

博 士 学 位 論 文

牛白血病ウイルスによる白血病発症機構の解明

-Tax の変異と腫瘍原性に関する研究-

令和元年度

森 宏

L233P mutation of bovine leukemia virus (BLV) Tax protein
correlated with leukemogenicity.

SUMMARY

Bovine leukemia virus (BLV) can be divided into two categories based on the amino acid at position 233 in the Tax protein, which probably plays a crucial role in leukemogenesis. We show here that a rat fibroblast cell line stably expressing L233-Tax formed significantly larger tumors than P233-Tax-expressing cells in a murine xenograft study. Although the microvessel density was comparable in both tumors, visible blood vessel invasion was observed only on tumors from L233-Tax-expressing cells. Endothelial cell tube formation assays using human umbilical vein endothelial cells showed no significant difference in angiogenic activity between conditioned medium from L233- and P233-Tax-expressing cells, whereas *in vitro* chemotaxis assays revealed that only L233-Tax-expressing cells produced a chemoattractant for endothelial cells. Since pathological neovascularization can occur from the recruitment of endothelial progenitor cells, these results suggest that L233-Tax-expressing cells recruit murine endothelial progenitor cells and promote neovascularization to support tumor growth. BLV-infected lymphoma cells may also recruit bovine endothelial progenitor cells to promote neovascularization. The findings of this study are consistent with our previous observation that BLV carrying P233-Tax has a significantly longer incubation period for developing tumors than the virus carrying L233-Tax and provide insight into the function of Tax in leukemogenesis by BLV.

略語表

本論文中において、以下の略語を使用した.

ATL	Adult T-cell leukemia
BLV	Bovine leukemia virus
CM	Conditioned medium
CT	Threshold cycle
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EBL	Enzootic bovine leucosis
EDTA	Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FCS	Fetal calf serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HBZ	HTLV-1 basic leucine zipper factor
H-DME	Ham's F12 medium:DMEM (1:1)
HTLV	Human T-lymphotropic virus
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
HIF	Hypoxia-inducible factor
LTR	Long terminal repeat
miRNA	Micro-RNA
MVD	Microvessel density
NHEJ	Non-homologous end joining
PBS	Phosphatase-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
RFU	Relative firefly luciferase unit
TAE	Tris-acetate-EDTA
TEC	Tumor endothelial cell
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
WHO	World Health Organization

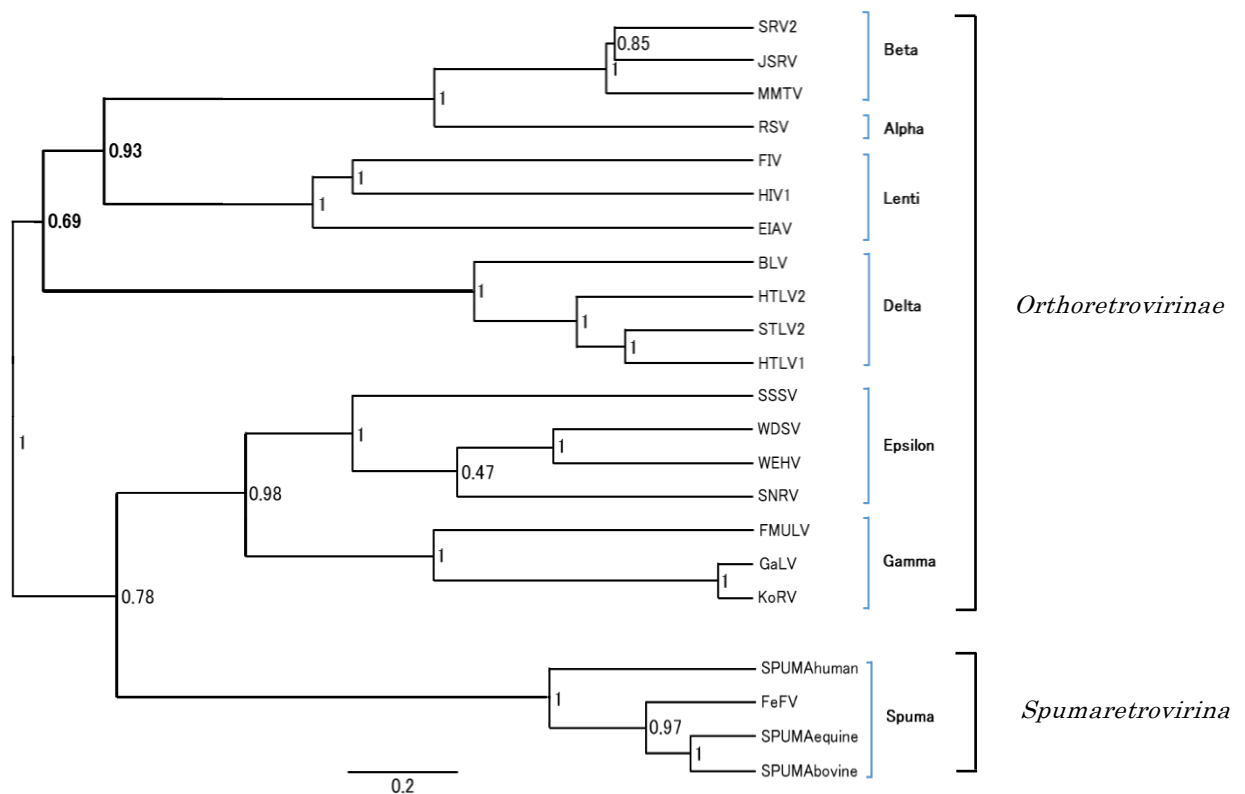
目次

序論	1
本論	7
第 1 章 Tax の <i>in vitro</i> における腫瘍原性.....	7
1) 緒言.....	7
2) 材料および方法.....	10
3) 結果.....	19
(1) Tax のアミノ酸配列の確認.....	19
(2) L233-Tax および P233-Tax 持続発現細胞の樹立.....	19
(3) L233-Tax および P233-Tax の BLV-LTR に対するトランス アクチベーション活性	22
(4) Tax 発現細胞におけるゲノムの損傷.....	24
(5) Tax 発現細胞の足場非依存性増殖	27
4) 考察.....	30
第 2 章 Tax の <i>in vivo</i> における腫瘍原性と液性因子の生物活性	32
1) 緒言.....	32
2) 材料および方法.....	33
3) 結果.....	36
(1) ノードマウス皮下移植実験	36
(2) 免疫組織染色	39
(3) チューブ形成試験	41
(4) 走化性試験	44
4) 考察.....	47
総括	49
謝辞	50
引用文献.....	51

序論

牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus: BLV) は、地方病性牛白血病 (Enzootic bovine leucosis: EBL) の病因であり、レトロウイルス科 (Family *Retroviridae*)、オルトレトロウイルス亜科 (Subfamily *Orthoretrovirinae*)、デルタレトロウイルス属 (Genus *Deltaretrovirus*) に分類され、ヒト T リンパ球向性ウイルス (human T-lymphotropic virus: HTLV) に極めて近縁なウイルスである。オルトレトロウイルス亜科には、デルタレトロウイルスの他にニワトリの白血病ウイルスや肉腫ウイルスを含むアルファレトロウイルス属 (Genus *Alpharetrovirus*)、マウス乳がんウイルスを含むベータレトロウイルス属 (Genus *Betaretrovirus*)、サルを含むほ乳類に白血病や肉腫を引き起こすガンマレトロウイルス属 (Genus *Gammaretrovirus*)、魚の肉腫ウイルスを含むイプシロンレトロウイルス属 (Genus *Epsilonretrovirus*) ならびにヒト免疫不全ウイルスを含むレンチウイルス属 (Genus *Lentivirus*) が分類される。一方、スプーマレトロウイルス亜科 (Subfamily *Spumavirinae*)、スプーマウイルス属 (Genus *Spumavirus*) に分類されるウイルスは種々の動物から分離されるが、それらの宿主に対する病原性は不明である (Fig. 1)。^{1, 2)}

レトロウイルスは (+) 鎖 RNA 2 分子をゲノムとして有し、宿主細胞に感染後、自身の逆転写酵素によってその RNA を鋳型に DNA (プロウイルス) を合成する。その際、プロウイルスゲノムの両端には long terminal repeat (LTR) と呼ばれる繰り返し配列が形成される。次いで、インテグラーゼによってプロウイルス DNA を宿主細胞ゲノム上に挿入した後、宿主の RNA ポリメラーゼによってウイルスゲノム RNA および mRNA が転写されて子孫ウイルスの複製が行われる。一方、宿主ゲノム上のプロウイルスも細胞分裂によってコピー数を増やす。



Alpharetrovirus	RSV	Rous sarcoma virus
Betaretrovirus	SRV2	Simian retrovirus type 2
	JSRV	Jaagsiekte sheep retrovirus
	MMTV	Mouse mammary tumor virus
Gammaretrovirus	FMULV	Friend murine leukemia virus
	GaLV	Gibbon ape leukemia virus
	KoRV	Koala retrovirus
Deltaretrovirus	BLV	Bovine leukemia virus
	HTLV1	Human T-lymphotropic virus type 1
	HTLV2	Human T-lymphotropic virus type 2
	STLV2	Simian T-lymphotropic virus type 2
Epsilonretrovirus	SSSV	Atlantic salmon swim bladder sarcoma virus
	WDSV	Walleye dermal retrovirus
	WEHV	Walleye epidermal hyperplasia virus
	SNRV	Snakehead retrovirus
Lentivirus	FIV	Feline immunodeficiency virus
	HIV1	Human immunodeficiency virus type 1
	EIAV	Equine infectious anemia virus
Spumaretrovirus	SPUMAhuman	Human foamy virus
	FeFV	Feline leukemia virus
	SPUMAEquine	Equine foamy virus
	SPUMABovine	Bovine foamy virus

Fig. 1. Phylogenetic reconstruction of retroviruses using reverse transcriptase sequences. ³⁾

典型的なレトロウイルスのプロウイルスゲノムは 5'LTR – *gag* – *pro* – *pol* – *env* – 3'LTR の形で配列する。両端の LTR はプロウイルス DNA の宿主細胞ゲノムへの挿入時に重要な役割を果たし、5'LTR はウイルス遺伝子の転写プロモーターとして機能する。*gag* 遺伝子はウイルス粒子の内部構造タンパク質、*pro* 遺伝子はプロテアーゼ、*pol* 遺伝子は逆転写酵素およびインテグラーゼ、*env* 遺伝子はエンベロープ糖タンパク質をコードする。アルファおよびガンマレトロウイルスの一部は宿主細胞のがん原 (*c-onc*) 遺伝子に由来する *v-onc* 遺伝子を有し、これらのウイルスが宿主動物に感染すると、本遺伝子産物の作用によって短い潜伏期で肉腫を形成する。一方、*v-onc* 遺伝子を有しないウイルスは、複製を繰り返し、プロウイルスが宿主細胞の *c-onc* 遺伝子上流に挿入された場合にのみ、すなわち、比較的長い潜伏期の後に 3'LTR の作用によってその転写が活性化され、細胞の悪性増殖を引き起こす (Fig. 2)。

BLV および成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) の病因である HTLV-1 を含むデルタレトロウイルスのプロウイルスゲノム上には、*env* 遺伝子と 3'LTR の間に pX と呼ばれる領域が存在する (Fig. 3)。本領域において最大のオープンリーディングフレームがコードする Tax タンパク質は、5'LTR からのウイルス遺伝子転写のトランスアクチベーターとして機能する。⁴⁻⁸⁾ さらに、本タンパク質は細胞増殖因子を含む様々な細胞遺伝子の転写を調節することが知られている (Fig. 3)。⁹⁻¹¹⁾ また、BLV および HTLV-1 の Tax は Ha-Ras タンパク質との共発現によってラット胎児線維芽細胞を腫瘍化する^{12, 13)} とともに、単独で各々ヒツジ B 細胞およびヒト T 細胞を不死化することが報告されている。¹⁴⁾

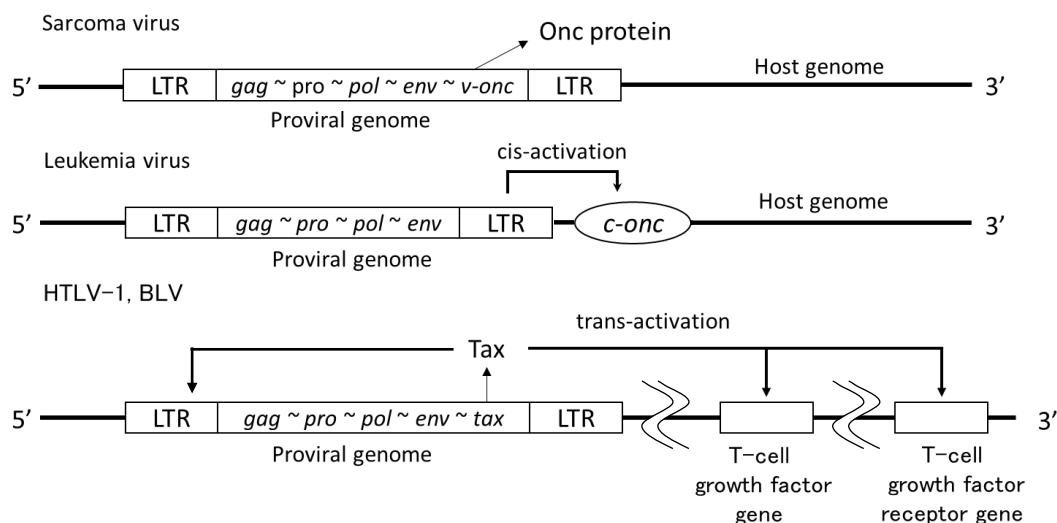


Fig. 2. Mechanism of canceration by retrovirus.

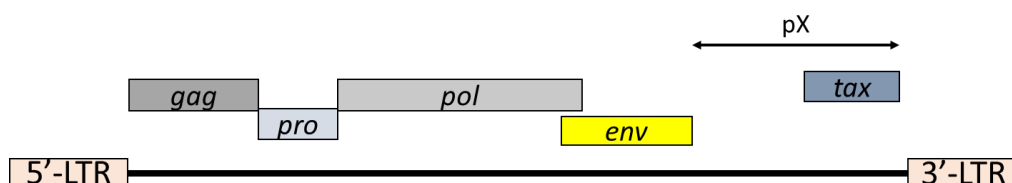


Fig. 3. Genome structure of BLV provirus.

