HTLV-I *env-pX* トランスジェニックラットにみられる 破骨細胞およびB細胞系譜への影響

山崎 英俊¹⁾, 宮本 顕友¹⁾, 池田 仁²⁾,
石津 明洋²⁾, 國貞 隆弘¹⁾, 林 眞一¹⁾,
吉木 敬²⁾

1) 鳥取大学医学部生命科学科免疫

2) 北海道大学医学部第一病理学

Effect of osteoclastogenesis and B lymphopoiesis in the bone marrow of transgenic rats
with the *env-pX* gene of human T-cell lymphotropic virus type I

Hidetoshi Yamazaki¹⁾, Akitomo Miyamoto¹⁾,
Hitoshi Ikeda²⁾, Akihiro Ishizu²⁾,
Takahiro Kunisada¹⁾, Shin-Ichi Hayashi¹⁾,
Takashi Yoshiki²⁾,

1) Department of Immunology, School of Life Science,
Faculty of Medicine, Tottori University

2) Department of Pathology, Hokkaido University School
of Medicine

Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is associated with various clinical disorders including adult T cell leukemia, myelopathy, arthropathy. Hypercalcemia resulting from osteoclast activation and a variety of hematopoietic abnormalities have been also observed in HTLV-I infected patients, however, precise mechanism about initial trigger(s) prior to presenting symptoms is still unknown. In this study, to assess effects of HTLV-I on hematopoiesis, we analyzed characteristics of early hematopoietic precursors and cell surface molecules of lymphocyte in HTLV-I *env-pX* transgenic rats. Progenitor cells for osteoclasts were significantly increased even in the marrow of asymptomatic *env-pX* rats. Progenitors for B cells were also highly enriched, while colony forming cells (CFC) elicited by GM-CSF(CFU-GM) and M-CSF(CFU-M) were comparable to normal littermates. Following arthritis in *env-pX* transgenic rats, osteoclastogenesis was further augmented and the CFCs were increased. Bone marrow cells carrying adjuvant-induced arthritis retained a constant number of progenitors for osteoclast and B lymphocytes, whereas the number of CFU-GM and CFU-M increased. In *env-pX* rats without arthritis the expression of CD80/86 and ICAM-I were upregulated on the surface of peripheral lymphocytes, compared with those of normal rats and rats with adjuvant-induced arthritis. These results indicate that the *env-pX* transgene affect early stages of osteoclast and B-cell lineages and lymphocytes prior to developing diseases, in contrast, an increase of the CFCs was caused indirectly by arthritis. This study provides a novel standpoint for the

mechanisms of pathogenesis by HTLV-I.

Key words | HTLV-I, *env-pX* transgenic rat, hematopoiesis, osteoclastogenesis, B lymphopoiesis

はじめに

成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-I) は, ATL のほか瘻性脊髄麻痺 (HAM/TSP), 慢性関節症 (HAAP) などの病因とも深く関わっていることが知られている¹⁻³⁾. 以前より HTLV-I の *pX* 領域の遺伝子産物 Tax がウイルス自身のみならず, 宿主の様々な遺伝子を活性化することが知られ, Tax がこれらの疾患の発症と深く関与していると考えられてきた⁴⁾. したがって生体内における疾患発症と *pX* 遺伝子の関係を明らかにする目的で HTLV-I の遺伝子導入動物が作製されてきた. 我々の樹立した *env-pX* トランスジェニックラットは, HTLV-I 感染患者に見られる様々な疾患 (関節炎, シェーグレン症候群類似の慢性唾液腺炎像など) を発症することから HTLV-I 関連疾患の発症機序解明のためのモデル動物であると考えられる⁵⁾.

HTLV-I により多様な疾患が発症するが, HTLV-I 遺伝子による直接的影響と疾患に付随する二次的な影響を区別できない. 以前より HTLV-I 感染患者は ATL をはじめ様々な血液細胞系譜への影響が報告されており, ATL 患者の多くに破骨細胞の活性化を伴う高カルシウム血症や顆粒球症あるいは単核球増多が認められている⁶⁾. そこで我々は *env-pX* ラットの血液細胞系譜への HTLV-I の直接的影響と疾患による二次的な影響を判別するために以下の実験を行なった.

