

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 望月 浩之

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、病態の解明などにおいて有用である。医学領域ではさまざまなクローン性解析法が報告されてきたが、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い。そこで、本研究では、ネコにおいてイムノグロブリン重鎖 (Immunoglobulin heavy chain, IgH)、T 細胞受容体 γ (T-cell receptor γ chain, TCR γ) 遺伝子再構成および X 染色体不活化パターン (XCIP) に基づいた細胞のクローン性解析法を構築し、それを利用して臨床検体を解析することによってその有用性を検討した。

第 1 章：ネコにおける 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解析法を構築することを目的とした。これまでに報告されている IgH/TCR γ 遺伝子再構成を利用したクローン性解析法は検出感度が低い。これは、ゲノム上の多様性や体細胞超変異に伴うプライマー配列におけるミスマッチが生じるためである。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。

まず、ネコの B 細胞性リンパ腫細胞株 MS4 を樹立し、クローン性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為に、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、得られた配列を基に IgHV 領域プライマー および IgHJ 領域プライマー を設計した。MS4 および正常な脾臓を用いて PCR 反応の条件を検討し、アッセイを構築した。臨床例から得られた B リンパ系腫瘍サンプル 26 検体を用いてクローン性 IgH 遺伝子再構成の検出を試みたところ、腫瘍サンプルの 84% においてクローン性が検出された。本研究で構築した系を用いることにより、ネコにおいて高感度かつ簡便に 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 TCR γ 遺伝子再構成を利用したクローン性解析

本章では、第 1 章と同様の手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、T 細胞性腫瘍の 87%、B 細胞性腫瘍の 7%、非腫瘍性サンプルの 3% においてクローン性が検出された。

第 3 章：ネコにおける XCIP を利用したクローン性解析

雌の体細胞では 2 本の X 染色体のうち片方は不活化されており、全ての細胞は母方、

もしくは父方由来の 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 を用い、AR 遺伝子 Exon 1 にある CAG tandem repeat (CAGr) の多型を調べた。その結果、CAGr の多型が認められ、さらに 68% の雌ネコがヘテロ接合体であった。次に、CAGr 近傍部位のメチル化状態の違いによって 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 解析法を構築した。

構築したアッセイでは、健常ネコ白血球ではクローン性が認められなかったのに対し、ネコ乳腺腫瘍細胞株では明らかなクローン性が検出された。次に 15 検体の腫瘍サンプルおよび 3 検体の骨髄異形成症候群 (MDS) の骨髄サンプルに関して解析したところ、腫瘍サンプルの 80% およびすべての MDS の骨髄サンプルにおいてクローン性が検出された。本研究の結果からネコ MDS はクローン性の前白血病状態であることが示唆された。

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 遺伝子再構成検出系は、ネコのリンパ系腫瘍の診断に役立つのみならず、その微小残存病変の検出など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などの疾患で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。

本申請論文を審査した結果、審査委員一同博士 (獣医学) の学位を授与するに値すると判断した。