

## 論文の内容の要旨

農学生命科学研究科獣医学専攻  
平成12年度博士課程 入学

氏名 岡山 太郎  
指導教官 辻本 元

論文題名 Molecular and Cellular Biological Studies on *Gfi-1* (*Growth factor independence-1*) Gene in the Dog and Cat

(犬および猫における *Gfi-1* (*Growth factor independence-1*) 遺伝子に関する分子細胞生物学的研究)

近年、診断技術の進歩と動物の寿命の延長の結果、腫瘍性疾患に罹患する動物が増加しており、小動物臨床において大きな問題となっている。犬や猫のコンパニオンアニマルとしての位置づけが確立されるにつれ、飼い主の動物に対する意識や獣医療に対する要求も変化してきている。動物のクオリティー・オブ・ライフの向上と余命の延長のため、腫瘍性疾患に対するより有効性の高い診断・治療技術の開発への要求度は益々高くなっていると言える。その実現のためには対象疾患の病態に関する詳細な理解が必要不可欠であり、小動物の獣医学においては、腫瘍発生における分子病態に関する研究が必要とされている。

*Gfi-1* (*Growth factor independence-1*) 遺伝子は、さまざまな標的遺伝子の転写を制御することにより、細胞の増殖や生存に関与するproto-oncogeneであることが知られている。その発現タンパクはzink-fingerファミリーに属する55 kDの転写因子であり、C-末端に存在する6つのzink-fingerモチーフにより塩基配列特異的に標的DNAに結合する。N-末端に存在するSNAGドメインはこの分子に特徴的なドメインであり、*Gfi-1*による転写制御活性に不可欠である。

*Gfi-1*遺伝子は、当初、ラットのインターロイキン-2 (Interleukin-2, IL-2) 依存性リンパ系

細胞株において、Moloney murine leukemia virus (MoMuLV) の感染が細胞をIL-2非依存性に形質転換させる際に、MoMuLVのゲノムへのインテグレーションによってその発現が増強される標的遺伝子として単離された。その後、Gfi-1はリンパ系細胞の成長因子であるIL-2への細胞の依存性を低減させることや、シグナル伝達因子であるSTAT3の活性を抑制する因子であるPIAS3を抑制することにより、細胞増殖を促進することが示された。このように、マウスおよびラットといった実験動物において、Gfi-1は細胞のアポトーシスを抑制するとともにその増殖を促進する役割を果たすことによりリンパ系腫瘍発生の分子病態に関与することが示されている。

一方、Gfi-1は通常の免疫細胞や血液細胞の分化および増殖においても重要な役割を果たすことが報告されている。Gfi-1遺伝子のノックアウトマウスでは骨髄球系および単球系細胞の分化の異常が認められるが、クロマチン免疫沈降法による解析の結果、Gfi-1は、細胞のアポトーシスや細胞周期の制御などに関わるさまざまな遺伝子の発現を統合的に制御することによって、骨髄球系細胞の分化を制御することが示された。さらにGfi-1は、造血幹細胞の増殖と分化を抑制することにより、その未分化な状態と自己複製能を保持することに重要な役割を果たすことが示された。

そこで私は、小動物の腫瘍性疾患における分子病態の解明のため、犬および猫の腫瘍性疾患の発症機構におけるGfi-1の関与について以下のような一連の研究を行った。第1章では犬および猫におけるGfi-1遺伝子の分子クローニングを行い、さまざまな正常組織および腫瘍細胞株におけるGfi-1遺伝子の発現を検討した。第2章では、猫のIL-2依存性リンパ系細胞株を用い、さまざまな濃度のIL-2の存在下で培養を行うことにより、Gfi-1の機能を検討した。第3章では、遺伝子特異的に発現の抑制を引き起こすRNA干渉法を用い、犬の肥満細胞腫由来細胞株におけるGfi-1の機能を解析した。