HTLV-1 の Tax は細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の主要な標的であるため, Tax 発現細胞は宿主の免疫機構によって速やかに排除される.¹⁵⁾ そのため, 実際の ATL 患者の腫瘍細胞や ATL 細胞株では *tax* 遺伝子の変異や 5' LTR の欠失あるいはメチル化によって Tax の発現は認められない場合が多い. 一方, 3' LTR の欠損やメチル化の例は報告されていない.¹⁶⁻¹⁹⁾ 以前から, HTLV-1 の (一) 鎖から 3'LTR の逆向きプロモーター活性によって転写される RNA の存在が報告されており,²⁰⁾ 2002 年に Tax のトランスアクチベーション活性を抑制する分子として HTLV-1 basic leucine zipper factor

(HBZ) が同定された。²¹⁾ Tax とは異なり, HBZ は ATL 細胞株および新鮮腫瘍細胞を含む HTLV-1 感染のすべてのステージにおいて発現が認められる。²²⁾

HTLV-1 は感染のごく初期にウイルス粒子の産生が認められるが, 大部分は感染細胞が非感染細胞に接着することによってウイルスを伝達する。²³⁾ その後, Tax および HBZ の作用によってウイルス感染 T 細胞がポリクローナルに増殖し, 体内でのウイルスコピー数を増やす。この過程でウイルス感染細胞に Tax によるゲノム損傷や DNA のメチル化などが蓄積し, アポトーシス抵抗性や不死化が付与される。次いで, Tax および HBZ によるウイルス感染細胞の増殖促進と宿主の免疫機構による Tax 発現細胞の排除との間で平衡状態が成立する。そのような状況で, 不死化したウイルス感染細胞の中に Tax に依存しない増殖能を獲得した T 細胞クローンが出現すると, 免疫による排除を回避して異常な増殖を起こすようになる。このように, ATL の発症においては, ウイルス感染初期には Tax が, Tax の発現が認められなくなる中期以降では HBZ が中心的役割を担うものと考えられている。²⁴⁾

BLV は HTLV-1 に極めて近縁なウイルスであるが, ATL の潜伏期が 50-60 年であることに對し, BLV による白血病の好発年齢は 5-8 才とその潜伏期は短い。また, ATL 腫瘍細胞内では HTLV-1 の Tax は多くが欠損・不活化されているのに対し, BLV 感染白血病細胞では欠損はほとんど認められない。さらに, BLV では HBZ 様タンパク質の報告はなく, 3'LTR の逆向きプロモーター活性によるマイナス鎖からの miRNA の転写が報告されているのみである。²⁵⁾ したがって, BLV Tax の機能を解析することはデルタレトロウイルスの白血病発症機構における Tax の役割を理解するうえの重要なモデルとなる。

腫瘍はイニシエーション (ゲノムの不安定化, 細胞死への抵抗性), プロモーション (増殖を伴う不死化・増殖シグナルの維持), プログレッション (血管新生・浸潤と転移) の 3 段階を経て進展する。²⁶⁾ 本研究の第一章では, BLV Tax を持続的に発現するラット株化線維芽細胞を樹立して本タンパク質が宿主細胞ゲノムに与える影響並びに足場非依存性増殖能に与える影響を調べ,

Tax のイニシエーションおよびプロモーションにおける役割を検討した．次いで第二章では，**Tax** 発現細胞をヌードマウス皮下に移植して腫瘍形成能を調べて **Tax** が腫瘍のプログレッションにおいて果たす役割を推測するとともに，**Tax** 発現細胞が分泌する液性因子の活性について検討した．

本論

第 1 章 Tax の *in vitro* における腫瘍原性

1) 緒言

デルタレトロウイルスのプロウイルスゲノム上には, *env* 遺伝子と 3'LTR の間に数種の調節タンパク質をコードする pX と呼ばれる領域が存在する.²⁷⁾ それらのうち, 最大のタンパク質 Tax はプロウイルスの 5'LTR に作用してウイルス遺伝子の転写を活性化する.⁴⁻⁸⁾ さらに, *c-fos* などの宿主細胞がん原遺伝子やアポトーシス関連遺伝子の転写に影響を及ぼす.⁹⁻¹¹⁾ また, HTLV-1 および BLV の Tax は単独で宿主細胞 DNA ポリメラーゼによるゲノム DNA の損傷修復機能を阻害すること,²⁸⁾ Ha-Ras との共発現によってラット胎児線維芽細胞を悪性転換すること,^{12,13)} さらに, *in vitro* でそれぞれヒト T 細胞およびヒツジ B 細胞を不死化することが報告されている.¹⁴⁾

当研究室では, BLV による白血病発症の機構を明らかにするため, 全国の食肉衛生検査所の協力を得て EBL の疫学調査を実施してきた.²⁹⁾ その結果, ①BLV は Tax の 233 位アミノ酸によって Leu233 (L233) -Tax 型と Pro233 (P233) -Tax 型に 2 分され (Fig. 4), ②L233-Tax ウイルス感染牛の EBL 発症月齢の分布と P233-Tax ウイルスのそれは各々対数正規分布すること (Fig. 5), ③P233-Tax ウイルス感染牛の EBL 平均発症月齢は L233-Tax のそれに比べ有意に高いことを報告した.³⁰⁾ これらの成績は, P233-Tax ウイルスによる EBL の潜伏期は L233-Tax ウイルスに比べ有意に長いことを示唆している. すなわち, P233-Tax ウイルスは L233-Tax ウイルスに比べ腫瘍原性が低い可能性を示している.

本章では, Tax の L233P 変異と BLV の腫瘍原性が関連するメカニズムを明らかにするため, L233-Tax および P233-Tax を持続的に発現するラット株化線維芽細胞を樹立した. これらを単一細胞ゲル電気泳動法に供し, 両 Tax による宿主ゲノムに対する損傷能を比較し, Tax が BLV による白血病発症の

イニシエーションに果たす役割を調べた。さらに、軟寒天内コロニー形成試験により両 Tax 発現細胞の足場非依存性増殖能を調べ、Tax が腫瘍のプロモーションに果たす役割について検討した。

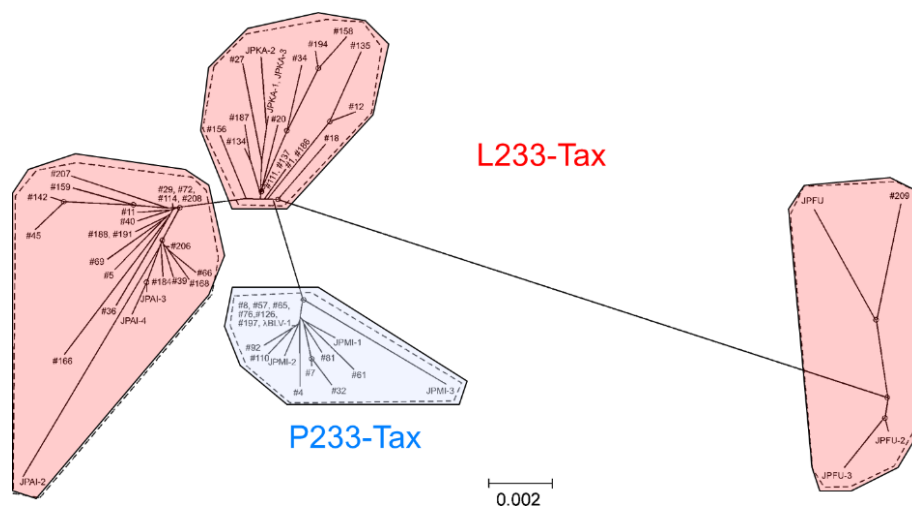


Fig. 4. Phylogenetic tree of the *tax* gene of BLV.³⁰⁾

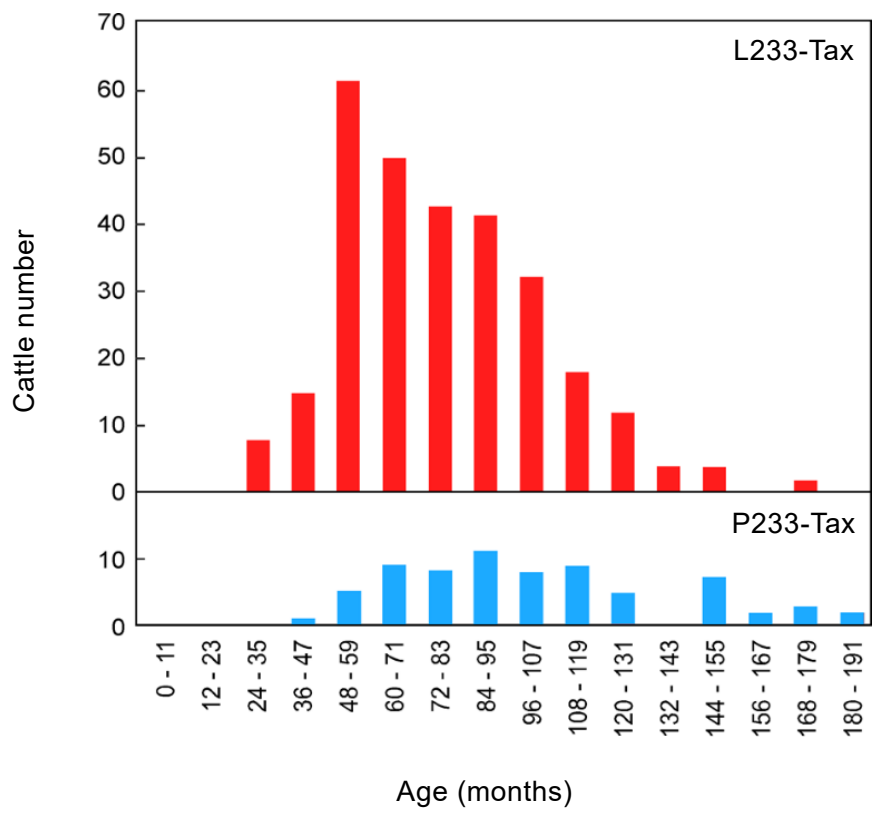


Fig. 5. Frequency distribution of age at diagnosis of EBL.³⁰⁾

2) 材料および方法

(1) リンパ肉腫検体

2008 年 6 月茨城県および 2009 年 8 月群馬県の食肉衛生検査所において、全身性腫瘍のため廃棄されたウシの胃表面および腸間膜リンパ節に形成された腫瘍を用いた。腫瘍組織は世界保健機構 (WHO) の感染性物質の輸送規制に従い、1 次および 2 次容器に梱包した。凍結後、北海道医療大学薬学部分子生命科学講座免疫微生物学教室に送付し、使用まで -80°C で保存した。

(2) 腫瘍細胞総 DNA の抽出

ウシ腫瘍組織からの総 DNA 抽出には Kapa Express Extract Kit (Kapa Biosystems) を用いた。すなわち、腫瘍片約 10mg を切り出し、PCR-grade water 44 μl , 10 \times KAPA Express Extract Buffer 5 μl , 1U/ μl KAPA Express Extract 1 μl に懸濁した。懸濁液を Heat block fastgeneTM (NIPPON Genetics) 中で 75°C , 10 分間加熱した。次いで、 95°C で 5 分間加熱し、数秒間遠心した後、上清を得た。これに、TE [10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)] 200 μl を加え、使用時まで -20°C で保存した。

(3) プライマー

BLV *tax* 遺伝子第 2 エクソンの 5'末端 15 塩基に相補的な配列に開始コドン ATG および制限酵素 *Bam*H I 認識配列を付加した rTax Fw および 3'末端 30 塩基に相補的な配列に *Xho*I 認識配列を付加した rTax Rv を設計し、合成をファスマックに委託した (Table 1)。

Table 1. Primers used in this chapter

Primer	Nucleotide sequence
rTax Fw	5'- <u>GGATCCGCCACCATGGCAAGTGTGTTGGT</u> -3' <i>Bam</i> H I
rTax Rv	5'- <u>CTCGAGTCAAAAAAGGCGGGAGAGCCATTCATTTTC</u> -3' <i>Xho</i> I

(4) *tax* 遺伝子の増幅

PCR 溶液は 10×AccuPrime™ reaction mix (Invitrogen) 5μl, 10μM rTax Fw および rTax Rv 各 1.5μl, AccuPrime™ *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen) 1.25U (0.5μl), リンパ肉腫総 DNA 5μl を混合し, 滅菌精製水で全量を 50μl とした. iCycler (Bio-Rad) で 94°C 1 分間加熱後, 94°C 15 秒, 60°C 30 秒, 68°C 30 秒の反応を 35 回繰り返した. その後, 72°C 5 分で伸長反応を行い, L233-Tax または P233-Tax をコードする遺伝子を増幅した.

(5) アガロースゲル電気泳動

泳動用緩衝液には 0.1μg/ml 臭化エチジウム (和光純薬) を含む 1×TAE 緩衝液 [40mM Tris-HCl (pH 8.0), 20mM 酢酸, 1 mM EDTA] を用いた. 泳動用緩衝液に NE-AG01 (FastGene) を 1% (w/v) になるように溶解してアガロースゲルを作製した. PCR 産物 5μl に 6×loading buffer (TaKaRa) [30mM EDTA, 36%グリセリン, 0.05%ブロモフェノールブルー, 0.05%キシレンシアノール] を 1μl 加え, 泳動用試料とした. 泳動用緩衝液に浸したアガロースゲルの試料溝に調製試料を添加し, Mupid-2x 泳動装置 (ADVANCE) を用いて 100V 定電圧で 30 分間泳動した. トランスイルミネーター上にゲルを置き, LAS-1000 UV mini® (FUJIFILM) を用いて蛍光を検出した.

(6) DNA 断片の精製

アガロースゲル電気泳動で分画した BLV *tax* 遺伝子断片を Wizard® SV

and PCR clean-up system (Promega) を用いて精製した. すなわち, アガロースゲルをスーパーLED ビューアー (BioSpeed) 上に置き, 約 0.9kb のバンドをメスで切り出した. 切り出したゲルを秤量し, 10 mg に対して 10 μ l の割合で membrane binding solution を加え, 60°C でゲルが融解するまで攪拌した. SV minicolumn assembly にゲル融解液を添加後, 室温で 1 分間静置した. これを 15,000 \times g で 1 分間遠心し, DNA をカラムに吸着させた. membrane wash solution 700 μ l で 1 回, 500 μ l で 1 回洗浄後, nuclease-free water を 50 μ l 加えた. 1 分間室温に静置した後, 15,000 \times g, 1 分間遠心して精製 DNA 溶液を溶出した.

(7) Tax 発現プラスミドの構築

(6) で得られた DNA 溶液 1 μ l に, 10 \times K buffer (TaKaRa) 1 μ l, *Bam*H I (15U/ μ l) 0.4 μ l, *Xho* I (10 U/ μ l) 0.4 μ l および滅菌精製水を加えて全量を 10 μ l とし, 30°C で 1 時間保温後, 37°C で一晩消化した. 産物を本章 (5) および (6) に準じ, アガロース電気泳動に供して約 0.9kb の DNA を精製した. これらを L233-Tax および P233-Tax DNA とした. *Bam*H I /*Xho* I 消化発現プラスミド pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) 84ng に各 Tax DNA を加え, 精製水で全量を 10 μ l に調製した, これに DNA Ligation Kit<Mighty Mix> (TaKaRa) を等量加え, 16°C で 30 分間連結反応を行い, pcA95/L233 および pcA95/P233 を得た.

