

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 20 年度博士課程入学

氏 名 望月 浩之

指導教員名 辻本 元

論文題目 Clonality Analysis of the Neoplastic Diseases
in Cats
(ネコにおける腫瘍性疾患のクローン性解析)

細胞のクローン性増殖は腫瘍における本質的な特徴であり、増殖細胞のクローン性解析は腫瘍と非腫瘍の鑑別、病態の解明、病変のモニタリングなどにおいて有用と考えられる。医学領域では、特定の遺伝子/染色体異常の解析やフローサイトメトリー法による免疫表現型の解析など、さまざまなクローン性解析法が報告されてきた。しかし、獣医学領域において利用できるクローン性解析法は少なく、臨床的な要望を満たすには至っていない。そこで、本研究では、ネコにおいて抗原受容体遺伝子再構成および X 染色体不活化パターンに基づいた細胞のクローン性解析法を構築し、それを利用して症例由来サンプルを解析することによってその臨床的有用性を検討した。

第 1 章：ネコにおけるイムノグロブリン重鎖 (Immunoglobulin heavy chain, IgH) 遺伝子再構成を利用したクローン性解析

本章では、IgH 遺伝子再構成を利用したクローン性細胞検出系を構築することを目的として研究を行った。ネコにおいて抗原受容体遺伝子再構成を利

用したクローン性解析法に関してこれまでに数報の報告があるが、いずれにおいても検出感度が低く、偽陰性を生じやすいことが臨床上問題となっている。感度が低いことの理由としては、胚細胞型抗原受容体遺伝子の多様性および抗原刺激によって生じる体細胞超変異が挙げられる。アッセイの感度を向上させるためには、PCR 解析システムに用いるプライマー 数を増やし、プライマー 配列におけるミスマッチを極力減らす必要があると考えられた。しかし、単純に PCR 反応数を増加させるだけでは、煩雑でコストのかかるアッセイになってしまう。そこで本研究では、Multiplex PCR およびキャピラリー電気泳動法を用いることにより、高感度かつ簡便な検出系の構築を試みた。

アッセイを構築する前にネコの B 細胞性リンパ腫由来細胞株 (MS4) を樹立し、クローン性細胞のコントロールとしてその後の実験に供した。アッセイを構築するにあたり、正常な脾臓における IgH 遺伝子転写産物をクローニングし、得られた配列のアラインメントを基にしてプライマー を設計した。IgH 遺伝子 V 領域プライマー (forward プライマー) を 6-FAM, VIC で蛍光標識した。J 領域プライマー (reverse プライマー) は混合プライマー として作製した。クローン性細胞のコントロールとして MS4 細胞を、一方、非クローン性細胞のコントロールとして正常な脾臓を用い、PCR 反応の条件を検討した上でアッセイを構築した。26 検体の B リンパ系腫瘍由来臨床サンプルを用いてクローン性 IgH 遺伝子再構成の検出を試みた。その結果、腫瘍サンプルの 84% (22/26) においてクローン性の IgH 遺伝子再構成が検出された。本研究で構築したアッセイ系を用いることにより、ネコにおいて高感度、簡便、かつ迅速に B リンパ系細胞のクローン性解析が可能となった。

第 2 章：ネコにおける T 細胞受容体 γ (T-cell receptor γ chain, TCR γ) 遺伝子再構成を利用したクローン性解析

ネコにおいては高分化型の T リンパ系腫瘍が増加しているが、病理組織学的検査においても炎症性病変と高分化型リンパ系腫瘍との鑑別はしばしば困難である。このような場合、TCR γ 遺伝子再構成を利用したクローン性解析は補助診断として有用であると考えられた。

本章では、第 1 章と同様の手法 (Multiplex PCR およびキャピラリー電気泳動法) を用いることにより、TCR γ 遺伝子再構成を検出するクローン性解析法の構築を行った。アッセイの検証のため、30 検体の T 細胞性腫瘍サンプル、27 検体の B 細胞性腫瘍サンプル、および 34 検体の非腫瘍性サンプルを用い、クローン性 TCR γ 遺伝子の再構成の検出を行った。その結果、87% (26/30) の

T 細胞性腫瘍、7% (2/27) の B 細胞性腫瘍、3% (1/34) の非腫瘍性サンプルにおいてクローン性の TCR γ 遺伝子再構成が認められた。

第 3 章：ネコにおける X 染色体不活化パターンを利用したクローン性解析

X 染色体不活化パターン (X-chromosome inactivation pattern, XCIP) を利用したクローン性解析法は古くから医学領域においてさまざまな臓器系のクローン性解析に用いられてきた。XCIP を利用したクローン性解析法では雌の体細胞において片方の X 染色体が不活化されている現象を利用する。雌の体細胞は、その X 染色体不活化パターンにより、母方もしくは父方由来の一方の X 染色体が不活化された細胞の 2 種類に分けられる。この 2 つの細胞集団のバランスは、非腫瘍性細胞集団では偏りが無いが、腫瘍性細胞集団においては著しい偏りが生じる。XCIP を利用したクローン性解析法ではこの 2 種類の細胞集団の偏りを検出する。本研究では、ネコのアンドロゲンレセプター (AR) 遺伝子の多型および不活化を解析することにより、各種細胞に応用可能なクローン性解析システムを構築した。

アッセイの構築にあたり、153 頭のネコの末梢血 DNA サンプルを用い、AR 遺伝子の Exon 1 内にある CAG タンデムリピートの多型を調べた。その結果、CAG タンデムリピートの多型が認められ、68% の雌ネコがそのリピート数に関してヘテロ接合体であることが示された。次に、メチル化感受性酵素 *Hpa*II 処理後の PCR によって X 染色体の活性化/不活性化を検出した。これら情報をもとにして、ネコにおける XCIP を利用したクローン性解析法を構築した。

構築したアッセイでは、健常ネコ末梢血白血球ではクローン性が認められなかったのに対し、ネコの乳腺腫瘍由来の 3 細胞株では明らかなクローン性が検出された。次に AR 遺伝子 CAG リピートに関してヘテロ接合体であった 15 検体の腫瘍サンプルおよび 3 検体の骨髓異形成症候群の骨髓サンプルに関して解析したところ、80% (12/15) の腫瘍サンプルおよび 3 検体すべての骨髓異形成症候群の骨髓サンプルにおいてクローン性が検出された。これまでネコにおける骨髓異形成症候群の病態は不明であったが、本研究の結果からクローン性の前白血病状態であることが示された。

これら一連の研究により、ネコにおいて IgH/TCR γ 遺伝子再構成および XCIP を利用したクローン性解析法を構築することができた。本研究において構築した高感度な IgH/TCR γ 遺伝子再構成検出システムは、ネコにおいて最も頻度の高い腫瘍であるリンパ系腫瘍の診断に役立つばかりではなく、その微小

残存病変の検出などの病状モニタリングにも応用できるものと考えられた。また、ネコでしばしば認められる好酸球増加症候群や組織球増殖性疾患は腫瘍性か反応性かを形態学的に鑑別することは困難であり、XCIPを利用したクローン性解析がこれら疾患の病態解明に有用であると考えられる。

小動物臨床においては、感染症や一般的な疾患のコントロールが可能となって、高齢の動物を診療する機会が増えた結果、腫瘍性疾患の重要性が認識されている。本研究の成果はネコにおける腫瘍性疾患の診断および病態解析に分子生物学的手法を有効に利用したものであり、今後の小動物診療の発展につながるものと考えている。