

学位論文題名

ヒト内在性レトロウイルス HERV-R  
遺伝子導入ラットにおける  
Env 蛋白の発現とその抗原性の解析

学位論文内容の要旨

I. 目的

真核生物遺伝子内には、感染性レトロウイルスと相同性を保ち、ゲノム内に組み込まれて細胞分裂や生殖により増幅される遺伝子群が存在し、内在性レトロウイルス (endogenous retrovirus: 以下 ERV) と呼ばれている。マウスにおいては自己免疫疾患の発症や免疫能形成過程での自己スーパー抗原としての関与が報告されている。ヒトにおいて ERV は多種が同定されているほか、ERV に関連する塩基配列は全ゲノムの 7% に達し、様々な疾患との関連や細胞融合への関与の可能性が報告されている。しかし、その生物学的機能と意義について、いまだ十分に解析されているとは言えない。

当教室では、ヒト ERV の一つである HERV-R (human endogenous retrovirus type-R, 別名 endogenous retrovirus 3: ERV3) に着目し、研究を進めてきた。HERV-R は第 7 染色体等に存在する C 型レトロウイルスで、遺伝子全長約 9.9 kb には 5'LTR-gag-pol-env-3'LTR の構造が保たれており、env 領域には糖蛋白産生の可能性を有している。ヒトにおいては胎盤や副腎等における臓器特異的な発現、サイトカインによる発現調節、胎盤や胎児心組織における蛋白発現が報告されている。

ヒトにおいては HERV-R 遺伝子機能の解析には限界があるため、当教室ではその生物学的意義を明らかにするために遺伝子導入モデルを作製した。樹立された HERV-R 遺伝子導入ラット (5 系) では、臓器特異的な env mRNA 発現、加えて胎児・胎盤形成の経過に伴う mRNA の発現が確認されている。今回、この遺伝子導入ラットを用いて、遺伝子産物発現のさらなる解析とその抗原性について検討した。

II. 材料と方法

1. RNA 抽出と発現確認

ラット組織を摘出し液体窒素により凍結し total RNA を抽出、Oligo dT をプライマーとし M-MLV-逆転写酵素を用いた逆転写反応を行った。続いて、HERV-R env mRNA のスプライシング領域を挟んだプライマーで PCR を行い mRNA 発現の有無を確認した。

2. 抗 Env 蛋白抗体の作製と精製

HERV-R Env 蛋白検出のために、抗原性を有すると考えられる部位を選択して合成ペプチド (KDSEWPPERIIQYYG) を作製し、ウサギに免疫し抗血清を得た(ペプチド研究所)。さらに、この合成ペプチドとアルブミンとの結合物を作製した。このアルブミン結合合成ペプチドを固定したカラムクロマトグラフィーにより上記の抗血清を分離、精製した。

3. Env 蛋白の糖鎖切断と Western blotting 解析

トランスジェニックラットのハーダー腺より抽出した可溶性蛋白溶液に Glycopeptidase F

(TaKaRa) を加え、そのプロトコールに従って、変性条件にて 37℃、17 時間反応させて N-グリコシド型糖鎖の切断を行った。糖鎖切断後の可溶性蛋白溶液に泳動バッファーを加えて煮沸した後、7.5%ポリアクリルアミド SDS-PAGE によって電気泳動し、メンブレンに転写した。免疫染色は、一次抗体として精製抗 HERV-R Env 抗体を 750 倍希釈で 1 時間反応させた。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識した抗ウサギ免疫グロブリンポリクローナル抗体 (DAKO) を 1500 倍希釈で 1 時間反応させた。

#### 4. 免疫組織化学染色

HERV-R 遺伝子導入ラット、同系正常 WKAH ラットおよびそれぞれの胎児組織を採取しホルマリン固定後、パラフィン包埋しプレパラートを作製した。プレパラートは圧力鍋を用いてクエン酸バッファーによる抗原賦活化を行い、精製抗 HERV-R Env 抗体 (150 倍希釈) を一次抗体とし、自動免疫組織化学染色機 (Ventana) とそれに付属する二次抗体を用いて染色を行った。