(8) 大腸菌の形質転換

大腸菌 JM109 株コンピテント細胞 (TOYOBO) 100 μ l に Tax 発現プラスミド 5 μ l を加え氷中に 1 時間, 42°C で 30 秒間, さらに氷中で 10 分間放置後, S.O.C. Medium [2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose] (Thermo Fisher) 100 μ l を加え, 37°C で 1 時間振盪した. 50 μ g/ml アンピシリン含有 LB 寒天培地[1.5% (w/v) Bacto agar (Difco), 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) tryptone (Difco), 0.5%

(w/v) yeast extract (和光純薬)]に塗布し, 37℃で 16 時間培養して形質転換株を選択した.

(9) プラスミドの精製

アンピシリン添加 LB 寒天培地上のコロニーを釣菌し, 50μg/ml アンピシリン添加 LB 培地[1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) tryptone (Difco), 0.5% (w/v) yeast extract (和光純薬)] 2ml に懸濁した後, 37℃16 時間振盪した. 2,500×g で 4℃, 10 分間遠心し, 沈渣を Resuspension buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA, 100μg/μl RNase A] 100μl に懸濁した. これに Lysis buffer [200mM NaOH, 1% (w/v) SDS]を 100μl 添加し,転倒混和後,室温で 5 分間静置した. 3M 酢酸カルシウム (pH5.5) を 100μl 添加して転倒混和後, 20,000×g で 4℃, 10 分間遠心した.上清に TE 緩衝液飽和フェノールを 300μl 加えて攪拌後, 20,000×g で 4℃ , 10 分間遠心した.新しい 1.5 ml マイクロチューブに水層を移し,イソプロパノールおよび 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) をそれぞれ 210μl および 30μl 加えて転倒混和後, -80℃に 30 分間放置した. 20,000×g で 4℃, 30 分間遠心して得た沈査に 70%エタノールを 50μl 加え, 20,000×g, 4℃, 5 分間遠心した. 沈査を真空乾燥後, TE 10μl を加えて室温で 1 時間静置し, 完全に溶解させた. これらを制限酵素 *Bam*H I および *Xho* I で消化した後, 本節 (5) に準じてアガロース電気泳動に供し, 制限消化による約 0.9kb の *tax* 遺伝子の存在を確認した.

(10) 塩基配列の決定

BigDye Terminators v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) および ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した. 精製プラスミド DNA (150~300 ng), rTax Fw あるいは rTax Rv (最終濃度 3.2μg), 5×sequencing buffer 2μl, premix solution 4μl に滅菌精製水を加え, 全量を 20μl に調製した.iCycler を用いて 96℃ で 5 分間熱変性させた後, 96℃ 30 秒, 50℃ 5 秒, 60℃ 4 分の反応を 25 回繰り返す

た.

反応液に 125 mM EDTA および 99.5%エタノールをそれぞれ 5 μ l および 60 μ l 加えて転倒混和後,室温で 15 分間静置した. 15,000 \times g, 30 分間遠心して得た沈殿を 70%エタノールで洗浄し, 真空乾燥した後, Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems) を 20 μ l 加えて 95°C で 2 分間加熱した. 氷中で冷却後, ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer を用いたキャピラリー電気泳動に供した. DNA の塩基配列は ABI PRISM310 の付属ソフトを用いて決定した.

(11) 細胞

ラット株化線維芽 (Rat-1) 細胞は理化学研究所バイオリソースセンターから購入した. 細胞の培養には 10%ウシ胎児血清 (FCS) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (日水) を使用した. 細胞の培養は 37°C, 5%CO₂ 下で行った.

(12) Tax 持続発現細胞の樹立

pL233-Tax, pP233-Tax および対照として pcDNA3.1 (+) を Rat-1 細胞にトランスフェクトした. すなわち, Lipofectamine® 3000 (Invitrogen) 1.5 μ l および Opti-MEM® Medium (Gibco™) 51.5 μ l を混合したチューブを用意し, もう一方のチューブには Opti-MEM® Medium 50 μ l に プラスミド溶液 1 μ g/ μ l および P3000 Reagent 2 μ l を混合した DNA 溶液を用意した. これらを混合し, 室温に 5 分間放置した. 混合溶液 100 μ l を 12-well culture plate (Nunc) に前日播種し, 70-90%コンフルエントとなった Rat-1 細胞に滴下した. 24 時間培養後, 10%FCS, 500 μ g/ml G418 含有 DMEM に置換して 5~6 週間培養した. これらを L233-Tax 発現細胞, P233-Tax 発現細胞および対照細胞とした. 位置効果による発現量の偏りを避けるため, トランスフェクタントの各プールを以下の実験に供した.

(13) リアルタイム PCR

Trizol Reagent (Invitrogen) を用いて Tax 持続発現細胞から総 RNA を抽出し, Recombinant RNase Inhibitor (TaKaRa) 1 μ l (40U/ μ l) の存在下で DNaseI (TaKaRa) 2 μ l (5U/ μ l) 処理を行った. 内部標準として *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) 遺伝子を用いた. 細胞総 RNA 20 μ l を GAPDH-Rv (5'-GAAGACGCCAGTAGACTCCA-3') および tax7808R (5'-GGACCATACGTGTAACCGGTC-3') と共に SuperScript III RT (Invitrogen) 1 μ l (200units/ μ l) を用いた逆転写反応に供した (50 $^{\circ}$ C, 1hr). リアルタイム PCR は, CFX Connect Real-TimeSystem (Bio-Rad) を用いてマニュアルに従い実施した. Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) を用いて Tax cDNA の増幅は両 *tax* 遺伝子に共通する塩基配列に相補的なプライマー対 taxFw3 (5'-GCCCAGCTACTTGTATTCTACCC-3') および tax7808R を用いて実施した. GAPDH cDNA 増幅用のプライマーには GAPDH-Rv (5'-CAACGACCCCTTCATTGACC-3') および GAPDH-Rv を用いた. 各増幅反応の特異性を確かめるため, PCR 産物は融解曲線分析にかけた. 測定は 3 回行い, サイクル閾値比較 (CT) 法³¹⁾を用いて Tax 発現細胞間の転写レベルを比較した.

(14) レポーターアッセイ

L233-Tax 発現細胞, P233-Tax 発現細胞および対照細胞を各々 5×10^4 cell/well となるように 24-well culture plate (Nunc) に播種した. BLV LTR の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポーターベクター pGL-LTRluc³³⁾ 0.45 μ g, 内部標準としてウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc) を発現する pRL-TK (Promega) 0.05 μ g および FugeneHD[®] (Promega) 1.25 μ l を加え, DMEM で 25 μ l とした. 混和後, 室温に 15 分間放置し, 80%コンフルエントとなった Tax 発現細胞および対照細胞に滴下した. プレートシェーカーで 1 分間混合後, 37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養した. 培養上清を除き, リン酸緩衝

生理食塩水 (PBS; 137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 2.7mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) で 2 回洗浄した. Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega) に添付されている Passive Lysis Buffer を 5 倍に希釈し, 1 穴あたり 100μl ずつ加えた. プレートシェーカーで 15 分間混和し, 細胞膜を溶解した. 上清を白色の 96-well assay plate (Nunc) に 75μl ずつ分注し, キットに付属の Luciferase Assay Reagent II を 75μl ずつ加え, Tecan Infinite M1000 (TECAN) を用いて発光量を測定した. その後, 100 倍希釈した Stop&Glo 試薬を 75μl 加えて 10 分間インキュベートし, 内部標準としてウミシイタケルシフェラーゼによる発光量を測定した. なお, レポーターの陰性対照としてホタルルシフェラーゼ遺伝子のみでプロモーターを欠く pGL3 (Promega) を用いた. 実験は 3 穴ずつ行った. 各細胞で認められたルシフェラーゼによる発光量をウミシイタケルシフェラーゼによる発光量で除してトランスフェクション効率を補正し, ルシフェラーゼ活性を比較した.

(15) ゲノム損傷の検出

Tax 発現細胞における二本鎖ゲノム損傷は Trevigen 社の Comet assay kit (#4250-050-K) を用いた中性単一細胞ゲル電気泳動法 (コメットアッセイ) により評価した. すなわち, 各 Tax 発現細胞を 0.25%トリプシン・0.02% EDTA で分散し, 10% FCS 加 DMEM で洗浄した後, 3.0×10^3 個を 37℃に保持したキットの LMAgarose150μl に懸濁した. これを高撥水性フッ素樹脂ベースインクでコートした 10 穴スライドガラス (6 mm φ) (Matsunami Glass Ind.,Ltd.) に載せた. アガロースを固化した後, スライドガラスをキットの Lysis Solution に浸し, 暗所で 4℃ 1 時間放置した. これを 4℃で TAE 緩衝液に 15 分浸漬後, 21V で 30 分間電気泳動を行った. 次いで, 2 回の滅菌精製水浸漬 (5 分間) した後, 70%エタノールで 30 分間脱水した. アガロースが十分に脱水されたことを確認した後, SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (ThermoFisher) で染色し, 蛍光顕微鏡下で撮影した. Image J を用いてオープンソースソフトウェア (OpenComet: <http://cometbio.org/index.html>) に取

り込み、各蛍光像のピクセル数を計測した. 1 スライドにつき 150 回程度撮影し、コメット尾部のピクセル数を総ピクセル数で除し、核から漏出した tail DNA %を求めた (Fig. 6).

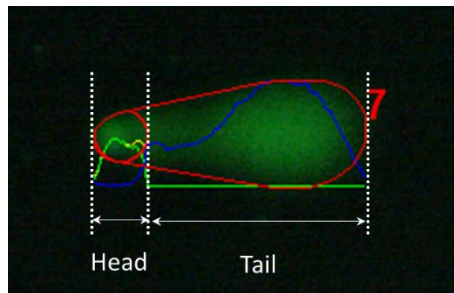


Fig. 6. Typical damaged DNA in comet. The DNA damage is quantified by measuring the displacement between the genetic material of the nucleus ('comet head') and the resulting 'tail'. Tail Moment and Tail DNA% are the two most common parameters to analyze Comet assay results. At least 50-100 cells should be analyzed per sample. In this experiment, Tail DNA % was used. $\text{Tail DNA\%} = (\text{No. of tail pixel} / \text{no. of total pixel}) \times 100$.

(16) 軟寒天コロニー形成試験

Tax 発現細胞の足場非依存性増殖能を調べるため、軟寒天内コロニー形成試験を行った. Tax 発現細胞および対照細胞 3×10^5 個を 0.3% agarose, 15% FCS, 500 $\mu\text{g/ml}$ G418 を含む 1ml の DMEM に懸濁し、予め 0.5% agarose, 15% FCS, 500 $\mu\text{g/ml}$ G418 添加 DMEM を固化させた 6cm シャーレに播種した. 6 週間培養後、暗視野で低倍率の顕微鏡下撮影し、形成されたコロニーの断面積を ImageJ により測定した.

(17) 統計解析

レポーターアッセイおよびコメットアッセイのデータは、平均値±標準偏差で示した。各データの比較は one-way ANOVA により行い、 $p < 0.05$ を有意とみなした。軟寒天コロニー形成試験の成績は順位和検定により比較した。

3) 結果

(1) Tax のアミノ酸配列の確認

L233-Tax および P233-Tax を発現するベクター pL233-Tax および pP233-Tax の塩基配列を調べた結果、両者は Tax の 233 位アミノ酸を除き全て同一の配列をコードすることが確認された。

(2) L233-Tax および P233-Tax 持続発現細胞の樹立

Tax233 位アミノ酸の Leu→Pro (L233P) 変異がその機能に及ぼす影響を調べるため、ラット株化線維芽細胞に L233-Tax または P233-Tax を発現するプラスミドをトランスフェクト後、G418 で選択し、薬剤耐性細胞株を得た。両 *tax* 遺伝子に共通なプライマーを用いたリアルタイム PCR によりそれぞれの転写量を調べた。その結果、pL233-Tax 形質転換細胞における *GAPDH* mRNA および *tax* mRNA の CT 値はそれぞれ 14.19 ± 0.119 および 30.79 ± 0.069 であった。同様に、pP233-Tax トランスフォーマントにおけるそれらは、それぞれ 15.48 ± 0.639 および 32.18 ± 0.255 であった (Fig. 7)。両形質転換細胞における内部標準遺伝子の転写量と *tax* 遺伝子の転写量の差 ΔCT は、16.60 および 16.70 であった。したがって、両形質転換細胞ではほぼ等量の *tax* mRNA が転写されていることが確認された。*tax* 遺伝子を含まないベクターでのトランスフェクションにより G418 耐性となった対照細胞では、*GAPDH* 遺伝子および *tax* 遺伝子に対応するプライマーで増幅された産物の CT 値はそれぞれ 17.38 ± 0.394 および 30.41 ± 0.111 であった。

