

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 水 野 拓 也

アポトーシスは、様々な分子によって制御される細胞死であり、なかでも 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の異常が免疫不全、自己免疫疾患および腫瘍などの病態と関連している可能性が示唆されている。獣医临床上重要な疾患の一つであるネコ免疫不全ウイルス (FIV) 感染症においては、リンパ球の減少による免疫不全の進行が病態の中心であるが、そのリンパ球減少の機構に関し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た一連の研究から構成されている。

第 I 章では、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、これら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 章では、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。RT-PCR により、5 種類の猫のリンパ腫細胞株において野生型 Fas mRNA 以外に 5 種類の選択的スプライシング産物が存在することが明らかとなった。また、猫のリンパ腫症例から採取した腫瘍組織においても、同様の Fas mRNA の選択的スプライシング産物が検出された。これらの選択的スプライシング産物では、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、膜貫通領域を欠く可溶性 Fas 蛋白が生成されていることが予想され、それらがリンパ腫の発生に関与している可能性が示唆された。

第 III 章では、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 mRNA の発現を解析した。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では、感染後、Fas および Fas リガンドの顕著な発現増強が認められた。また、10 頭の FIV 自然感染猫由来 PBMC においては、Fas および Fas リガンド mRNA の発現が増強していた。これらのことから、FIV 感染症におけるリンパ球減少には 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 章では、Fas リガンド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を行い、さらにその転写調節領域の解析を行った。Fas リガンドの 5' 非翻訳領域に関して 10 種類の 5' 末端欠損変異体を作成し、それらの T リンパ系細胞株における転写活性を測定したところ、開始コドンの上流の 172~459 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。この結果は、FIV 感染症等における

Fas リガンドの発現上昇の機構の解析に有用であると考えられる。

第V章では、猫の TNFR I の遺伝子クローニングを行い、全翻訳領域を含む cDNA クローンを得た。次に、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 TNFR I の発現が増強していることが示された。

第VI章では、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。CRFK 細胞および CRFK/FIV 細胞のいずれにおいても TNFR I および TNFR II mRNA は同程度に発現していることが示された。また、TNFR I を介するシグナル伝達における 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。一方、CRFK/FIV 細胞において、種々のカスパーズ阻害剤による TNF- α 誘導性アポトーシスの阻害およびカスパーズ 3 の核内基質である poly (ADP-ribose) polymerase の分解から、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、猫の免疫学的疾患におけるアポトーシス機構の解析に関する本論文は、学問的および応用上価値ある論文であり、審査委員一同は博士 (獣医学) の学位論文に値するものと認めた。