

博士（歯学）山崎英俊

学位論文題名

HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットにおける

膠原病の発症と自己抗体の產生

- HTLV-I env-pX 遺伝子導入モデルラット -

学位論文内容の要旨

[緒言]

ヒトT細胞白血病ウイルス(以下 HTLV-I)は、成人T細胞白血病のほか痙性脊髄麻痺、慢性関節症、ぶどう膜炎の原因ウイルスであるほか、シェーグレン症候群、肺胞性気管支炎、多発性筋炎、感染性皮膚炎をも引き起こすと考えられており、その発症機序解明のためモデル動物の作製が求められている。

[目的]

本研究ではこれらの HTLV-I 関連疾患発症機序解明を目指し、疾患発症に深く関与していると考えられている env および pX 領域遺伝子を HTLV-I に感染感受性のあるラットに導入した。

[実験方法]

1. トランスジェニックラットの作製 過排卵誘起した F344 および WKAH の受精卵に HTLV-I LTR (long terminal repeat) をプロモーターとした env, pX 領域遺伝子を有する発現コンストラクトをマイクロインジェクション法にて注入し、産仔を得、系統化した。

2. 導入遺伝子の解析 ラット尾部より DNA を抽出し、polymerase chain reaction (PCR) 法およびサザン法にて導入遺伝子の組込みの確認をした。

3. 導入遺伝子発現の解析 各臓器より mRNA を抽出し、ノーザン法にて導入遺伝子の発現を検索した。また、微量の発現を検索するために、reverse transcriptase (RT)-PCR 法も同時におこなった。脾細胞および関節腫脹部、心筋組織から可溶化蛋白を抽出し、抗 env および抗 pX 抗体によるウエスタンプロット法によって導入遺伝子産物の同定を試みた。

4. トランスジェニックラットにおける病態の解析

1) 組織学的検索 env-pX ラットの各臓器、組織は 10% ホルマリン固定、ヘマトキシリン・エオジン染色後病理組織学的観察をおこなった。

2) 血液生化学的解析 env-pX ラットの末梢血について、各種血液学的および生化学的検査をおこなった。

3) 免疫学的解析

(a) 自己抗体の測定 env-pX ラットの血漿中の抗 1 本鎖 DNA 抗体、抗 2 本鎖 DNA 抗体、抗核抗体、リウマチ因子、抗カルジオリビン抗体価を測定した。

(b) 抗 HTLV-I 抗体の検出 env-pX ラット血清中の導入遺伝子産物に対する抗体の検出は、ヒトならび

にラット HTLV-I 產生 T 細胞株 MT-2 および WKA-S1 細胞の可溶化蛋白を抗原とするウエスタンプロット法によりおこなった。

### (c) リンパ球機能の検討

i) 自己増殖能の検定 env-pX ラット頸部リンパ節細胞を未処理培養、concanavalin A(Con A)存在下培養あるいは mitomycin C で処理した LEJ ラットリンパ節細胞との混合培養により、その自律的増殖能、非特異的増殖能およびアロ特異的増殖能を  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込み量により検出し、同週齢 non-トランスジェニックラットリンパ節細胞のそれぞれの増殖能と比較した。

### [結果]

1. トランスジェニックラットの作製 WKAH では注入卵数 2886 個、全産仔数 115 頭のうち 2 頭(Tg17, Tg62)に導入遺伝子の組み込みが確認されたが、F344 では注入卵数 348 個、全産仔数 49 頭のうち 1 頭も確認されなかった。Tg17, Tg62 はどもに欠失なく導入遺伝子が子孫に伝達し、その導入遺伝子の量は 1 ゲノムあたり約 10 コピー以上と考えられた。
2. 導入遺伝子の発現 env-pX ラットの病変を認めない肺、脾臓、大脳、睾丸および病変をおこした心筋、関節で 2.1Kb の pX mRNA に相当するバンドが認められた。しかし、このレベルでは env mRNA に相当する約 4kb のバンドは確認されなかった。一方、RT-PCR 法では検索したすべての組織で env, pX ともその message の発現が確認された。蛋白発現についてはノーザンプロットでその発現がみられた脾臓および病変を伴う心筋、関節からの可溶化蛋白のウエスタンプロット法により検出を試みたが、Tg17, Tg62 とも Env, Tax に相当する蛋白の発現は確認されなかった。
3. 疾患の発症とその病態