しかしながら、*tax* 遺伝子プライマーによる産物の解離曲線は、明らかに異なるメルトピークを示したことから非特異産物であることが確認された (Fig. 8)。

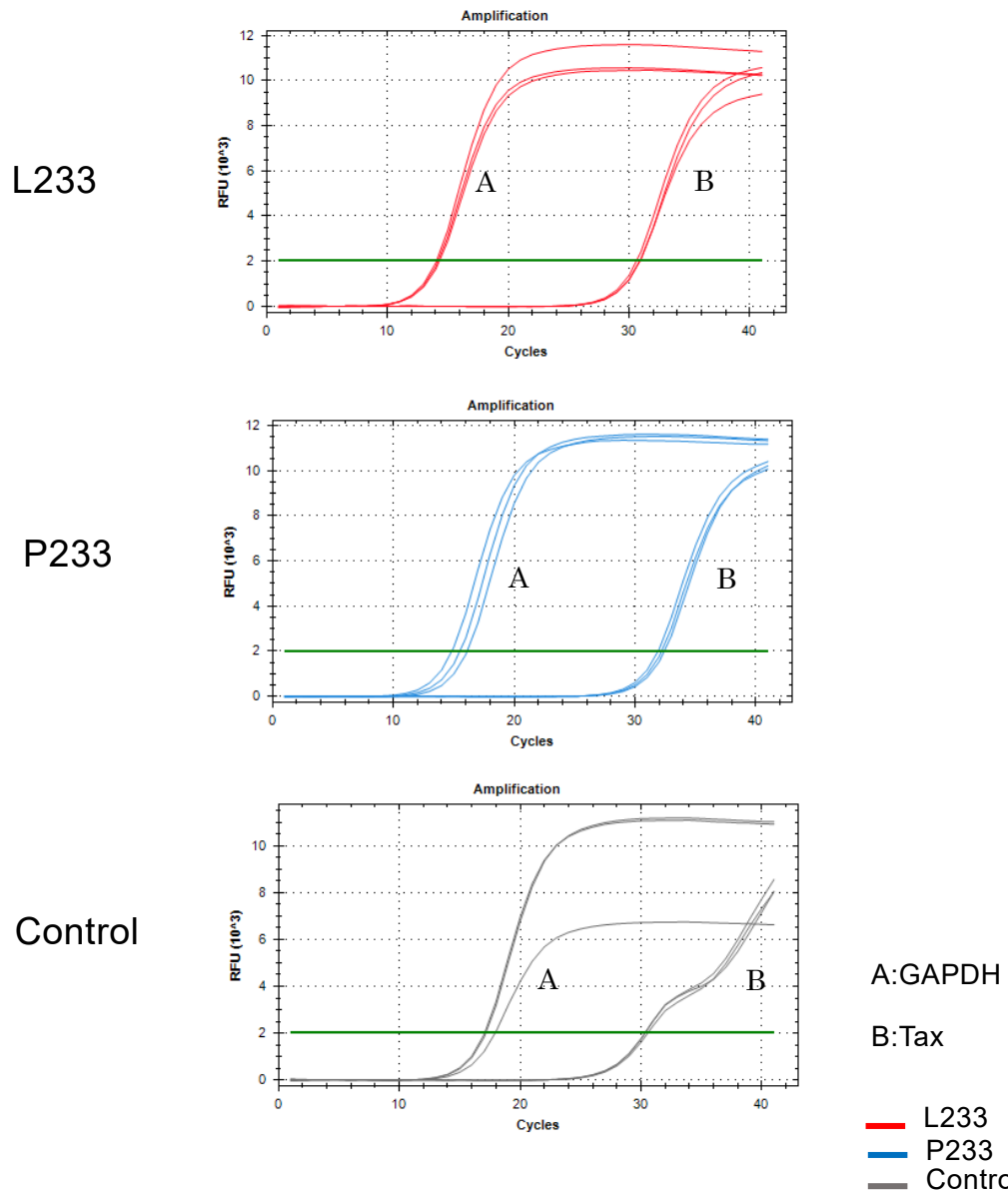
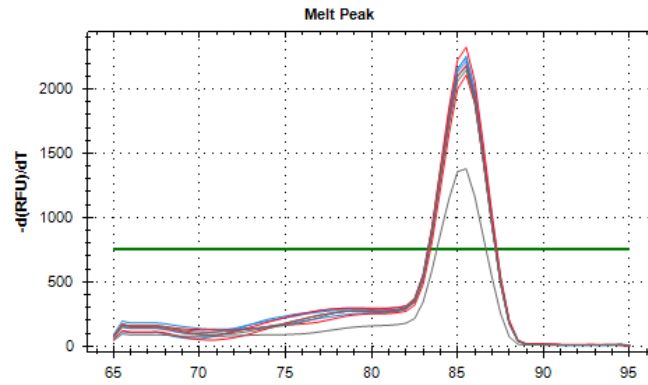
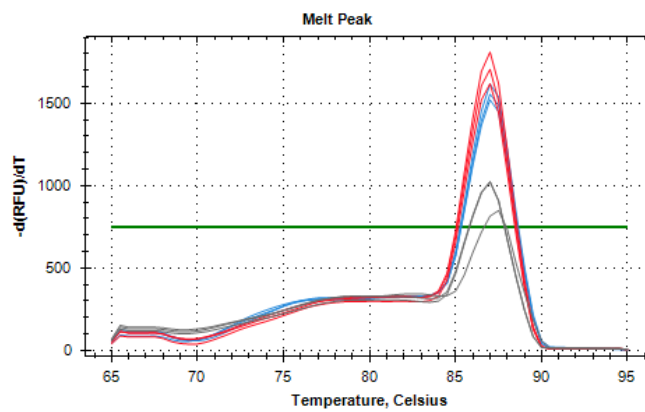


Fig. 7. Quantitation of Tax mRNA transcription in the transformant cells. In the present study, we carried out real time RT-PCR to estimate Tax expression in the cells. ΔC_t value, which indicates difference of threshold cycle number between internal control gene and Tax gene, in L233 -Tax- expressing cells was 16.7 and that of P233-Tax was 16.6. Since there was little difference between the cells, these cells seemed to produce comparable amount of Tax.

GAPDH



Tax



— L233
— P233
— Control

Fig. 8. Melt peak of PCR products in the transformant cells. Although some amplicons were observed in control cells using Tax gene specific primers, their melting curves were different from those from Tax mRNA, indicating non specific amplification.

(3) L233-Tax および P233-Tax の BLV-LTR に対するトランスアクチベーション活性

Tax の機能的発現を確認し, L233-Tax および P233-Tax の LTR に対するトランスアクチベーション活性を比較するため, ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーターアッセイを行った. 結果を Fig. 9 に示す. pL233-Tax および pP233-Tax により形質転換した細胞で検出された発光量は, それぞれ 712.984 ± 313.172 および 1665.017 ± 425.161 であった. 一方, pcDNA3.1(+) による形質転換細胞のそれは 123.340 ± 69.603 であった. 両 Tax 形質転換細胞は対照に比べ有意に高い活性を示したことから, これらは機能的な Tax を持続的に発現していることが確認された. 一方, P233-Tax 発現細胞は, L233-Tax 発現細胞に比べ有意に高いルシフェラーゼ活性を示した. mRNA の転写量がほぼ同等であったにもかかわらず, LTR に対するトランスアクチベーション活性は P233-Tax の方が有意に高かったことから, L233P 変異により Tax のウイルス遺伝子に対するトランスアクチベーション活性は増大することが分かった.

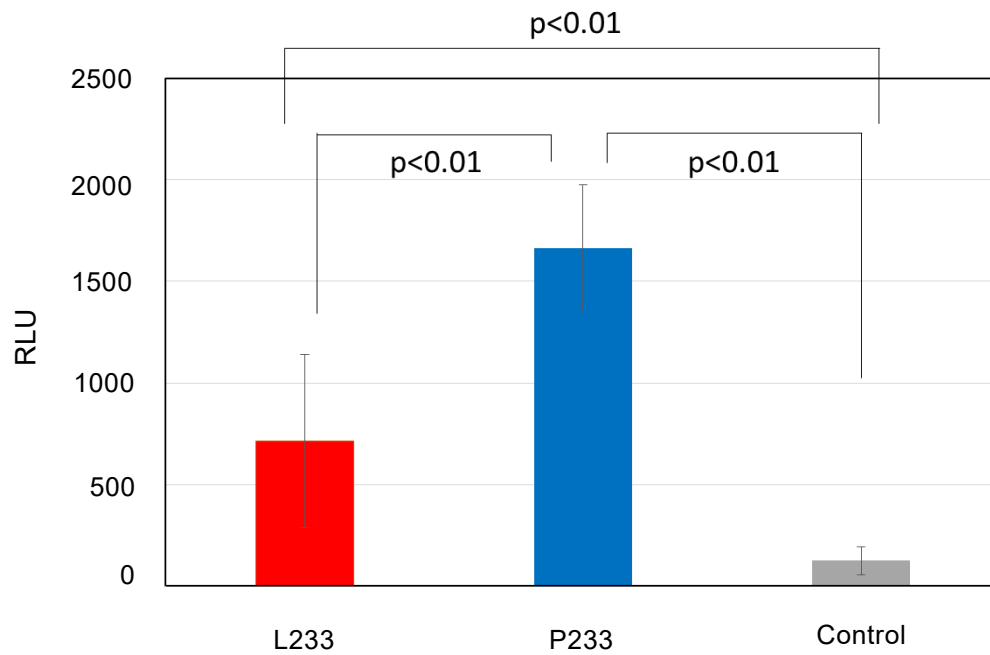
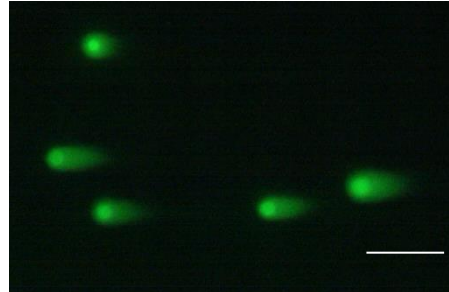


Fig. 9. Transactivation of transcription from LTR. A luciferase reporter gene assay was carried out to assess the transactivation activity of the Tax protein directed to the BLV LTR. Rat fibroblast cell lines transformed by pcA95/L233, pcA95/P233, or pcDNA3.1(+) were transfected with the reporter plasmid pGL-LTRluc and the reference plasmid phRL-TK. Cells were harvested 48 h later, and firefly luciferase activity was measured and normalized to Renilla luciferase activity. Data are presented as the average and standard deviation from three independent transfections.

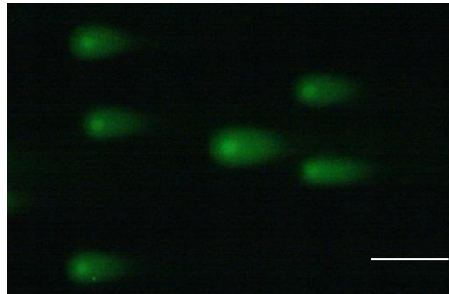
(4) Tax 発現細胞におけるゲノムの損傷

DNA の損傷には塩基の変化, 同一鎖上あるいは相補鎖間の架橋, 鎖の切断があり, これらは細胞内における生理的条件下でも恒常的に生じている. 本章で実施した中性条件下でのコメットアッセイでは, DNA の二本鎖切断が検出される. Fig. 10 に Tax 発現細胞および対照細胞をコメットアッセイに供した泳動像を示す. 両 Tax 発現細胞, 対照細胞ともに DNA が核外へ漏出していたことから, プラスミドの挿入によりゲノム DNA の二本鎖切断が誘導されている可能性が示された. OpenComet による定量の結果, 両 Tax 発現細胞とも対照細胞に比べ Tail DNA%が有意に大きな値を示していた (Table 2). したがって, Tax はプラスミド挿入による宿主細胞ゲノム DNA の二本鎖切断を促進することが確認された. さらに, L233-Tax 発現細胞および P233-Tax 発現細胞の平均 Tail DNA%に有意差が認められたことから, L233-Tax の方が宿主細胞のゲノム DNA に二本鎖切断を誘発しやすいものと考えられた.

P233



L233



Control

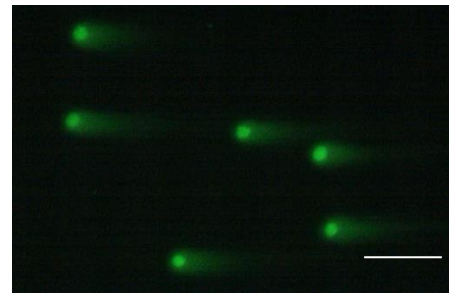


Fig. 10. Tax-induced DNA damage was measured by a comet assay. The experiments were repeated three times. To obtain enough cell counts for statistical analysis, at least 600 cells in each sample were counted. The bar indicates 100 μ m.

Table 2. DNA damage in Tax-expressing cells

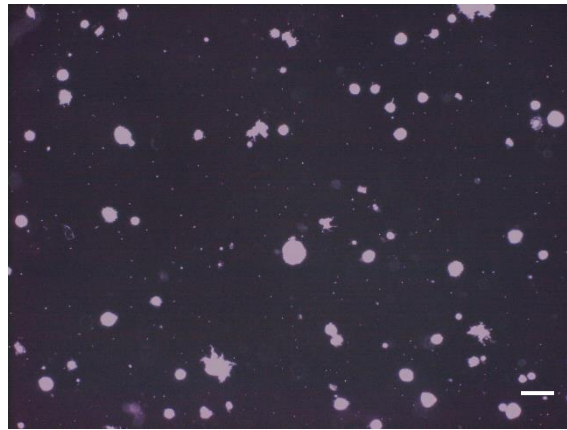
Tax	Tail DNA %	
P233	58.96±6.25 (n=639)	
L233	59.74±6.09 (n=687)	*
Control	57.96±6.19 (n=646)	**

* p<0.05
 ** p<0.01

(5) Tax 発現細胞の足場非依存性増殖

血球系細胞を除くすべての正常細胞は、細胞外マトリックスを足場にして増殖する.³³⁾ しかし、がん化に伴い細胞は足場なしに増殖する能力を獲得し、転移が可能となる。本章では Tax 発現細胞の悪性度を評価するために軟寒天内でのコロニー形成能を調べた。その結果、いずれの Tax 発現細胞および対照細胞も軟寒天内でコロニーを形成した (Fig. 11)。両 Tax 発現細胞間ではコロニー出現頻度に大きな差は認められなかった。一方、対照細胞では直径 $20\mu\text{m}$ ($1200\mu\text{m}^2$) を超えるコロニーの数は明らかに少なかった。次いで、コロニーの断面積を測定したところ、P233-Tax 発現細胞の最頻値は $4,000\text{--}8,000\mu\text{m}^2$ であったのに対し、L233-Tax 発現細胞では $2,000\text{--}4,000$ 平方 μm^2 が最頻値であった。一方、対照細胞では $1,000\text{--}2,000\mu\text{m}^2$ が最頻値であった (Fig. 12)。順位和検定の結果、L233-Tax 発現細胞と P233-Tax 発現細胞の間で有意差が認められた。したがって、P233-Tax 発現細胞は L233-Tax 発現細胞に比べて足場非依存性増殖能が高いことがわかった。

L233



P233



pcDNA



Fig. 11. Anchorage independent growth of Tax expressing cells. Tax-expressing cells or control cells were seeded in soft agar to evaluate anchorage-independent growth ability. Five weeks after seeding, the cross-section areas of colonies were analyzed using ImageJ. The assay was carried out in quadruplicate, and the data presented are total numbers of well-defined colonies in the four individual plates. The bar indicates 100 μ m.

