

HTLV-I pX トランスジェニックラット乳癌由来培養

乳癌細胞のアポトーシス誘導に関する研究

学位論文内容の要旨

I. 緒言

ヒト T 細胞白血病ウイルス (以下 HTLV-I) は、LTR (long terminal repeat) をプロモーターとして 4 種類の構造遺伝子すなわち gag、pol、env 及び pX 遺伝子を持つ成人 T 細胞白血病 (adult T cell leukemia, ATL) の原因レトロウイルスである。そのうち pX 遺伝子がコードする蛋白である p40tax は HTLV-I LTR の活性化のみならず、腫瘍化における関与が示唆されている。pX 遺伝子の機能を検索する目的で H2-pX トランスジェニックラット (以下 H2-pX ラット) の作製を行った結果、この H2-pX ラット雌に高率に未分化な乳癌 (pX 乳癌) が発生した。またこの乳癌においては炎症性サイトカインを含むいくつかの宿主細胞性遺伝子が活性化していた。一方、乳癌の発癌や増殖にはホルモンが関与し、ホルモン感受性を有することが特徴の一つである。またアポトーシスは癌や自己免疫疾患など多くの疾病の発症に深く関わっている。今回、ヌードマウスに可移植性で原発腫瘍と同様の生物学的特徴を有するホルモンレセプター陽性のクローン化 pX 乳癌細胞株を樹立し、ホルモンが増殖におよぼす影響および血清除去後のアポトーシス誘導の成否につき検討を行った。

II. 材料と方法

- 1) クローン化 pX 乳癌細胞株の樹立: H2-pX ラット (F344 系) に発生した乳癌から培養 pX 乳癌細胞を樹立し、限界希釈法にてクローニングを行った。
- 2) RNA 解析: 各細胞あるいは組織から抽出した total RNA に対し、それぞれの遺伝子に対する DNA probe を用いて Northern blot 解析を行った。
- 3) ヌードマウスへの移植: クローン化 pX 乳癌細胞をヌードマウス背部皮下に移植した。移植腫瘍の組織学的検討、血球数の計算と血液像の検討を行った。
- 4) 増殖曲線: pX 乳癌細胞を 10% FCS を含む培地と含まない培地で 24 時間培養後、25ng/ml のプロラクチンを加え、経時的に培養 7 日目まで生細胞数を算出した。コントロールとして c-SST-2 細胞 (ラット自然発症乳癌細胞株) を用いた。
- 5) DNA 断片化の解析: 2×10^6 の pX 乳癌細胞を無血清培地で培養、経時的に DNA を抽出し、2% agarose gel にて電気泳動し DNA ladder の有無について検討した。
- 6) フローサイトメトリー: 無血清培地で培養した pX 乳癌細胞を propidium iodine で

染色し、FACSscanにて解析を行った。コントロールとして c-SST-2 細胞を用いた。

III. 結果

- 1) ノードマウスに移植可能なオリジナル pX 乳癌と同様の性格を有するクローン化培養 pX 乳癌細胞株を樹立することができた。
- 2) pX 乳癌細胞を移植したノードマウスには著明な脾腫と全身性の顆粒球増多症を認めた。
- 3) pX 乳癌細胞株はプロラクチンレセプターを発現しており、プロラクチン添加によって増殖は促進された。
- 4) 無血清培地で pX 乳癌細胞を培養すると急激な細胞増殖抑制、細胞死を認めた。この現象はプロラクチンの添加によって全く影響を受けなかった。c-SST-2 は無血清培地でも 6 日目まではゆるやかな増殖を示した。
- 5) pX 乳癌細胞は血清除去後 2 時間で DNA ladder を確認できるアポトーシスをおこしていた。フローサイトメトリーでは、pX 乳癌細胞は無血清下で c-SST-2 に比べてアポトーシスが多く、逆に S 期、G0/G1 期の割合は低い傾向にあった。
- 6) pX 乳癌細胞はアポトーシス誘導時においても pX 遺伝子は高発現性を持続していた。

