

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 遠藤 能史

染色体不安定性はヒトの多くの腫瘍で認められ、その悪性化に深く関与していると考えられている。染色体不安定性の中でも、分裂期における染色体の不均衡な分配によって生じる異数性は非常に多くの腫瘍において認められる。紡錘体形成チェックポイントは分裂期において、全染色体の均等な分配を監視するシグナル伝達機構であり、その異常は異数性を誘導する。最近、いくつかの腫瘍において、このチェックポイントの異常が報告されており、それと悪性度との関連が注目されている。

犬の悪性黒色腫は非常に悪性度が高く、積極的な治療にも関わらず、ほとんどの症例が1年以内に死亡する。我々の研究室ではすでに4種の犬の悪性黒色腫細胞株を樹立しているが、その全てが異数性を示す。ヒトの腫瘍において悪性度の高い腫瘍や末期の腫瘍は染色体不安定性や異数性の程度が増加することが示されており、犬の悪性黒色腫の悪性度に関しても染色体不安定性が強く関与すると考えられる。

そこで本研究では異数性の原因の一つである紡錘体形成チェックポイント機構に着目し、その異常をもたらす分子機構について、これらの犬の悪性黒色腫細胞株を用い、以下に示す一連の研究が行われた。

まず、これらの4つの犬悪性黒色腫細胞株における紡錘体形成チェックポイント機能について評価した。細胞分裂を同期化していない、非同調培養下における悪性黒色腫4株において、細胞分裂を止める作用のある微小管阻害剤による細胞周期の分裂期停止能は、3株（CMeC1、KMeC、LMeC）において正常な紡錘体形成チェックポイントを有するHeLa細胞と類似していた。一方、1株（CMeC2）では他の3株と比較して分裂指数が低下しており、紡錘体形成チェックポイント異常が疑われた。CMeC2株における分裂期停止細胞の減少は、単に細胞増殖率の差によって生じた可能性があったため、G1/S1期に同調した細胞を用いて、全ての同調細胞が分裂期を通過する時間(one cycle time)の間、微小管阻害剤処理し、分裂期細胞の蓄積を比較した。その結果、DNA量からは明確な差異がみられなかったものの、形態

学的にはCMeC2株の分裂期細胞(round-up)は他の細胞株と比較して減少し、分裂期マーカーの解析においても、他の細胞株と比較して低下していた。さらに、CMeC2株は、染色体早期分離を示す細胞が多く認められたことから、CMeC2株は紡錘体形成チェックポイント機能が低下していることが示唆された。

紡錘体形成チェックポイントのシグナル伝達には様々な分子が関与することが示されている。そこで第3章では、CMeC2細胞株の紡錘体形成チェックポイント異常の分子機構をタンパクレベルで検討した。紡錘体形成チェックポイント関連因子の発現や活性化は細胞周期に依存して変化し、特に分裂期において最大となる。そこでこれらの因子の発現量、リン酸化を非同調培養細胞、分裂期細胞、同調細胞の3つの培養条件にて評価した。

その結果、CMeC2株において、紡錘体形成チェックポイント機能と関連する因子であるMps1とBubR1のリン酸化が、他の細胞株と比較して低下していることが認められた。Mps1の活性はリン酸化によって調節され、BubR1のリン酸化は活性型Mps1により調節されると考えられている。従って、CMeC2株で認められた紡錘体形成チェックポイントの異常は、Mps1の活性化機構が関与していることが示唆された。

自己リン酸化はMps1の活性化調節に重要であると考えられる。そこで第4章では、CMeC2株のMPS1キナーゼの活性異常の分子機構を分析するため、MPS1遺伝子の変異について検討した。しかしながら、リン酸化部位や自己リン酸化に重要なキナーゼドメインにおいて変異は認められなかった。従って、CMeC2株で認められたMPS1キナーゼの不活性化においてMps1遺伝子の変異は関連性のないことが示唆された。

以上、従来報告のなかった犬の腫瘍におけるMps1の活性異常を伴う紡錘体形成チェックポイントの異常は、獣医学領域における初めて報告であり、頻度は必ずしも高いとは言えないが、犬の悪性黒色腫の異数性の原因の1つであると考えられた。今後、染色体不安定性と悪性黒色腫の進行の関連性を解明するために、他の細胞株における異数性の原因やMps1活性化異常の原因を追究する必要があると考えられた。

以上要するに、本研究は、従来十分な検討がなされていなかった、小動物の悪性腫瘍と染色体異数性との関連を、紡錘体形成チェックポイントの機能から解析したものであり、この分野の研究に貢献するところは少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(獣医学)の論文として価値あるものと認めた。