## 第1章 犬および猫のGfi-1 遺伝子の分子クローニングとその発現

Gfi-1は、様々な遺伝子の発現を制御することにより腫瘍発生や細胞の分化に関与することが知られている。犬および猫においてGfi-1遺伝子に関する研究を遂行するための基礎的知見を得るため、犬および猫のGfi-1遺伝子の分子クローニングを行った。はじめに、ヒト、マウスおよびラットのGfi-1 遺伝子の塩基配列において相同性の高い部分を基にしたプライマーを作成し、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法および3' および5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法により、犬および猫のGfi-1 遺伝子cDNAの全塩基配列を決定した。これらの遺伝子からコードされる犬および猫のGfi-1タンパクはいずれも422アミノ酸残基からなり、ヒト、マウスおよびラットのGfi-1タンパクと86.5 - 91.2%の相同性を示した。犬および猫のGfi-1タンパクにおいても、他の種において認められるSNAGドメインおよび6つのzink-fingerドメインが保存されていることが示され、犬および猫のGfi-1が他の種のそれらと同様の機能を有することが示唆された。次に、犬および猫のさまざまな正常組織と腫瘍細胞株から抽出したRNAを鋳型として、RT-PCR法によりGfi-1 遺伝子の発現を検討した。その結果、Gfi-1 遺伝子の発現は犬および猫の胸腺、リンパ節、脾臓、骨髄といったリンパ系および造血系組織において強く発現しており、これ

ら組織において何らかの生理的な機能を担っていることが示唆された。また、犬および猫のリンパ腫細胞株においても*Gfi-1* 遺伝子の強い発現が認められ、犬と猫におけるリンパ腫の腫瘍発生への関与が示唆された。さらに、*Gfi-1* 遺伝子の発現は犬の肥満細胞腫、骨肉腫および乳腺腫瘍に由来する複数の細胞株においても認められた。本章における研究により、犬および猫の*Gfi-1* 遺伝子に関する基礎的な知見が得られ、以下の研究を遂行することが可能となった。

## 第2章 猫のIL-2依存性リンパ系細胞株における*Gfi-1*遺伝子の発現様式の解析

リンパ腫は、猫において最も発症頻度の高い悪性腫瘍であり、小動物臨床における最も大きな問題の一つである。ネコ白血病ウイルス (Feline leukemia virus, FeLV) の感染によるリンパ腫については、比較的詳細にその分子病態が解析されており、FeLVによる外来*myc*遺伝子の導入またはFeLVのゲノムへの挿入による*myc*遺伝子の発現増強が腫瘍発生に寄与していることが報告されている。しかし、FeLVの感染によらないリンパ腫における腫瘍発生機構に関してはほとんど報告がない。そこで私は、マウスおよびラットにおいてリンパ腫発生への関与が示されている*Gfi-1*のネコのリンパ系細胞における機能を、IL-2依存性のネコのリンパ系細胞株であるKumi-1をさまざまな濃度のIL-2の存在下で培養することにより検討した。IL-2を含まない培地でKumi-1細胞を2日間培養したところ、アポトーシスを起こした細胞集団とアポトーシスを免れた細胞集団が認められた。この時の*Gfi-1* 遺伝子の発現をreal-time (RT-) PCR 法により定量した結果、IL-2非存在下においてアポトーシスを免れた細胞における*Gfi-1* 遺伝子の発現量は、IL-2存在下の細胞におけるものよりも有意に高かった。このことから、*Gfi-1*はネコのリンパ系細胞のIL-2非存在下での生存に関わることが示唆された。さらに、アポトーシス関連遺伝子として知られている*Bax*および*Bcl-xL*の発現をreal-time PCR 法により定量したところ、IL-2非存在下でアポトーシスを免れた細胞においてはIL-2存在下で培養した細胞と比べて*Bax*遺伝子の発現量が増加していることが示されたが、*Bcl-xL*遺伝子に関しては両細胞集団の間にその発現量の差は認められなかった。以上のことから、*Gfi-1*は抗アポトーシスに働く*Bcl-xL*遺伝子の発現を直接あるいは間接的に調節して保持することにより、*Bax*遺伝子の発現増強によって誘導されるアポトーシスに対して細胞に抵抗性を付与している可能性が示唆された。成長因子に依存せずに生存・増殖する性質は、腫瘍細胞が自立的な増殖能を獲得するために必要不可欠であるが、*Gfi-1*はネコのリンパ系細胞のIL-2非依存的な増殖を促すことにより、ネコのリンパ腫の腫瘍発生に関与するものと考えられた。

