

学位論文題名

ヒト内在性レトロウイルスの臓器特異的発現とサイトカインによる試験管内発現誘導に関する研究

学位論文内容の要旨

酵母からヒトに至る全ての真核細胞にはその染色体内に感染性レトロウイルスと相同性のある塩基配列が多数存在していて、それらは内在性レトロウイルス (endogenous retroviruses, 以下ERV) と呼ばれる。これらERVは感染性レトロウイルスの宿主胚細胞ゲノムへの組み込みに由来したり、一部のものは転移性遺伝要素 (トランスポゾン) が進化したものと考えられている。多くは終止コドンの形成や欠失などにより不活化されているが、一部にはmRNAの発現や蛋白の産生が可能なものもあり、細胞の分化や増殖などの生理的機能あるいは発癌や免疫異常などの病因に、直接または間接に関与していることが予想される。実際、マウスなどではERVが胸腺レベルでの免疫の発生や自己免疫疾患の病因に深く関わっていることが知られている。ヒトでも現在までに多くのERVが単離され、そのうちのいくつかは機能的遺伝子と考えられているが、それらの生物学的な意義はまだほとんど分かっていない。

我々はヒトERVの基本的性格の解析の一環としていくつかのヒトERVについて種々の組織や培養細胞での発現を調べてきた。それらの検討と他の施設からの報告から、ERV3が生物学的活性のあるERVの一つであることが分かってきた。ERV3は第7染色体上に位置する1コピー型のC型ERVで、プロウイルスの全長を有し、*env*(外被膜)領域に完全な読み取り枠を残していることからEnv糖蛋白の産生が予想されている。その生物活性の根拠は次の2点に要約される。i) mRNAの発現量が組織や培養細胞の種類によって異なり、組織によっては個体間で差がある。ii) いくつかの培養細胞ではある種の刺激によりその発現量が増加する。

本研究では、I) ヒトERVのmRNA発現の臓器間差を正確に知る目的で、剖検臓器を用いたノザンプロット解析により個々の個体内での発現の比較検討を行った。さらにERV3の恒常的な高発現を示した副腎について、その局在を明らかにする目的で *in situ* hybridizationを試みた。II) 以前報告されたヒト培養尿細管上皮細胞 (hKEC) やPBMC以外の正常細胞での発現様式を調べる目的で、多くの疾患への関与が推測される血管内皮細胞のモデルとしてヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) を用い、競合PCR法を利用した定量的RT-PCR法により各種サイトカイン刺激後のERV3 mRNA量の変化について検討した。

I)で対象としたヒトERVは、ERV3の他、同じくプロウイルスの全長を有するC型ERVで*env*領域に完全な読み取り枠を持つ多コピー型の λ 4-1、human T lymphotropic virus type Iと*gag*領域で高いホモロジーを持ち*gag*相当領域からの蛋白の産生が証明されているHRES-1、マウス内因性スーパー抗原のMls(minor lymphocyte stimulatory antigen)

を産生する事で知られる内在性マウス乳癌ウイルス(Mtv)とhomologyの高いHERV-K、ERV3とのクロスハイブリダイゼーションから当教室で新たにその断片を単離したERVの一つであるSY-3の5種類である。剖検臓器を用いたノザンプロット解析の結果、HERV-KとSY-3では検索したいずれの臓器においてもmRNAの発現は確認できず、またHRES-1では全ての臓器において発現を認めたものの発現量に臓器間差はなかった。一方ERV3とλ4-1では複数の正常臓器での発現と発現量の臓器間差を認めた。特にERV3は、21週胎児と新生児を含む全ての個体で、副腎での発現が他の臓器と比較して高度であった。さらに、9例の正常副腎手術材料より抽出したRNAを用いてノザンプロット解析を行った結果、性別、年齢を問わずいずれの個体でもERV3 mRNAの強い発現を認めた。また、7例の副腎皮質腺腫(臨床診断; 原発性アルドステロン症 2例、Cushing症候群 3例、pre-Cushing症候群 1例、non-hyperfunctioning 1例)と5例の褐色細胞腫手術材料のノザンプロット解析では、ERV3の発現は臨床診断に関わらず全ての皮質腺腫において正常副腎のそれと同様に強い発現を示した。一方、褐色細胞腫では個体差が存在したものの、いずれも皮質腺腫と比較して発現量はごく少量であった。同一個体での正常副腎と腺腫との比較(2例)では、腺腫化に伴うERV3の著明な発現亢進や低下、あるいは新たな分子種の出現は観察されなかった。

