

博士（獣医学） 富 岡 幸 子

学 位 論 文 題 名

神 経 膜 腫 誘 発 ト リ 白 血 病 ウ イ ル ス の 病 原 性 な ら び に
分子生物学的性状の解析

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

いわゆるトリの神経膠腫は散在性髄膜脳炎を背景に星状膠細胞が多発性結節性に増殖する疾患である。本疾患はトリ白血病ウイルス (avian leukosis virus; ALV) によって誘発されることが示唆されている。ALV はプロウイルスとして細胞 DNA に組み込まれた後、その long terminal repeat (LTR) のプロモーター作用によって宿主のがん遺伝子の発現を活性化し細胞をがん化させる。ALV が誘発する腫瘍の大半は造血器系腫瘍であることから、神経膠腫誘発 ALV の発がん機構解明はレトロウイルスの中核神経系 (central nervous system; CNS) に対する病原性の理解に役立つ。本研究ではこの神経膠腫誘発 ALV の性状を明らかにするため卵黄囊内へのウイルス接種実験によって組織親和性を明らかにした。次に、ウイルスゲノムの全塩基配列の決定と LTR の転写活性の解析を行い本ウイルスの持つ神経細胞への特異な腫瘍原性について分子生物学的に考察を加えた。さらに、本疾患で発現するがん遺伝子産物について免疫組織化学的検討を行った。

第 I 章では、干渉試験により神経膠腫誘発 ALV が A 亜群に属することを明らかにした。次に本ウイルスの組織親和性と病原性を検索するために C/O 系 specific pathogen free (SPF) 鶏の卵黄囊内に本 ALV を接種した。組織学的には 50 あるいは 100 日齢の感染鶏 12 羽中 11 羽 (92%) に非化膿性脳炎が認められ、これらのうち 3 羽 (25%) に本疾患に特徴的な結節性脳病変が認められた。また、細胞質内基質封入体および異型心筋細胞の増殖を伴う非化膿性心筋炎が 12 羽中 9 羽 (75%) で認められた。免疫組織化学的には ALV 抗原が CNS および心臓を含む全身諸臓器から検出された。これら免疫組織化学的成績はプロウイルス DNA およびウイルス RNA に対する半定量的 PCR によって裏付けられた。以上の成績から、本ウイルスは全身諸臓器に広い親和性を示すにもかかわらず、CNS にのみ腫瘍を誘発することが示唆された。

第 II 章では、神経膠腫誘発 ALV が CNS に腫瘍を誘発する機序を解明する糸口として、ウイルスゲノム完全長のヌクレオチドシークエンスを決定した。本ウイルスのゲノム全長はがん遺伝子を欠く典型的な Alpharetrovirus, ALV の構造に一致した。本ウイルスのコード領域のシークエンスは ALV に近似していたが、LTR の U3, R エレメントおよび 3' LTR 上流の 3' 非翻訳領域 (3' untranslated region; 3' UTR) を含む非コード領域はトリ肉腫ウイルス CT10 株や 肉腫ウイルス Y73 株といった欠損型肉腫ウイルスあるいは ALV-J と高い相同性を示した。これらの成績と 3' UTR のシークエンス解析から、本ウイルスが複数の ALV および ASV から構成されるリコンビナントウイルスであることが推察された。また、LTR U3 エレメントを他の ALV と比較すると、本ウイルスにはわずかな欠失と点突然変異が認められた。さらに Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) アッセイによって、本ウイルス LTR のプロモーター活性は鶏胚線維芽細胞では ALV-A 標準株 RAV-1 と同等なのに対し、ヒト星状膠細胞腫由来細胞株 U87MG では有意に低いことが明らかになった。以上の成績から、ウイルスのリコンビネーションならびに LTR のシークエンスおよびそのプロモーター活性の差が神経膠腫を誘発する特異な性状に関与する可能性が推察された。

ALV によるリンパ性白血病は通常 c-myc への挿入突然変異によって誘発される。しかし ALV の挿入部位すなわち関連するプロトがん遺伝子の種類が異なった場合、表現型の異なる腫瘍が誘発される。そこで、第 III 章では本疾患で発現しているがん遺伝子産物を免疫組織化学的に検索した。その結果、病変を構成する星状膠細胞は疾患の初期から一貫して過剰に K-Ras を発現していることが明らかになった。

この成績から *K-ras* 遺伝子の活性化が病変形成初期から起こり本疾患の病理発生に重要な役割を果たすことが示唆された。一方、リンパ性白血病とは異なり *c-myc* へのプロウイルスの挿入はレーザーマイクロダイセクション法では検出されなかった。しかしながら、病巣内の星状膠細胞は *c-Myc* 弱陽性を示したことから、*c-myc* が *K-ras* と協調作用し腫瘍形成に関与することが推察された。