## 第3章 RNA干渉法を用いた犬の肥満細胞腫細胞株における*Gfi-1*の機能の解析

肥満細胞腫は、犬の皮膚に発生する腫瘍の11 - 27%を占め、犬の腫瘍性疾患の臨床において最も重要な疾患の一つである。犬の肥満細胞腫の腫瘍発生における分子病態については、肥満細胞の分化と生存に必須の成長因子であるstem cell factor (SCF) のレセプターをコードする遺伝子である*c-kit*遺伝子の変異に伴う自己活性化が報告されている。この変異によりSCFレセプターは活性化の状態を持続し、細胞における増殖と生存のシグナルを持続的

に伝えることによって腫瘍発生に関与することが示されている。c-kit遺伝子の変異は犬の肥満細胞腫の自然発症例のおよそ30 - 50%において検出されることが報告されているが、c-kit遺伝子の変異の他には腫瘍発生に関与する分子機構は報告されていない。そこで私は、ラットおよびマウスのリンパ腫発生に関与するとともに細胞の増殖とアポトーシスに関わる遺伝子の転写を制御する転写因子であるGfi-1に注目し、Gfi-1が犬の肥満細胞腫の腫瘍発生に関与する候補分子であると仮説を立てた。このGfi-1の機能を解析する手段として、目的の遺伝子に特異的なshort-hairpin RNA (shRNA) をコードする遺伝子を細胞に導入することによって標的遺伝子の特異的発現抑制を引き起こす、RNA干渉法を用いた。犬の肥満細胞腫細胞株であるLUMC細胞にGfi-1遺伝子特異的なshRNA発現ベクターを導入したところ、Gfi-1遺伝子の発現量が減少することが示された。そこで、Gfi-1遺伝子発現を抑制した細胞の増殖率を定量したところ、その増殖が有意に促進されていることが明らかとなった。これらGfi-1遺伝子発現を抑制した細胞において、各細胞周期における細胞の割合をフローサイトメーターを用いて解析したところ、コントロールと比較してG2/M期の細胞の割合が多く、G0/G1期の細胞の割合が減少していた。また、アポトーシス関連遺伝子であるBax遺伝子、Bcl-2遺伝子およびBcl-xL遺伝子の発現をreal-time PCR法により定量したところ、Gfi-1遺伝子の発現を抑制してもこれらの遺伝子の発現量に変化が認められないことが示された。以上のことから、Gfi-1は、犬の肥満細胞腫由来細胞株において、細胞周期の進行を負に調節し、細胞の増殖に抑制的に働く因子であることが明らかとなった。この結果は、Gfi-1が造血幹細胞の分化と細胞増殖に関して抑制的に働いて造血幹細胞を未分化な状態に維持するとともに自己複製能を保持するために必須の分子であることを示した最近の報告における所見と類似するものと考えられた。細胞が未分化な状態を維持して自己複製能を保持することは細胞の恒久的な増殖に重要であり、それはすなわち細胞の腫瘍性増殖に必須な形質と考えられる。したがってGfi-1は、犬の肥満細胞腫において細胞の分化と増殖を抑制することにより、腫瘍発生の分子病態に関与しているものと推察された。

以上のように、本論文は腫瘍発生や細胞分化に関与する転写因子をコードするGfi-1遺伝子に関する研究を犬および猫において遂行するための基礎的な知見を提供するとともに、動物のリンパ腫および肥満細胞腫におけるGfi-1の腫瘍発生への関与を示唆するものである。本論文は、小動物におけるGfi-1の腫瘍発生への関与に関する研究を通じて、特定の分子の病態への関与を解析する研究においてRNA干渉法によって直接的に解析する研究手法の有用性を示したものであり、小動物獣医学におけるさまざまな疾患の分子病態の解明を目的とした今後の分子細胞生物学的研究に新しい方向性を拓いたものである。