

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 藤野 泰人

論文題目

Cytogenetic studies on feline lymphoid tumors associated with the integration of feline leukemia virus

(和訳 猫白血病ウイルスの組み込みとリンパ系腫瘍発生に関する細胞遺伝学的研究)

申請者は小動物臨床において最も大きな問題の一つであるネコのリンパ・造血系腫瘍の発生機構に着目し、ネコの腫瘍発生に関連する遺伝子の染色体マッピング、ネコのリンパ系腫瘍細胞株の樹立および性状解析、およびネコのリンパ系腫瘍細胞におけるネコ白血病ウイルス (FeLV) の染色体上組み込み部位の同定といった一連の分子細胞遺伝学的研究を行った。

第一章では、ネコの細胞遺伝学的解析の基盤的研究として、アポトーシス関連遺伝子であるネコ *Fas* および *Fas* リガンド (*FasL*) 遺伝子の染色体座位を特定した。それぞれの遺伝子のゲノミッククローンをジゴキシゲニン標識し、正常ネコの末梢血単核球 (PBMC) から染色体標本を作成し、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) を行ったところ、*Fas* 遺伝子は D2p13-p12.2、*FasL* 遺伝子は F1q12-q13 に座位していることが明らかとなり、それら遺伝子のネコ染色体座は比較細胞遺伝学的にヒトおよびマウスの染色体座と相同であった。ネコ *Fas* および *FasL* 遺伝子の染色体座位の特定は、今後ネコにおける各種疾患の病理発生を研究する上で有用な情報を提供するものと考えられた。

第二章では、ネコの自然発生リンパ腫から株化細胞を樹立し、その性状解析を行ったところ、本細胞株に特徴的な所見が認められた。血液中 FeLV 抗原陽性で胸腺型リンパ腫を発症したネコの腫瘍細胞を採取し、株化細胞 (K0-1) 樹立に成功した。K0-1 は、サザンブロット解析によって T 細胞受容体 β 鎖遺伝子の再構成を有する T リンパ芽球様細胞株であり、染色体 DNA に FeLV プロウイルスが組み込まれていた。しかしウエスタンブロット解析では、K0-1 は細胞内に FeLV 構成蛋白を産生しているが、その分子量は通常の FeLV 蛋白とは異なっていることから不完全な蛋白であることが推測され、また培養上清中には FeLV 構成蛋白および逆転写酵素活性が検出されなかった。これらの結果より K0-1 は FeLV の組み込みがあるにもかかわらずウイルス粒子を産生しない細胞株であり、このようなネコの腫瘍細胞株はこれまでに報告がなく、FeLV に起因した腫瘍発生を研究する上で非常に有用な細胞株であると考えられた。また、K0-1 は細胞遺伝学的に染色体数が B2、F2、X 染色体のトリソミーを含む $2n=41$ であり、B2 および F2 のトリソミーは染色体ペインティングによって確認された。これまでの研究より、B2 染色体には *fit-1*、*pim-1*、F2 染色体には *myc* といった FeLV 共通組み込み部位である腫瘍関連遺伝子が座位しており、それらが K0-1 の腫瘍

化に関連している可能性が考えられた。

第三章では、分子細胞遺伝学的解析によりネコのリンパ系腫瘍細胞における FeLV の組み込みについて解析を行った。FeLV に起因した腫瘍発生機構の一つとして、プロウイルスが宿主 DNA 内の腫瘍関連遺伝子近傍に組み込まれ、その遺伝子の転写を制御する insertional mutagenesis が考えられている。申請者は FISH 法を用いて FeLV の染色体上組み込み部位を同定することにより、FeLV に起因した腫瘍発生の分子機構を検討した。FeLV プロウイルス DNA をピオチン化し、正常ネコ PBMC および FeLV 感染ネコリンパ系腫瘍細胞株である FL-74、FT-1 および K0-1 細胞株の染色体標本作製し FISH を行った結果、正常ネコ染色体には特異的なシグナルは検出されなかったが、腫瘍細胞株の染色体標本ではそれぞれ 6 カ所の有意なシグナルが検出された。DAPI 重染色によるネコの Q バンド解析に基づいて解析したところ、FL-74 では B2p15-p14、B2q11、D1p14、E1p14-p13、E1q12 および F2q16 の座位に、FT-1 では A2p23-p22、B2p15-p14、B4p15-p14、D4q23-q24、E1p14-p13 および E2p13-p12 の座位に、K0-1 では A2p22、A3q22、B1p13、B1q13、D1p13 および D3p15-p14 の座位に有意なシグナルが観察された。外来性 FeLV 特異的な LTR U3 プロンプを用いたサザンブロット解析を行った結果、FL-74、FT-1 および K0-1 細胞にはそれぞれ 6 コピーの FeLV プロウイルスが組み込まれていることが示され、FISH によって同定された座位の数と一致していた。これまでのネコにおける細胞遺伝学的成果と本研究における成果を比較した結果、FISH によって FeLV プロウイルスが検出された染色体には腫瘍関連遺伝子が座位しており、それらが腫瘍発生に関与している可能性が考えられた。また、A2 染色体には FT-1 および K0-1 の 2 細胞株において、B2 染色体には FL-74 および FT-1 の 2 細胞株において同じ座位のシグナルが認められ、それらの部位に FeLV の共通組み込み部位が存在していることが予想された。今後、これらの座位に存在する遺伝子を特定することにより、腫瘍発生の分子機構解明の進展が可能であると考えられた。

本研究によって得られた知見は、ネコにおける細胞遺伝学的な基盤を作り、それをウイルス学および免疫学的知見と融合させることによって発展させたものであり、リンパ系腫瘍の分子機構解明に有用な所見を提供するものである。また、比較細胞遺伝学的観点から、本研究成果は動物の腫瘍発生機構の解明に役立つばかりでなく、ヒトの疾患モデルとしても重要な知見となり得ると考えられ、審査委員は申請者を博士（獣医学）の学位を受けるに必要な学識を有する者と認め、合格と判定した。