

学 位 論 文 題 名

リンパ系特異的プロモーターを用いた
HTLV-1 遺伝子導入ラットにおける胸腺腫瘍の発生

学位論文内容の要旨

Human T lymphocyte virus type 1 (HTLV-1) は成人T細胞白血病(ATL)を始めとして、痙性脊髄麻痺(HAM/TSP)、慢性関節症(HAAP)などヒトにおける増殖性疾患や種々の炎症性疾患の病態形成に関係している。HTLV-1に特徴的なpXとよばれる遺伝子領域から翻訳される蛋白質のうちp40taxは、転写活性化因子としての作用を持ち、自らのウイルスプロモーターであるlong terminal repeat(LTR)に作用してウイルス遺伝子の発現を増強するのみならず、サイトカイン、プロトオンコジーンなど感染宿主の種々の細胞性遺伝子を活性化することが知られている。

近年、人工的な遺伝子を全細胞、全組織に等しく導入することを可能としたトランスジェニック動物の作製が可能となり、in vivoでもHTLV-1の遺伝子の機能が解析されるようになった。LTR制御下でtaxを発現させたトランスジェニックマウスの解析では、間葉系および神経原性腫瘍の発生が胸腺萎縮、筋変性などとともに報告され、マウスのクラスII MHCプロモーターの制御下でpXを発現させたトランスジェニックラットでは、高率に上皮系腫瘍としての乳癌の発生が報告されている。また、造血系腫瘍の発生としてはヒトのキラー細胞内に存在する細胞障害性顆粒の発現を調節するgranzyme Bプロモーターを用いてtaxを発現させたマウスにおいて、large granular lymphocytic leukemiaが発生したとの報告もある。

以上、今までに報告されたHTLV-1トランスジェニック動物での腫瘍の発生から考えても、生体内でpX遺伝子、特にtax遺伝子産物が造腫瘍性に働くことは間違いないが、その中にヒトATLのモデルとなり得るようなリンパ系腫瘍の発生は見られない。我々は、ATLのモデル系の作製にあたってはリンパ系特にT細胞で特異的な発現をする遺伝子のプロモーター、エンハンサー領域を用いてHTLV-1 pX遺伝子の発現をコントロールするのが適当と考え、その発現プロモーターとしてlymphocyte specific protein tyrosine kinase (p56 lck)プロモーターに注目した。p56 lckの作用はT細胞系のシグナル伝達を通して、細胞の分化と活性化に深く関与していると考えられている。p56 lckの転写を制御するプロモーターは胸腺細胞で特に強く発現し、成熟T細胞に分化していくに従って活性が低下していくtype1またはproximal(あるいはdownstream、3')プロモーターと、主に末梢T細胞や一部B細胞で発現しているtype2またはdistal(あるいはupstream、5')プロモーターが主に存在する。この内、lckのtype1プロモーターはトランスジェニックマウスを用いたin vivo実験系でもその活性が検討され、胸腺に特異的に発現し、その過剰発現を利用したトランスジェニックマウスで胸腺細胞由来の腫瘍の発生

の報告もある。本研究ではATLなどHTLV-Iによるリンパ系腫瘍の発生モデル動物作製を目指して、このlck type1プロモーターの制御下でpX遺伝子を発現するトランスジェニックラットを作製し、解析した。

遺伝子を導入するラットとして乳腺腫瘍を始めとする腫瘍の好発系ラットである近交系F344ラットを採用した。遺伝子が導入された8頭のFounderラット(F0.3、33、38、44、64、80、99、114)の内6系統(Tg3、33、38、64、80、99)について継代化に成功した。予想に反しリンパ系の腫瘍の発生は確認されなかったが、その内Tg38系列を中心として8週齢以降より高率に胸腺上皮を原発とする胸腺腫の発生をみた。このような腫瘍は同腹のnonTgラットでは全く確認されなかった。さらに、F344ラットでlck-pXラットに見られるような低週齢で発症する胸腺腫瘍が自然発症したとする報告は見られない。従って胸腺腫が遺伝子導入の影響、それも胸腺腫の発生が導入遺伝子の組み込み位置が各々異なると考えられるlck-pXラット6系統の内4系統(Tg3、38、64、99)に認められることより、導入遺伝子の発現効果、すなわち、従来より報告されているpXのトランス活性化作用に基づく腫瘍化機序が関与している可能性が高い。

