

学位論文題名

ヒト内在性レトロウイルス ERV 3 遺伝子導入ラットの
樹立とその分子生物学的及び病理組織学的解析

学位論文内容の要旨

内在性レトロウイルスは真核生物のゲノム内に見られる感染性レトロウイルスに似た配列を示す遺伝子の総称で、生物の種を問わず広く分布している。ヒトにも多数の内在性レトロウイルスが見出されてきており、ゲノムの約1%にも達すると考えられている。それらの大部分は遺伝学的に不活化された状態で存在するのみだが、そのうちのいくつかは遺伝子の発現が確認されている。当教室ではヒト内在性レトロウイルスのうち実際に mRNA のヒトでの発現が確認されている内の一つである ERV3 に着目し従来より研究してきた。ERV3 は約 9.9kb の 1 コピー型のヒト内在性レトロウイルスで、両端を LTR では含まれた中に *gag*、*pol*、*env* に相当する領域のあるほぼ全長のレトロウイルス遺伝子構造が保たれている。*gag*、*pol* 領域の発現は確認されていないが、スプライシングを介して *env* 領域の約 3.5kb の mRNA の転写が確認されている。この *env* 領域に約 1.8kb に及ぶ蛋白読み取り枠が保存されており、ENV 蛋白の産生が予想されている。従来までにいくつかの ERV3 の性質が見い出されてきたが、現在のところその機能や病原性、存在意義は不明である。本論文ではこの状況を打開するため ERV3 遺伝子を導入したモデル動物の作製を行った。導入遺伝子はヒト末梢血から採取したゲノム DNA より long PCR 法を用いて目的の遺伝子をいくつかの断片に分けて増幅精製し、遺伝子配列を確認した後一つにつなげて、ERV3 遺伝子の全長 (9.9kbp) をクローン化した。このクローン化遺伝子の細胞内での発現は、ラット繊維芽細胞株 W31 へ遺伝子導入し、ERV3 特異的プライマーを用いた RT-PCR を行い、増幅産物の DNA 塩基配列を決定することにより ERV3 *env* 領域の転写産物であることを確認した。遺伝子導入ラットの作製はクローン化遺伝子の WKAH/Hkm Slc 系ラット受精卵へのマイクロインジェクション、操作卵の偽妊娠ラットへの移植により行った。一連の操作により、3 頭の遺伝子導入ラットを得、そのうち 2 頭が継代化 (ETR5 系、ETR16 系) された。ERV3 *env* 領域をプローブとしたサザン解析からは ETR5 系は導入遺伝子が一箇所にタンデムで数コピー導入されており、ETR16 系は一個所で 1 コピーの遺伝子導入が考えられた。RT-PCR を用いた全身臓器での ERV3 *env* mRNA の発現の検討では、ETR5 系では、肺、副腎、唾液腺、腸管、骨格筋、脾臓、胸腺、リンパ節、末梢血、涙腺、卵巣に発現が見られ、ERV3 *env* をプローブとしたノーザン解析では特に涙腺、唾液腺に強い発現が見い出された。発現

