

学位論文題名

Hematopoietic Progenitor Cells as Possible Origins of Epithelial Thymoma in a Human T Lymphocyte Virus Type I pX Gene Transgenic Rat Model

(HTLV-I pX トランスジェニックラットに発生する上皮型胸腺腫の
骨髄前駆細胞由来に関する検討)

学位論文内容の要旨

I. 目的

HTLV-I (Human T Lymphocyte Virus Type I) は、成人 T 細胞白血病をはじめとする腫瘍性疾患や慢性関節症、ぶどう膜炎など種々の炎症性疾患の病態形成に関係している。HTLV-I に特異的な遺伝子領域である pX 遺伝子領域には高い転写促進活性を持つ Tax 蛋白がコードされており、自らのウィルスプロモーターである LTR (Long Terminal Repeat) を活性化するのみならず、Interleukin 2 (IL-2)、IL-2 受容体 α 鎖、TNF- α などのサイトカイン関連遺伝子や種々のプロトオンコジーンを活性化し HTLV-I 関連疾患を発症させると考えられている。申請者らはリンパ系組織での pX 遺伝子の病原性を解析する目的で、ラット lck type I (lymphocyte specific protein tyrosine kinase type I) promoter の制御下で HTLV-I pX 遺伝子を発現するトランスジェニックラット (以下 lck-pX ラット) を作製し、高率に髄質由来の上皮型胸腺腫を発生することを報告してきた。

本研究では HTLV-I pX 遺伝子を有する骨髄細胞の胸腺腫の発生にかかわる役割を解析する目的で、致死線量照射した正常ラットに lck-pX ラットの骨髄細胞を移植し、lck-pX ラット類似の胸腺腫発生の有無を検討した。

II. 材料と方法

1. 実験動物

5-9 週齢の近交系ラット F344/Jcl ラットおよび当教室にて作成した lck-pX ラット (Tg38 系) の雄を使用した。

2. 骨髄細胞の調整

胸腺腫細胞の起源を同定するために下記の 3 通りの方法で lck-pX ラットの骨髄細胞分画を得た。Total BMMC (Bone Marrow Mononuclear Cells) : lck-pX ラットの大腿骨を摘出し PBS にてフラッシング後、得られた骨髄細胞液に同量の Lympholyte rat を加え遠心後、中間層より骨髄単核細胞分画を分離し得た。nAd-BMMC (non adherent BMMC) : Total BMMC を Sephadex G10 カラムに通過させ接着系細胞を除去し浮遊系細胞分画を得た。Ad-BMMC (adherent BMMC) : Total BMMC をペトリディッシュ上で 10%FBS 加 α MEM 培地 (37°C, 5%CO₂) にて 24 時間培養後、非接着細胞を除去し、さらに 14 日間培養しコンフルエントに達した接着細胞を 0.25%トリプシン EDTA 処理にて接着系細胞分画として得た。

3. 骨髄細胞移植の方法

5-9 週齢の F344/Jcl ラット雄に致死線量 12Gy の放射線を照射し、lck-pX ラットから分離した 1×10^7 個の Total BMMC、nAd-BMMC、Ad-BMMC をそれぞれ尾静脈あるいは大腿静脈から注射し、3 群の骨髄移植ラットを得、移植後胸腺腫による症状が発症するまであるいは約 45 週間にわたり観察した。移植後 2 週間以内に死亡したラットは移植不成功例として除外した。

4. Thymic lymphocytes と Thymic adherent cells の分離法

無菌的に摘出した胸腺、胸腺腫をはさみにて細片化した後、DMEM 培養液に 10%FBS を加え 24 well plate の各 well に 2-3 片ずつ入れ、37°C、5%CO₂ の条件下で培地を交換せずに単層継代培養した。約 2 週間後に接着系細胞がコンフルエントに達した時点で浮遊系細胞を Thymic lymphocytes として回収し、接着系細胞はさらに 2 週間、3 日毎の培地交換を繰り返して浮遊系細胞を除去しながら継代培養して回収し Thymic adherent cells とした。

