

学位論文題名

異所性胸腺移植による
HTLV-I pX トランスジェニックラット胸腺種の
悪性化とその遺伝子発現解析

学位論文内容の要旨

I. 目的

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)は、成人 T 細胞白血病の原因ウイルスとして知られている。HTLV-I の構造遺伝子のうち HTLV-I に固有である pX 遺伝子がコードする Tax 蛋白は CREB, NF κ B, SRF 等の転写因子と結合し、感染宿主の細胞性遺伝子に多面的な影響を及ぼし、その病態形成に深く関与していると考えられている。当教室では、pX 遺伝子の腫瘍原性を *in vivo* で検討する目的で、p56 lck 遺伝子の type I promoter の制御下で pX 遺伝子を導入したトランスジェニックラット (lck-pX ラット) を作製し、このラットで上皮型胸腺腫を高率に発生することを以前報告した。このラットの胸腺腫は、他臓器への浸潤や遠隔転移等はみられず、基本的には良性の腫瘍と考えられる。今回、胸腺抜去後の lck-pX ラット腎被膜下に胸腺腫未発症 lck-pX ラット胸腺を移植し、約 6 ヶ月経過観察することにより、多数の腹膜播種や遠隔転移をきたし、胸腺腫の悪性化と考えられる現象が認められた。本研究では、lck-pX ラットに発生する胸腺腫 (primary thymoma) と lck-pX ラット腎被膜下移植後に悪性形質を獲得したと考えられる胸腺腫 (malignant thymoma) について、病理組織学的あるいは分子生物学的手法を用いて比較検討したので報告する。

II. 材料と方法

1. ラットからの胸腺摘出と腎被膜下胸腺移植

5 週齢の lck-pX ラットを対象として胸腺摘出を施行し、その 1 週間後に生後 2 日の lck-pX ラット新生児から摘出した胸腺を腎被膜下に移植した。

2. 病理組織学的解析

ラット組織は HE 染色を行い組織学的観察を行なった。Ki67 index は、対物 400 倍 10 視野における Ki-67 陽性細胞数/全細胞数の比の平均を百分率で示した。

3. 胸腺腫の皮下移植

約 5mm 角の腫瘍組織を 5ml の Hanks 培地中で細切し、7 週齢前後の lck-pX ラット左右背部皮下に 500 μ l ずつ注入した。移植の成立の有無は移植後 3 ヶ月まで観察し、肉眼的および組織学的に判定した。

4. リアルタイム定量 RT-PCR

凍結したラット腫瘍組織あるいは胸腺組織から全 RNA を抽出し cDNA を合成した. SYBR® Green I を含む反応液中で PCR 反応を行い, 蛍光をリアルタイムに検出することにより cDNA 量の定量を行なった. 検体間の各遺伝子の発現量は GAPDH の発現量で標準化した.

5. p16 遺伝子のゲノムサザンプロットティング

正常ラット胸腺組織から作製した cDNA を template として, ジゴキシゲニン標識プローブを作成した. 定法にてラット組織から抽出した DNA を制限酵素(Hind III, BamHI, PstI)で切断後, 電気泳動し, ナイロンメンブレンに転写した. メンブレンはプローブをハイブリダイゼーションさせた後, 洗浄し, 化学発光系でシグナルを検出した. バンド濃度は Scion image を用いて定量した.

III. 結果

1. 移植後約 6 ヶ月を経過するころより, 全例 (n=5) で腹腔内に多数の転移結節を形成し, 肺への遠隔転移もみられる malignant thymoma の発生が認められた.
2. HE 染色では, malignant thymoma は primary thymoma と比較して, N/C 比の増大や核分裂像の増加, 核異型の増強といった病理組織学的悪性変化が認められた. Ki67 index は primary thymoma が $25.85 \pm 4.34\%$ (mean \pm S.D.) であるのに対して, malignant thymoma では $55.77 \pm 7.12\%$ (mean \pm S.D.) であり, malignant thymoma で有意に高値であった ($p < 0.001$).
3. malignant thymoma を移植した群でのみ, 同系 lck-pX ラット皮下への移植の成立と腫瘍の増大が観察された.
4. primary thymoma と malignant thymoma の間で HTLV-I pX および cyclin D2, p16, ARF の発現量に有意な差が認められた ($p < 0.01$). HTLV-I pX および cyclin D2 は primary thymoma で高発現であったが, malignant thymoma では胸腺腫発症前と同等のレベルまで発現が低下する傾向が認められた. p16 と ARF は同様の傾向を示し, 非腫瘍胸腺では低発現であるものの, primary thymoma では高い発現を示した. 一方 malignant thymoma ではその発現がほとんど認められなかった.
5. どの酵素で切断した場合でも正常ラット組織, primary thymoma, malignant thymoma 間で p16 遺伝子のバンドのパターンに違いは認められなかった. しかし malignant thymoma のバンド濃度は他と比べ約 1/3 の濃度であった.

IV. 考察

malignant thymoma は primary thymoma と起源は同一ながら, 組織形態学的あるいは, 同系ラット皮下への可移植性において明確に primary thymoma とは異なり, 悪性腫瘍としての条件を備えていると考えられる. リアルタイム定量 RT-PCR の結果, p16 と ARF は検索した全例で primary thymoma では高発現である一方, malignant thymoma では発現しておらず, 両者間で最も大きな違いが認められた遺伝子である. ヒトでは食道癌, 神経膠腫, 中皮腫などの種々の腫瘍で欠失が報告されている. p16 のサザンプロットティングで malignant thymoma でみられた薄い band は, 腫瘍に介在する間質の細胞のシグナルを検出しているものと推測され, malignant thymoma においても p16/ARF 遺伝子領域が欠失している可能性が高いと考えられる.