の主体はヒトの場合よりもやや長い約 4.0kb で、ヒトと同様の約 3.5kb の発現もそれよりも弱いながらも発現していた。ETR16 系では RT-PCR 解析では、涙腺と唾液腺にのみ発現が確認され、ノーザン解析ではヒトと同じ約 3.5kb での発現が涙腺に強く、唾液腺にはそれよりも弱く認められた。ETR5 系の mRNA に対して、転写開始点の上流や poly(A) site の下流にプライマーを設定し RT-PCR 法で検討した結果、ETR5 系の 4.0kb の発現は遺伝子のタンデムな導入により通常よりも上流で転写開始が生じたり、あるいは下流の遺伝子の一部を巻き込んだ発現の可能性が示唆された。しかし、実際の蛋白産生には影響がないと考えられた。ヒトでの高発現臓器であることが知られている胎盤では、ETR5 系で胎生 12 日以降に RT-PCR 法により発現が確認され始め、胎生 16 日では遺伝子導入された胎児の胎盤のほぼすべてで発現し、妊娠後期まで継続していた。胎児本体では胎齢 16 日での発現が確認された。しかし、通常のノーザン解析では胎齢 16 日の胎盤、胎児とも検出感度以下であった。一方、ETR16 系では RT-PCR 法によっても胎生 19 日の胎盤に発現は確認されなかった。最も高発現であった ETR5 系の涙腺での蛋白発現を、ERV3 *env* 領域の合成ペプチドを免疫した兔抗血清を一次抗体として用いたウェスタン解析にて行った。その結果、ETR5 系の涙腺に特異的な約 85kDa のバンドが確認された。この分子量は DNA 塩基配列から予想される蛋白分子より大きなものであったが、この ENV 蛋白には 8 箇所の糖鎖結合の可能なアミノ酸配列部位が想定されており、その糖鎖がすべて結合している可能性が考えられた。2 系統のラットについて生後 320 日まで経時的に観察及び各臓器の組織像を検討したが、コントロールの WKAH ラットとの間に有意な差や病変は見い出せなかった。上記の結果を踏まえて考察すると、導入遺伝子自体は生体内でヒトと同様のスプライシングを示す mRNA の発現が確認され、特に ETR16 系はヒトと同じ 1 コピー型の遺伝子導入で ERV3 発現の作用としてもヒトと同様のものを期待できる。ETR5 系では約 0.5kb の mRNA の付加が確認されたものの蛋白の産生に影響がないと考えられた。従来より ERV3 にはサイトカインによる発現調節が見られ、また LTR 内にグルココルチコイド受容体が作用すると考えられている TGTTCT 配列が見られ、従来より高発現臓器としてステロイドホルモンが関与する臓器が報告されている。ヒト涙腺での ERV3 発現の検討は行われていないが、ラット涙腺ではアンドロゲン受容体が存在しており、今回得られた 2 系統に共通して涙腺が高発現であったのはこのアンドロゲン受容体に関連している可能性が考えられる。現在のところ樹立したラットでは涙腺を含め病変は確認されず、通常の状態では ERV3 の病原性は低いものと考えられたが、類似ウイルスなどの感染による分子相同性を介してこの ENV 蛋白に対して免疫反応が誘導される場合も想定される。また、ヒト培養細胞ではある種のサイトカインが ERV3 *env* の発現を制御することが知られており、炎症などによる局所でのサイトカインの発現を介した ERV3 *env* の発現増強がその炎症を修飾することも考えられる。一方、ERV3 *env* 領域には免疫抑制性に働く p15E 類似構造や細胞融合に関連する gp70 類似構造の塩基配列が保持されており、ヒト胎盤での高発現は母児間の免疫学的バリアーや胎盤での合胞体形成に関連している可能性やヒト胎児での単核球の分化に関与している報告もあり、発生分化の解析にも有効な材料を提供するものと

考えられる。以上の事より、今回樹立された ERV3 ラットは今後のヒト内在性レトロウイルスの解析に極めて有効であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

