

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岡山 太郎

論文題目

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)

申請者は、小動物臨床において最も大きな問題である腫瘍性疾患の分子病態に着目し、癌原遺伝子である*Growth factor independence-1* (*Gfi-1*) 遺伝子の、犬および猫における分子クローニングと、猫のリンパ球および犬の肥満細胞腫由来細胞株における機能解析といった一連の分子細胞生物学的研究を行った。

第一章では、犬および猫の*Gfi-1* 遺伝子の分子クローニングを行った。その結果、犬および猫の*Gfi-1* 遺伝子のcDNAの全塩基配列が明らかとなり、予測されたアミノ酸配列はこれまでに報告されているヒト、マウスおよびラットのそれらと86.5 - 91.2 %の相同性を持つことが示され、この分子の機能に必須のドメインが保存されていることが明らかとなった。また、*Gfi-1* 遺伝子の発現を犬と猫の正常組織において検討した結果では、リンパ節、脾臓、骨髄といった免疫系および造血系組織においてその発現が認められ、これらの組織においてなんらかの生理的な機能を有することが示唆された。また、リンパ腫、肥満細胞腫、骨肉腫、乳腺腫瘍に由来するいくつかの細胞株においても*Gfi-1* 遺伝子の発現が認められた。以上のことから、今後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盤となる知見が提供された。

第二章では、猫のIL-2依存性リンパ系細胞株であるKumi-1細胞を用い、猫のリンパ球における*Gfi-1* 遺伝子の機能の解析を行った。Kumi-1細胞をIL-2の非存在下で培養したところ、フローサイトメトリーを用いた解析の結果、IL-2を加えて培養した場合に比べてアポトーシスを起こしている細胞の割合が約2倍に増加していた。このときの*Gfi-1* 遺伝子の発現量をリアルタイムPCR法により定量したところ、アポトーシスを免れて生存している細胞では、IL-2を加えて培養した細胞に比べ、有意に高い*Gfi-1* 遺伝子の発現が認められた。さらに、アポトーシス関連遺伝子である*Bax* および*Bcl-xL* 遺伝子の発現量をリアルタイムPCR法により検討した。IL-2を加えずに培養した細胞においてはIL-2を加えて培養した細胞に比べ*Bax* 遺伝子の発現増加が見られたが、同時に*Bcl-xL* 遺伝子の発現量に変化がなかったことから、

*Bcl-xL*遺伝子が*Bax*遺伝子の発現増強に対して拮抗的に作用し、細胞の生存に関与したものと考えられた。以上のことから、*Gfi-1*遺伝子は、猫のリンパ球のIL-2非存在下でのアポトーシスに対して抑制的に働き、細胞の生存に関与していることが示された。ここで認められた知見は、細胞が増殖因子の存在によらず不死化し、自律的な生存、増殖能の獲得につながるものと考えられ、細胞の腫瘍化における病態の中の一つの構成要素をなす可能性のあるものと考えられた。以上のことから*Gfi-1*遺伝子の猫のリンパ腫における腫瘍発生への関与の可能性が示唆され、今後臨床サンプルを用いた解析を含め、さらに多面的に検討する必要があるものと考えられた。

第三章では、RNA干渉法を用い、犬の肥満細胞腫由来細胞株であるLUMC細胞における*Gfi-1*遺伝子の機能を解析した。第一章で得られた犬の*Gfi-1*遺伝子の配列から選択された標的配列に対するshort-hairpin RNAを、レトロウィルスベクターによってLUMC細胞に導入した。リアルタイムPCR法によって*Gfi-1*遺伝子の発現量を検討したところ、約50%の発現抑制が確認された。この時の細胞の増殖率をWST-1の代謝産物を用いた比色法により検討したところ、コントロール細胞に比べて有意に増殖が亢進していることが示された。また、フローサイトメトリーによって細胞周期について検討したところ、*Gfi-1*遺伝子の発現が抑制された細胞では、コントロール細胞に比べてG0/G1期にある細胞の割合は減少し、G2/M期にある細胞の割合は増加しており、*Gfi-1*遺伝子の発現抑制によって細胞周期が促進されたことが示された。以上のことから、*Gfi-1*遺伝子は犬の肥満細胞腫由来細胞株において、細胞周期を抑制的に調節していることが明らかとなった。ここで認められた知見は、過去の報告において、*Gfi-1*遺伝子が造血幹細胞の増殖と分化を抑制することにより造血幹細胞の未分化性を維持し、自己複製能を保持するために重要な役割を担うことを示した報告と類似する点があるものと考えられた。この形質は、未分化性を保持することによって増殖能を失わずに恒久的な増殖能をもたらすという観点から言えば、細胞の腫瘍化の病態にも関与するものである。したがって、*Gfi-1*遺伝子が犬の肥満細胞腫において細胞周期を抑制的に制御することが、細胞の恒久的な増殖能の獲得に寄与している可能性が示された。

本研究は犬と猫における*Gfi-1*遺伝子の基盤的知見を提供するとともに、腫瘍発生における分子病態への関与の可能性を示し、犬と猫の腫瘍発生機構の解明へ新たな側面からの知見を提供したものである。また、従来の研究手法に加えRNA干渉法といった最新の研究手法を導入するなど、特定の遺伝子の機能解析を対象とした今後の獣医学における分子生物学的研究に、新しい方向性を示したものである。以上のことから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ものと認め、合格と判定した。