ATL は一般にキャリア状態から腫瘍化し, くすぶり型や慢性型といった低悪性度の ATL から急性型やリンパ腫型といった高悪性度の ATL へと進展する経過をたどる. 高悪性度の ATL への移行の際には p16 や p53

の遺伝子異常を高率にともなっていることが知られている。したがって本モデルでの胸腺腫の悪性化はヒト ATL の急性転化で見られる現象の一部を観察している可能性がある。良性腫瘍の状態から高悪性度腫瘍の状態までを連続的に観察できる本実験系は HTLV-I 関連腫瘍の悪性化機構を解明する上で有用な *in vivo* モデルとなり得るものと考ええる。

V. 結語

lck-pX ラット腎被膜下に lck-pX ラット胸腺を移植することにより、約 6 ヶ月間の観察期間で、lck-pX ラット胸腺腫(primary thymoma)の悪性化 (malignant thymoma) と考えられる現象を認めた。malignant thymoma は形態学的に悪性形質を有しているのみならず、遠隔転移能や同系 lck-pX ラット皮下への可移植性も獲得しており、明らかな悪性腫瘍であった。この malignant thymoma では p16 と ARF の発現が全例でほとんど認められず、p16/ARF 領域の異常が本腫瘍の悪性化に中心的な役割を果たしているものと考えられた。

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 畠 山 昌 則

学 位 論 文 題 名

異所性胸腺移植による HTLV-I pX トランスジェニックラット胸腺種の 悪性化とその遺伝子発現解析

ヒト成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV-I) の pX 遺伝子の造腫瘍性を *in vivo* で検討する目的で樹立されたトランスジェニックラット (lck-pX ラット) では、良性の上皮型胸腺腫 (primary thymoma) を発生する。申請者は、このラットの腎被膜下に異所性に正常胸腺を移植することにより、約 6 ヶ月間の観察で高度の腹膜播種や遠隔転移をきたす胸腺腫の悪性化 (malignant thymoma) と考えられる現象を認め、その悪性化機構を解明するために研究を行なった。malignant thymoma は組織形態学的、あるいは同系 lck-pX ラット皮下への可移植性の検討において、primary thymoma とは明確に異なる悪性腫瘍と考えられた。リアルタイム定量 RT-PCR による検討では、primary thymoma では p16, ARF 遺伝子が高発現であるのに対し、malignant thymoma ではそれらの発現がほとんど認められなかった。p16/ARF 遺伝子領域についてのサザンブロット解析では、正常組織 DNA と比べ、malignant thymoma ではバンド濃度が薄く、malignant thymoma でのこの遺伝子領域の欠損の可能性が示唆された。

質疑応答では、副査 畠山昌則教授から、①蛋白レベルでの発現解析の検討の有無について、②primary thymoma で、細胞周期を抑制する p16, ARF のような遺伝子が高発現しているにもかかわらず腫瘍化していることの原因について、③cyclin D1 の mRNA 発現の検討の有無について等の質問があった。それらの質問に対し申請者は、①p16 については免

疫染色で primary thymoma での高発現を確認した。②機序の詳細は不明ながら、cyclin D2 等の高発現による細胞周期の回転を停止させるために p16, ARF の高発現が誘導されていると考察している。③cyclin D1 の発現は検討しているものの、サンプル間でのばらつきが大きく、詳細な検討は行なっていないと回答した。次に副査 長嶋和郎教授から、①腎被膜下に移植することによる悪性化の理由について、②腎被膜下移植後胸腺の悪性化の時期について、③malignant thymoma で pX 遺伝子の発現が低下している理由についての質問があった。それらの質問に対し申請者は、①腎被膜下以外の腹腔内に移植した場合には、腫瘍の生着率が低く、悪性化は腎被膜下のみでみられる現象の可能性がある。その理由として腎実質からの血管新生や増殖因子の分泌の関与などが推測される。②移植後 3 ヶ月に腎被膜下に生着した腫瘍の検討では、組織像および遺伝子発現のパターンは primary thymoma に類似しており、少なくともこの時点では悪性化していないと考えられる。③aggressive な ATL では、pX が発現できない状態になっていることが多いという報告を引用し、この腫瘍の場合も、p16 と ARF の発現がなくなった状態では、増殖のための pX の発現は必ずしも必要ではないと考えられ、むしろ pX を発現していない clone が優位に増殖している可能性があるという回答した。最後に主査 吉木 敬教授から、培養細胞株への野生型 p16、ARF 遺伝子導入実験の可能性についての質問があった。それに対し申請者は、樹立した培養細胞株をもちいて、実際にそのような実験を計画中であり、p16、ARF、p53 等の遺伝子を組みあわせて導入することを検討中であることを回答した。以上、質疑に対する応答は概ね妥当であった。

この論文は、良性の胸腺腫瘍を腎被膜下という異所に移植することにより、起源は同一ながらも性質の全く異なる高悪性度腫瘍を誘導しており、その手法と結果にオリジナリティがある点で高く評価できる。今後この in vivo モデルを使った解析をすすめることにより、HTLV-I 関連腫瘍の悪性化および良性腫瘍の悪性化のメカニズム等が明らかになることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位などもあわせ、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。