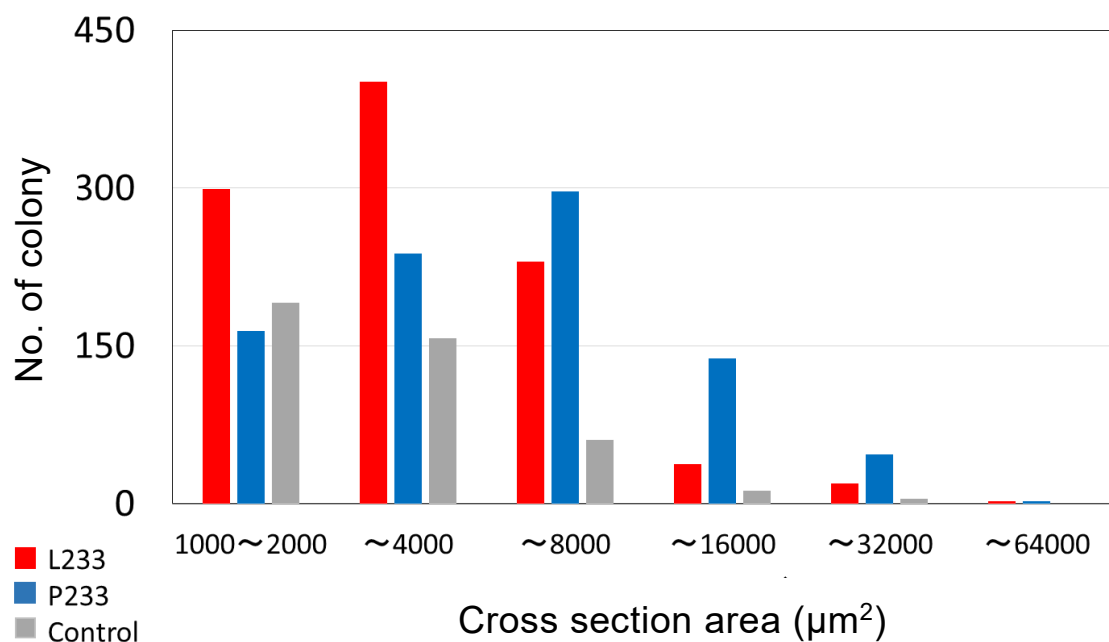


Fig. 12. Frequency distribution of colony cross-sectional area in Tax-expressing cells. The results show that P233-Tax-expressing cells formed larger colonies (peak between 4,000 and 8,000 μm^2 in cross-section areas) compared with L233-Tax-expressing cells (peak between 2,000 and 4,000 μm^2), although both formed colonies at a similar frequency.

(4) 考察

本章では, BLV による白血病の発症機構を明らかにするため, L233-Tax および P233-Tax を持続的に発現するラット線維芽細胞を樹立した. また, 対照細胞として空の発現ベクターで G418 耐性となった細胞を用いた. これらをコメットアッセイおよび軟寒天コロニー形成試験に供し, 宿主細胞ゲノムへの損傷活性および発現細胞の足場非依存性増殖能を比較評価した.

Tax の機能的発現を確認するため, BLV LTR の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポーターベクターを各細胞に導入した. その結果, 両 Tax 発現ベクターで形質転換した細胞は対照細胞に比べ有意に高い活性が認められた. したがって, これらの細胞では Tax が機能的に発現していることが確認された. また, P233-Tax 発現細胞は, L233-Tax 発現細胞に比べ有意に高いルシフェラーゼ活性を示した. 一方, リアルタイム PCR では, 両 Tax 発現細胞間で mRNA の転写量にほとんど差は認められなかった. したがって, P233-Tax は L233-Tax に比べウイルス遺伝子に対するトランスアクチベーション能が高いものと考えられる. 今後, トランスアクチベーション活性を正確に比較するため, 適切な抗 Tax 抗体を作成して分子当たりの活性を調べる必要がある.

コメットアッセイでは, 対照細胞においてもゲノムの損傷が検出された. プラスミド DNA の挿入によって宿主細胞のゲノムが不安定になり, 二本鎖切断が生じたものと考えられる. Tax 発現プラスミドを挿入された細胞ではより多くの DNA の漏出が認められた. HTLV-1 の Tax は宿主細胞の分裂時にゲノム二本鎖切断を誘発することが報告されている.³⁴⁾ BLV の Tax も同様に宿主ゲノムに二本鎖切断を生じさせているものと考えられる. また, L233-Tax 発現細胞は P233-Tax 発現細胞に比べ有意にゲノムの損傷が大きかった. したがって, L233-Tax はトランスアクチベーション活性が低い一方, P233-Tax より宿主細胞ゲノムに対する損傷能が大きいことが示唆された. 二本鎖切断の修復は相同組換あるいは非相同末端結合 (non-homologous

end joining: NHEJ) によって行われる。しかしながら、NHEJ ではしばしば塩基の欠損を伴うため、修復が変異の原因となることがある。DNA 損傷の修復に失敗した細胞ではアポトーシスが誘導されるが、一部は染色体異常など重大な損傷に進展すると考えられている。³⁵⁾ したがって、L233-Tax は腫瘍化のイニシエーションにおいて P233-Tax に比べ大きな役割を果たすことが示唆された。

軟寒天コロニー形成試験は細胞の足場非依存性増殖能を評価する試験法であり、*in vivo* における腫瘍形成能とよく相関する *in vitro* の実験系として認められている。³⁶⁾ 本研究では、両 Tax 発現細胞および対照細胞のいずれも足場非依存性増殖能を獲得したことが示された。しかしながら、対照細胞では直径 20 μ m を超えるようなコロニーの発現頻度は両 Tax 発現細胞に比べて明らかに低かった。対照細胞では、ゲノムへのプラスミドの挿入による *c-onc* 遺伝子の活性化、あるいはがん抑制遺伝子の不活化により足場非依存性増殖能を獲得したのかもしれない。一方、Tax 発現プラスミドによる形質転換細胞ではプラスミド挿入による影響に加え、Tax の機能的発現によってコロニー出現頻度が増加したものと考えられる。さらに、P233-Tax 発現細胞は L233-Tax 発現細胞に比べ有意に大きなコロニーを形成した。したがって、P233-Tax 発現細胞は *in vitro* では L233-Tax 発現細胞に比べ悪性度が高いものと考えられる。P233-Tax は、腫瘍のプロモーションでは L233-Tax より大きな役割を果たす可能性がある。

本章では、BLV の Tax が宿主細胞ゲノムの不安定化および足場非依存性増殖能の付与に働くことを示した。L233-Tax と P233-Tax を比較したところ、ゲノムの不安定化では L233-Tax が、足場非依存性増殖能付与では P233-Tax がより大きな役割を果たすことが示唆された。

第2章 Tax の *in vivo* における腫瘍原性と Tax 発現細胞が産生する液性因子の生物活性

1) 緒言

腫瘍はイニシエーション、プロモーション、プログレッションの3段階を経て進展する。前章では BLV のウイルス転写活性因子である Tax が宿主細胞のゲノム損傷および足場非依存性増殖能の付与において重要な役割を果たすことを示した。さらに、ゲノムの損傷では L233-Tax が、足場非依存性増殖能付与では P233-Tax がより大きな活性を有することが示唆された。すなわち、腫瘍化のイニシエーションにおいては L233-Tax が、プロモーションにおいては P233-Tax がより大きな役割を果たすものと考えられた。Inoue らは、L233-Tax をコードする BLV は P233-Tax をコードするウイルスに比べ EBL の潜伏期が短い可能性を示した。³⁰⁾ BLV 感染牛の多くは不顕性に経過するが、約 1/3 では B 細胞がポリクローナルに増殖してリンパ球増多症を呈し、数%がモノクローナルな B 細胞性リンパ腫を発症する。EBL の大部分では、モノクローナルな B リンパ腫細胞による多発性肉腫として認識される。

悪性新生物は、正常組織と同様、栄養素および酸素の供給、あるいは老廃物および二酸化炭素の排出を必要とする。そのため、これらを支持する新たな血管系を構築する必要がある。また、このような血管は腫瘍の転移においても重要な役割を果たす。²⁶⁾ 血管系の発達は既存の血管から新たな血管の形成 (angiogenesis: 血管新生) に加えて、内皮細胞の分化による新たな血管の形成 (vasculogenesis: 脈管形成) を含む。³⁶⁾ しかしながら、これらは創傷治癒過程や生理的状态では発生等の限られた時期においてのみ認められる。一方、腫瘍形成時には血管新生は常に活性化され、新生血管の増殖を持続するための新たな血管内皮細胞を持続的に発芽させる。²⁶⁾ 本章では、BLV 感染リンパ腫細胞の生体内における増殖および腫瘍形成と Tax の機能の関連を明らかにするため、両 Tax 発現細胞をヌードマウス皮下に移植し、その L233P 変異が及ぼす影響を調べた。

2) 方法

(1) 細胞

第 1 章 2)-(6)で樹立した L233-Tax および P233-Tax 発現 Rat-1 細胞ならびに対照細胞を 10%FCS および 500 μ g/mL G418 添加 DMEM で培養した. ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)は PromoCell から購入し, Endothelial Cell Growth Medium 2 (PromoCell) で培養した. 実験には 5-6 代継代したものをを用いた.

(2) ノードマウス皮下移植実験

4 週齢雌の BALB / C (nu / nu) マウスを CLEA JAPAN から購入し, 1 週間の馴致後, 実験に供した. 全ての動物実験は, 北海道医療大学動物実験委員会のガイドラインのもとで行った (承認番号:平成 27 年度 第 083 号). 80%コンフルエントの L233-Tax および P233-Tax 発現細胞ならびに対照細胞を 0.25%トリプシン-0.02%EDTA で分散し, 10%FCS 加 DMEM で洗浄した. DMEM に懸濁した後, 5×10^6 を各々 10 匹のマウスの背側部皮下に接種した. 6 週間後, 400 μ g/body weight g 以上のペントバルビタールナトリウム溶液を腹腔内に投与してマウスを安楽殺した. 腫瘍を摘出後, その重量を測定した. 一部は以下の免疫組織化学染色に供した.

(3) 免疫組織化学染色

腫瘍内の微小血管構造を調べるため, 血管内皮細胞マーカーである CD31 に対する抗体を用いた免疫組織化学染色を行った. すなわち, 腫瘍組織を 10%ホルマリンで 1 週間固定し, パラフィン包埋後, 3 μ m に薄切して組織切片とした. 脱パラフィン後, 切片を 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中で 121°C 10 分間加熱した. 3% H_2O_2 を含むメタノールに 30 分間浸漬して内因性ペルオキシダーゼを不活性化した後, 3%ウシ血清アルブミンを含む PBS で 30 分間ブロックした. ウサギ抗マウス CD31 抗体(希釈, 1:50; Abcam) を作

用させ、室温に 1 時間放置した。洗浄後、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Dako) を 30 分間作用させた。次いで、DAB + Substrate Chromogen System (Dako) を用いて発色を行い、CD31 抗体を検出した。切片をマイヤー・ヘマトキシリン溶液で対比染色した。免疫組織化学染色は札幌総合病理研究所に委託した。光学顕微鏡下で撮影し、単一または CD31 陽性細胞のクラスターを血管とみなした。40 倍で血管の密集する部位を 3 ヶ所選定し、400 倍下で血管数を計測して、微小血管密度 (微小血管/mm², MVD) を決定した。

(4) 血管内皮細胞チューブ形成試験

HUVEC を用いた本実験は血管新生誘導因子の *in vitro* 評価系として賞用される。³⁷⁾ 80%コンフルエントの L233-Tax または P233-Tax 発現細胞および対照細胞を PBS で 3 回洗浄し、Ham's F12 (Gibco™) と DMEM を等量混合した培地 (H-DME) に置換した。48 時間培養後、上清 (Conditioned medium:CM) を回収し、使用するまで -80 °C で保存した。μ-Slide Angiogenesis (ibidi) の各ウェルを 10μl の Matrigel (カタログ番号 356231; BD Biosciences) で満たし、37°C で 60 分間放置してゲル化した。これに、50μl の各 CM に懸濁した 2×10⁴ 個の HUVEC を添加した。20 時間培養後、光学顕微鏡下で撮影し、Image J を用いて HUVEC により形成されたチューブの長さを測定した。

(5) 走化性試験

Endothelial cell Growth Medium 2 で HUVEC を 8×10⁵ cells/ml に調製し、μ-Slide Chemotaxis 3D (ibidi) の観察領域に付着させた。H-DME で 2 回洗浄した後、第 1 リザーバーを H-DME で満たした。次いで、第 2 リザーバーは CM で満たし、37°C に保持した (Fig. 13)。細胞の付着した観察領域を光学顕微鏡下で 60 分毎に 10 時間まで撮影し、各細胞の位置をトレースした。走化性指数は、10 時間の総移動距離に対する第 2 リザーバー側への移動距離

の比として算出した。

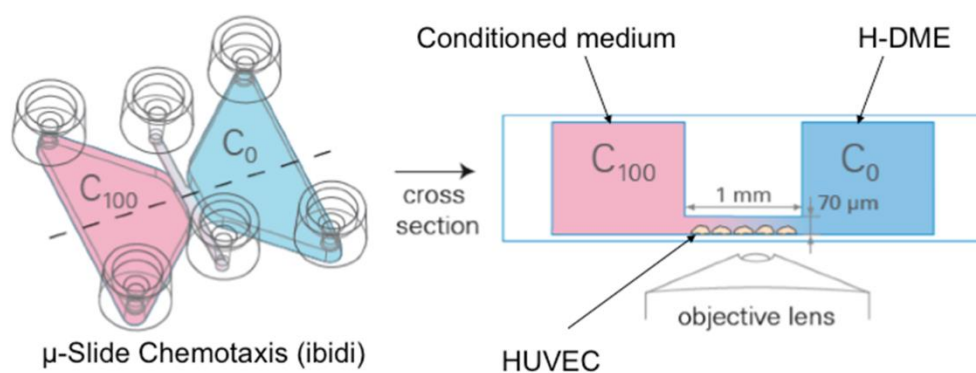


Fig. 13. Chemotaxis chamber used in this chapter.

(6) 統計

マウス皮下移植実験および免疫組織化学染色，血管内皮細胞チューブ形成試験のデータは，平均値±標準偏差で示した．各データの比較は **one-way ANOVA** を用いて行い， $p < 0.05$ を有意とみなした．走化性試験のデータはフィッシャーの正確確率検定を用いて比較した．

3) 結果

(1) ノードマウス皮下移植実験

L233-Tax または P233-Tax 発現ラット株化繊維芽細胞および対照細胞 5×10^6 個を、ノードマウスの背側皮下に接種した。6 週間後、両 Tax 発現細胞および対照細胞を移植したすべてのマウスで腫瘍が形成された (Fig. 14). L233-Tax 発現細胞を移植されたマウスの多くでは、表面に血管を伴った不規則で大きな腫瘍が形成された。一方、P233-Tax 発現細胞および対照細胞により形成された腫瘍の表面に血管は認められなかった。また、P233-Tax 発現細胞由来の腫瘍は不規則な形のものが多かったが、対照細胞のそれは卵円形に近いものが多かった。腫瘍重量を比較したところ、L233-Tax 発現細胞由来腫瘍の平均重量は $3.83 \pm 0.77\text{g}$ ($n=10$) であったのに対し、P233-Tax 発現細胞および対照細胞はそれぞれ $0.84 \pm 0.20\text{g}$ ($n=10$) および $0.33 \pm 0.13\text{g}$ ($n=10$) であった ($P<0.01$)。また、P233-Tax 発現細胞由来腫瘍と対照細胞由来腫瘍のそのの間では $P<0.05$ で有意差を示した (Fig. 15).