以上の成績をまとめると、本研究によって神経膠腫誘発 ALV は全身諸臓器に広い親和性を示すにもかかわらず、主に CNS に腫瘍を誘発することが確認された。また、この CNS に対する腫瘍原性にはウイルスのリコンビネーション、プロウイルス LTR のシークエンスおよびそのプロモーター活性の差、*K-ras* 遺伝子の活性化が関与していることが推察された。

学位論文審査の要旨

主査教授 梅村孝司
副査教授 小沼操
副査助教授 御領政信
副査助教授 落合謙爾

学位論文題名

神経膠腫誘発トリ白血病ウイルスの病原性ならびに 分子生物学的性状の解析

いわゆるトリの神経膠腫は散在性髄膜脳炎を背景に星状膠細胞が多発性結節性に増殖する疾患である。本疾患はトリ白血病ウイルス (avian leukosis virus; ALV) によって誘発されることが示唆されている。ALV はプロウイルスとして細胞 DNA に組み込まれた後、その long terminal repeat (LTR) のプロモーター作用によって宿主のがん遺伝子の発現を活性化し、細胞をがん化させる。ALV が誘発する腫瘍の大半は造血器系腫瘍であることから、神経膠腫誘発 ALV の発がん機構解明はレトロウイルスの中核神経系 (central nervous system; CNS) に対する病原性の理解に役立つ。本研究では卵黄嚢内へのウイルス接種実験によって神経膠腫誘発 ALV の組織親和性を明らかにした。次にウイルスゲノムの全塩基配列の決定と LTR の転写活性の解析を行い分子生物学的に考察を加えた。さらに、本疾患で発現するがん遺伝子産物について免疫組織化学的検討を行った。

第 I 章では、干渉試験により神経膠腫誘発 ALV が A 亜群に属することを明らかにした。次に本ウイルスの組織親和性と病原性を検索するために鶏卵黄嚢内に本 ALV を接種した。感染鶏の 92% に非化膿性脳炎が認められ、これらのうち 25% には本疾患に特徴的な結節性脳病変が認められた。また、細胞質内基質封入体および異型心筋細胞の増殖を伴う非化膿性心筋炎が感染鶏の 75% で認められた。ALV 抗原が CNS および心臓を含む全身諸臓器から検出された。プロウイルス DNA およびウイルス RNA の半定量的 PCR の成績は免疫組織化学的成績と相関した。以上の成績から、本ウイルスは全身諸臓器に広い親和性を示すにもかかわらず、CNS に腫瘍を誘発することが示唆された。

第 II 章では、ウイルスゲノムの全塩基配列を決定した。本ウイルスのゲノム全長はがん遺伝子を欠く典型的な Alpharetrovirus, ALV の構造に一致した。コード領域のシークエンスは ALV に近似していたが、LTR および 3' LTR 上流の 3' 非翻訳領域 (3' untranslated region; 3' UTR) を含む非コード領域は欠損型肉腫ウイルスと高い相同性を示した。これらの成績と 3' UTR のシークエンス解析から、本ウイルスが複数の Alpharetrovirus から構成されるリコンビナントウイルスであることが推察された。他の ALV と比較すると、本ウイルスの LTR には消失と点突然変異が認められた。Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) アッセイによって、本ウイルス LTR のプロモーター活性は鶏胚線維芽細胞では ALV-A 標準株 RAV-1 と同等なのに対し、ヒト星状膠細胞腫由来細胞株では有意に低いことが明らかになった。以上の成績から、ウイルスのリコンビネーションならびに LTR のシークエンスおよびそのプロモーター活性の差が神経膠腫を誘発する特異な性状に関与する可能性が推察された。

ALV によるリンパ性白血病は通常 *c-myc* への挿入突然変異によって誘発される。しかし、ALV の挿入部位すなわち関連するがん遺伝子の種類が異なった場合、表現型の異なる腫瘍が誘発される。そこで、第 III 章では本疾患で発現するがん遺伝子産物を免疫組織化学的に検索した。その結果、病変を構成する星状膠細胞は疾患の初期から一貫して過剰に K-Ras を発現していることが明らかになった。この成績から *K-ras* 遺伝子の活性化が病変形成初期から起こり、本疾患の病理発生に重要な役割を果たすことが示唆された。一方、リンパ性白血病とは異なり *c-myc* へのプロウイルスの挿入はレーザーマイクロダイセクション法では検出されなかった。

以上の成績をまとめると、本研究によって神経膠腫誘発 ALV は全身諸臓器に広い親和性を示すにもかかわらず、主に CNS に腫瘍を誘発することが示された。また、この CNS に対する腫瘍原性にはウイルスのリコンビネーション、プロウイルス LTR のシークエンスおよびそのプロモーター活性の差、*K-ras* 遺伝子の活性化が関与する可能性が示された。よって、審査委員一同は富岡幸子氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。