#### 5. 皮膚移植

10 週齢の WKAH ラットの背部皮膚に、同週齢の HERV-R 遺伝子導入ラットおよび同系移植片として WKAH ラット、同種移植片として Lewis ラットの尾より採取した皮膚片を移植し、固定保持した。皮膚移植片の 80%以上が壊死に陥った時点で拒絶と判定し、50 日間観察した時点で残存する移植片を生着と判定した。

皮膚の再移植実験では、WKAH ラット背部皮膚に第 1 回目として 2 片の HERV-R 遺伝子導入ラット尾部皮膚片を移植した。50 日後に第 2 回目の移植を第 1 回目とは離れた背部に同様の方法で施行した。

### III. 結果

1. 前立腺および尾部皮膚において新たに mRNA の発現を確認した。
2. HERV-R 遺伝子導入ラットのハーダー腺では、Env 糖蛋白は腺房細胞の細胞質に分布が認められた。また涙液への分泌が示唆された。
3. 糖鎖切断前後の分子量の変化から、遺伝子より推定される 8 箇所の糖鎖結合可能部位のすべてに N-グリコシド型糖鎖が結合しているものと考えられた。
4. HERV-R 遺伝子導入ラットの胎児の非角化表皮および鼻腔、口腔粘膜、および成熟ラットを含めた食道粘膜において HERV-R Env 蛋白が検出された。
5. 皮膚移植実験では HERV-R Env 蛋白の抗原性が示唆された。

### IV. 考察

本ラットにおいて、導入した HERV-R 遺伝子産物である糖蛋白が糖鎖切断により示す 62 kDa の分子量は、ヒトにおいて報告されている蛋白の分子量とほぼ一致している。高発現を示すハーダー腺はヒトに存在しない臓器であるが、その役割と分泌様式からヒトではアポクリン腺がその counter part として想定される。また、HERV-R 遺伝子上流部に GRE (Glucocorticoid response element) 類似の配列が存在しており、一方ハーダー腺は androgen による分泌調節を受けているという報告があることから、発現メカニズム解析への関与から興味深い。加えて、免疫組織化学染色では、ハーダー腺、食道粘膜、胎児期の非角化表皮、鼻腔粘膜での発現が確認されたことから、粘膜免疫や重層扁平上皮の角化への関与の可能性について今後検討してゆく必要がある。このラットでの結果を受けて、抗 HERV-R Env 抗体を用いてヒトにおける Env 蛋白発現分布の検索は今後の重要な課題である。

皮膚移植実験において、再移植実験では 2 回目の移植片の早期脱落現象は観察されず抗原として量が不十分である可能性も残るが、導入遺伝子産物は抗原として認識されているものと考えられる。シェーグレン症候群及び全身性エリテマトーデス患者あるいは心奇形胎児妊婦の血清と HERV-R 蛋白との反応が報告されている。健康人は ERV に対して免疫学的寛容の状態にあり有意な免疫反応の惹起や炎症所見は起きないものの、これらの疾患の患者では何らかの遺伝的背景や環境要因によりその免疫学的寛容状態が破綻して ERV が自己抗原として認識されている可能性も考えられる。現在まで、HERV-R 遺伝子導入ラットにおいて特異的臓器炎の発症は確認され

ていないが、十分量の Env 抗原による免疫操作や HERV-R と相同性の高いウイルスを感染させるなどにより人為的に免疫学的寛容状態を破綻させれば、Env 抗原を標的とした自己免疫疾患を誘導できる可能性が期待される。

#### V. 結 語

本ラットを用いた HERV-R Env 蛋白の解析は、HERV-R の生物学的意義の解明への一助となると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 志 田 壽 利