IV. 考察

ラット乳癌ではプロラクチンやそのレセプターの存在が腫瘍の発生や増殖に重要であることが示されている。今回の研究でもプロラクチンレセプターを有する pX 乳癌細胞ではプロラクチンは slow response ではあるものの細胞増殖因子として働いていた。このことは H2-pX ラットにおける pX 乳癌の発生が雌に圧倒的に多く見られる事実を裏付けるもので、HTLV-I の pX 遺伝子に誘導される腫瘍原性は宿主の遺伝的背景に関連している可能性が示唆される。本研究でも c-SST-2 で示されたように、一般に血清除去などの低栄養状態にさらされた細胞が、ただちに細胞死するものではない。しかし、pX 乳癌細胞は血清を除去するとただちにアポトーシスによる細胞死をおこし、G0/G1 期ならびに S 期の細胞減少とその後のほぼ完全な細胞増殖抑制が見られた。また、この細胞増殖抑制は pX 乳癌の増殖因子として働くプロラクチンの投与に全く反応せず、アポトーシスを含む強力な細胞増殖抑制機構が働いていると考えられる。更にアポトーシスをおこしている細胞でも、血清添加培地で増殖を続ける pX 乳癌細胞と同様に pX 遺伝子の恒常的な発現を認めた。この pX 遺伝子に関連するアポトーシスについては pX 遺伝子の直接作用というより、p40tax 依存性の状態における間接的作用と考えられているものの、アポトーシス関連遺伝子や細胞周期関連遺伝子を介して pX 乳癌細胞の増殖抑制やアポトーシスの誘導がおこっているものと考えられる。今後はこの pX 乳癌細胞を用いて、p40tax 発現が無血清培養下で実際にどのような分子機構を介して細胞周期の抑制やアポトーシスを誘導しているかを解明していく必要がある。

V. 結語

今回、pX 乳癌細胞の培地から血清を除去すると速やかにアポトーシスが誘導されることが示され、HTLV-I pX 遺伝子の発現は細胞増殖に働くのみならず、ある一定の条件下では pX 遺伝子により腫瘍化した細胞が逆にアポトーシスに傾くことを明らかにした。

pX 乳癌細胞を用いた pX 遺伝子関連のアポトーシス誘導分子機構の解明は今後、HTLV-I 感染細胞の制御さらには HTLV-I 感染者の治療法の開発につながるものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 小 野 江 和 則

学 位 論 文 題 名

HTLV-I pX トランスジェニックラット乳癌由来培養 乳癌細胞のアポトーシス誘導に関する研究

ヒト T 細胞白血病ウイルス (以下 HTLV-I) は、LTR (long terminal repeat) をプロモーターとして 4 種類の構造遺伝子すなわち gag、pol、env 及び pX 遺伝子を持つ成人 T 細胞白血病 (adult T cell leukemia, ATL) の原因レトロウイルスである。そのうち pX 遺伝子がコードする蛋白である p40tax は HTLV-I LTR の活性化のみならず、腫瘍化における関与が示唆されている。pX 遺伝子の機能を検索する目的で pX トランスジェニックラット (以下 pX ラット) の作製を行い、この pX ラット雌に高率に未分化な乳癌 (pX 乳癌) が発生した。今回、この pX 乳癌から原発腫瘍と同様の生物学的特徴を有するクローン化 pX 乳癌細胞株を樹立し、ホルモンが増殖におよぼす影響および血清除去後のアポトーシス誘導の成否につき検討を行うことを目的とした。

pX ラット (F344 系) に発生した乳癌から培養 pX 乳癌細胞を樹立し、限界希釈法にてクローニングを行った。RNA 解析は、各細胞あるいは組織から抽出した total RNA に対し、それぞれの遺伝子に対する DNA probe を用いて Northern blot 解析を行った。クローン化 pX 乳癌細胞をヌードマウス背部皮下に移植し、移植腫瘍の組織学的検討、血球数の計算と血液像の検討を行った。pX 乳癌細胞を 10% FCS を含む培地と含まない培地で 24 時間培養後、25ng/ml のプロラクチンを加え、経時的に生細胞数を算出した。コントロールとして c-SST-2 細胞 (ラット自然発症乳癌細胞株) を用いた。DNA 断片化によるアポトーシス解析は、 2×10^6 の pX 乳癌細胞を無血清培地で培養、経時的に DNA を抽出し、2% agarose gel にて電気泳動し DNA ladder の有無について検討した。フローサイトメトリーは、無血清培地で培養した pX 乳癌細胞を propidium iodine で染色し、FACScan にて解析を行った。コントロールとして c-SST-2 細胞を用いた。

