

神経膠腫誘発トリ白血病ウイルスの神経組織に対する 新たな病原性の解析

学位論文内容の要旨

いわゆるトリの神経膠腫 (so-called fowl glioma) は非化膿性髄膜炎を背景にして星状膠細胞が多発性結節性に増殖する鶏の疾患である。わが国では1995年に動物園で飼育されていた日本鶏 (*Gallus gallus domesticus*) に本疾患の初発例が発見された。罹患鶏の脳病変の結節内にトリ白血病ウイルス (avian leukosis virus; ALV) 抗原が存在したこと、ならびに超微形態学的にレトロウイルス様粒子が確認されたことから、本疾患はALVに起因する腫瘍性疾患であると推察された。その後、罹患鶏の脳乳剤を幼雛の脳内に接種することで神経膠腫が他の個体に伝播することが示されると共に、本疾患の原因であるALVが分離された。この原因ウイルスは全身諸臓器に広い親和性を示すにも関わらず中枢神経系に腫瘍を誘発することが明らかにされた。さらに、干渉試験およびウイルスゲノムのシーケンス解析により、本ウイルスはこれまでに知られていない新たなALV A亜群 (ALV-A) の一種であることが示唆され、トリの神経膠腫誘発ウイルス (fowl glioma-inducing virus; FGV) として報告されるようになった。

既知のALV-Aの多くが造血器系腫瘍を誘発するのに対し、FGVは神経系に腫瘍原性を示すという特徴を有している。ALVの構造遺伝子の一つであるenvはエンベロープ糖蛋白をコードし、またALVのプロウイルスがその両端に持つlong terminal repeat (LTR) 配列はプロモーターとしてウイルスのmRNA転写を制御する。FGVを構成する各構造遺伝子とLTRのシーケンスを他のALVおよびトリ肉腫ウイルスのそれらと比較した結果、FGVのenv SU領域およびLTRはALV-A標準株のそれと大きく異なることが明らかとなった。この成績から、FGVのenvとLTRの両者あるいはその一方が、FGVの特異な神経病原性に関与すると推察された。

このように、FGVは神経系に腫瘍原性を示すというユニークな特徴を有しており、これら神経病原性と発癌機構の解明は哺乳類および鳥類のレトロウイルスの神経系に対する病原性の理解に役立つ。本研究の第I章および第II章では、末梢神経および小脳に対するFGVの新たな神経病原性について記載した。さらに第III章では、FGVの神経病原性におけるLTRプロモーターの役割について、トランスジェニックマウス技術を用いて検討した。

第I章では、FGVを頭蓋内に接種された11羽の鶏（日本鶏9羽およびSPF鶏2羽）に見られた多発性末梢神経腫大を検索した。11羽全ての鶏は臨床的に進行性の脚麻痺あるいは斜頸を示した。腰仙骨神経叢、腕神経叢ないし脊髄神経節が主に侵され、組織学的にこれら末梢神経は神経線維間での紡錘形細胞の瀰漫性増殖から

成り、残存する軸索を腫瘍細胞が同心円状に取り囲む特徴的な onion bulb 様構造が観察された。紡錘形細胞は免疫組織化学的に S-100 α/β 蛋白に陰性を示し、超微形態学的には双極性の短い細胞質突起を持ち不連続な基底膜に被われ、細胞質にはときおり飲小胞が存在していた。以上の形態学的特徴は末梢神経での周膜細胞の増殖を特徴とする極めて稀な病態、神経内型神経周膜腫のそれと概ね一致した。獣医学領域では、本疾患は過去にイヌで 1 例のみ報告されているに過ぎない。また、腫大した末梢神経を用いた polymerase chain reaction (PCR) 法により 11 例中 8 例 (73%) から FGV 特異配列が検出された。以上の成績から、鶏の多発性神経内型神経周膜腫の原因に FGV が関与していることが示唆された。

