

氏名 (本籍)	小 林 一 博 (愛知県)
学位の種類	博 士 (医学)
学位授与番号	甲第 1006 号
学位授与日付	平成 28 年 2 月 17 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Early microlesion of viral encephalitis confirmed by galectin-3 expression after a virus inoculation
審査委員	(主査) 教授 山 口 瞬 (副査) 教授 竹 内 保 教授 岩 間 亨

論文内容の要旨

Galectin-3 は、 β ガラクトシドに特異的に結合する、30 kD のタンパク質である。Galectin-3 は、細胞増殖、アポトーシス、mRNA スプライシング、炎症などにおいて重要な働きをすることが示されている。また Galectin-3 は、自己免疫疾患モデルマウスの脳において、マイクログリアの活性化と関係することが示されているが、中枢神経系の病的な状態における役割は十分に解明されていない。

一方、Encephalomyocarditis virus (EMCV) は、マウスを含む様々な動物において、急性心筋炎と脳炎を引き起こすことが知られている。本研究では、EMCV をマウスに感染させ、感染急性期における脳組織での Galectin-3 の発現パターンを免疫組織化学的な手法を用いて調べ、Galectin-3 の局在性と経時的な変化に着目した解析を行った。これらの解析を通じて、ウイルス性脳炎における Galectin-3 の病態への関与の有無について明らかにすることを目指した。

【対象と方法】

【ウイルス接種】 生後 6 週の C57BL/6J 雄マウスに、500 plaque forming units (pfu) の EMCV を生理食塩水 0.1 mL に混じて腹腔内投与した。EMCV の接種日を day 0 と設定した。

【組織標本】 EMCV を接種したのち、接種後 12 h (hours), 24 h, 48 h, 96 h, 7 days, 10 days の時点で経心臓的に 10%ホルマリン溶液による灌流固定を行った。その後、脳の切除を行い、冠状断で分割した。それらのサンプルからパラフィン包埋ブロックを作成し、3 μ m で薄切を行い hematoxylin and eosin (HE) 染色標本を作成した。

【免疫組織化学染色・蛍光免疫染色】 anti-mouse Galectin-3/Mac2 抗体と、マイクログリアを標識する anti-Iba-1 抗体を用いて、上記 12 h, 24 h, 48 h, 96 h, 7 days, 10 days 各時間の切片に対する免疫組織化学染色を施行した。また 96 h の切片に対して蛍光免疫染色を施行した。

【結果】

【Galectin-3, Iba-1 の染色性の評価】 上記標本に対して小脳、海馬、視床および大脳半球の 4 箇所、免疫組織化学染色の評価を行った。免疫染色における発現量は 3 段階で評価した。Galectin-3 陽性細胞がみられない場合を(-), Galectin-3 陽性細胞はみられるが 5 個未満である場合を(+), Galectin-3 陽性細胞が 5 個以上みられる場合を(++)とした。0 h から 24 h まで、すべての脳領域において Galectin-3 陽性細胞はみられなかった。48 h の時点では、小脳領域において少数 (<5 細胞) の非常に明瞭な陽性細胞を含む小病変が観察され、(+) の結果であった。96 h 以上経過した標本においては、小脳、海馬、視床および大脳半球いずれにおいても、脳の退行変性をともなう領域で

Galectin-3 陽性細胞が多数みられ, (++)の結果であった。一方 Iba-1 は, 0 h から 48 h まで, 正常マイクログリアに軽微な陽性所見を認めたが, 発現パターンに変化は見られなかった。96 h 以降, いずれの領域においても病変部で強い発現の増強を認めた。

Galectin-3 と Iba-1 の染色性を比較すると, Iba-1 の発現に変化がみられない 48 h の時点で, Galectin-3 は少数の細胞に, 非常に明瞭な陽性像を示していた。96 h 以降の染色性の比較では, Iba-1 が病変部に限局しない広範な染色像を示したのに対し, Galectin-3 は病変部に限局した染色像を示していた。Galectin-3 陽性細胞は EMCV による病変に一致しているのに対して, Iba-1 陽性細胞の範囲は病変周囲の反応性領域にも広がっていると考えられた。

【蛍光免疫染色による Galectin-3, Iba-1 の二重染色と共染細胞の評価】

EMCV 感染後 96 h の蛍光免疫染色では, Galectin-3 と Iba-1 が共染する細胞がみられた。また Galectin-3 陽性細胞の存在する領域は病変部分に限局し, Iba-1 陽性細胞の存在する領域に包含されるように存在しており, 免疫組織化学染色の所見と合致していた。Galectin-3 陽性細胞は, Iba-1 を発現し, さらに肥大化した突起を有することから, 活性化したマイクログリアと考えられた。

【EMCV 感染後 48 h の脳組織における Galectin-3 陽性細胞の評価】

48 h の時点では, 小脳においてのみ, Galectin-3 陽性細胞を含む微小病変部位が検出された。この微小病変部位は小脳において, 切片当たり 1~2 個の割合で検出された。しかし通常の HE 染色では, これらの病変部位において形態学的な変化を捉えることはできなかった。

【考察】

本研究により, EMCV 感染による脳炎では, 急性期に Galectin-3 の発現が脳の広範な領域で増加することが示された。また, Iba-1 では染色性に変化が見られない時点 (EMCV 感染後 48 h) でも, Galectin-3 は小脳で非常に限局的かつ特徴的な染色性を示しており, EMCV による脳炎のごく初期から, 病変部の活性化マイクログリアにおいて高発現していることが明らかにされた。脳組織においては, 感染後 48 h の時点で初めて, EMCV の mRNA が PCR 法で検出可能となることから, Galectin-3 が EMCV による脳炎の初期段階から, 神経細胞変性における重要因子として働いていると考えられた。

【結語】

Galectin-3 がウイルス性脳炎における初期診断のバイオマーカーとなりうる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

申請者 小林一博は, 脳炎を引き起こす Encephalomyocarditis virus (EMCV) をマウスに感染させ, 感染急性期における脳組織での Galectin-3 の発現パターンを, 免疫組織化学的手法で解析した。その結果, EMCV による脳炎では, Galectin-3 の発現が脳の広範な領域で増加すること, Galectin-3 陽性細胞は活性化マイクログリアと一致すること, さらに Galectin-3 の発現は他のマーカーでは検出できない早い時期から観察されることを明らかにした。本研究の成果は, ウイルス性脳炎の病態に関して新たな知見を加えるものであり, 脳病理学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Kazuhiro Kobayashi, Masayuki Niwa, Masato Hoshi, Kuniaki Saito, Kenji Hisamatsu, Yuichiro Hatano, Hiroyuki Tomita, Tatsuhiko Miyazaki, Akira Hara: Early microlesion of viral encephalitis confirmed by galectin-3 expression after a virus inoculation

Neuroscience Letters 592, 107-112 (2015). doi:10.1016/j.neulet.2015.02.061