また、同じF344ラットにマウスH2クラスIプロモーターを利用してpX遺伝子を導入したH2-pXトランスジェニックラットの検討では4ヶ月から乳腺腫瘍の発生をみる事が報告されているが、胸腺腫の発生は確認されていない。従ってH2-pXラットに使用されているH2クラスIプロモーターと異なるlck type1プロモーターの特性によって、lck-pXラットに有意に胸腺腫が発生した可能性が示唆された。

腫瘍発生率及びpX遺伝子のmRNAレベルでの発現は、その発現量、臓器特異性を含めlck-pXラット各系統により異なっており、サザン法による各系統差の検討から導入遺伝子の構造は同じでもその組み込み位置、コピー数の差の違いなどが発現レベルを大きく規定していることが示唆され、特に遺伝子のコピー数によるというよりも導入遺伝子の組み込み位置の違いや遺伝子の不活化の程度の違いによる影響が強いと推測された。

pX mRNAの発現パターンはTg44においては胸腺を中心としたプロモーターの特性にほぼ従い、また、腫瘍低発生群であるTg3でも弱いながら胸腺主体の発現が見られた。しかし、腫瘍高発生群であるTg38を中心としてRT-PCR法によって検索した全臓器において発現を認めた。Tg3とTg38の比較より胸腺での発現量と腫瘍化に相関があることが示唆されるが、胸腺外他臓器においてのpX遺伝子の発現がどの細胞で発現し、Tg64、Tg99で見られた胸腺外腫瘍とどう関わり、lckプロモーターの特異性とどう関係するのかは明らかではない。しかし胸腺腫を含めたノザン解析の結果では胸腺腫においてのみ特異的に強い発現を認め、胸腺腫での発現が腫瘍化の結果として発現が増強した可能性も否定はできないものの、腫瘍化を来す前から胸腺で特異的に強く発現し、腫瘍化に強く関わっている可能性が高いと考えられる。

胸腺上皮での腫瘍化は、プロモーターの本来の特異性が破綻し、胸腺上皮でpXの発現が強くなった結果胸腺上皮での腫瘍化が起こったと一応説明可能である。プロモーター特性の破綻は、遺伝子の組み込み効果の他採用したプロモーター領域(-269~+26)の元々の性質によるものかもしれないが、胸腺外腫瘍でも同様に、他と比較して胸腺外臓器での発現が強くなった結果もたらされたと説明できるかもしれない。

一方LTRウイルスプロモーターの制御下でenv-pX遺伝子をWKAHラットに導入したLTR-env-pXトランスジェニックラットの胸腺では、腫瘍化でなく胸腺萎縮という形で発現効果が現われている。アポトーシス関連因子への介入などと説明され、これと同様のことがlck-pXラットで起こる可能性はあるが、現在の所確認されていない。この違いはプ

ロモーターの違いによって発現する細胞や発現時期などに差が生じた可能性、pXだけでなくenv遺伝子も含まれることの影響、そして遺伝子を導入したラットの違いから来る遺伝的背景の差の影響などによると考えられる。lck-pXラットは腫瘍の好発系と言われているF344ラットに遺伝子を導入しており、同じ遺伝子を導入し同じように発現していたとしても、両者にその発現効果の違いが出る可能性がある。特にtaxは転写活性のネットワーク内に間接的に介入するので、taxの標的となる因子の分布の違いも無視することができず、そのような環境要因の差が同じ遺伝子を導入し、同じように発現していたとしても用いた動物の種差、系統差、さらには同じ動物内であっても遺伝子が発現している細胞、組織の違いによってその発現効果に差が生じる要因となる可能性がある。

以上により、pX遺伝子の胸腺での発現に伴うリンパ球の分化や機能異常、それに伴う免疫異常や腫瘍化が起こる可能性についてさらに検討を重ねる必要があるが、pX遺伝子の臓器発現が臓器特異的な腫瘍化に直接関連する可能性は高く、さらに、lck-pXラットはpX遺伝子のリンパ組織における造腫瘍化能を含めた病原性を明らかにするための有用なモデルであると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 柿 沼 光 明

