The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Moloney murine leukemia virus infection acclerates lymphomagenesis in Eμ−bcl−2 transgenic mice
Author(s)	神藤, 佳孝
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39838
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【20】

氏　　名	神藤佳孝（しんとうよしたか）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　12369　号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Moloney murine leukemia virus infection accelerates lymphomagenesis in Eμ－bcl－2 transgenic mice （bcl－2トランスジェニックマウスに生じる悪性リンパ腫の解析）
論文審査委員	（主査） 教　授　辻本　賀英 （副査） 教　授　長田　重一　　教　授　越智　隆弘

論文内容の要旨

［目的］

悪性リンパ腫は他の悪性腫瘍と同様に多段階の遺伝的変異の蓄積の結果生じる。Bリンパ球でbcl－2を過剰発現するトランスジェニックマウス（line 6）は，polyclonalなBリンパ球の蓄積を伴うlymphadenopathyを呈し，長期の潜伏期の後悪性リンパ腫を発症する。この潜伏期間を短縮し，かつ悪性リンパ腫発症に関わる遺伝子に分子Tag（目印）をつけるため，B又はTリンパ球でbcl－2を過剰発現するトランスジェニックマウス由来の新生児にMoloney白血病ウイルス（MMuLV）を感染させた。これらのマウスは約3カ月後，脾臓，胸腺，リンパ節の腫大を伴う悪性リンパ腫を発症した。この系を用いリンパ腫形成のプロセスを遺伝子レベルで解析することが本実験の目的である。

［方法と成績］

(1)MMuLV感染によるbcl－2トランスジェニックマウス（bcl－2TGM）におけるリンパ腫発症の促進：B細胞またはT細胞においてbcl－2を過剰発現するトランスジェニックマウス（B－bcl－2TGM，T－bcl－2TGM）及び，bcl－2 transgeneを持たないlittermateの新生児にMMuLVを生後12－24時間以内に腹腔内投与し，悪性リンパ腫発症までの期間を比較した。B，T－bcl－2TGMは19週までに全てのマウスがリンパ腫を発症しているが，littermateでは約50％が発症しているにすぎない。さらに50％のマウスが悪性リンパ腫を発症するまでの期間を比較すると，littermateでは約130日あるが，B，T－bcl－2TGMでは約100日になっており，発症までの期間が有意に短くなっていることが判明した。このことはB，T－bcl－2TGMにMMuLV感染後生じる悪性リンパ腫はウイルスゲノム挿入による細胞内の癌遺伝子の活性化と，bcl－2遺伝子の相乗作用の結果であることを示唆している。

(2)MMuLV感染したB，T－bcl－2TGMに発症したリンパ腫の病理学的解析：肉眼的には全身のリンパ節の腫脹が見られ，特に頚部，腋窩，鼠径，腸間膜リンパ節で著明であった。大きさにして正常の10倍以上の脾，胸腺腫及び，中等度の肝腫大が認められた。顕微鏡的観察では，各リンパ節，胸腺とも正常構造は存在せず全て腫瘍性リンパ球に置換されていた。組織型では，lymphoblastic lymphomaの組織像を示しており脊髄，肺，肝への浸潤も認められ，悪性度の高いリンパ腫としてのpotentialを示した。

(3)リンパ腫細胞の表面抗原の解析：発症したリンパ腫細胞のlineageを知るためその細胞表面抗原をFACSにて解析した。使用した抗体は，B220，IgM，Sca－1，Thy－1，CD3，CD4，CD8である。B－bcl－2TGM

では，8／17例はB cell lineageであり，その内3例はR220（+），IgM（−），Sca−1（+or−or low），Thy−1（low or−），CD3（−），CD4（+or−or low），CD8（−）であり，pre−Bリンパ腫と考えられた。また，残りの5例はB220（+），IgM（+）でmature Bリンパ腫であった。9／17例はT cell lineageであり，その内5例が，CD4（+），CD8（−）or CD4（−），CD8（+）のmature Tリンパ腫，4例がCD4（+），CD8（−）のimmature Tリンパ腫であった。T−bcl−2TGMでは，7／8例がT cell lineageであり，その内6例がimmature T cellリンパ腫，1例がmature Tリンパ腫であった。残りの1例はpre−B phenotypeを示した。まとめると，MMuLV感染したlittermateでは，B220（−），Thy1（+），CD4（+），CD8（−）とmature T cellのphenotypeを示すが，T−bcl−2TGMでは主にimmature T cell phenotype，B−bcl−2TGMでは主にimmature T cell，pre−B，B cell phenotypeを示すリンパ腫であった。したがって，B，T−bcl−2TGMの間でもTGM，non−TGMの間でも発症するリンパ腫は明らかに異なる細胞リニエジ及び異なる分化度の細胞より構成されていることを示し，この系におけるbcl−2の影響を示唆している。

