

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科獣医学専攻
平成9年度博士課程 入学

氏名 水野 拓也
指導教官 辻本 元

論文題名 **Studies on Apoptosis and its Association with Feline Immunodeficiency Virus Infection in Cats**
(猫におけるアポトーシス機構と FIV 感染症の病態に関する研究)

アポトーシスは、ネクローシスとは異なる細胞死として発見され、さまざまな遺伝子の発現によって制御される細胞死として注目されている。さらに近年、Fas/Fas リガンドおよび、Tumor necrosis factor (TNF) /TNF receptor (TNFR) を介するアポトーシスについては、その異常が免疫不全、自己免疫疾患および腫瘍などの各種疾患の病理発生と密接に関連している可能性が示唆されている。しかしながら、猫の疾患においてはアポトーシスとの関連性についての研究は始まったばかりであり、その研究基盤も整っていない。

猫における疾患のうち、ネコ免疫不全ウイルス (FIV) 感染症は、致死的な疾患を引き起こすことから、獣医临床上重要な疾患の一つであると同時に、ヒトの AIDS の動物モデルとしても注目されている。FIV 感染症においては免疫不全の発生がその病態の中心であり、リンパ球の減少によって免疫不全が引き起こされる。そのリンパ球減少の機構に関しては、FIV 感染が直接および間接的にリンパ球にアポトーシスを誘導することが示されているが、その分子機構についてはよく解っていない。

本論文は、猫におけるアポトーシス研究の基盤を築き、さらに FIV 感染症におけるアポトーシス機構を解明することを目的として行った一連の研究から構成されている。第 I 章から第 IV 章においては、Fas/Fas リガンド系に焦点を当て、その遺伝子の構造および機能

解析を行った上で、FIV 感染によって誘導されるアポトーシスにおいて Fas/Fas リガンドの役割を検討した。第 V 章および第 VI 章においては、TNF/TNFR 系に着目し、TNFR の構造および機能解析を行うとともに、FIV 感染によって誘導されるアポトーシスにおいて TNFR のシグナル伝達について検討した。

第 I 章 猫の Fas および Fas リガンドの cDNA クローニング：Fas は TNF レセプタースーパーファミリーに属する I 型膜貫通型タンパクであり、そのリガンドである Fas リガンドと結合することによりアポトーシスを誘導する。Fas は、さまざまなヒトの疾患におけるアポトーシスの異常と密接に関連していることがこれまで報告されている。本章においては、猫の Fas および Fas リガンドの全翻訳領域を含む cDNA クローンを単離し、それらの全塩基配列を決定した。これらの cDNA がコードするアミノ酸配列の比較では、猫の Fas および Fas リガンドは他種のものと同じ高い相同性を有しており、その機能に重要なドメインがよく保存されていることが明らかとなった。これら cDNA クローンを用いることにより、猫におけるアポトーシスに関して、Fas および Fas リガンドの発現を解析することが可能となった。

第 II 章 猫の Fas 遺伝子のゲノミッククローニングおよびその選択的スプライシング：正常猫脾臓由来 DNA から PCR によって猫の Fas 遺伝子のゲノミッククローニングを行い、そのエクソン・イントロン構造を明らかにした。次に、5 種類の猫のリンパ腫細胞株 RNA を鋳型に用い、Fas mRNA を増幅する RT-PCR を行ったところ、全ての細胞株において通常の Fas mRNA に由来するバンドの他に 4~5 本の短いバンドが認められ、その塩基配列の解析によりこれらが選択的スプライシング由来産物であることが明らかとなった。正常猫由来 Concanavalin A (ConA) 刺激末梢血単核球 (PBMC) においても同様の選択的スプライシング産物が認められた。次に、猫のリンパ腫症例から採取した腫瘍組織を用い、RT-PCR 解析を行ったところ、リンパ腫由来細胞株で認められたものと同様の Fas mRNA の選択的スプライシング産物が検出され、とくに通常の Fas mRNA が検出されず、特定の選択的スプライシング産物のみしか認められない症例も存在した。これらの選択的スプライシング産物では、いずれも膜貫通領域の欠損またはフレームシフトによる早期終止コドンによる膜貫通領域の欠失が認められたため、膜貫通領域を欠いた可溶性 Fas タンパクが生成されていることが予想され、それらがリンパ腫の病態に関与している可能性が示唆された。

第 III 章 FIV 感染によって誘導されるリンパ系細胞のアポトーシスにおける Fas および Fas リガンドの発現：FIV の接種によってアポトーシスが誘導された猫の T リンパ芽球様