副腎でのERV3発現の局在を明らかにするため、正常副腎の凍結切片を用いた*in situ* hybridizationを行った。その結果、用いた2種類のprobeは共に皮質全層の皮質細胞にはほぼ均一な発現シグナルを捕らえたが、髄質細胞ではbackgroundレベルであった。さらにcompetition assayにて、同一の非標識プローブの添加によりシグナルがほぼ完全に抑制されたことより、これら発現シグナルが個々のプローブに特異的であることが確認された。したがって、副腎におけるERV3の高発現は皮質細胞での高発現によるものであることが明らかとなった。この結果は副腎腫瘍を用いたノザンプロット解析の結果と矛盾しなかった。

一方、各種サイトカインで48時間刺激したHUVECにおけるERV3のmRNA量を求めた結果、いずれの検体においてもERV3 mRNA量はIL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 刺激で増加し、IFN- γ 刺激で減少を示した。各症例間での発現量の個体間差を補正する目的で、stimulation indexとして無刺激時のERV3 mRNAの発現量に対する各サイトカイン刺激後の発現量の比を求め、4個体を総合して統計学的解析を行った結果、IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 刺激による発現増強(TNF- α > IL-1 β > IL-1 α)およびIFN- γ による抑制はいずれも統計学的に有意($p < 0.05$, t-検定)であった。

数種類のヒトERVの臓器発現の検討により、その発現量の臓器間差の存在から、少なくともERV3とλ4-1には生物活性が存在している可能性が示された。特にERV3では副腎皮質全層の皮質細胞が高発現していることが明らかとなり、副腎皮質への細胞分化との関連が示唆された。その機序の詳細については現段階では不明であるが、産生されたステロイドホルモンのERV3発現への影響、発現したEnv蛋白の皮質細胞への関与、ERV3と共に発現することが知られている下流の転写調節因子(H-p1k)を介した皮質関連の細胞性遺伝子への発現調節など、いくつかの可能性が考えられた。

またHUVECを用いたサイトカインによるERV3の発現の変化の検討からは、生体内でも炎症局所の血管内皮でERV3の発現が増強している可能性が示唆された。

過剰に発現したERV産物はループスマウスなどで知られているように時として自己免疫疾患などのtarget分子として疾患に関与する可能性がある。さらに、ウイルス蛋白に対し誘導されたトレランスが同じウイルスの感染によって容易に破綻されることも知られている。したがって、副腎皮質細胞あるいは血管内皮細胞上に発現したERV3産物が、特発性

Addison病や血管炎などにおいて、自己抗原の一つとしてその病態を修飾している可能性も充分考えられる。今後、抗体や組み換え蛋白などを用いてこれらの可能性について検討してゆく必要がある。

いずれにせよ今回の二つの実験結果は、ERV3の生物学的活性の存在を示唆する知見に新たな項目を付け加え、今後のヒトERVの研究にはずみをつけたという意味で大きな価値があると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 細 川 眞澄男

副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

ヒト内在性レトロウイルスの臓器特異的発現とサイトカインによる試験管内発現誘導に関する研究

全ての真核細胞はその染色体内に感染性レトロウイルスと相同性のある塩基配列を多数有していて、それらは内在性レトロウイルス (endogenous retroviruses , 以下ERV) と呼ばれる。ERVは感染性レトロウイルスの宿主胚細胞ゲノムへの組み込みに由来したり、転移性遺伝要素が進化したものと考えられている。既に不活化されているものも多いが、mRNAの発現や蛋白の産生が可能なものもあり、生理的機能や発癌、免疫異常などの病因への関与が予想されている。実際、マウスなどではERVが自己免疫疾患などの病因に深く関わっていることが知られている。ヒトでも現在までに多くのERVが単離され、いくつかは機能的遺伝子と考えられているがそれらの生物学的な意義はまだほとんど分かっていない。本研究ではヒトERVの基本的性格の解析の一環として、I) ヒトERVのmRNA発現の臓器間差を知る目的で、いくつかのERVについて剖検臓器を用いたノザン解析により個々の個体内での発現分布の検討を行った。さらにERV3の恒常的な高発現を示した副腎について、その局在を明らかにする目的で*in situ* hybridization (ISH) を試みた。II) 正常培養細胞での発現様式を調べる目的で、多くの疾患への関与が推測される血管内皮細胞のモデルとしてヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) を使い、競合PCR法を利用した定量的RT-PCR法により各種サイトカイン刺激後のERV3 mRNA 量の変化について検討した。剖検臓器を用いたノザン解析の結果、ヒトERVであるHERV-KとSY-3では検索したいずれの臓器においてもmRNAの発現は確認できず、またHRES-1では全ての臓器において発現を認めたものの発現量に臓器間差はなかった。一方ERV3とλ4-1では複数の臓器での発現と発現量の臓器間差を認め、特にERV3では全ての個体で副腎での発現が他の臓器と比較して高度であった。さらに副腎腫瘍手術材料のノザン解析では、ERV3の発現は臨床診断に関わらず全ての皮質腺腫において高発現を示した一方、褐色細胞腫ではいずれも低発現であった。副腎切片を用いたISHの結果、用いた2種類のプローブは共に同一の非標識プローブの添加によりほぼ完全に抑制されるプローブ特異的なシグナルを皮質全層の皮質細胞に捕らえ、ERV3の発