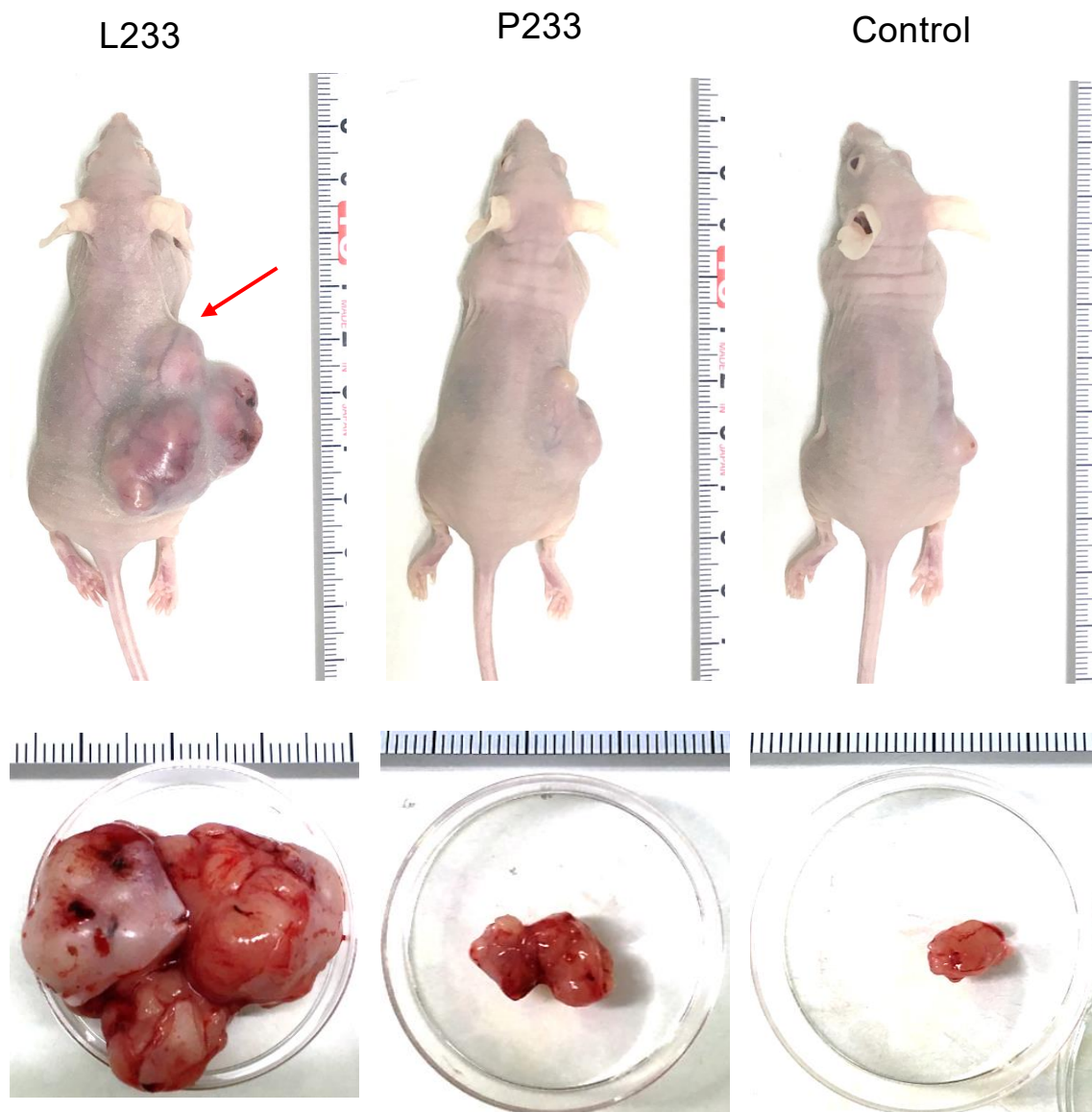


Fig. 14. Appearance of tumor derived from BLV-Tax expressing cells. Five-week-old athymic nude mice were inoculated subcutaneously with either of the Tax-expressing cells or control cells. Images of animals at six weeks after inoculation. The arrow indicates invasion of blood vessels. Six weeks later the mice were euthanized and the tumor extraction.

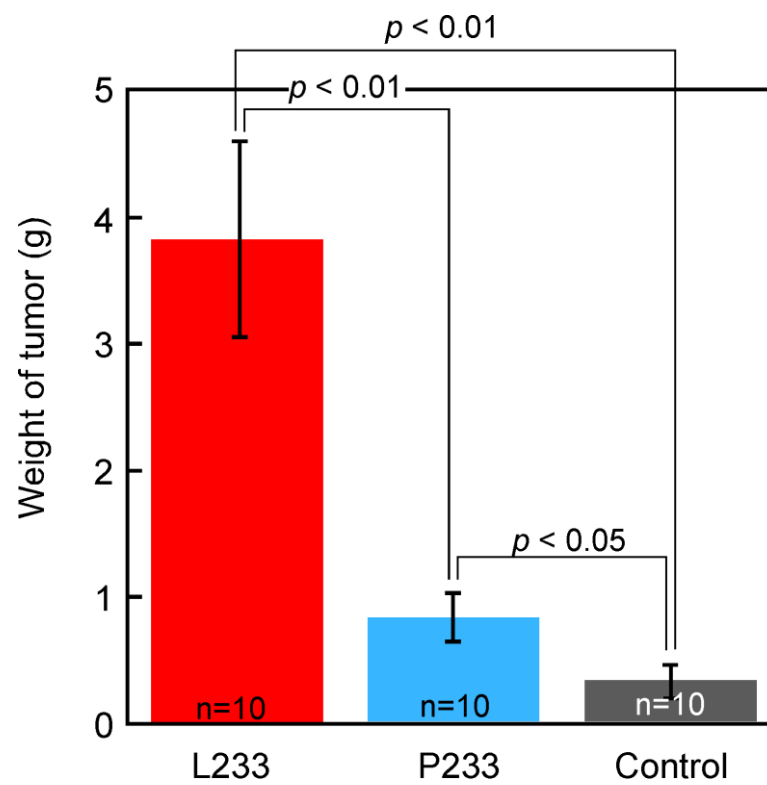


Fig. 15. Comparison of weight of the tumors. Tumors were excised and weighed, and the data presented are the average and standard deviation of 10 tumors.

(2) 免疫組織染色

ヌードマウス皮下に形成された腫瘍内の微小血管を検出するため、血管内皮細胞のマーカーである CD31 に対する抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。腫瘍表面に伸びる血管の有無にかかわらず、両 Tax 発現細胞および対照細胞では多数の微小血管がすべての腫瘍において観察された(Fig. 16.). L233-Tax 発現細胞由来腫瘍内の微小血管数の平均値は 1100 ± 190.8 ($n=10$), P233-Tax 発現細胞および対照細胞はそれぞれ 1300 ± 81.6 ($n=10$) および 1113.4 ± 63.4 ($n=10$) であった。したがって、L233-Tax 発現細胞, P233-Tax 発現細胞および対照細胞由来腫瘍の間に MVD の有意な差は認められなかった (Fig. 17) .

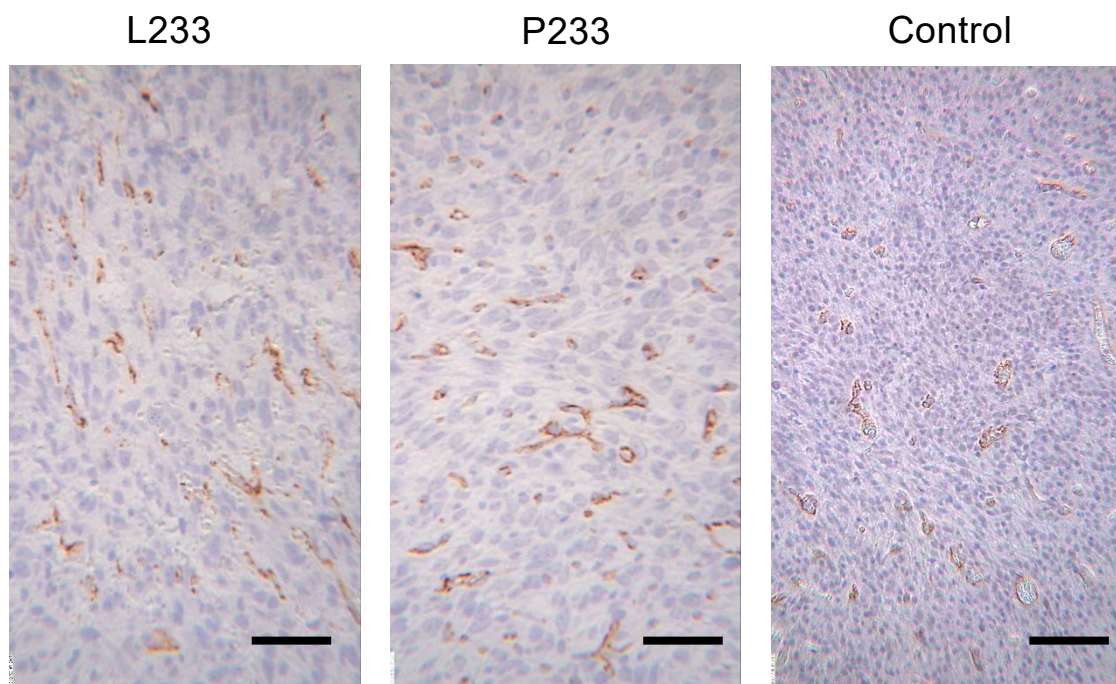


Fig. 16. CD31-positive cells in the tumors. Immunohistochemistry using anti-CD31 antibodies was performed in tumors derived from Tax-expressing cells or control cells. Representative images of three individual sections are shown. The bar indicates 50 μ m.

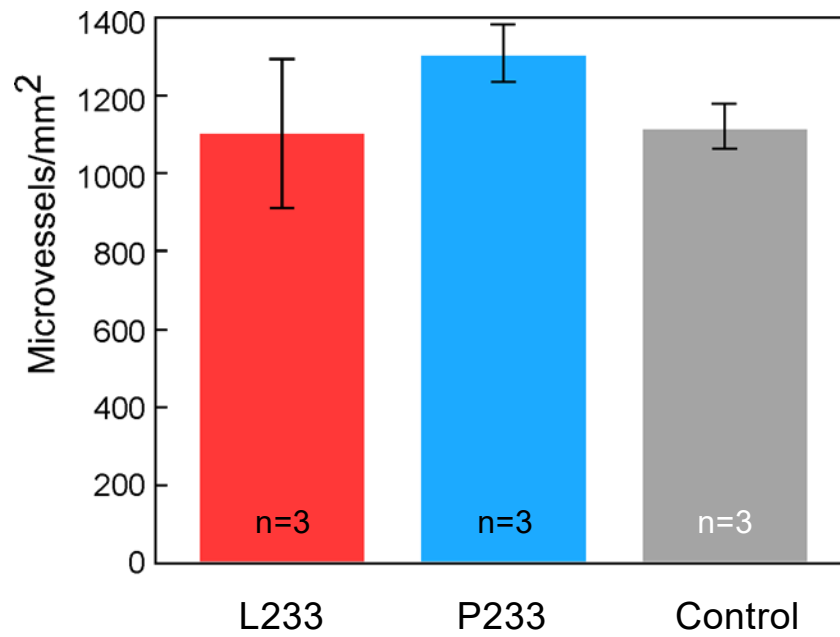


Fig. 17. Comparison of microvessel density in the tumors. Single cells or clusters of cells positive for CD31 were considered a vessel. MVD (microvessels/ mm²) was determined from three hot spots, and the data presented are the average and standard deviation

(3) チューブ形成試験

ヌードマウス皮下に腫瘍を形成した細胞が血管新生誘導因子を分泌しているか否かを調べるため、これらの細胞を48時間培養して得たCMをHUVECによるチューブ形成試験に供した。その結果、両Tax発現細胞あるいは対照細胞から得たCM中ではHUVECはMatrigel上によく分枝したチューブを形成し、網目状の構造を呈した。一方、新鮮なH-DME中のHUVECはほとんどチューブ形成しなかった (Fig. 18)。総チューブ長の平均値はL233-Tax発現細胞群, P233-Tax発現細胞群, 対照細胞群, H-DME群でそれぞれ $158.5 \pm 15.32\text{mm}$ (n=6), $143.83 \pm 28.89\text{mm}$ (n=6), $94.33 \pm 16.79\text{mm}$ (n=6), $24.83 \pm 4.8\text{mm}$ (n=6)であった。H-DME中で形成されたチューブ長は、いずれのCM中で形成されたチューブ長より有意に短かった。両Tax発現細胞間およびP233-Tax発現細胞群と対照細胞群から得たCMの間ではチューブ長に有意差は認められなかった。一方、L233-Tax発現細胞群と対照細胞群との間では有意差が認められた (Fig. 19)。

