

学 位 論 文 題 名

HTLV-IpX トランスジェニックラットにおける  
乳腺腫瘍の病理学的及び分子生物学的解析

学位論文内容の要旨

I.はじめに

ヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV-I）の腫瘍化機構は未だ明らかでないが、その構成遺伝子の1つであるpX 遺伝子は、ウイルス遺伝子のみならず宿主の細胞増殖にかかわる重要な遺伝子に作用することが知られ注目されている。本研究ではトランスジェニックラット作製系を確立した上で、HTLV-IpX 遺伝子の *in vivo* での機能解析を目的として、HTLV-I に対して感染感受性を有する近交系ラットを宿主とした pX トランスジェニックラット（pX ラット）を作製し、病理学的及び分子生物学的解析を行った。その結果 pXラット雌にこれまでに報告のない乳腺由来の上皮性悪性腫瘍が発生し、さらにこの腫瘍において Gro、MIP-2 などの宿主細胞性遺伝子の発現増強を確認した。pX ラットは pX 遺伝子の腫瘍化機構及び宿主細胞性遺伝子の活性化機構を調べる上で有用なモデル動物と考えられるため報告する。

II.材料と方法

1) 導入遺伝子

Mouse H-2K<sup>d</sup> promotor 領域を tax.rex cDNA に結合した pX 発現プラスミド pH2/tax.rex から KpnI / SalI 断片 4.3 Kb の発現ユニットを切り出し実験に用いた。

2) プローブ DNA

HTLV-IpX cDNA クローン、ラット Gro クローン、ラット MIP-2 クローン、ラット IL-1 $\alpha$  クローン、ラット TNF- $\alpha$  クローン、ヒト c-erbB2 クローン、ヒト int-2 クローン、ヒト c-sis クローン、マウス c-fos クローン、ヒト c-myc クローンを以下の Southern 解析、Northern 解析に用いた。ヒト及びマウス由来のものはラットゲノムDNA に cross hybridize することを確認の上使用した。またラットエストロゲン受容体は 40mer 合成 oligo DNA を用いた。

ラットプロラクチン受容体は正常 F344 ラット乳腺 mRNA より RT-PCR 法によってプローブを合成した。なお internal control としてラット  $\beta$ -actin クローンをを用いた。

### 3) マイクロインジェクション

導入遺伝子は pH2/tax.rex プラスミドを制限酵素処理後 agarose gel 電気泳動を行い KpnI / SalI 断片 4.3Kb を透析膜にて溶出し、phenol/chloroform 抽出及び DEAE カラムアフィニティークロマトグラフィーにて精製したのち PBS にて希釈しインジェクション用 DNA とした。受精卵への遺伝子導入は体外培養用培地に modified-KRB 培地を用い、概ねトランスジェニックマウスにおける方法に準じて行った。受精卵は F344 ラットより採取し、遺伝子導入後に SD ラット卵管采に移植した。

### 4) DNA 解析

ラット尾部の一部より proteinase K / SDS 法にてゲノム DNA を抽出し、制限酵素処理、agarose gel 電気泳動後、ナイロン膜にトランスファーし、 $^{32}\text{P}$  で標識した pX probe で hybridization を行った後洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。

### 5) RNA 解析

Total RNA を、各組織から APGC 法にて抽出し、agarose formaldehyde gel にて電気泳動を行い、以下 DNA 解析と同様の方法にて行った。

### 6) 病理学的検索及び免疫染色

ヘマトキシリン-エオジン染色、鍍銀染色を行い組織学的観察を行った。免疫染色は一次抗体に抗ウシケラチンウサギポリクローナル抗体、抗ヒトサイトケラチンマウスモノクローナル抗体及び抗ヒト筋特異的アクチンマウスモノクローナル抗体を用い、二次抗体以降は常法に従った。

## III. 結果

### 1) pX ラットの作製

F344 ラット受精卵 1124 個に遺伝子導入を試み、1 頭の founder ラットを継代したが、遺伝子をホモに持つ個体を得られずヘテロ個体のみで継代した。

### 2) 導入遺伝子の発現

pX ラット肝臓、腎臓、脾臓、肺、心臓、顎下腺、リンパ節、胸腺、卵巣など種々の臓器で pX mRNA の恒常的な発現が認められたが、中枢神経系及び末梢血単核球での発現は確認できなかった。

### 3) 乳腺腫瘍の発生とその組織学的特徴

生後 9 か月令以降の pX ラット雌の乳腺分布に一致して腫瘍を認め、その発生頻度は加齢と共に増大した。この腫瘍はほぼ線維性結合織性被膜で覆われた、核小体の目だつ細胞境界の不鮮明な未分化な大型異型細胞充実性増殖よりなり、核分裂像も散見された。また腫瘍胞巣内に多数の好中球及び foamy

macrophage の浸潤を伴い、膠原繊維の増生と所々に壊死巣が認められた。鍍銀染色では上皮性癌巢の形成が見られ、上皮由来の未分化な悪性腫瘍と考えられた。抗ケラチン抗体による免疫染色では正常ラットの表皮、乳管上皮及び pX ラット乳腺腫瘍が染色された。また筋特異的アクチンによる染色では腫瘍内に萎縮した筋線維が残存した像も見られ浸潤性増殖が確認された。腫瘍の移植は正常ラットでは拒絶され、pXラットでのみ可能であった。