現と副腎皮質への細胞分化との関連が示唆された。一方、各種サイトカインで48時間刺激したHUVECにおけるERV3のmRNA量を求めた結果、いずれの個体においてもIL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 刺激で増加し、IFN- γ 刺激で減少を示した。4個体のstimulation indexを総合して解析を行った結果、上記サイトカイン刺激による変化はいずれも統計学的に有意であった。このことから生体内でも炎症局所の血管内皮でERV3の発現が増強している可能性が示唆された。

上記の主旨の発表が公開発表の場で約20名の聴衆を前にして行われた。最初に副査の細川教授から、1. 内在性レトロウイルスの発現の個体差の意味、2. ヒト自己免疫疾患での臓器発現の検討の可能性、3. 副腎でのERV3の高発現の意味、4. ERV3が蛋白にまでなっている可能性、5. ERVがウイルス粒子を形成する可能性、6. ヒト血清中におけるERVに対する抗体の有無について質問があった。申請者は1. 2.に対し、疾患との関係が興味深いがヒトの場合には使える臓器が限られていて解析が充分でない旨、またPBMCを用いた検討では少なくともSLEについては正常人との間に差はなかったこと、3. に対しては産生ステロイドの作用 $\rightarrow$ ERV3 $\uparrow$ 、ERV3 $\uparrow$ $\rightarrow$ 下流の転写調節因子 $\uparrow$ $\rightarrow$ 皮質特異的遺伝子 $\uparrow$ の二つの可能性が考えられるがまだ解析できていない旨、4. に対しては、ERV3 *env*領域には完全な読み取り枠があることから蛋白にまでなっている可能性が高く、さらに共同研究者の作製したモノクローナル抗体を使ったウエスタン解析でも高発現臓器においてERV3と考えられるバンドが確認された旨、5. に対しては、ERV3、 λ 4-1では*env*のみの発現であることから粒子を作っている可能性は極めて低い、胎盤などではC型粒子が観察されるという報告もあり何らかの条件下で粒子を形成するようになる可能性も考えられる旨、また6. に対しては、共同研究者の作製したERV3の組み換え蛋白に対する抗体の産生は少なくとも、正常人、SLE、RA患者では検出できなかった旨回答した。次いで同副査の小池教授から、1. 当初よりERV3と λ 4-1に注目した根拠、2. ループスマウスでのERVの知見がmotivationとなっているのなら肝臓で多量に発現しているもの、あるいは血中に蛋白として存在していることが分かっているものに注目すべきと考えるがどうか、3. ステロイド治療患者の副腎でのERV3の発現、4. ERV3の発現と血管病変との関連を証明するための今後のstrategyについて質問があった。申請者は、1.に対してはループスマウスなどで知られるC型のERVであること、プロウイルスの全長を有し、*env*領域に完全な読み取り枠を持つことを挙げ、2.に対しては今のところ肝臓で特に高発現しているERVは見つかっていない旨、またHRES-1のように既に蛋白を産生していることの分かっているものもありそのようなものも視野に入れて模索してゆく必要がある旨、3. については未検討である旨、4. に対しては病変局所におけるISH、抗体を使った免疫染色、局所および血中での免疫応答の有無についての検討などの方法が考えられる旨回答した。最後に主査の吉木教授より、ERV3と副腎皮質の分化形成との関係に対しては胎児での解析が一つの有用な手段と考えられるが、他に良い戦略がないかとの質問があり、申請者は、皮質細胞の培養法を確立できれば種々の解析が可能となると回答した。以上、いずれの質問に対しても概ね妥当と思われる回答を示した。

本研究は、ヒトERVの発現様式の解析を通して特にERV3の生物活性の存在を示唆する二つの知見を新たに見出し、それらは今後のヒトERVの役割のさらなる解明につながるものであり学術的価値が高いと考えられた。したがって審査員一同は、本研究を博士（医学）の学位に値するものと判定した。