(4)MMuLV感染したB，T−bcl−2TGMに発症したリンパ腫形成に関与する遺伝子の同定：ウイルスゲノムが染色体DNA内に挿入されると，その近傍の癌遺伝子の活性化が起こる。そこで，MMuLVの挿入により活性化されることが知られている遺伝子（c−myc，N−myc，pim−1，tic−1，bmi−1，p53，myb）のプローブを用いてproviral integrationを検索するとc−myc（26%，9／35），pim−1（6%，2／35），tic−1（23%，8／35）遺伝子の領域にウイルスゲノムの挿入が認められた。約46%のリンパ腫にはこれらの領域へのproviral integrationは認められず，未知の遺伝子の関与が示唆された。

［総括］

本実験の結果，MMuLVの感染がB，T−bcl−2TGMにおける悪性リンパ腫の発症を促進することが示された。bcl−2の活性化だけでは発癌には至らないので，本実験におけるリンパ腫の形成はbcl−2と他の癌遺伝子の共同作用の結果である。MMuLVのゲノムが細胞性癌遺伝子近傍に挿入されることによりその癌遺伝子が活性化され，bcl−2の作用と相まって早期に悪性リンパ腫が発症したものと考えられる。Flow cytometryによる表面抗原の解析から，MMuLV感染bcl−2TGMに発症した悪性リンパ腫は主にpre−B，mature B又はimmature T cellのphenotypeをもつことが示された。B，T−bcl−2TGMにMMuLVが感染し発症した悪性リンパ腫における既知の癌遺伝子の活性化としてはc−myc，pim−1，tic−1を認めた。一方，c−myc／bcl−2，pim−1／bcl−2の2種類のdouble transgenic mouseにおいてmonoclonalなmalignant pre−B lymphomaが発症することが示されており，リンパ腫発症にはさらに他の癌遺伝子の活性化が必要であると考えられる。本実験においてMMuLVの一部をプローブとしたサザンブロットでは5−10種類のproviral insertionが認められており，bcl−2に加え相当数の癌遺伝子の活性化が悪性リンパ腫の発症には必要であると思われる。さらに，約46%のケースではこれら既知の癌遺伝子の活性化が認められないことより，未知の癌遺伝子の存在が示唆される。他の癌と同様，ヒトのリンパ腫の発生及び高度悪性化は多段階の遺伝的変化，特に癌遺伝子の変化の蓄積の結果として起こる。ここで示した実験系はbcl−2遺伝子の活性化を伴うヒト濾胞性リンパ腫のモデルである。このリンパ腫は浸潤性リンパ腫などへの高度悪性化が比較的高頻度で起こり臨床においても大きな問題となっているが，その機構の詳細は全く不明である。この悪性度の高いリンパ腫の一部でc−myc癌遺伝子の活性化が報告されており，ここで示したモデル系の結果とよく一致している。我々が開発したbcl−2TGM／MMuLV実験系による癌遺伝子を単離，同定するシステムはヒト濾胞性リンパ腫の発生及び悪性化に関わる遺伝子群の単離解析のための有効なシステムであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

bcl−2遺伝子の活性化を伴うヒト濾胞性リンパ腫は浸潤性リンパ腫などへの高度悪性化が比較的高頻度で起こり臨床において大きな問題となっているが，その機構の詳細は全く不明である。しかしながら，現在これらの機構を系統的に解析する有効なシステムは存在せず研究の進行に支障をきたしていた。本研究において確立された，bcl−2トランスジェニックマウス／Moloney白血病ウイルス実験系は，低悪性度のリンパ腫を短期間で高度悪性化させ，

また高悪性度のリンパ腫形成時に必要とされる遺伝子群に分子 Tag をつけ，単離解析を可能にした点で，ヒト濾胞性リンパ腫の発生及び悪性化に関わる遺伝子群の単離解析のための有効なシステムであると考えられ，学位授与に値するものと考える。