

学位論文題名

マウス白血病細胞に認められたN-myc 遺伝子の活性化

学位論文内容の要旨

I. 目 的

AKR マウスは胸腺リンパ腫を好発するが、その要因の1つとしては、内在性レトロウイルスが胸腺上皮を通して胸腺リンパ球に感染し、プロウイルスとしてゲノム中に挿入されることによる。骨髓キメラは、移植された胸腺リンパ球に白血病ウイルスが宿主の胸腺上皮を通して感染し、胸腺リンパ腫が誘導される。この場合のリンパ腫発生のメカニズムについては不明な点が多い。AKR, C57BL/10, BALB/c 系統において、Moloney 白血病ウイルス (MuLV), mink cell focus forming virus (MCF) を実験的に感染させることにより、胸腺リンパ腫の発症に強くかかわっている遺伝子として、細胞の増殖を制御する c-myc とチロシンキナーゼ遺伝子群の *pim-1* の2つの癌遺伝子が注目されるようになった。さらに最近になって、N-myc の3' 側に Moloney MuLV が挿入した例が報告された。本研究は、17株の胸腺白血病細胞株における MuLV の挿入部位を解析し、癌遺伝子との関わりとリンパ腫発症メカニズムについて検討することを目的とした。

II. 実験材料および方法

1. AKR マウス, [BALB/c→AKR] および [(BALB/c×B6) F₁→AKR] 骨髓キメラマウスにおいて自然発症した胸腺リンパ腫から樹立された17の胸腺白血病細胞株を用いた。
2. Thy1.1対立形質の検出には FITC ラベル抗 Thy1.1mAb を用い、抗 Thy1.2はビオチン化した抗 Thy1.2mAb と PE ラベル二次抗体を用いて検出した。
3. サザン法による解析は高分子 DNA を制限酵素で消化後、0.8%アガロースゲルで電気泳動を行い、10×SSC でニトロセルロール膜に移した。ハイブリダイゼーションはニクトランスレートしたプローブを用い、50%ホルムアミド、6×SSPE、5×デンハルト溶液、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムと100 μg/ml の一本鎖大腸菌 DNA を含む溶液中で42℃で行った。ハイブリダイゼーション後、ニトロセルロース膜は最後に0.1×SSC と0.1% SDS で60℃で

洗った。サザンおよび以下に述べるノーザンハイブリダイゼーションに用いた DNA ブローブは、マウス *N-myc* の約 7.7kb *Eco* RI 断片、*N-myc* の 5' flanking 領域と第 1 エクソンの半分に担当する 1.8kb の *Eco* RI/*Bam* HI 断片、*N-myc* の第 3 エクソンの非翻訳領域に担当する 0.8kb の *Hinc* II/*Eco* RI 断片、マウス *c-myc* の第 2, 第 3 エクソンを含む約 6 kb の *Bam* HI/*Bam* HI 断片の他に、*v-myc*, *v-fos*, *v-abl*, マウス *pim-1* の 0.9kb の *Bam* HI/*Bam* HI 断片、マウス *lck* 全 cDNA, マウス *L-myc* の 0.4Kb の *Bgl* II/*Bgl* II 断片を用いた。

4. mRNA の解析は、total RNA を Chomczynski と Sacchi の方法の変化によって抽出し、RNA (20 μ g) を 2.2M のホルムアルデヒドを含む 1 % のアガロースゲルで分画し、20 $\times$ SSC を用いてニトロセルロース膜に移した。ハイブリダゼーションの条件は 250 μ g の 1 本鎖 DNA を用いた以外はサザンハイブリダイゼーションと同じである。サイクロヘキシミド (CHX) による *c-myc* と *N-myc* mRNA のスーパーインダクションのために、 1×10^6 細胞/ml を 0.5% 胎仔血清を含む PRMI1640 中で、10 μ g/ml の CHX を付加したものとしないもので、2.5 時間培養した。その後全 RNA を上記にしたがって抽出した。
5. Polymerase chain reaction (PCR) と塩基配列の決定は、PCR はゲノム DNA 1 μ g を鋳型とし、55 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 1 分の反応を 25 サイクル、Cetus の増幅機を用いて行った。増幅された DNA は 2 % のアガロース電気泳動で分析した。増幅された *N-myc* と LTR の挿入部を含む DNA 断片をゲルから溶出し、Taq DNA ポリメラーゼを用いたジデオキシ法の変法でシーケンスした。PCR に用いた 2 つのプライマーと *N-myc* の 6,293 から 6,312 の配列をシーケンスのプライマーとして用いた。