5. Thymic lymphocytes と Thymic adherent cells における pX 遺伝子、whn 遺伝子の発現解析

上記の方法により培養分離した Thymic lymphocytes、Thymic adherent cells よりそれぞれ DNA、RNA を抽出し pX をプライマーとする PCR、RT-PCR を施行した。whn (winged-helix-nude) 遺伝子の発現は real-time RT-PCR により定量的に評価した。

6. 胸腺細胞および骨髄細胞における UEA-1 陽性細胞の検討

UEA-1 (Ulex Europaeus Agglutinin-1) 陽性細胞の存在の有無を胸腺では免疫染色にて、骨髄細胞では免疫染色後の FACS にて解析を行った。

III. 結果

1. 骨髄細胞移植後の胸腺腫の発生

ドナーを lck-pX ラット、レシピエントを正常ラットとし Total BMMC を移植した群では、約 5 ヶ月以内に 19 頭中 18 頭に胸腺腫の発生を認めた。この胸腺腫は組織学的に lck-pX ラットに発生する胸腺腫と同様の紡錘形細胞の増殖からなり、抗ケラチン抗体および抗 Tax 蛋白抗体陽性であることから、lck-pX ラット胸腺腫と同じ上皮型胸腺腫であることが確認された。さらに nAd-BMMC を移植した群にも 3 頭中 2 頭に胸腺腫の発生を認めたが、Ad-BMMC を移植した 17 匹中胸腺腫を発生したラットは認められなかった。

2. 胸腺腫細胞における pX 遺伝子発現の解析

胸腺腫発生の有無に関わらずレシピエントラットの Thymic lymphocytes と Thymic adherent cells の双方に pX 遺伝子の組み込みを認めた。また胸腺腫を発生した Thymic adherent cells には pX 遺伝子の発現も認められた。

3. レシピエントに発生した胸腺腫の由来の解析

第 3 嚔嚢由来の正常胸腺上皮細胞に発現している whn 遺伝子は lck-pX ラットの上皮型胸腺腫細胞においてはほとんど発現していなかった。しかし、正常胸腺髄質上皮に発現している UEA-1 はレシピエントに発生する胸腺腫で陽性であった。さらに、lck-pX ラットの BMMC には FACS 解析の結果、約 7.5% に UEA-1 強陽性細胞が認められた。

IV. 考察

正常レシピエントラットに発生する胸腺腫細胞は、移植した lck-pX ラットの骨髄単核細胞分画に存在する浮遊系細胞中の前駆細胞に由来すると考えられた。この際、胸腺腫細胞の染色体数は正常ラット胸腺上皮細胞と同様であることから細胞融合による形質転換の可能性は否定された。胸腺髄質および骨髄細胞中には共に UEA-1 陽性細胞が存在し、しかも胸腺原基に由来するすべての胸腺上皮細胞に発現する whn 遺伝子が胸腺腫細胞においてはほとんど発現していなかったことから、この lck-pX ラット骨髄中の UEA-1 陽性前駆細胞がこのモデルに発生する上皮型胸腺腫細胞の由来であると考え

られた。

V. 結語

髄質由来上皮型胸腺腫発生 lck-pX ラット骨髓単核細胞を移入した正常ラットにも同様な胸腺腫を発生することから、lck-pX ラットに発生する上皮型胸腺腫は、骨髓に含まれる前駆細胞が胸腺に遊走して髄質上皮に分化し、pX 遺伝子発現を伴って腫瘍化している可能性が高いと考えられた。

さらに、このラットモデルを用いることにより胸腺上皮や上皮型胸腺腫の発生、機能における骨髓細胞の役割をさらに解明することが出来るものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

Hematopoietic Progenitor Cells as Possible Origins of Epithelial Thymoma in a Human T Lymphocyte Virus Type I pX Gene Transgenic Rat Model

(HTLV-I pX トランスジェニックラットに発生する上皮型胸腺腫の
骨髄前駆細胞由来に関する検討)