学 位 論 文 題 名

リンパ系特異的プロモーターを用いた

HTLV-1 遺伝子導入ラットにおける胸腺腫瘍の発生

本研究は、Human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) の腫瘍形成能を中心とした病原性の解明を目的としたものである。本研究ではまず、ATLを中心とした腫瘍発症モデルの作製のためにはHTLV-Iの病原性の主体の可能性が強いpX領域の遺伝子を、胸腺・リンパ系組織で強制発現させた動物を作るのが適当なのではないかという点に注目して実験が進められた。実験は、腫瘍の好発系と言われるFischer344ラットを用いて、胸腺細胞を中心としたimmatureリンパ系細胞において特異的な発現を制御するlymphocyte specific protein tyrosine kinase (p56 lck)のタイプ1プロモーター(-269~+26)でpX発現を制御させたトランスジェニックラット(lck-pXラット)を作成し解析を加えた。

その結果、導入遺伝子のゲノム内での組み込み位置、pX mRNAの発現の各々異なる動物が得られた。胸腺を中心としたリンパ組織に特異的に強い発現を示す系統も得られた。さらに複数の系統において、上皮系マーカー陽性でspindle cell typeを中心とした胸腺腫の発生がTg38系統を中心に高率に確認された。このような腫瘍は同腹のコントロールラットでは見られず、さらに病変が独立した複数の系統に発生したことより、腫瘍の発生がpX遺伝子産物の作用によって発生したと考えられた。導入遺伝子の構造は同じでも、各系統によって腫瘍発生率及びpX遺伝子のmRNAレベルでの発現は異なっており、導入遺伝子の組み込み位置などの違いによる影響が強いと推測された。pXの発現は、ノザンレベルにおいて胸腺腫瘍特異的な発現が見られ、さらにpXの発現が弱いTg3系統は、腫瘍の発生率も低く、発現の強いTg38系統では高率に発生しpXの発現量が腫瘍の発生に直接関連する可能性も示唆された。腫瘍は幾つかの系統においては胸腺外にも発生した。腫瘍の発生に伴い分葉好中球の増加を認めたが、末梢血液において白血病を示唆する所見は得られなかった。以上により、lck-pXラットがHTLV-I pX遺伝子の腫瘍化能を中心とした病原性を明らかにするための有用なモデルであることが示唆された。

上記の様な主旨で、申請者による公開發表が約20名の聴衆を前にして行われた。副査の守内教授からは主に以下の点について質問と指摘があった。先ず、プロモーター特性とは異なる胸腺上皮由来の腫瘍が発生した結果に関して、特にプロモーターのシークエンスによる確認をしたか。プロモーター選択の理由などについて。また、コピー数が多い系統

があるように見えるが腫瘍の発生率はどうか。違う系統同士を交配させたらどうか。結局、白血病発症にはTax以外の特にLTRのほうが重要だったのではないか、などについて。柿沼教授からは、腫瘍発生の研究として重要性の高い研究だが、やはりなぜATLが発症せず胸腺腫なのか。プロモーターが短いのが原因ではないか。F344ラットを使用した理由について。また、ラットにおいてT細胞系の腫瘍の発生はどの程度か。ラットに存在するレトロウィルスの形態などの点について。そして、導入遺伝子周囲の塩基配列の情報が重要ではないかという点について指摘があった。

申請者は、それらの指摘に対して概ね同意しつつ今後の課題としたいと回答したが、それらの回答の中で特にプロモーターの問題に関しては、細胞分離前のwholeの胸腺組織としてはこの採用した長さのプロモーターでも特異性が得られると言うことに言及し、また、Tax以外の因子に関する問題には、Taxに注目する理由を述べる中で、LTRを用いたトランスジェニックの系でも白血病ができていないことをあげた。動物の選択に関しては、特にラットがHTLV-Iに対する疾患感受性と言う点で劣っていないことを述べた。いずれの質問に対しても申請者は、自らの実験結果と既に報告されている種々の知見を根拠として概ね妥当な回答を行った。

本研究は、HTLV-I遺伝子による新たな腫瘍発生モデルを提供した点でも価値の高い研究であり、HTLV-Iの胸腺組織を中心とした実際の生体内での役割の解明など、さらなる発展が期待される。従って審査員一同は、本研究を博士(医学)の学位に値するものと判定した。