

## 論 文 要 旨

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

北海道医療大学大学院薬学研究科

森 宏

〔背景・目的〕牛白血病ウイルス(bovine leukemia virus : BLV)はヒト T リンパ球向性ウイルス 1 型(human T-lymphotropic virus-1 : HTLV-1)とともにデルタレトロウイルス属に分類され, B 細胞性の地方病性牛白血病を引き起こす. 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. また, デルタレトロウイルスゲノム上の *env* 遺伝子と 3' LTR の間には pX と呼ばれる領域が存在し, この領域がコードするウイルス転写活性化因子 Tax は多数の細胞遺伝子の転写を調節することが知られている. 当研究室では, BLV による白血病発症機構を明らかにするため大規模な疫学調査を実施し, BLV は Tax の 233 位アミノ酸によって L233 型と P233 型に二分されること, P233 型ウイルスでは L233 型ウイルスに比べ白血病発症の潜伏期が長い可能性を示した. 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 過程を経て進展する. 本研究では白血病発症における BLV Tax の役割を明らかにするため, L233-Tax および P233-Tax を持続発現するラット株化線維芽細胞を樹立し, *in vitro*における両 Tax のイニシエーション活性およびプロモーション活性を比較した. 次に, ノドマウス皮下移植実験によってプログレッション活性を比較した.

〔方法〕ラット株化線維芽細胞に L233-Tax あるいは P233-Tax 発現プラスミドを導入し, 持続発現細胞を樹立した. リアルタイム PCR によって両細胞における *tax* mRNA の転写量を調べた. また, ルシフェラーゼ遺伝子をリポーターとして BLV LTR に対するトランスアクチベーション活性を比較した. 両 Tax 発現細胞をコメットアッセイに供し, 核からの漏出 DNA を測定してゲノム損傷の程度を比較した. 次に, 軟寒天コロニー形成試験に供し, 足場非依存性増殖能を評価した. さらに, ノドマウス皮下に接種して *in vivo*における腫瘍形成能を比較した. Tax によって宿主細胞に発現誘導される液性因子の活性を調べるため, 両 Tax 発現細胞の培養上清をヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用いたチューブ形成試験および走化性試験に供した.

[結果・考察] リアルタイム PCR の結果、両 Tax 発現細胞における *tax* mRNA の転写量はほぼ同量であった。一方、リポーターアッセイでは P233-Tax は L233-Tax に比べ強い酵素活性を示したことから、P233-Tax の方が LTR に対してより強いトランスアクリベーション活性を有することが示唆された。コメットアッセイの結果、両 Tax 発現細胞は対照細胞に比べゲノム損傷の程度が有意 ( $p < 0.01$ ) に大きかった。したがって、BLV Tax は宿主細胞ゲノムに損傷を与えることが示された。また、L233-Tax は P233-Tax に比べ有意 ( $p < 0.05$ ) にゲノム損傷能が高かった。一方、軟寒天コロニー形成試験では、P233-Tax 発現細胞は L233-Tax 発現細胞に比べ有意 ( $p < 0.01$ ) に大きなコロニーを形成した。したがって、L233-Tax は腫瘍化のイニシエーション活性は P233-Tax に比べ高いものの、プロモーション活性は低いことが示唆された。ヌードマウス皮下移植実験では、L233-Tax 発現細胞が P233-Tax 発現細胞に比べ有意 ( $p < 0.01$ ) に大きな腫瘍を形成した。また、L233-Tax 発現細胞由来腫瘍表面では新生血管が目視された。チューブ形成試験の結果、L233-Tax 発現細胞の培養上清と P233-Tax 発現細胞のそれとの間に有意差は認められなかった。一方、走化性試験では多くの HUVEC は L233-Tax 培養上清側に移動し、P233-Tax 培養上清側への移動性とは有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められたことから、L233-Tax は HUVEC 誘引物質の産生を宿主細胞に誘導することが分かった。ヌードマウスにおいても L233-Tax 発現細胞はマウスの血管内皮細胞を誘引し、血管を創成することによって腫瘍の成長を促進したものと考えられる。腫瘍組織への血管の導入は腫瘍細胞の転移を促進する。すなわち、L233-Tax は P233-Tax に比べプログレッション活性が高いものと考えられる。以上の成績から、BLV Tax はウイルス感染 B リンパ球の悪性化から白血病細胞による肉腫進展までの 3 過程において重要な役割を果たすことが示唆された。L233-Tax がより高いプログレッション活性を示したことから、BLV による白血病の発症には血管内皮細胞誘引物質の産生促進が極めて重要であることが示された。

[結語] 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、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、リンパ肉腫のプログレッション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、成人 T 細胞白血病の治療法開発への応用も期待される。