1) 組織病理学的解析 Tg17, Tg62 では、ともに約 5 週齢以降に後肢足関節部に一致して慢性関節リウマチ類似の関節炎を発症した。さらに関節炎のほか病理組織学的に、壊死性血管炎、血栓形成、筋炎、心筋炎、シェークレン症候群類似の慢性唾液腺炎、涙腺炎など collagen vascular diseases の病像を伴っていた。また、約半数の env-pX ラットに顕著な体重減少と胸腺萎縮も認めた。

2) 血液生化学的解析 env-pX ラットの末梢血では、好中球数の増加を認めたがリンパ球数に著変なく、異型リンパ球の出現も確認されなかった。また、env-pX ラットは高ガンマグロブリン血症を呈していた。

### 3) 免疫学的検討

(a) 自己抗体の測定 env-pX ラットではリウマチ因子、抗 2 本鎖 DNA 抗体や抗カルジオリビン抗体が高値を示した。しかし、特に高値を示したリウマチ因子などは関節炎の程度や血管炎、筋炎、心筋炎、唾液腺炎などの発症には相関しなかった。間接蛍光抗体法では核辺縁が強染する抗核抗体を検出し、抗 2 本鎖 DNA 抗体陽性の所見と一致した。

(b) 抗 Env, 抗 Tax 抗体の产生について HTLV-I 產生培養細胞可溶化抗原を標的としたウエスタンプロット法では導入遺伝子産物に対する抗体は検出されなかった。

(c) リンパ球機能について env-pX ラットリンパ球は非刺激下で強い自律性増殖能が確認されたが、Con A やアロ抗原に対しての反応性はコントロールと差がなかった。

### [考察]

独立した 2 系統の env-pX ラットでは RT-PCR 法により広汎な臓器に導入遺伝子の発現を検出できたが、通常のノーザンレベルでは困難であることから、env-pX ラット内での HTLV-I LTR のプロモーター活性は弱く、特異性も低いと考えられる。また 2 系統とも導入遺伝子が異なる位置に tandem に組み込まれているにもかかわらず同一の疾患を誘導し得たことより、発症した疾患は組込まれた位置効果による可能性より

も、導入遺伝子産物により直接的あるいは間接的に誘導された結果と考えられる。

神経線維腫症、関節炎、シエーグレン症候群、胸腺萎縮はすでに pX や env-pX トランスジェニックマウスでも報告されているが、これらに加えて今まで報告がない壞死性血管炎、筋炎、心筋炎も env-pX ラットでは高率に発症し、これら多種類にわたる疾患あるいは異常が同一個体に高率に発症するという報告は本研究が最初である。

本研究において、env-pX ラットの血清中にリウマチ因子、抗核抗体、抗カルジオリビン抗体など自己抗体が検出される。現在のところ、env-pX 遺伝子による自己に対する免疫学的寛容の破綻の機序は不明であるが、env-pX 領域産物が自己免疫現象を誘導しうることはほぼ間違いないと考えられた。

以上、本研究で樹立した env-pX ラットは HTLV-I 関連疾患モデル動物となるばかりでなくヒトの collagen vascular diseases の発症に関するレトロウイルスの病因的役割を調べる上で非常に有用なモデルになると考えられる。

## 学位論文審査の要旨

主査教授 小口春久  
副査教授 松本 章  
副査教授 渡邊継男  
副査教授 吉木 敬

### 学位論文題名

# HTLV-I env-pX 遺伝子導入ラットにおける 膠原病の発症と自己抗体の產生

- HTLV-I env-pX 遺伝子導入モデルラット -

学位申請者は、主査および副査全員と個別に会し、審査は口頭試問により研究目的ならびにその内容について詳細になされた。

ヒトT細胞白血病ウイルス(以下 HTLV-I)は、その腫瘍原性のほか痙性脊髄麻痺やリウマチ性疾患など様々な免疫学的疾患の原因の一つである可能性が考えられている。本研究ではこれらの HTLV-I 関連疾患発症機序解明を目指し以下の実験をおこなった。