HTLV-I (Human T Lymphocyte Virus Type I) は、成人 T 細胞白血病をはじめとする腫瘍性疾患や慢性関節症、ぶどう膜炎など種々の炎症性疾患の病態形成に関係している。ラット lck type I (lymphocyte specific protein tyrosine kinase type I) promoter の制御下で HTLV-I pX 遺伝子を発現するトランスジェニックラット (以下 lck-pX ラット) では、高率に髄質由来の上皮型胸腺腫を発生する。本研究では HTLV-I pX 遺伝子を有する骨髄細胞の胸腺腫の発生にかかわる役割を解析する目的で、致死線量照射した正常ラットに lck-pX ラットの骨髄細胞を移植し、lck-pX ラット類似の胸腺腫発生の有無を検討した。

ドナーを lck-pX ラット、レシピエントを正常ラットとし骨髄単核細胞を移植した群では、約 5 ヶ月以内に 19 頭中 18 頭に胸腺腫の発生を認めた。この胸腺腫は組織学的に lck-pX ラットに発生する胸腺腫と同様の紡錘形細胞の増殖からなり、抗ケラチン抗体および抗 Tax 蛋白抗体陽性であることから、lck-pX ラット胸腺腫と同じ上皮型胸腺腫であることが確認された。さらに骨髄単核細胞中の浮遊系細胞分画を移植した群にも 3 頭中 2 頭に胸腺腫の発生を認めたが、非接着系細胞分画を移植した 17 匹中胸腺腫を発生したラットは認められなかった。胸腺腫上皮細胞と胸腺リンパ球の双方に pX 遺伝子の組み込みと発現を認めることから、骨髄細胞移植により正常レシピエントラットに発生する胸腺腫細胞は、移植した lck-pX ラットの骨髄単核細胞分画に存在する浮遊系細胞中の前駆細胞に由来すると考えられた。この際、胸腺腫細胞の染色体数は正常ラット胸腺上皮細胞と同様であることから細胞融合による形質転換の可能性は否定的である。

Lck-pX ラット胸腺髄質および骨髄細胞中には共に UEA-1 陽性細胞が存在し、しかも胸腺原基に由来するすべての胸腺上皮細胞に発現する whn 遺伝子が胸腺腫細胞においてはほとんど発現していなかったことから、この lck-pX ラット骨髄中の UEA-1 陽性前駆細胞が、このモデルに発生する髄質由来上皮型胸腺腫細胞の由来であると考え

られた。

以上、髄質由来上皮型胸腺腫発生 lck-pX ラット骨髄単核細胞を移入した正常ラットにも同様な胸腺腫を発生することから、lck-pX ラットに発生する上皮型胸腺腫は、骨髄に含まれる前駆細胞が胸腺に遊走して髄質上皮に分化し、pX 遺伝子発現を伴って腫瘍化している可能性が高いと考えられた。

口頭発表において加藤紘之教授より lck-pX ラット作成、骨髄移植ラット作成の動機、経緯について、lck-pX ラット、骨髄移植ラットに発生する胸腺腫の発症機序、臓器特異性について、ヒト胸腺腫の発症機序について質問があった。

つづいて小野江和則教授より骨髄移植におけるレシピエントラットの胸腺腫未発症段階での胸腺髄質領域における pX 発現骨髄由来細胞の存在の有無について、ドナー骨髄細胞の調製において接着系細胞分画と非接着系細胞分画に分離した意義について、本研究にて観察された骨髄細胞から胸腺上皮細胞への形質転換が、細胞融合によるものではないということの染色体解析による証明について質問があった。また吉木敬教授より、この胸腺腫を腎被膜下に移植した場合の悪性化の可能性について、このラットモデルを用いることによる、胸腺上皮や上皮型胸腺腫の発生、機能における役割の解析における有用性について質問があったが、いずれの質問に対しても、申請者はおおむね妥当な回答をした。

lck-pX ラットに発生する上皮型胸腺腫は、骨髄に含まれる前駆細胞が胸腺に遊走して髄質上皮に分化し、pX 遺伝子発現を伴って腫瘍化すること、さらに、このラットモデルを用いることにより胸腺上皮や上皮型胸腺腫の発生・機能がさらに解明されるものと期待される。

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。