研究結果および考察

1. *env-pX* トランスジェニックラットの樹立

env-pX 遺伝子と疾患発症との関係を明らかにする目的で HTLV-I の遺伝子導入動物 *env-pX* トランスジェニックラット (以下 *env-pX* ラット) を作製した⁵⁾. 同ラットは末梢血を含む検索したすべての組織で導入遺伝子の発現が確認され, 約 5 週令より高率に発赤腫脹を伴う関節炎をはじめとする様々な膠原病様病変を発症した. 同ラットは HTLV-I 患者にみられる様々な疾患を発症するこ

とより HTLV-I 関連疾患発症のメカニズムを解明するための有用なモデルである.

2. 好中球数の増加と高ガンマグロブリン血症

HTLV-I 感染により ATL をはじめとする様々な血液細胞への影響が報告されており, *env-pX* ラットでも血液細胞の異常の有無を検討した. *env-pX* ラットでは ATL でみられるような異型リンパ球の存在やリンパ球数の増加は示さないものの, 好中球数の増加と高ガンマグロブリン血症を呈した. 同ラットは高率にリウマチ様関節炎を発症することより, 高ガンマグロブリン血症が自己抗体の産生によるものかどうかを検討した結果, 関節炎を有する *env-pX* ラットには高率にリウマチ因子をはじめとする自己抗体の産生が認められた. (図 1)

3. *env-pX* ラットのリンパ球に見られる CD80/86 や ICAM-I の発現増強

env-pX ラットのリンパ球には腫瘍性変化や数の異常を認めなかったが, *pX* 領域の tax により細胞表面分子を始めとする様々な遺伝子の活性化の報告がされていることから, *env-pX* ラットと正常ラット間で末梢単核球の表面分子の解析をおこなった.

正常ラットに比べ *env-pX* ラットの末梢血中の CD3 陽性細胞では関節炎発症後のみならず, 発症前に既に CD80/86 や ICAM-I の発現増強が認められた. また末梢血中の CD3 陰性細胞でも発症前に軽度ではあるが CD80/86 の発現増強を, さらに発症後においては CD80/86 と MHC class II の発現増強を認め, これらは HTLV-I に非関連アジュバント誘発関節炎を発症したラットでは認められなかった (Data not shown). したがって, 導入した, *env-pX* 遺伝子によりリンパ球の細胞表面分子の発現が活性化されることが明らかとなった. 以上より, *env-pX* ラットの T 細胞および B 細胞が疾患発症以前から活性化していることがわかった. 疾患発症の機序として, 遺伝子導入された標的側の細胞の変化が原因であるばかりでなく, 免疫担当細胞側の直接的变化により疾患が引き起こされる可能性も考えられる.

図1 *env-pX* ラットの血液生化学的解析

(a) 末梢血の血算値 Tgは*env-pX* ラットを、nTgは対照ラット意味する (b) 血清中のアルブミン、グロブリン測定値 (c) 自己抗体の測定: リウマチ因子, 抗2本鎖DNA抗体, 抗カルジオリピン抗体価を測定した, リウマチ因子の測定は凝集反応にて, 抗2本鎖DNA抗体, 抗カルジオリピン抗体の測定はELISA法にておこなった, ●は関節炎を発症した*env-pX* ラット, ○は未発症の*env-pX* ラットを意味する。

4. 未発症 *env-pX* ラットに見られる破骨細胞

および破骨細胞前駆細胞の増加

ATL 患者の多くに破骨細胞の活性化を伴う高カルシウム血症が認められることから、*env-pX* 遺伝子の破骨細胞系譜への影響を検討した。まずラットの骨髓細胞から誘導される破骨細胞の数を検討したところ、関節炎発症前の *env-pX* ラットで発症後の *env-pX* ラットに見られる結果と同様に破骨細胞数の増加を認めた。そこで、破骨細胞の増加が前駆細胞の増加によるものかどうかを検討したところ、関節炎発症前においても破骨細胞の前駆細胞が増加していることが明らかになった。(図2) したがって、*env-pX* 遺伝子が破骨細胞系譜に直接影響を与えている可能性が考えられる。現在、高カルシ

ウム血症の患者における破骨細胞の活性化の原因の一つとして、パラサイロイドホルモン関連蛋白(PTHrP)の産生過多がいわれている。同ホルモンは破骨細胞系譜においては、比較の後期に増殖というよりはむしろ分化に働くと考えられるので、*env-pX* ラットで見られた前駆細胞の増加という現象を説明するには不十分であると考える。