学 位 論 文 題 名

## ヒト内在性レトロウイルス HERV-R

### 遺伝子導入ラットにおける

### Env 蛋白の発現とその抗原性の解析

申請者はヒト内在性レトロウイルスの生物学的意義を解明することを目的として、その一つである HERV-R 遺伝子を導入したモデル動物（ラット）における導入遺伝子発現とその抗原性について解析を行った。その結果、HERV-R 遺伝子導入ラットのハーダー腺では、Env 蛋白は遺伝子より推定される 8 箇所の糖鎖結合可能部位のすべてに N-グリコシド型糖鎖が結合した糖蛋白として、腺房細胞の細胞質に発現していることが確認され、涙液の一部として分泌されていることが示唆された。免疫組織化学的に HERV-R 遺伝子導入ラットの胎児の非角化表皮および鼻腔、口腔粘膜、および成熟ラットを含めた食道粘膜において HERV-R Env 蛋白が検出された。発現部位と HERV-R Env 蛋白と p15E 蛋白が相同性を持つという報告から粘膜免疫への関与の可能性が示唆された。さらに、遺伝子導入ラット皮膚片が同系ラットへの移植実験において緩徐な脱落を示すことから、導入遺伝子産物が抗原性を有しているものと考えられた。内在性レトロウイルスが自己免疫疾患における自己抗原となっているとする報告があることから、この Env 蛋白が自己抗原として働く可能性を考慮してモデル動物の解析を進めたい。発表後の副査 志田壽利教授との質疑応答は以下の通りである。

問：2 回目の皮膚移植実験の目的と結果の解釈はどうか。答：抗原に対するメモリーで細胞性免疫あるいは液性免疫反応が早く起きることを期待したが、2 回目で脱落が促進されないことから Env の抗原性が十分に高くはないのではないかと考えている。

問：内在性レトロウイルスの生物学的意義について LINEs や SINEs との関連から考えることがあるか。答：HERV-R Env の蛋白としての発現、機能に重点をおいて解析してきており、LINEs や SINEs の介在については深く関連付けて考えてこなかった。

問：Env に主眼をおいて解析を進めているようだが、gag, pol が細胞性免疫等に関係して疾患を誘導することを考えないのか。答：Env は蛋白として発現しているが、gag, pol はストップコドンの挿入により発現していないと考えられており、現時点では病態に関わっている可能性は非常に低いと考えている。続いて、副査 長嶋和郎教授と以下の

ような質疑応答があった。問：ハーダー腺で強い発現がみられることは興味深い。プロモーターとの関係から、この臓器特異的な発現を説明できるか。答：導入遺伝子の挿入された場所がハーダー腺で発現を促進される場所であったという可能性もある。しかし、HERV-R の LTR には Glucocorticoid Response Element と相同性を有する配列があるという報告があるとともに、ハーダー腺では androgen による発現調節を受けているという報告がある。ホルモンによる発現調節を受けている可能性が示唆される。問：膵臓などの他の分泌腺での発現とそれによる変化はみられるか。答：その他の臓器では蛋白発現は確認できていない。また病理組織学的には炎症等の像は認められていない。問：実際に分泌量が増減するという事はないのか。答：分泌量の測定は行っていない。Androgen 等の投与によって分泌量が変化するかどうか確かめる必要があると考えている。問：胎生期から発現しているため免疫学的寛容の状態にあるのかもしれないが、自己免疫疾患を誘発する条件について考えているか。答：LPS やサイトカインの投与を試みたが現時点で有意な疾患誘発には至っていない。条件を変えて試みていくことを考えている。最後に主査 吉木 敬教授と以下のような質疑応答があった。問：多種の内在性レトロウイルスの一つに過ぎない HERV-R で、内部遺伝子のコードする蛋白であり研究の方向付けが難しいと思うが、今後どのように解析していくつもりか。答：内在性レトロウイルスの存在する意味を考えた時に、イントロンに過ぎない、他の遺伝子発現調節に関与している、機能的蛋白である、自己抗原となっている等の可能性を考えている。このモデルラットで蛋白の発現が確認されている以上、機能的蛋白あるいは自己抗原としての作用に着目して研究を進めていきたいと考えている。問：ヒトにおいて皮膚（表皮）や前立腺での発現は報告されているか。答：ヒトにおいてそれに関係する報告はみられない。今後、このラットでの研究結果をヒトに外挿していく際に着目する必要があると考える。以上、質疑に対する応答は概ね妥当であった。

この論文は、HERV-R 遺伝子導入ラットにおいて、その Env 蛋白の発現と抗原性について新たな成果を得て考察を加えた点が高く評価され、ヒトではその生物学的研究に制約のある内在性レトロウイルスの機能解明を進める研究として期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻病態解析学講座分子病理学分野大学院生としての研鑽や取得単位を併せ、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。