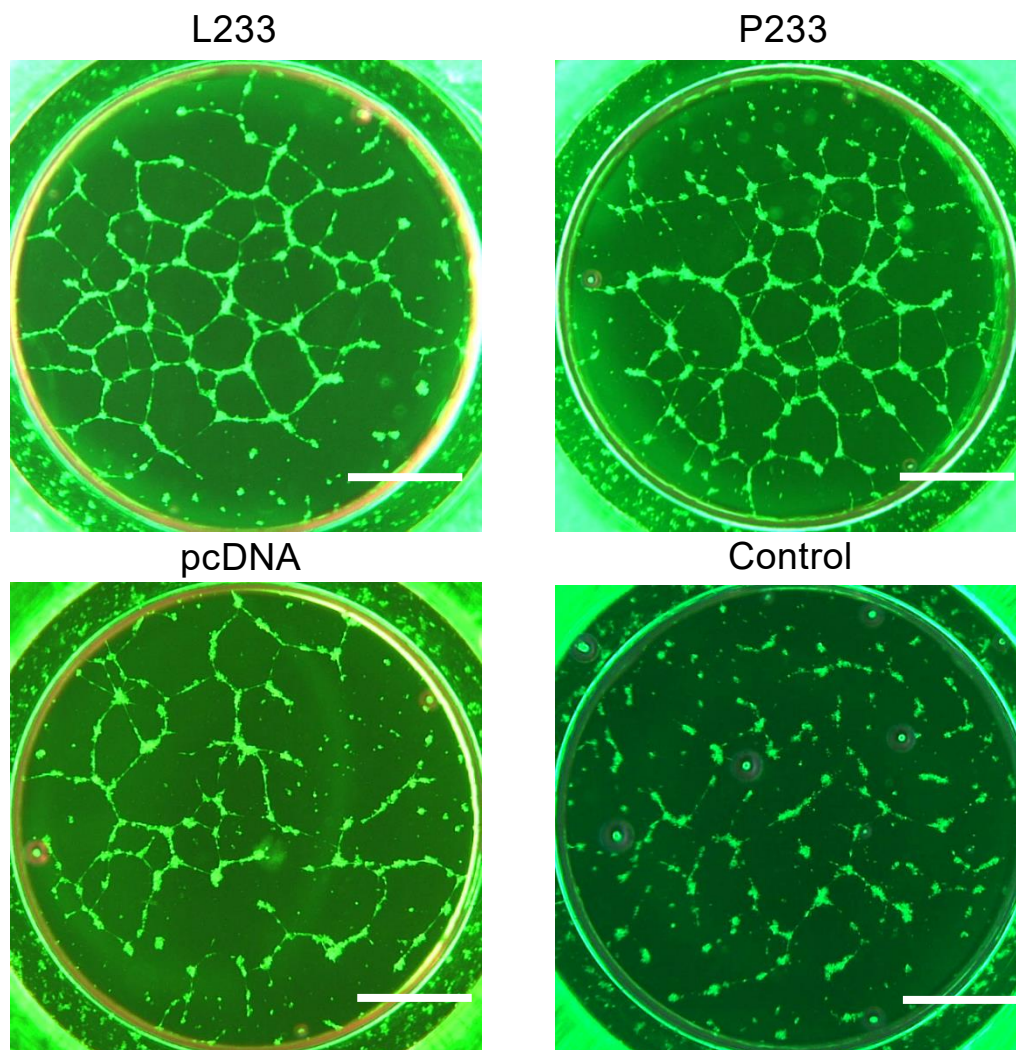


Fig. 18. Vascular endothelial cell tube formation assay. Endothelial cell tube formation assays were performed using HUVEC and CM from Tax-expressing cells or control cells. The cells were suspended in CM and placed onto Matrigel in a well of a μ -Slide Angiogenesis chamber slide, and cell morphology was examined under a light microscope 20 h later. The bar indicates 1 mm.

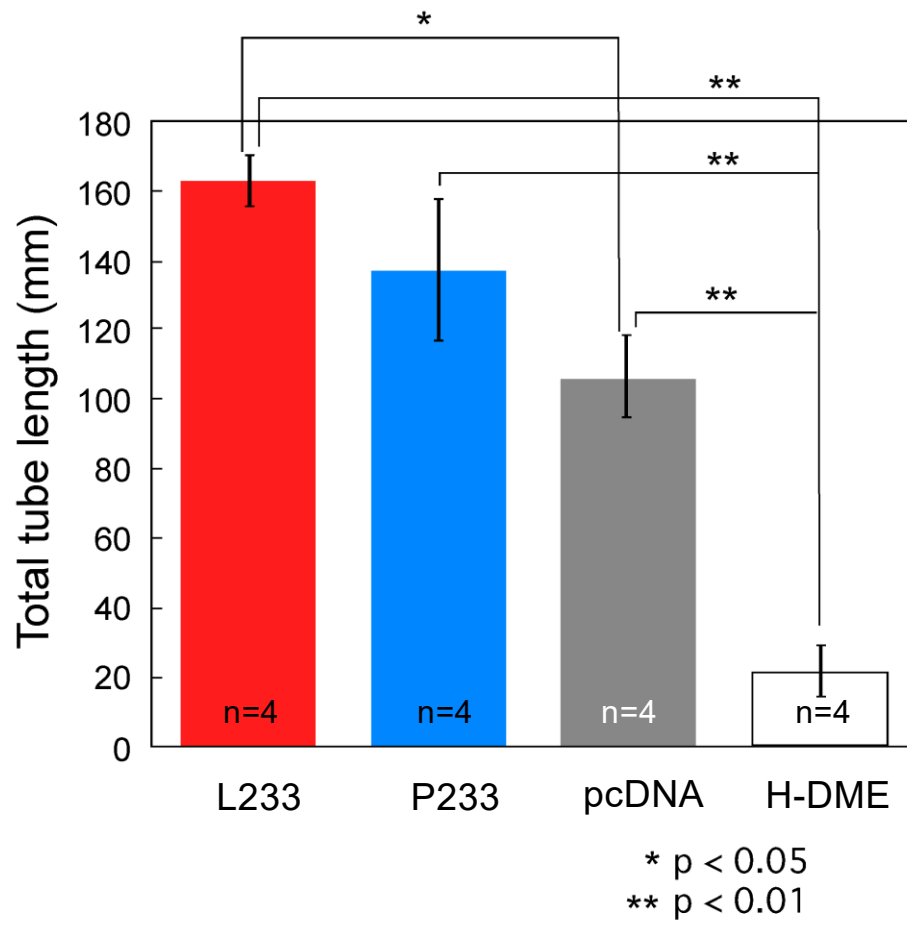


Fig. 19. Comparison of total length of tube derived from HUVEC. The total tube length in each well was measured, and the data presented are the average and standard deviation of four individual wells.

(4) 走化性試験

両 Tax 発現細胞および対照細胞ともにヌードマウス皮下に腫瘍を形成し、その内部の微小血管環境に大きな差は認められなかった。一方、L233-Tax 発現細胞由来腫瘍のみで目視可能な血管の挿入が認められた。そのため、各細胞の CM を HUVEC に対する走化性試験に供し、血管内皮細胞誘引物質の有無を調べた。1 時間毎に記録した HUVEC の軌跡を Fig. 20 に示す。L233-Tax 発現細胞由来 CM に対しては 32 個の HUVEC 中 21 個 (65.6%) が正の走化性を示したのに対し、P233-Tax 発現細胞のそれに対しては 35 個中 14 個 (42%) のみであり、有意な差が認められた。さらに、L223-Tax 発現細胞の CM 側への HUVEC の移動度の平均値は $51.05 \pm 17.64 \mu\text{m}$ であったのに対し、P233-Tax 発現細胞の CM に対しては $-8.16 \pm 13.85 \mu\text{m}$ であった ($p < 0.01$)。走化性指数の比較では、L233-Tax 発現細胞 CM では HUVEC のほとんどが正方向に移動しているのに対し、P233-Tax 発現細胞および対照細胞の CM では多くの HUVEC が原点付近にとどまっていた (Fig. 21)。

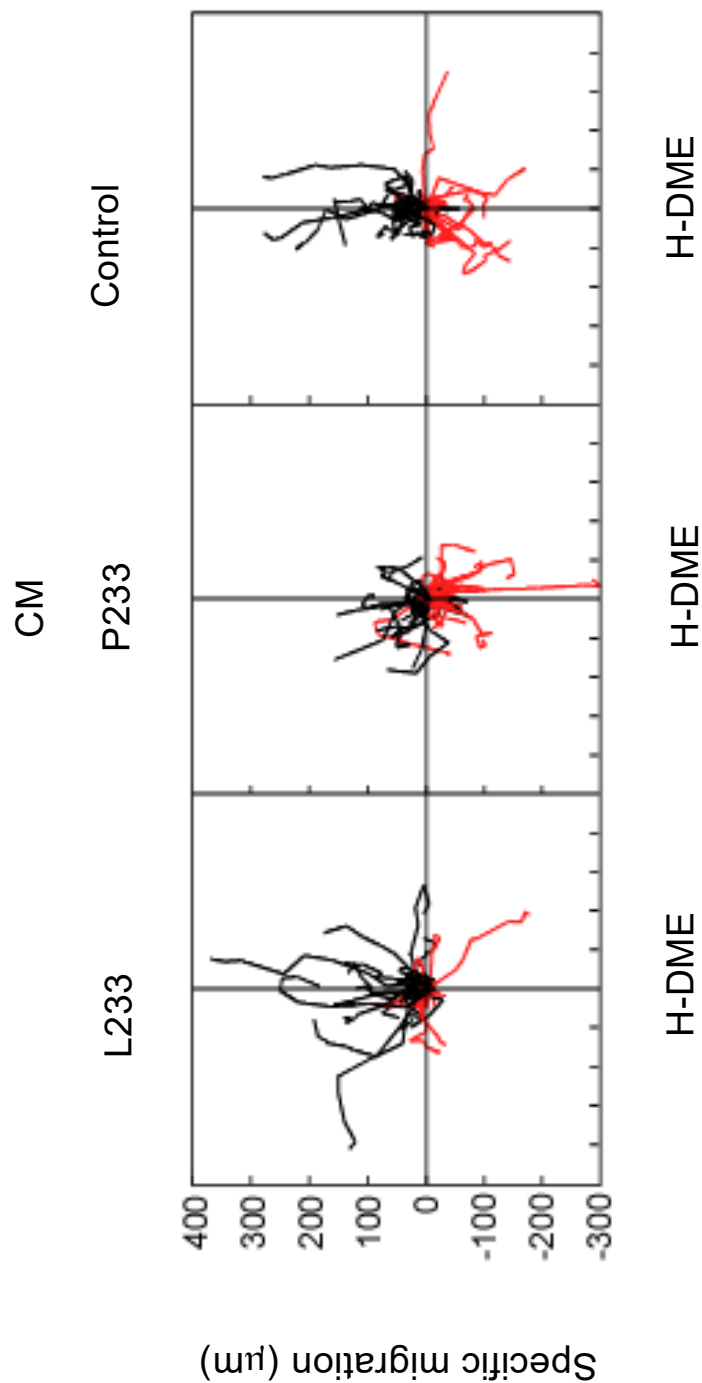


Fig. 20. Chemotaxis assays using HUVEC. HUVEC were attached to the observation area in a μ -Slide Chemotaxis 3D chamber slide, and the direction of cell migration was examined at 60-min intervals for 10 h. Trajectory plots of the cells that migrated in response to the CM are indicated. The black lines show the trajectory that has moved to the CM side, and the red lines that have moved to the H-DME side. Note that concentration gradients decrease from top to bottom.

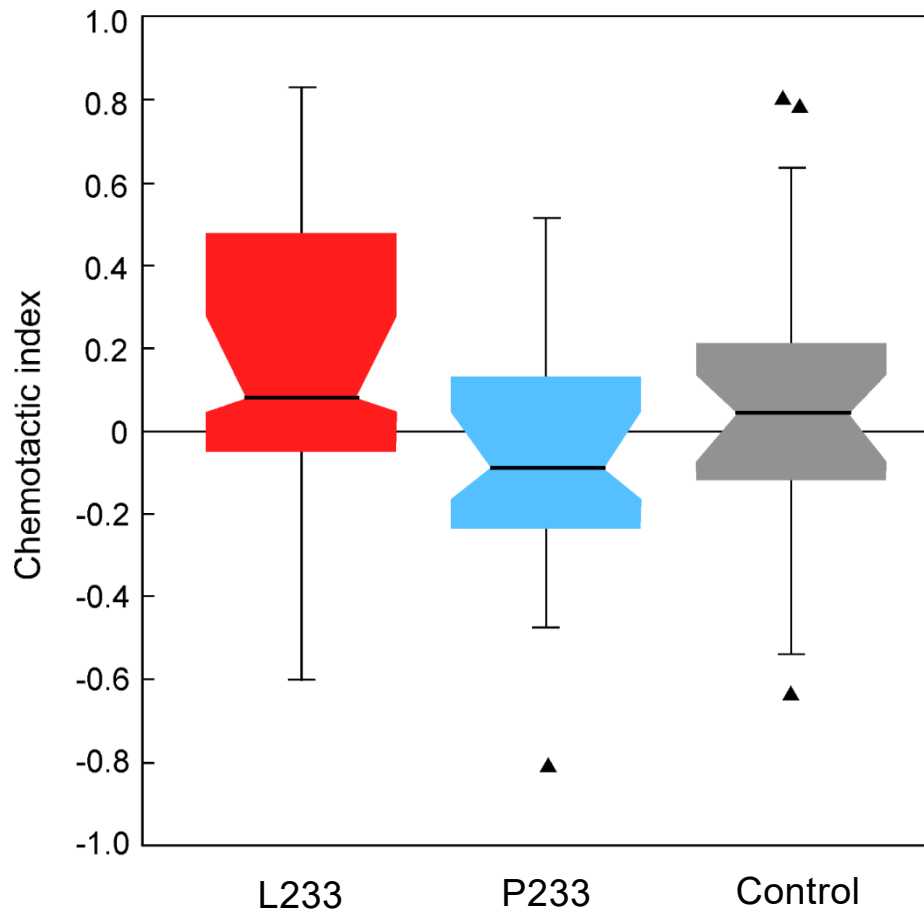


Fig. 21. Comparison of specific mobility of HUVEC. Chemotaxis assays were performed using HUVEC and CM from Tax-expressing cells or control cells. Box plots showing the distribution of the chemotactic index of the cells. Upper horizontal line of the box, 75th percentile; lower horizontal line of the box, 25th percentile; horizontal bar within the box, median; notch, 95% confidence interval for the actual mean; upper horizontal bar outside the box, the highest datum still within the interquartile range (IQR) $\times 1.5$ of the upper quartile; lower horizontal bar outside the box, the lowest datum still within 1.5 IQR of the lower quartile. Triangles represent outliers not included between the whiskers.

