脳白質病変モデル動物においても、BD 患者大脳白質病変部位においても、OLG は DNA 断片化を伴う障害を受けているが細胞密度に有意な減少は見られなかった。そこで、白質障害部位に存在する OLG の機能回復を図るため、何らかの治療的介入の余地があると考え、遺伝子治療の可能性について検討を試みた。WKY および SHR BCAL 25 日後に、LacZ 遺伝子を挿入したアデノウイルスベクター (AxCALacZ)を脳定位固定装置を用いて脳梁に注入し、5 日後に遺伝子導入効率を検討した。AxCALacZ 注入 5 日後の脳梁では、BCAL した WKY, SHR、およびそれぞれの対照例において LacZ 遺伝子の発現を示す β -gal 陽性細胞が観察された。脳梁における β -gal 陽性細胞には、GFAP 陽性アストロサイト、APC 陽性 OLG が含まれており、この両者を含めて β -gal 陽性細胞密度をカウントした。非手術 WKY, SHR, 慢性低灌

流 WKY および慢性低灌流 SHR における β -gal 陽性細胞密度は、 149.8 ± 10.7 , 157.6 ± 15.9 , 150.9 ± 5.8 および 252.8 ± 17.8 ($/\text{mm}^2$)であり、慢性低灌流 SHR で遺伝子導入効率の有意な上昇が認められた。アデノウイルスの感染に際しては、アデノウイルスの外殻蛋白 penton base と宿主細胞表面の α V-integrin の結合によって能動的にウイルスが取り込まれると考えられており、 α V-integrin の発現レベルが高いほどアデノウイルスの感染効率が向上することになる。そこで本モデル脳梁における α V-integrin の発現について調べたところ、BCAL の有無に関わらず WKY と SHR の脳梁において α V-integrin 陽性細胞が観察された。非手術 WKY, SHR, 慢性低灌流 WKY および慢性低灌流 SHR の脳梁における α V-integrins 陽性細胞密度は、 185.6 ± 9.2 , 177.6 ± 36.7 , 180.3 ± 22.2 および 274.1 ± 25.7 ($/\text{mm}^2$)で、慢性低灌流 SHR において α V-integrin 陽性細胞の有意な増加が認められた。

虚血侵襲によって α V-integrin、特に α V β 3 の発現誘導が、虚血後非常に遅い時期のグリア細胞および血管内皮細胞に起こることが報告されており、本慢性低灌流 SHR においても同様の結果が得られたことと一致している。次に BD 患者および対照例各 5 例の前頭葉白質における α V-integrin の発現を検討すると、血管内皮細胞および中膜平滑筋細胞に加えて一部の GFAP 陽性アストロサイトおよび APC 陽性 OLG にも陽性反応が観察された。白質領域における血管以外の α V-integrin 陽性細胞密度は、BD 患者および正常コントロールでそれぞれ 45.6 ± 2.3 および 33.0 ± 1.0 ($/\text{mm}^2$)で、BD 患者で有意に増加していた。以上の結果から BD の白質障害部位に対してアデノウイルスベクターによる遺伝子治療が有効である可能性が示唆された。