細胞株から RNA を抽出し、real-time PCR システムを用いた RT-PCR 法により Fas および Fas リガンドの mRNA 量を定量したところ、感染 6 日後から Fas および Fas リガンドの顕著な発現増強が認められた。しかし、Con A で刺激した猫の PBMC に FIV を感染させてアポトーシスを誘導し、同様の方法によって Fas および Fas リガンド mRNA の発現を定量したところ、FIV 感染による発現の変化は認められなかった。次に、FIV 感染猫由来 PBMC が短時間の培養によりアポトーシスを起こす機構を解析するために、10 頭の FIV 自然感染猫から PBMC を採取し、Fas および Fas リガンド mRNA の発現を定量した。その結果、FIV 感染猫の PBMC においては、非感染猫の PBMC に比べ、Fas および Fas リガンド mRNA の発現が増強しており、とくに Fas リガンドの発現増強が顕著であった。以上の結果より、FIV 感染症において認められるリンパ球減少のメカニズムには Fas および Fas リガンドの発現増強によるアポトーシスが関与している可能性が示唆された。

第 IV 章 猫の Fas リガンド遺伝子のゲノミッククローニングおよびその転写調節領域の解析：第 III 章で FIV 感染において明らかな Fas リガンドの発現増強が認められたため、本章では、その発現増強機構を明らかにする目的で、猫の Fas リガンド遺伝子のゲノミッククローニングおよびその転写調節領域の解析を行った。第 I 章で得られた猫 Fas リガンド cDNA をプローブに用い、猫のゲノミックライブラリーをスクリーニングしたところ、4 つのエクソンおよび 5kb の 5'非翻訳領域を含む 17kb の Fas リガンド遺伝子クローンが得られた。その 5'非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子をリポーター遺伝子として利用したプラスミドに組み込み、10 種類の 5'末端欠損変異体を作成した。その欠損変異体をヒトおよび猫の T リンパ系細胞株にトランスフェクトし、それらの転写活性を測定したところ、開始コドンの上流の 172 番目の塩基から 459 番目の塩基の領域に転写調節領域が存在することが明らかとなり、その領域に TCF-1, NF-AT などの転写因子結合モチーフが同定された。

第 V 章 猫の TNFR I の cDNA クローニングおよび TNFR I/TNFR II 遺伝子の発現解析：TNF は TNFR I および TNFR II の二種類のレセプターと結合することが知られているが、両レセプターの間で TNF が結合した後のシグナル伝達機構が異なることが明らかとなっている。猫の TNFR II 遺伝子の塩基配列はすでに報告されているため、本章では猫の TNFR I の cDNA クローニングを行った。次に、猫由来細胞におけるこれら遺伝子の発現を RT-PCR によって解析した結果、TNFR I および TNFR II のいずれも、Con A 刺激によって猫の PBMC にその発現が誘導され、また猫リンパ腫細胞株においてその発現が増強していることが示された。また、FIV 感染猫から採取した PBMC では正常猫より得た PBMC に比べて TNFR I の発現が増強していることが示された。

第 VI 章 TNF- α によって誘導される FIV 感染細胞の細胞死におけるカスパーズの活性化：FIV 持続感染線維芽細胞(CRFK/FIV)において認められる TNF- α 誘導性アポトーシスの分子機構を明らかにするため、そのシグナル伝達に関する検討を行った。はじめに、CRFK および CRFK/FIV 細胞における TNFR I および TNFR II mRNA の発現を RT-PCR を用いて検討したところ、いずれのレセプターも非感染細胞と感染細胞において同程度に発現していることが示された。TNFR I を介するシグナル伝達にはカスパーズおよび NF- κ B を介する経路があることが知られているため、それぞれの活性化について解析した。NF- κ B の活性化を electrophoretic mobility shift assay によって検討したところ、感染細胞と非感染細胞の両方において同程度の NF- κ B の活性化が認められた。次に、種々のカスパーズ阻害剤で処理したところ、CRFK/FIV 細胞における TNF- α 誘導性アポトーシスが著しく阻害された。またカスパーズ 3 の核内基質である poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)は、FIV 感染細胞においてのみ 89kD および 24kD の 2 つのタンパクに分解されていたことから、CRFK/FIV における TNF- α 誘導性アポトーシスはカスパーズの活性化によって引き起こされていることが示唆された。

以上のように本論文は、猫におけるアポトーシス解析のために主要な各遺伝子の構造および機能解析を主体としており、近年、急速にその研究が進展しているアポトーシスに関する分子基盤の獣医学領域への応用を可能としたものである。さらに、本論文によって、FIV 感染症においてその病理発生に深く関与しているアポトーシスの分子機構の各ステップにおける多くの新しい知見を見出すことができた。猫におけるアポトーシス機構と FIV 感染症の病態に関する本論文は、生物が本来持っている細胞死の機構が異常に誘導されることによって病気が発生することを明らかにしたものである。