FGV を卵黄嚢内接種した鶏の小脳に、神経膠腫ないし神経周膜腫とは別個の形態異常が観察された。第 II 章ではこれら小脳病変の形態学的特徴を明らかにするため、SPF 鶏の 7 日齢鶏胚に FGV を接種し小脳の経時的検索を行った。FGV 接種鶏 (70-140 日齢) の小脳は、肉眼的に軽度萎縮していた。組織学的に、これら小脳では内顆粒層の顆粒細胞脱落、外顆粒層の遺残およびプルキンエ細胞層の配列異常が認められた。これらの病変は FGV 接種鶏のうち 1 羽を除く全例に認められた。胎生期小脳の検索では外顆粒層は対照群よりも厚くその配列は乱れ、分子層および内顆粒層は菲薄化して形成は遅延していた。顆粒細胞は免疫組織化学的に ALV 共通抗原に陽性を示した。また、抗ビメンチン抗体を用いた免疫組織化学的検索により、胎生期小脳の分子層では Bergmann 線維が減数し柵状配列は乱れていることが示された。terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling 法および超微形態学的検索では、胎生期小脳の外顆粒層顆粒細胞および分子層内に移動した顆粒細胞は高頻度にアポトーシスに陥っていることが明らかとなった。以上の成績から、FGV 接種鶏に見られた小脳形態異常は FGV 感染により引き起こされた顆粒細胞のアポトーシスに起因する小脳低形成であること、ならびにこの細胞死が他の顆粒細胞の移動障害、分子層での Bergmann 線維の配列異常、およびプルキンエ細胞層の構築異常を誘発することが示唆された。

ALV の LTR はウイルス複製のみならず、組織特異的発癌に重要な役割を果たす。ALV-A は一般的にファブリキウス嚢由来 B 細胞リンパ腫を誘発するのに対し、FGV は神経膠腫および神経周膜腫を誘発する。第 III 章では LTR の制御下でレポーター遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製し、reverse transcription (RT)-PCR 法を用いて FGV LTR の *in vivo* での転写活性を検索した。RT-PCR 法により導入遺伝子は全身諸臓器で発現が見られたが、大脳、小脳および精巣で高頻度に発現することが明らかとなった。以上の成績から、FGV LTR プロモーターは *in vivo* で pan-specific プロモーターとして機能する一方、特に中枢神経系および精巣において導入遺伝子発現を誘導する能力を持つことが明らかとなった。

以上の成績をまとめると、本研究によって鶏の神経組織に対する FGV の新たな病原性、すなわち多発性神経内型神経周膜腫の誘発に関与すること、および小脳低形成を引き起こすことが示された。また、FGV の LTR プロモーターがこれら神経病原性に関与していることが示唆された。

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	教授	昆泰寛
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神経組織に対する 新たな病原性の解析

トリの神経膠腫は星状膠細胞が腫瘍性に増殖する疾患で、トリ白血病ウイルス A 亜群 (ALV-A) に属する神経膠腫誘発ウイルス (FGV) を原因とする。通常の ALV-A とは異なり、FGV は神経系に腫瘍原性を示す。今回、申請者は FGV の神経病原性について病理学的、分子生物学的研究を行った。

第 I 章では FGV 感染鶏に見られた末梢神経腫大を検索した。病変は onion bulb 様構造を伴う紡錘形細胞増殖から成り、免疫染色と電顕検索から周膜細胞由来の神経内型神経周膜腫と診断された。病巣から FGV 特異配列が検出され、本疾患への関与が示唆された。第 II 章では FGV 卵黄嚢内接種鶏の小脳に観察された形態異常を検索した。主な小脳病変は顆粒細胞脱落、外顆粒層遺残、プルキンエ細胞層配列異常であった。胎生期小脳では顆粒細胞移動が遅延しており、Bergmann 線維の配列は乱れていた。顆粒細胞は高頻度にアポトーシスに陥っていた。以上より本病変は顆粒細胞のアポトーシスに起因する小脳低形成であることが示唆された。第 III 章ではトランスジェニックマウスを用いて FGV long terminal repeat (LTR) 転写活性の組織特異性を検索した。LTR 転写活性は脳、小脳および精巣で高頻度に発現し、FGV の神経向性に対する LTR の関与が推察された。

本研究の成果から、FGV は星状膠細胞のみならず周膜細胞、小脳顆粒細胞に対しても病原性を示すことが明らかにされた。また、特異な神経病原性に LTR 転写活性の組織特異性が関与する可能性を見出した。

以上のように申請者は、レトロウイルスの神経病原性機構の解明に貢献した。

よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者豊田武士の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。