Ⅲ. 結 果

この実験に用いた細胞株の Thy1 表現抗原は CAK 群では骨髓細胞の doner の持つ Thy1.2 抗原を持ち、doner 由来の細胞が腫瘍化したことを示していた。サザン法による分析では、17 細胞株のうち 3 つの細胞株 (CAK1.3, NAK39 および CAK28) に *c-myc* 近傍へのレトロウイルスの挿入によると思われる再構成バンドが認められた。5 つの細胞株 (CAK4.4, CAK28, NAK34, NAK39 および L176) に *pim-1* 近傍でのレトロウイルスの挿入を確認した。3 つの細胞株 (CAK20, NAK36 および L176) に *N-myc* 近傍に MuLV の挿入を認めた。CAK28, NAK39 は *pim-1* と *c-myc*, L176 は *pim-1* と *N-myc* の 2 つの遺伝子の近傍に挿入が見出された。CAK4.4, NAK13, NAK36, NAK39 および L176 についてこれらの細胞株から抽

出した DNA を *Hind*III 切断後, *N-myc* 全体, *N-myc* の 5' プローブ, *N-myc* の 3' プローブを用いて解析した。MuLV の挿入は coding 領域から 61 塩基対下流に存在する単一の *Hinc*II 切断点の近くで起こっていることが明らかになった。*c-myb*, *c-fos*, *c-abl*, *lck* および *L-myc* についてもサザン解析を行ったが, MuLV の挿入はみられなかった。CAN20, NAK36 および L176 の 3 細胞株における LTR 挿入部位を調べるために, *N-myc* の終始コドンから上流の部分と MuLV LTR の間の DNA 断片を PCR によって増幅した。*N-myc* のセンスプライマーと U3 アンチセンスプライマーを用いた時, 約 130 塩基対の断片が L176, NAK36 および CAK20 の細胞株から増幅され, MuLV は *N-myc* と同じ向きに挿入されていることが示された。次に, PCR で増幅された約 130bp の DNA 断片の塩基配列を決定した。L176 と NAK36 では挿入部位は転写終止コドンから 18 塩基下流であったが, CAK20 では 20 塩基下流であった。L176 と NAK36 の LTR U3 部分的塩基配列は同一であったが, CAK20 で挿入された LTR U3 配列はいくつかの位置で異なっていた。ノーザン法による解析では, *pim-1* の転写は, CAK4.4, CAK28, NAK34 および, NAK39 株に認められ, これら 4 株は *pim-1* 遺伝子領域の DNA 再編成を示していた。*N-myc* mRNA の発現は *N-myc* の 3' 領域にレトロウイルスの挿入があった細胞株 (CAK20, NAK36, L176) にのみ認められ, これらの細胞株では *c-myc* mRNA の発現はなかった。その他の細胞株では *c-myc* 遺伝子の近傍のレトロウイルスの挿入の有無にかかわらず *c-myc* mRNA は発現していた。CHX 処理後は, *c-myc* mRNA の発現は上昇したが, *N-myc* 遺伝子の 3' 領域にウイルスの挿入を持つ細胞株では, *c-myc* mRNA の発現は CHX で誘導されなかった。これらの細胞株における *N-myc* の発現は CHX によって影響を受けなかった。

IV. 考 案

マウスのゲノムでの *N-myc* 周辺のレトロウイルスの挿入は他の研究室からも報告されているが, 本実験の結果は, 自然発症胸腺リンパ腫においても *N-myc* の周辺にレトロウイルスの挿入がみられることを示し, *N-myc* 終止コドン近傍は内在性白血病ウイルスの高頻度な挿入部位の 1 つと考えられる。*myc* グループと *pim-1* 遺伝子の共同作用による白血病化のメカニズムは AKR マウスに自然発症した胸腺リンパ腫ばかりでなく, [BALB/c → AKR] 骨髓キメラにもあてはめられ, 少なくともマウスの白血病モデルにおいては *pim-1* 群と *myc* 群の 2 群の癌遺伝子が発症の十分条件になっている可能性がある。また最近 *myc* グループと協同作用して腫瘍を発生させる新しい遺伝子が B リンパ腫ではいくつか発見された。*myc* グループとの

協同作用でマウスの胸腺リンパ腫を発生させる遺伝子は *pim-1* の他にもあると思われ、それらの相互作用がリンパ腫の悪性化に関与していると思われる。〔BALB/c→AKR〕骨髓キメラにおいて胸腺リンパ腫をひきおこす MuLV の性状については興味深く、CAK20でみとめられた挿入 LTR U3 配列は L176と NAK36とは4つの位置で異なり、その配列は Database LASL-GDB Rel. 71 (GenBank) には認められなかった。BALB/cとB6がいずれもB-tropic ウイルスに感受性であるのに対し、AKRはN-tropicに感受性な事実と照らし合わせると、CAK20で挿入された MuLV の起源、性状について興味を持たれた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 柿 沼 光 明

