

平成21年4月22日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006年度～2009年度

課題番号：18380179

研究課題名（和文）グリオーマ誘発レトロウイルスの神経病原性発現機構の解明

研究課題名（英文）Pathological and molecular biological analysis of nervous lesions caused by glioma-inducing retroviruses

研究代表者

落合 謙爾 (KENJI OCHIAI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：80214162

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学，応用獣医学

キーワード：ウイルス性腫瘍，神経系腫瘍，トリ白血病ウイルス，発癌，レトロウイルス

1. 研究計画の概要

いわゆるトリのグリオーマ so-called fowl glioma は申請者の知る限り自然界で発生する動物の脳腫瘍の中でウイルスとの因果関係が実験的に証明された初めてのグリオーマである。本疾患の原因ウイルス Fowl glioma-inducing virus (FGV) は組み換えによって神経病原性を獲得したトリ白血病 ALV であることが明らかとなり，その腫瘍原性には神経系細胞で産生される未知の蛋白（転写因子），プロモーターとして働く LTR，そして宿主細胞側の癌遺伝子 *c-myc* あるいは *K-ras* が関与して癌化に結びつくことが浮き彫りとなった。本研究課題は研究費交付期間に（1）FGV の LTR を活性化させる神経系細胞特異的転写因子の同定，（2）トランスジェニック（Tg）ニワトリを用いた LTR の機能解析，（3）採卵鶏由来グリオーマ原因 ALV の分離および感染実験による病原性の解析，（4）採卵鶏由来 ALV と申請者が過去に分離した日本鶏由来 FGV との分子系統学的比較，（5）グリオーマ誘発 ALV の *env* 遺伝子と ALV-A 由来トリレトロウイルスベクター（RCAS(A)株）の *env* を入れ換えたキメラウイルスの腫瘍原性の変化，以上5課題を行うことで，レトロウイルスの神経病原性発現機構を解明することを目的とする。

2. 研究の進捗状況

課題(1) ①免疫組織学的検索の結果，*K-ras* 遺伝子が星状膠細胞の腫瘍化に関与することが示唆された。②FISH 法により FGV 感染鶏線維芽細胞ではプロウイルス DNA は 2, または 5 番染色体に挿入される

傾向が認められた。③ゲルシフトアッセイにより末梢神経組織に多量に転写因子が存在することがわかった。現在，転写因子の分離を試みている。

課題(2) LTR 導入 Tg ニワトリで LTR の機能を解析するため，LTR と GFP 遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターを作製した。現在鶏胚に導入できるだけの十分なウイルスタイトルが得られるよう検討している。

課題(3) ①皮下腫瘍とグリオーマを併発した鶏から新たに分離された ALV (TymS_90 株) の中枢神経系に対する病原性を明らかにするため，感染実験を行った。その結果，TymS_90 は FGV 同様，グリオーマおよび小脳低形成を誘発する一方で，脳室周囲の小円形細胞の結節性増殖とクモ膜の増殖といった FGV とは異なる病原性を持つことが明らかとなった。②日本鶏 1 羽に FGV との関連が推察されている神経周膜腫が発生した。野外例に本疾患が確認されたのは世界で初めてのことである。

課題(4) ①TymS_90 のウイルスゲノム全長を明らかにし，FGV のそれと比較した。両者は異なるクラスターに属し，*env* 遺伝子領域に共通の塩基配列は見出されなかった。②日本鶏の神経線維腫から内因性レトロウイルス *ev-1* に由来する変異ウイルスが分離された。③ALV の疫学調査を容易にする材料採取条件を確立した。④現在，これまでに分離された FGV 近縁株 4 株と神経線維腫由来 ALV の病原性を感染実験によって解析している。

課題(5) FGV-*env* 領域を RCAS(A)株の対応する領域と入れ換えたキメラウイルスを作製した。現在，このキメラウイルスの病原性を解析するために感染実験を行っている。

3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。本研究課題は5つからなる。これらのうち、課題(1)では本疾患の発症に関与する転写因子や癌遺伝子が浮き彫りにされつつある。課題(2)では導入遺伝子のコンストラクトの作製に時間を要したが、目的のコンストラクトはすでに完成した。これにより Tg ニワトリが得られる見通しが着いた。課題(3), (4) はすでに計画以上の成績が得られている。課題(5)ではすでにキメラウイルスの感染実験を開始しており今年度前期には終了する予定である。以上のように、本研究課題のおよそ8割はすでに達成できたと考えられるため、当初の計画以上に進展していると判断した。

4. 今後の研究の推進方策

課題(2)の最終目的は Tg ニワトリの解析であるが、G0 トランスジェニックキメラ鳥類でも目的は達成されることから、今年度は G0 世代を解析する予定である。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計4件)

- ① Ochi, A., Ochiai, K. *et al.*, 他2名, Naturally occurring multiple perineuriomas in chickens (*Gallus domesticus*), *Vet. Pathol.* 45(5): 685-689, 2008
- ② Hatai, H., Ochiai, K. *et al.*, 他8名, A recombinant avian leukosis virus associated with fowl glioma in layer chickens in Japan, *Avian Pathol.* 37(2): 127-137, 2008
- ③ Hatai, H., Ochiai, K. *et al.*, 他6名, Prevalence of fowl glioma-inducing virus in chickens of zoological gardens in Japan and nucleotide variation in the env gene. *J. Vet. Med. Sci.* 70(5):469-474, 2008
- ④ Hatai, H., Ochiai, K. *et al.*, 他1名, Detection of avian leucosis virus genome by a nested polymerase chain reaction using DNA and RNA from dried feather shafts, *J. Vet. Diagn. Invest.* 21: in press, 2009

[学会発表] (計5件)

- ① 畑井仁ら, 採卵鶏に発生したいわゆるトリの神経膠腫の病理学的所見と疫学的考察, 第143回日本獣医学会学術集会, 2007年4月4日, つくば国際会議場
- ② 越智章仁ら, 野外で発生した鶏の多発性神経周膜腫の病理学的検索, 第143回

日本獣医学会学術集会, 2007年4月4日, つくば国際会議場

③ Hatai, H. *et al.*, Prevalence of fowl glioma in Japan and the causal avian leukosis viruses, Combined 58th and 42nd annual meeting of the American college of Veterinary Pathologists and the American Society for Veterinary Clinical Pathology, November 11-13, 2007, Savannah International Trade and Convention Center Savannah, Georgia

④ 越智章仁ら, 神経系に腫瘍原性を持つトリレトロウイルスの疫学的検索, 第145回日本獣医学会学術集会, 2008年3月29日, 麻布大学

⑤ 唯野剛史ら, 採卵鶏の神経膠腫から分離されたトリ白血病ウイルスの病原性, 第146回日本獣医学会学術集会, 2008年9月24日, ワールドコンベンションセンターサミット(シーガイア), 宮崎

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/comp-pathol/daimoku-gli1.html>