過排卵誘起したラットの受精卵に HTLV-I LTR をプロモーターとした env、pX 領域遺伝子をマイクロインジェクション法にて注入し、トランスジェニックラットを作製した。次にラット尾部より DNA を抽出し、導入遺伝子の組込みの確認をした。さらに mRNA を抽出し、導入遺伝子の発現を検索した。また可溶化蛋白を抽出し、導入遺伝子産物の同定も試みた。最後にトランスジェニックラットにおける病態の解析として組織学的検索、血液生化学的解析および免疫学的解析をおこなった。

以上の実験より次の結果を得た。

1 トランスジェニックラットの作製 WKAH では 2 頭(Tg17、Tg62) に導入遺伝子の組み込みが確認された。

2 導入遺伝子の発現 各臓器より mRNA を抽出し、ノーザン法にて導入遺伝子の発現を検索したところ、env-pX ラットの病変を認めない肺、脾臓、大脳、睾丸および病変をおこした心筋、関節で pX mRNA に相当するバンドが認められた。一方、RT-PCR 法ではすべての組織で env、pX ともその発現が確認された。蛋白発現については可溶化蛋白のウェスタン法による検出を試みたが、Env、Tax に相当する蛋白の発現は確認されなかった。

3 疾患の発症とその病態

- 1) 組織病理学的解析 Tg17、Tg62ともに後肢足関節部に慢性関節リウマチ類似の関節炎を発症し、壞死性血管炎、血栓形成、筋炎、心筋炎、シェーグレン症候群類似の慢性唾液腺炎、涙腺炎など collagen vascular diseases の病像を伴っていた。また、約半数の env-pX ラットに胸腺萎縮も認めた。
- 2) 血液生化学的解析 env-pX ラットの末梢血では、好中球数の増加と高ガンマグロブリン血症を認めた。

### 3) 免疫学的検討

- (a) 自己抗体の測定 env-pX ラットではリウマチ因子、抗 2 本鎖 DNA 抗体や抗カルジオリピン抗体が高値を示した。しかし、自己抗体の產生の有無と関節炎の程度や他の疾患の発症には一定傾向はなかった。
- (b) 抗 Env、抗 Tax 抗体の產生について HTLV-I 產生培養細胞可溶化抗原を標的としたウエスタンプロット法では導入遺伝子産物に対する抗体は検出されなかった。
- (c) リンパ球機能について env-pX ラットリンパ球は非刺激下で強い自律性増殖能が確認されたが、Con A やアロ抗原に対する反応性はコントロールと差がなかった。

以上の結果から、独立した 2 系統の env-pX ラットは導入遺伝子が異なる位置に組み込まれているが同一の疾患を誘導し得たことより、発症した疾患は位置効果による可能性より、導入遺伝子産物により誘導された結果と考えられる。関節炎、シェーグレン症候群、胸腺萎縮はすでに pX や env-pX トランスジェニックマウスでも報告されているが、これらに加えて今まで報告がない壞死性血管炎、筋炎、心筋炎も env-pX ラットでは高率に発症した。これら多種類にわたる疾患、異常が同一個体に高率に発症するという報告は本研究が最初である。

本研究において、env-pX ラットの血清中にリウマチ因子などの自己抗体が検出される。現在のところ、env-pX 遺伝子による自己に対する免疫学的寛容の破綻の機序は不明であるが、env-pX 領域産物が自己免疫現象を誘導しうることはほぼ間違いないと考えられた。

以上、本研究で樹立した env-pX ラットは HTLV-I 関連疾患モデル動物となるばかりでなく、ヒトの collagen vascular diseases の発症に関与するレトロウイルスの病因的役割を調べる上で、非常に有用なモデルになりうると考えられる。

審査は各審査担当者により個別に実施された。各審査担当者は、学位申請者から本論文の内容およびその関連事項や本研究の将来の発展性などについて詳しく質問をおこなった。具体的には、トランスジェニック動物の作製法、レトロウイルスの特徴や関連疾患さらに、HTLV-I トランスジェニックラットにおいて発症した collagen vascular diseases の発症原因について質問された。これらの質問に対して学位申請者より、明快かつ適切な回答が得られ、本学位申請者は、専門領域のみならず、関連分野についても十分な学識と理解を有していることが確認された。

以上より、本学位申請者は博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。