5. 疾患発症に伴う顆粒球、マクロファージの増加

以前より HTLV-I 感染者で顆粒球および単球マクロファージの増加が報告されている。そこで顆粒球および単球マクロファージの前駆細胞(CFU-GM および CFU-M)の増殖を調べるために、骨髓細胞からメチルセルロースにて誘導されるコロニー形成細胞数を検討した。その結果、関節炎発症に伴い CFU-M および CFU-GM の顕著な増加を認めた(図3)。関節炎発症前には変化がないことから *env-pX* 遺伝子による直接の影響というよりは疾患発症による二次的な影響と考えられる。

6. 未発症 *env-pX* ラットに見られる B 前駆細胞の増加

B 細胞系譜への HTLV-I 遺伝子による直接的な影響は報告されていないが、*env-pX* ラットで自己抗体の産生が亢進していること、B 細胞の表面分子の発現亢進が認められることから、B 細胞系譜につ

図2(a) 骨髓細胞から破骨細胞の誘導

ラット大腿骨より骨髓細胞を採取しマウス血液支持細胞株 ST-2 上で $1\alpha 25(\text{OH})_2\text{VitaminD}_3$ および Dexamethasone を添加培養し、TRAP (酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ) 染色により、誘導される破骨細胞の数。横軸に誘導された TRAP 染色陽性の多核細胞(MNC)あるいは TRAP 陽性の単核細胞の数を示す。+/+ は対照ラット、Tg- は関節炎発症前の *env-pX* ラット、Tg+ は関節炎発症後の *env-pX* ラットを意味する。* は対照群との有意差 ($p < 0.05$) の認められたもの。

(b) 破骨細胞の前駆細胞の出現頻度

10⁶ 当たりの骨髓細胞より誘導された破骨細胞の前駆細胞数を表す。

図3 顆粒球、マクロファージの前駆細胞(CFU-GM, CFU-M)の解析

ラット骨髓細胞をメチルセルロース上で M-CSF あるいは GM-CSF 添加培養し、誘導されるコロニー形成細胞数を測定した。+/+ は対照ラット、Tg- は関節炎発症前の *env-pX* ラット、Tg+ は関節炎発症後の *env-pX* ラットを意味する。* * は対照群との有意差 ($p < 0.01$) の認められたもの。

いて検討した。その結果、関節炎発症前の *env-pX* ラットの骨髓細胞から誘導されるB前駆細胞数が増加していた(図4)。*env-pX* 遺伝子により破骨細胞系譜、B細胞系譜という二つの異なる血液細胞系譜への影響が認められたことから、血液細胞系譜の比較的初期に *env-pX* 遺伝子が影響を与えている可能性が考えられる。

7. 関節炎発症が CFU-M および CFU-GM の増加に影響する

上記の現象が関節炎などの疾患による二次的な影響か否かを確かめるために、HTLV-I に非関連アジュバント誘発関節炎を発症したラットについて同様の方法で発症前後の血液細胞への影響を検討した。その結果、アジュバント関節炎を発症したラットでは、CFU-M および CFU-GM の増加は認められたが、破骨細胞前駆細胞、B前駆細胞の増加は認めな

かった。(図5)したがって、*env-pX* ラットにみられた血液細胞系譜への影響を、*env-pX* 遺伝子導入による直接的影響と関節炎による二次的な変化の

図4 B前駆細胞の頻度解析: 10^6 当たりの骨髓細胞より誘導されたB前駆細胞数を表す。+/+は対照ラット, Tg-は関節炎発症前の *env-pX* ラット, Tg+は関節炎発症後の *env-pX* ラットを意味する。

図5 関節炎の血液細胞への影響

- 骨髓細胞から破骨細胞の誘導: 横軸に誘導された TRAP 染色陽性の多核細胞 (MNC) あるいは TRAP 陽性の単核細胞の数を示す。+1 および +2 は HTLV-I 非関連アジュバント誘発関節炎ラットを、+/+ は対照ラットを意味する。アジュバント誘発関節炎ラットは、Lewis ラットの後肢皮下にフロイント完全アジュバントを投与することにより誘導した。
- 破骨細胞の前駆細胞の出現頻度: 10^6 当たりの骨髓細胞より誘導された破骨細胞の前駆細胞数を表す。
- 顆粒球、マクロファージの前駆細胞 (CFU-GM, CFU-M) の解析: ラット骨髓細胞をメチルセルロース上で M-CSF あるいは GM-CSF 添加培養し、誘導されるコロニー形成細胞数を示す。
- B 前駆細胞の頻度解析: 10^6 当たりの骨髓細胞より誘導された B 前駆細胞数を表す。