3) 考察

BLV の Tax は白血病発症に重要な役割を果たすと考えられているが、その詳細はいまだ解明されていない。当研究室では以前、Tax の L233P 変異が BLV の病原性と強く関連していることを報告した。³⁰⁾ 前章では Tax の腫瘍原性を宿主細胞ゲノム損傷能および軟寒天コロニー形成能により評価し、インシエーションにおいては L233-Tax が、プロモーションにおいては P233-Tax がより強い活性を示す可能性を示した。本章では腫瘍のプログレッションにおける Tax の役割を明らかにするため、両 Tax 発現細胞および対照細胞をヌードマウス皮下に移植した。さらに、HUVEC を用いたチューブ形成試験および走化性試験によって各細胞が産生する液性因子の活性を評価した。その結果、L233-Tax 発現細胞は P233-Tax 発現細胞より著しく大きな腫瘍を形成することが分かった。対照細胞もごく小さな腫瘍を形成したが、いずれの細胞に由来する腫瘍内部においても微小血管環境の差は認められなかった。一般に、腫瘍組織内では低酸素誘導因子(HIF)を含む非特異的な反応による腫瘍血管内皮細胞(TEC)の血管新生が誘導される。³⁸⁾ また、HUVEC を用いたチューブ形成試験においては、両 Tax 発現細胞および対照細胞の CM で網目状の構造を呈し、総チューブ長の有意差は L233-Tax 発現細胞と対照細胞との間で認められたのみであった。したがって、ヌードマウス皮下に形成された腫瘍組織内の微小血管環境の構築には Tax の寄与は少ないものと考えられた。また、L233-Tax と P233-Tax 間では差が認められなかった。したがって、これらの腫瘍で認められた血管新生は HIF などの非特異的因子が作用した結果と考えられる。

血管新生誘導能では差が認められなかったにもかかわらず、L233-Tax 発現細胞由来腫瘍では著明な新規の脈管形成が認められた。病的な脈管新生では既存の血管からのみならず末梢あるいは骨髄の血管内皮前駆細胞を誘引することによっても生じる。³⁹⁾ HUVEC を用いた走化性試験の結果、L233-Tax 発現細胞のみが明らかに誘引物質を分泌していることが示された。したがって、

ヌードマウスに移植された L233-Tax 発現細胞は、マウスの血管内皮前駆細胞を初期の微細な腫瘍に誘引することによって新規の脈管を形成させ、大量の栄養素および酸素の運搬路を確保し、腫瘍を成長させたものと考えられる。

BLV の Tax は、がん原遺伝子 *c-fos* の活性化およびアポトーシス促進遺伝子 *bcl-2* の抑制⁹⁻¹¹⁾を含む多数の細胞遺伝子の発現を調節し、ヒツジ B 細胞を IL-4 非依存性に不死化する。⁴⁰⁾ Tax はまた、DNA 二本鎖切断の修復を阻害し、それによって細胞 DNA に変異を蓄積させることが示されている。²⁸⁾ しかしながら、Tax の mRNA はリンパ球増多症を呈する BLV 感染牛では極めて少数 (1/20,000 程度) の B 細胞で検出されるのみであり、⁴¹⁾ 腫瘍においても転写レベルは低い。⁴²⁻⁴⁴⁾ そのため、BLV 感染リンパ腫細胞による腫瘍形成、すなわち、プログレッションにおける Tax の役割は不明であった。本研究で明らかになった血管内皮細胞誘引因子はごく少数の細胞が分泌するだけで十分であり、Tax の発現量が少ないという報告と矛盾しない。

ヌードマウス皮下移植実験の成績と EBL の潜伏期から推定された BLV の病原性はよく一致していた。したがって、L233-Tax ウイルス感染ウシ B リンパ腫細胞もまた血管内皮細胞誘引物質を分泌し、ウシの血管内皮前駆細胞を誘引することによって脈管形成を誘導して腫瘍の成長を促進している可能性が強い。P233-Tax 発現ラット繊維芽細胞と同様、P233-Tax ウイルス感染リンパ腫細胞は、ほとんど血管内皮細胞誘引物質を分泌しないことが推測される。そのため、脈管形成は制限されて腫瘍の成長は遅れ、EBL の潜伏期間が 2 年以上長くなるものと考えられる。さらに、腫瘍組織への血管の侵入は腫瘍細胞の遠隔組織への転移を容易にする。EBL の特徴は、モノクローナルな細胞による多発性リンパ肉腫である。L233-Tax 発現細胞が分泌する血管内皮誘引物質は腫瘍の転移、すなわちプログレッションに大きな役割を果たすことが示唆される。

総括

本研究では、疫学的に BLV の病原性との関連が示唆されていた Tax の L233P 変異が Tax 発現細胞の腫瘍原性に及ぼす影響を *in vitro* および *in vivo* において解析した。その結果、以下の知見を得た。

1. Tax 発現細胞は対照細胞に比べゲノムの損傷が大きかった。また、L233-Tax は P233-Tax に比べ宿主ゲノム損傷能が高かった。したがって、BLV による白血病発症のイニシエーションでは L233-Tax がより大きな役割を果たすものと考えられた。
2. P233-Tax 発現細胞は、軟寒天中において L233-Tax 発現細胞より大きなコロニーを形成した。したがって、腫瘍のプロモーションにおいては P233-Tax の方が大きな役割を果たすことが示唆された。
3. L233-Tax 発現細胞は、ヌードマウス皮下に大きな血管を伴った腫瘍を形成した。P233-Tax 発現細胞由来腫瘍は有意に小さく、血管を伴わなかった。L233-Tax 発現細胞は HUVEC に対する誘引物質を分泌していたことから、L233-Tax は腫瘍組織への脈管形成において大きな役割を果たすものと考えられた。すなわち、L233-Tax は腫瘍のプロGRESSIONにおいて重要な役割を果たすことが示唆された。

BLV の Tax はウシ B 細胞腫のイニシエーション、プロモーションに大きな役割を果たし、リンパ肉腫のプロGRESSIONにも重要な役割を担うことが示唆された。これらの知見はデルタレトロウイルスによる白血病発症機構を理解するうえで極めて有益と考えられ、ATL の治療法開発への応用も期待される。

謝 辞

本研究に際して、研究全般にわたる多大なご指導,ご鞭撻を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科 岡崎克則教授に心より深く感謝致します。

本論文を審査頂き、数々のご助言とご指導を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科 泉剛教授, 小島弘幸教授, 小林大祐准教授に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、有益なご教授を賜りました北海道医療大学薬学部 大澤宜明准教授ならびにご退職された渡邊恵美博士に深く感謝致します。

本研究の実験材料をご提供いただきました茨城県県西食肉衛生検査所, (株)群馬県食肉卸売市場の皆様に厚くお礼申し上げます。

本論文の基礎となる報文の執筆にあたり共著者としてご協力を賜り、基礎となる報文の提出に快諾していただきました富安貴史君, 西山加那子さんならびに松本舞子さんに深く感謝致します。

本論文を提出するにあたり、ご支援とご協力を頂きました全ての方々に心より御礼申し上げます。

令和元年7月

森 宏

引用文献

- 1) Weiss RA, The discovery of endogenous retroviruses, *Retrovirology*, 3, 67 (2006).
- 2) Sommerfelt MA, Retrovirus receptors, *J Gen Virol*, 80, 3049-3064 (1999).
- 3) Goff SP, *Retroviridae*, in: *Fields Virology*, 6th ed, Wolters Kluwer, 1424-1473 (2013).
- 4) Cann AJ, Rosenblatt JD, Wachsman W, Shah NP, Chen IS, Identification of the gene responsible for human T-cell leukaemia virus transcriptional regulation, *Nature*, 318, 571-574 (1985).
- 5) Fujisawa J, Seiki M, Kiyokawa T, Yoshida M, Functional activation of the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type I by a trans-acting factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, 2277-2281 (1985).
- 6) Fujisawa J, Seiki M, Sato M, Yoshida M, A transcriptional enhancer sequence of HTLV-1 is responsible for transactivation mediated by p40x HTLV-1, *EMBO J*, 5, 713-718 (1986).
- 7) Sodroski J, Rosen C, Goh WC, Haseltine W, A transcriptional activator protein encoded by the *x-lor* region of the human T-cell leukemia virus. *Science*, 228, 1430-1434 (1985).
- 8) Sodroski JG, Goh WC, Rosen CA, Salahuddin SZ, Aldovini A, Franchini G, Wong-Staal F, Gallo RC, Sugamura K, Hinuma Y, Trans activation of the human T-cell leukemia virus long terminal repeat correlates with expression of the *x-lor* protein. *J Virol*, 55, 831-835 (1985).
- 9) Arainga M, Takeda E, Aida Y, Identification of bovine leukemia virus tax function associated with host cell transcription, signaling, stress response and immune response pathway by microarray-based gene expression analysis, *BMC Genomics*, 13, 121 (2012).

- 10) Currer R, Van Duyne R, Jaworski E, Guendel I, Sampey G, Das R, Narayanan A, Kashanchi F, HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways, *Front Microbiol*, 3, 406 (2012).
- 11) Klener P, Szynal M, Cleuter Y, Merimi M, Duvillier H, Lallemand F, Bagnis C, Griebel P, Sotiriou C, Burny A, Martiat P, Van den Broeke A, Insights into gene expression changes impacting B-cell transformation: cross-species microarray analysis of bovine leukemia virus Tax-responsive genes in ovine B cells. *J Virol*, 80, 1922–1938 (2006).
- 12) Willems L, Heremans H, Chen G, Portetelle D, Billiau A, Burny A, Kettmann R, Cooperation between bovine leukaemia virus transactivator protein and Ha-ras oncogene product in cellular transformation, *EMBO J*, 9, 1577-1581 (1990).
- 13) Pozzatti R, Vogel J, Jay G, The human T-lymphotropic virus type I tax gene can cooperate with the ras oncogene to induce neoplastic transformation of cells, *Mol Cell Biol*, 10, 413-417 (1990).
- 14) Szynal M, Cleuter Y, Beskorwayne T, Bagnis C, Van Lint C, Kerkhofs P, Burny A, Martiat P, Griebel P, Van den Broeke A, Disruption of B-cell homeostatic mediated by the BLV-Tax oncoprotein: association with upregulation of Bcl-2 and signaling through NF- κ B. *Oncogene*, 22, 4531–4542 (2003).
- 15) Kannagi M, Ohashi T, Harashima N, Hanabuchi S, Hasegawa A, Immunological risks of adult T-cell leukemia at primary HTLV-I infection, *Trends Microbiol*, 12, 346-352 (2004).
- 16) Taniguchi Y, Nosaka K, Yasunaga J, Maeda M, Mueller N, Okayama A, Matsuoka M, Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms, *Retrovirology*, 2, 64 (2005).
- 17) Takeda S, Maeda M, Morikawa S, Taniguchi Y, Yasunaga J, Nosaka K, Tanaka Y, Matsuoka M, Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells, *Int J Cancer*, 109, 559-567 (2004).

- 18) Koiwa T, Hamano-Usami A, Ishida T, Okayama A, Yamaguchi K, Kamihira S, Watanabe T, 5'-long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vitro and in vivo, *J Virol*, 76, 9389-9397 (2002).
- 19) Tamiya S, Matsuoka M, Etoh K, Watanabe T, Kamihira S, Yamaguchi K, Takatsuki K, Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia, *Blood*, 88, 3065-3073 (1996).
- 20) Larocca D, Chao LA, Seto MH, Brunck TK, Human T-cell leukemia virus minus strand transcription in infected T-cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 163, 1006-1013 (1989).
- 21) Gaudray G, Gachon F, Basbous J, Biard-Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard JM, The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription, *J Virol*, 76, 12813-12822 (2002).
- 22) Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, Matsuoka M, HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 720-725 (2006).
- 23) Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Bangham CRM, Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton, *Science*, 299, 1713-1716 (2003).
- 24) 安永純一郎, 松岡雅雄. HTLV-I と発がん, *ウイルス*, 56, 241-250 (2006).
- 25) Durkin K, Rosewick N, Artesi M, Hahaut V, Griebel P, Arsic N, Burny A, Georges M, Van den Broeke A, Characterization of novel Bovine Leukemia Virus (BLV) antisense transcripts by deep sequencing reveals constitutive expression in tumors and transcriptional interaction with viral microRNAs, *Retrovirology*, 13, 33 (2016).

- 26) Douglas H, Robert AW, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell*, 144, 646-674 (2011).
- 27) Sagata N, Yasunaga T, Ohishi K, Tsuzuku-Kawamura J, Onuma M, Ikawa Y, Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames, *EMBO J*, 3, 3231-3237 (1984).
- 28) Philpott SM, Buehring GC, Defective DNA repair in cells with human T-cell leukemia/bovine leukemia viruses: role of tax gene, *J Natl Cancer Inst*, 91, 933-942 (1999).
- 29) Matsumura K, Inoue E, Osawa Y, Okazaki K, Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leukosis in Japan, *Virus Res*, 155, 343-348 (2010).
- 30) Inoue E, Matsumura K, Soma N, Hirasawa S, Wakimoto M, Arakaki Y, Yoshida T, Osawa Y, Okazaki K, L233P mutation of the Tax protein strongly correlated with leukemogenicity of bovine leukemia virus, *Vet Microbiol*, 167, 364-371 (2013).
- 31) Aruga H, The principle and applications of real-time PCR, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 73, 292-295 (2007).
- 32) Yin MJ, Gaynor RB, Complex formation between CREB and Tax enhances the binding affinity of CREB for the human T-cell leukemia virus type 1 21-base-pair repeats, *Mol Cell Biol*, 16, 3156–3168 (1996).
- 33) 木岡紀幸, 細胞増殖シグナルの足場依存性に関与する新規細胞骨格タンパク質に関する研究. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 77, 968-973 (2003).
- 34) Baydoun HH, Bai XT, Shelton S, Nicot C, HTLV-I Tax increases genetic instability by inducing DNA double strand breaks during DNA replication and switching repair to NHEJ, *PLoS One*, 7, e42226 (2012).

- 35) Matsumoto Y, Biological defense mechanisms against DNA double-strand break and their possible medical applications, *Hyomen kagaku*, 32, 569-574 (2011).
- 36) Gupta V, Knshan A, Zubrod CG, Correlation of in vitro clonogenic assay data with in vivo growth delays and cell cycle changes of a human melanoma xenograft, *Canser Res*, 43, 2560-2564 (1983).
- 37) 土肥良秋, 工藤秀明, 西野朋子, 藤本淳, 血管発生と血管新生・新生血管形成に関する研究の沿革-, *J UOEH*, 25, 409-417 (2003).
- 38) Pugh WC, Ratcliffe JP, Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system, *Nature Med*, 9, 677–684 (2003).
- 39) Furuya Y, Okazaki Y, Kaji K, Sato S, Takehara K, Kuwana M, Mobilization of endothelial progenitor cells by intravenous cyclophosphamide in patients with systemic sclerosis, *Rheumatology (Oxford)*, 49, 2375-2380 (2010).
- 40) Frie MC, Coussens PM, Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle, *Vet Immun Immunopathol*, 163, 103-114 (2015).
- 41) Gaynor EM, Mirsky ML, Lewin HA, Use of flow cytometry and RT-PCR for detecting gene expression by single cells, *Biotechniques*, 21, 286–291 (1996).
- 42) Kettmann R, Deschamps J, Cleuter Y, Couez D, Burny A, Marbaix G, Leukemogenesis by bovine leukemia virus: proviral DNA integration and lack of RNA expression of viral long terminal repeat and 3' proximate cellular sequences, *Proc Natl Acad Sci USA*, 79, 2465–2469 (1982).
- 43) Tajima S, Tsukamoto M, Aida Y, Latency of viral expression in vivo is not related to CpG methylation in the U3 region and part of the R region of the long terminal repeat of bovine leukemia virus, *J Virol*, 77, 4423–4430 (2003).

- 44) Tajima S, Aida Y, Induction of expression of bovine leukemia virus (BLV) in blood taken from BLV-infected cows without removal of plasma, *Microbes Infect*, 7, 1211–1216 (2005).