結果としてヌードマウスに移植可能なオリジナル pX 乳癌と同様の性格を有するクローン化培養 pX 乳癌細胞株を樹立することができた。pX 乳癌細胞を移植したヌードマウスには著明な脾腫と全身性の顆粒球増多症を認めた。この現象は pX 乳癌細胞

が発現している炎症性サイトカインである Gro, MIP-2 によってもたらされたと考えられた。pX 乳癌細胞株はプロラクチンレセプターを発現しており、プロラクチン添加によって増殖は促進された。一方、無血清培地で培養すると急激な細胞増殖抑制、細胞死を認め、この現象はプロラクチンの添加によって全く影響を受けなかった。一方、c-SST-2 は無血清培地でも 6 日目まではゆるやかな増殖を示した。pX 乳癌細胞は血清除去後 2 時間で DNA ladder を確認できるアポトーシスをおこしており、フローサイトメトリーでは、pX 乳癌細胞は血清除去後早期に c-SST-2 に比べてアポトーシスが多く、逆に S 期、G0/G1 期の割合は低い傾向にあった。pX 乳癌細胞はアポトーシス誘導時においても pX 遺伝子は高発現性を持続していた。

以上の結果からプロラクチンレセプターを有する pX 乳癌細胞ではプロラクチンは slow response ではあるものの細胞増殖因子として働いていた。このことは pX ラットにおける pX 乳癌の発生が雌に圧倒的に多く見られる事実を裏付けるもので、HTLV-I の pX 遺伝子に誘導される腫瘍原性は宿主の遺伝的背景に関連している可能性が示唆された。pX 乳癌細胞は血清を除去するとただちにアポトーシスによる細胞死をおこし、G0/G1 期ならびに S 期の細胞減少とその後のほぼ完全な細胞増殖抑制が見られ、この細胞増殖抑制は pX 乳癌の増殖因子として働くプロラクチンの投与に全く反応せず、アポトーシスを含む強力な細胞増殖抑制機構が働いていると考えられる。更にアポトーシスをおこしている細胞でも、pX 遺伝子の恒常的な発現を認め、pX 遺伝子に関連するアポトーシスについては pX 遺伝子の直接作用というより、アポトーシス関連遺伝子や細胞周期関連遺伝子を介して pX 乳癌細胞の増殖抑制やアポトーシスの誘導がおこっているものと考えられた。

口答発表において吉木教授より無血清培地で pX 乳癌細胞がアポトーシスに陥る経路、クローン 2 の上皮マーカーについて、そしてアポトーシスをおこす pX 乳癌細胞の pX の発現は生細胞と死細胞は分離して行ったのかについての質問があった。ついで小野江教授よりヌードマウスの脾腫は腫瘍性か反応性か、c-SST-2 をコントロールとした理由、そして実際の臨床への応用についての質問があった。また加藤教授よりクローン 2 でも同じようにアポトーシスが誘導されるか、pX 乳癌とヒト乳癌の関連についての質問があった。最後に分子病理、田中先生からヒト乳癌で顆粒球増多を呈する例についての質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

HTLV-I pX 遺伝子の発現は細胞増殖に働くのみならず、ある一定の条件下では pX 遺伝子により腫瘍化した細胞が逆にアポトーシスに傾くことを明らかにし、pX 遺伝子関連のアポトーシス誘導分子機構の解明につながる可能性を示唆した本研究の意義は大きく、審査員一同協議の結果、本論文は博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。