図6 血液細胞における *env-pX* 遺伝子と関節炎の影響
env-pX 遺伝子による直接の影響を実線で、関節炎による二次的影響を破線で示した。

2群に分けることができた。つまり、CFU-M および CFU-GM の増加は関節炎による二次的な変化であり、一方、破骨細胞前駆細胞、B 前駆細胞の増加は疾患の発症に先行して生じる *env-pX* 遺伝子導入による直接の影響ではないかと考えられる (図6)。

おわりに

以上から、*env-pX* ラットの血液細胞系譜にみられた現象を、二つに分類することができる。破骨細胞およびB細胞に対する影響は *env-pX* 遺伝子による直接的な影響、顆粒球やマクロファージに対する影響は疾患発症による二次的なものと考えられた⁷⁾。また、発症以前より免疫担当細胞であるT細胞やB細胞が活性化されていることから、遺伝子導入による標的臓器の変化が発症に関与するばかりでなく、導入遺伝子による免疫細胞側の変化が、疾患

の発症の直接の引き金になりうると考えられる⁸⁾。

env-pX ラットは HTLV-I 関連疾患の発症機序解明のための有用なモデル動物である。しかしながら、実際に *env-pX* ラットで観察された事象がヒトの疾患発症に対応するのかという問題が残されている。現在、我々はヒト破骨細胞の培養系を確立し ATL 発症患者のみならず HTLV-I 感染患者における破骨細胞の変化について検討中である。

謝辞：稿を終えるに当たり、このような発表の機会をお与えくださった、本学会長であります熊本大学医学部 高橋 潔先生、同大学医学部 竹屋元裕先生に深謝いたします。あわせて本研究にご協力いただいた北海道大学医学部 小池隆夫先生、中丸裕爾博士、菅谷寿晃博士に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazder AF, Bunn PA, Minna JD, and Gallo RC : Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA 77 : 7415-7419 1980
- 2) Hollsberg P and Hafler DA : Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type I infection. N Engl J Med 328 : 1173-1182 1993
- 3) Ishiguro N, Abe M, Seto K, Sakurai H, Ikeda H, Wakisaka A, Togashi T, Tateno M and Yoshiki T : A rat model of human T lymphocyte virus I (HTLV-I) infection. 1. Humoral antibody response, provirus integration, and HTLV-I associated myelopathy/Tropical spastic paraparesis-like myelopathy in seronegative HTLV-I carrier rats. J Exp Med 176 : 981-989 1992
- 4) Yamada S, Ikeda H, Yamazaki H, Shikishima H, Kikuchi K, Wakisaka A, Kasai N, Shimotohno K and Yoshiki T : Cytokine-producing mammary carcinomas in transgenic rats carrying

- the pX gene of human T-lymphotropic virus type I. *Cancer Res* 55 : 2524-2527 1995
- 5) Yamazaki H, Ikeda H, Ishizu A, Nakamaru Y, Sugaya T, Kikuchi K, Yamada S, Wakisaka A, Kasai N, Koike T, Hatanaka M and Yoshiki T : A wide spectrum of autoimmune diseases in transgenic rats carrying the env-pX gene of human T lymphocyte virus type I. *Int Immunol* 9 : 339-346 1997
 - 6) Kiyokawa T, Yamaguchi K, Takeya M, Takahashi K, Watanabe T, Matsumoto T, Lee SU. and Takatsuki K : Hypercalcemia and osteoclast proliferation in adult T-cell leukemia. *Cancer* 59 : 1187-1191 1986
 - 7) Yamazaki H, Kunisada T, Ishizu A, Ikeda H, Miyoshi I, Sudo T, Hayashi S-I. and Yoshiki T : Promotion of early osteoclastogenesis and B lymphopoiesis in the bone marrow of transgenic rats with the env-pX gene of human T-cell lymphotropic virus type I. *Oncogene*, in press
 - 8) 中丸裕爾：種々の膠原病を発症する HTLV-I *env-pX* 遺伝子導入ラットの免疫学的解析. *北海道医誌* 72 : 529-544 1997