ヒト内在性レトロウイルス ERV 3 遺伝子導入ラットの 樹立とその分子生物学的及び病理組織学的解析

内在性レトロウイルスとは真核生物のゲノム内に見られる感染性レトロウイルスに類似した配列を示す遺伝子の総称で、ヒトを含め真核生物に広く分布している。それらの大部分は遺伝学的に不活化された状態で存在するのみだが、一部ではmRNA発現が確認されている。申請者は多数あるヒト内在性レトロウイルスのうち今までに研究実績のあるERV3に着目し、研究を行った。ERV3は約9.9kbの1コピー型のヒト内在性レトロウイルスで、ほぼ全長のレトロウイルス遺伝子構造が保たれており、env領域のmRNAの転写、蛋白読み取り枠の保存が見られ、ENV蛋白の産生が予想されている。現在のところその機能や病原性、存在意義は不明である。本論文ではこの状況を打開するためERV3遺伝子を導入したモデル動物の作製を行った。導入遺伝子はERV3遺伝子の全長をヒトゲノムDNAよりlong PCR法を利用し分離精製し用いた。導入遺伝子の発現能をin vitroで確認した後、WKAHラット受精卵へのマイクロインジェクションにより遺伝子導入ラットを作製した。一連の操作により、2系が継代化(ETR5系、ETR16系)された。サザン解析からはETR5系はタンデムで数コピー導入が、ETR16系は1コピーの導入が考えられた。RT-PCRを用いた検討では、ETR5系では、肺、副腎、唾液腺、腸管、筋、脾臓、胸腺、リンパ節、末梢血、涙腺、卵巣に発現が見られ、ノーザン解析では特に涙腺、唾液腺に強いERV3 envの発現が見られた。発現の主体は約4.0kbで、ヒトと同様の約3.5kbの発現も弱く認められた。ETR16系ではRT-PCR、ノーザン解析とも涙腺と唾液腺にのみ発現が確認され、約3.5kbでの発現が涙腺に特に強く認められた。ETR5系のmRNAに対して、さらにRT-PCR法で検討した結果、ETR5系の4.0kbの発現は通常よりも上流での転写開始や、下流の遺伝子を巻き込んだ発現の可能性が示唆された。ヒトでの高発現臓器である胎盤では、ETR5系で胎生12日以降にRT-PCR法により発現が確認され始め、妊娠後期まで継続していた。胎児では胎齢18日での発現が確認された。その一方、ETR16系では胎盤に発現は確認されなかった。ETR5系の涙腺での蛋白発現を、ERV3 env領域の合成ペプチドの兎抗血清を用いたウェスタン解析にて行った結果、特異的な約85kDaのバンド

が確認された。この分子量は塩基配列からの予想より大きく、糖鎖結合部位に糖鎖が結合している可能性が考えられた。2系統のラットについて生後320日まで経時的に観察及び各臓器の組織像を検討したが、コントロールのWKAHラットとの間に有意な差や病変は見い出せなかった。上記の結果を踏まえ申請者は以下のように考察した。導入遺伝子自体は生体内でヒトと同様のスプライシングを示すmRNAの発現が確認され、特にETR16系は1コピー型の遺伝子導入でヒトと同様のものを期待できる。また従来よりERV3の発現にはサイトカインやステロイドホルモンの関与が報告されており、ラット涙腺ではアンドロゲン受容体が存在していることから、涙腺での高発現と関連が考えられる。現在のところ明らかな病変は確認されず、通常の状態ではERV3の病原性は低いものと考えられるが、今後類似ウイルスなどの感染や、炎症などによるERV3の発現増強、交叉反応による変化も考えられる。一方、ERV3のヒト胎盤での高発現は母児間の免疫学的バリアーや合胞体形成に関連している可能性や、単核球の分化に関与している報告もあり、発生分化の解析にも有効な材料を提供するものと考えられる。以上の事より、今回樹立されたERV3ラットは今後のヒト内在性レトロウイルスの解析に極めて有効であると考えられる。

申請者の学位論文内容の発表後、副査の小池隆夫教授からERV3発現の臓器特異性についての見解を求められ、またERV3蛋白が血中に流れている可能性についての質問があった。また、ERV3を選択した理由、ERV3とヒト疾患との関与、特にSjögren症候群との関連についての質問があった。

次いで副査の守内哲也教授よりERV3遺伝子の構造、導入遺伝子の塩基配列についての質問があった。さらに、検出したmRNA、蛋白のシーケンスの確認の必要性、mis-poly(A) splicingの説明、加齢に伴う変化に関する質問があり、今後の研究方針についての意見を求められた。

最後に主査より皮膚移植での拒絶の有無、HTLV-I感染実験に関する助言、また中枢神経系の発現についての質問や、ERV3ラットの今後の可能性に関する助言を受けた。申請者はいずれの質問にも過去の文献や、実験結果などを引用しつつ適切に解答した。

今回樹立されたERV3ラットはヒトと同様のERV3mRNAを発現しており、ERV3遺伝子を持つモデル動物として貴重な存在で、今後の更なる解析により内在性レトロウイルスの生物学的意義の解明が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。