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 武 市 紀 年

本研究は、17株の自然発症白血病細胞株におけるマウス白血病ウイルス (MuLV) の挿入部位を解析し、癌遺伝子とリンパ腫発症の関わりについて検討することを目的とした。

〔実験材料および方法〕

1. AKRマウス, 〔BALB/c→AKR〕および〔BALB/c×B6〕F₁→AKR〕骨髓キメラマウスにおいて自然発症した胸腺リンパ腫から樹立された17の白血病細胞株を用いた。
2. MuLV 挿入の解析はサザン法で行った。
3. mRNA の解析は、ノーザンハイブリダイゼーションで行った。mRNA の安定性はサイクロヘキシミド (CHX) を用いて解析した。
4. MuLV の挿入部位は polymerase chain reaction (PCR) と塩基配列決定によって行った。

〔結果〕

1. この実験に用いた細胞株の Thy1 表現抗原は CAK 群では骨髓細胞の doner の Thy1.2 抗原を持ち、doner 由来の細胞が腫瘍化したことを示していた。
2. サザン法による解析では、17細胞株のうち3つの細胞株に *c-myc* の近傍、5つの細胞株に *pim-1* 近傍、また3つの細胞株で *N-myc* 近傍への MuLV の挿入を認めた。CAK28

と NAK39は *pim-1* と *c-myc*, L176は *pim-1* と *N-myc* の2つの遺伝子の近傍に挿入が見出された。

c-myb, *c-fos*, *c-abl*, *lck* および *L-myc* についてもサザン解析を行ったが, MuLV の挿入はみられなかった。

3. *N-myc* の近傍へ MuLV の挿入の認められた細胞株の DNA を *Hind* III 切断後, *N-myc* の全体, *N-myc* の 5' プローブ, *N-myc* の 3' プローブを用いて解析した。MuLV の挿入は coding 領域から61塩基対下流に存在する単一の *Hinc* II 切断点の近くで起こっていること見いだした。
4. CAK20, NAK36およびL176の3細胞株における LTR 挿入部位を調べるために, *N-myc* の終止コドンから上流の部分と MuLV LTR の間の DNA 断片を PCR によって増幅し, MuLV がすべて *N-myc* と同じ向きに挿入されていることを見いだした。
5. PCR で増幅された約130bp の DNA 断片の塩基配列を決定した。L176と NAK36では挿入部位は転写終止コドンから18塩基対下流であったが, CAK20では20塩基対下流であった。L176と NAK36で挿入されていた LTR U3 の部分的塩基配列は同一であったが, CAK20で挿入されていた LTR U3 配列はいくつかの位置で異なっていた。
6. ノーザン法による解析では, *pim-1* の転写は, CAK4, 4, CAK28, NAK34および NAK39の4株に認められ, これら4株は *pim-1* 遺伝子領域の DNA 再編成を示していた。*N-myc* mRNA の発現は *N-myc* の 3' 領域に MuLV の挿入があった細胞株 (CAK20, NAK36, L176) にのみ認められこれらの細胞株では *c-myc* mRNA の発現はなかった。その他の細胞株では *c-myc* 遺伝子の近傍の MuLV の挿入の有無にかかわらず *c-myc* mRNA は発現していた。CHX 処理後は, *c-myc* mRNA の発現は上昇したが, *N-myc* 遺伝子の 3' 領域にウイルスの挿入を持つ細胞株では, *c-myc* mRNA の発現は誘導されなかった。これらの細胞株における *N-myc* の発現は CHX によって影響を受けなかった。

以上の口頭発表に対して, 葛巻教授, 武市教授から骨髓キメラマウスを用いた理由, *N-myc* の MuLV による活性化は初期のリンパ腫でもあるのか, *N-myc* 3' 側に MuLV が選択的に挿入される理由, *N-myc* が活性化されている細胞株の生物学的な特徴, *c-myc*, *N-myc* いずれにも DNA 再構成が認められなかった細胞株についての解釈等に関して質問があったが, 申請者は, 部分的には不十分であったが, 全体的には, おおむね妥当な回答をしえたと思われた。その後, 調査の2教授の口頭諮問を受け, 合格と判定された。

本研究の結果は、自然発症胸腺リンパ腫においても *N-myc* の翻訳停止コドンの約20塩基下流に MuLV の挿入が見られること、*N-myc* の遺伝子の恒常的発現は *c-myc* の転写を抑制すること、〔(BALB/cxB6) F₁→AKR〕骨髄キメラにおいて胸腺リンパ腫をひきおこす MuLV は B-tropic の宿主域をもつと思われるが、そのようなウイルスの LTR の塩素配列の一部を明らかにしたことなどの新知見を含み、博士(医学)に値する論文と判断された。