#### 4) 腫瘍組織に於ける導入遺伝子及び宿主細胞性遺伝子の発現

腫瘍組織では他の臓器と比較して導入 pX 遺伝子の強い発現が確認された。また乳腺腫瘍に関連する癌遺伝子 (c-erbB2、int-2、c-myc)、immediate early gene (c-fos、c-sis) の発現は確認されなかったが、サイトカイン遺伝子 (Gro、MIP-2、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ )、及びホルモン受容体遺伝子 (エストロゲン受容体、プロラクチン受容体) などの宿主細胞性遺伝子のうち IL-8 ファミリーである Gro、MIP-2、及び IL-1 $\alpha$  の強い発現が、また TNF- $\alpha$  の弱い発現が確認された。またプロラクチン受容体の発現も見られたが、エストロゲン受容体の発現は確認されなかった。

### IV. 考察

1) 多段階発癌を考慮すると、乳腺腫瘍を高率に自然発症する F344 系ラットでは乳癌発生の initiation がすでにかかっており、pX 遺伝子の発現が promotion、progression のステップに働いている可能性がある。

2) 腫瘍内好中球浸潤は Gro 及び MIP-2 の発現により誘導された可能性が高い。またその発現は pX 遺伝子産物の tax による NF- $\kappa$ B 結合部位を介する細胞性遺伝子の活性化機序と同様であると考えられる。

3) Friend ウイルス誘発ラット腫瘍における腫瘍の拒絶機序や HTLV-I 感染細胞において pX 遺伝子産物が宿主 CTL の認識しうる抗原であることから、正常ラットへの腫瘍移植片の拒絶は高発現 pX 抗原が標的となっていると考えられるが、宿主細胞性遺伝子の活性化による作用も否定できない。

4) 白血病、リンパ腫の発生は現在まで見られていない。今後さらに ATL をはじめとする HTLV-I 関連疾患のモデルに近づくためには導入遺伝子のプロモーターの選択を考慮する必要がある。

5) 導入遺伝子をホモに持つ個体を得られないのは、導入遺伝子が生存に必須の遺伝子を破壊している可能性と、胚初期に pX 遺伝子の強い発現が致死的に働いている可能性が考えられる。

### V. 結語

1) トランスジェニックラット作製系を確立し、HTLV-I pX トランスジェニックラットを樹立した。

2) 導入遺伝子は月令に依存せず広範な臓器で恒常的に発現したが、末梢血単核球及び中枢神経系での十分な発現は得られなかった。

3) pX ラットは生後 9 か月令以降に高率に多数の好中球浸潤を伴う乳腺腫瘍

を発生した。この腫瘍は導入 pX 遺伝子によって誘発された乳腺由来の未分化癌と考えられた。

4) 発生腫瘍は pX ラットに可移植性で、正常同系ラットには移植は成立しなかった。

5) 腫瘍は導入 pX 遺伝子のみならず、Gro、MIP-2、IL-1 $\alpha$  等の細胞性遺伝子を強く発現していた。

6) pX ラットは pX 遺伝子の in vivo での発癌機構及び細胞性遺伝子の活性化機構を調べる上で有用なモデルになると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 細 川 眞澄男

学 位 論 文 題 名

## HTLV-IpX トランスジェニックラットにおける

### 乳腺腫瘍の病理学的及び分子生物学的解析

Human T cell Leukemia Virus Type-I (HTLV-I)は成人T細胞白血病の原因ウイルスであり、特異な pX 遺伝子を持つ。山田氏の今回の研究はHTLV-Iに対する感染感受性のある近交系ラットへ pX 遺伝子を導入し、in vivo での同遺伝子の機能を検索しうる動物モデルの作製目的として行われたものである。

まず、マウス H-2K<sup>d</sup> プロモーター領域を pX cDNA に結合した発現ユニットをマイクロインジェクション法にて F344 ラット受精卵に注入し産仔を得た後、サザンブロット法にて導入遺伝子を持つ個体をスクリーニングした。その後同系ラットとの交配により系統化が行われ、導入遺伝子及び宿主細胞性遺伝子の発現はノーザンブロット法にて検索された。その結果、pX ラットは種々の臓器で予想された 2.1Kb の mRNA の恒常的な発現を認めたが、中枢神経系及び末梢血単核球ではノーザンレベルでの発現は確認されなかった。その後、生後9か月令以降の pXラット雌に乳腺腫瘍が発生し、組織学的には強い好中球浸潤を伴った上皮由来の未分化な悪性腫瘍と考えられ、この腫瘍は pX ラットに移植可能であった。また腫瘍組織では他の臓器と比較して導入 pX 遺伝子の強い発現が確認されると共に、Gro、MIP-2、IL-1 $\alpha$ 等の宿主細胞性遺伝子の強い発現を確認し、IL-8 サブファミリーであるGro、MIP-2の発現増強と好中球浸潤との関連が示唆された。

本論文はHTLV-I の pX 遺伝子をラット受精卵に注入して作製されたトランスジェニックラットの初めての報告である。これまでトランスジェニックマウスの系において、pX 関連遺伝子の導入による様々な疾患の報告がされているが、マウス自体は HTLV-I に対する感染感受性を有せず、必ずしも HTLV-I 感染における病態を反映しているか疑問であったが、感染感受性を有する

ラットに導入した pX 遺伝子は種々の臓器で発現し乳腺腫瘍を発生させた。このことは pX 遺伝子の腫瘍化能を in vivo で証明し、pX 遺伝子の腫瘍化能のメカニズムを解明するモデルとなり得るのみならず、HTLV-I が上皮性腫瘍の発生にも関与する可能性を示唆するものである。またラット受精卵はマウスに比較して脆弱であり、マイクロインジェクションなどの機械的刺激に弱く、また受精卵の培養も困難である事から、これまでトランスジェニックラットの作製の報告は極めて少ない。従ってこの研究は幾つかの技術的困難を克服して行われたものであり、技術的観点からも極めて価値があり、十分学位に値するものと判断された。副査の葛巻、細川両教授をはじめ吉木、内野、小池各教授からも数多くの質問があったが申請者からはいずれに関しても極めて順当に対応しており、合格と判定された。