

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 21 年度博士課程入学

氏名 藤原 亜紀

指導教員名 辻本 元

論文題目

Genetic and epigenetic aberrations of tumor suppressor gene *p16* in canine lymphoid tumors

(犬リンパ系腫瘍における癌抑制遺伝子 *p16* のジェネティックおよび
エピジェネティックな異常)

犬においてリンパ腫は最も発生頻度の高い悪性腫瘍の一つであり、造血器腫瘍のうち約 80% を占める。リンパ腫は一般的には化学療法に対する感受性が高く、その治療においては基本的には多剤併用化学療法が用いられている。しかし、多くの症例では化学療法によって寛解が得られても再発時に抗癌剤耐性が認められることが多く、その生存期間は最も一般的な病型である多中心型リンパ腫で約 1 年とされている。犬のリンパ系腫瘍の中ではリンパ腫が最も多いが、急性リンパ芽性白血病や慢性リンパ性白血病の発生も認められる。人医療においてリンパ系腫瘍の病態解明や予後予測に関連して WHO 分類が最も広く用いられるようになったが、それを動物に外挿した動物版の WHO 分類が提唱され、人と犬の間でリンパ系腫瘍の病態を比較できるようになった。

P16, P15 はサイクリン依存性キナーゼ (Cyclin-dependent kinase, CDK) 4, CDK6 に結合することによってサイクリン D-CDK 複合体形成を阻害し、RB (Retinoblastoma protein) のリン酸化による G1 期から S 期への細胞周期移行を制御している。一方、P14 は MDM2 (Mouse double minute 2) に結合することによって P53 の分解を阻害し、別経路から RB のリン酸化による細胞周期移行を制御している。人のリンパ系腫瘍においては、これら *p16*, *p15*, *p14* に関して、その遺伝子変異の他、エピジェネティックな制御による不活化が高頻

度に認められている。さらに、これら分子の不活化がさまざまなリンパ系腫瘍において負の予後因子になることが報告されている。犬のリンパ系腫瘍においては、特定の病型における*p16*遺伝子領域の欠失が報告されているが、これら遺伝子のエピジェネティック制御を証明した研究は行われていない。

本論文における一連の研究においては、犬のリンパ系腫瘍における病態解明を進めるとともに予後因子を探索するため、*p16*, *p15*, *p14* 遺伝子のジェネティックな異常およびエピジェネティックな制御に関して検討を行った。

第1章：犬のリンパ系腫瘍細胞におけるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子をコードする *p16*, *p15*, *p14* 遺伝子不活化

イヌの *p16* 遺伝子に関してはその一部の配列が知られていたが、その *p15* 遺伝子との高い相同性および *p14* 遺伝子との exon 共有のため、これら 3 遺伝子を区別して解析するためにその全長を同定する必要があった。そこで、本章においてイヌ *p16* 遺伝子の全長 cDNA の配列を同定し、*p16*, *p15*, *p14* のそれぞれに特異的なプライマーを作製した。*p16* 遺伝子に関しては real-time PCR によってその発現量を定量し、*p15* 遺伝子および *p14* 遺伝子に関しては半定量的な RT-PCR を行った。ゲノム DNA の解析においては、*p16*, *p15*, *p14* 遺伝子が座位する 11 番染色体の領域にそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR を行った。はじめに、6 種類の犬のリンパ系腫瘍細胞株 (CLBL-1, GL-1, UL-1, CL-1, Nody-1, Ema) について解析し、次にリンパ系腫瘍を発症した 28 症例 (B 細胞性 14 例、T 細胞性 14 例) から採取した腫瘍サンプルに関する解析を行った。その結果、2 種類の T 細胞性リンパ系腫瘍細胞株 (Nody-1, Ema) において、*p16*, *p15*, *p14* 遺伝子すべての発現が消失していた。また 3 種類の細胞株 (CLBL-1, GL-1, UL-1) においては、正常リンパ節に比べて *p16* 遺伝子の発現が低下していた。*p16*, *p15*, *p14* 遺伝子の発現が消失していた 2 細胞株においては、当該領域のゲノム PCR でまったく増幅が認められず、これら遺伝子領域の欠失が示唆された。同様の異常が 14 例の T 細胞性リンパ系腫瘍症例のうち 2 例で認められたが、B 細胞系リンパ系腫瘍症例では認められなかった。以上の所見から、*p16*, *p15*, *p14* 遺伝子の同時欠失は犬のリンパ系腫瘍において認められる分子生物学的な異常の一つであると考えられた。

第2章：犬リンパ系腫瘍細胞における *p16* 遺伝子 CpG island のメチル化による不活化

第1章においては、3 種類のリンパ系腫瘍細胞株 (CLBL-1, GL-1, UL-1) において *p16* 遺伝子発現低下が認められたが、他の 2 株 (Nody-1, Ema) で認められたような当該遺伝子領域の欠失がなかったため、その発現抑制にはエピジェネティックな機構の関与が推察された。そこで、本章では *p16* 遺伝子に関して DNA メチル化によるエピジェネティックな制御について検討した。*p16* 遺伝子の発現低下が認められた CLBL-1, GL-1, UL-1 およびその発現量の増加が認められた CL-1 を用い、*p16* mRNA の発現量を定量する

とともに、bisulfite sequence 法によって *p16* 遺伝子 CpG island のメチル化を検討した。さらに、メチル化阻害薬である 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 添加による *p16* 遺伝子の発現量の変化を検討した。その結果、*p16* mRNA の発現が低下していた 3 株のいずれにおいても、その CpG island は高メチル化状態であり、5-aza-dC の存在下での培養によって発現量が上昇した。一方、*p16* 発現量が増加していた CL-1 においては、CpG island は非メチル化状態であり、5-aza-dC 処理による発現量の増加は認められなかった。以上の結果から、DNA メチル化を介したエピジェネティックな制御による *p16* 遺伝子の不活化は犬のリンパ腫細胞における分子学的異常の一つであることが示された。

第 3 章：犬の高悪性度リンパ腫症例における *p16*, *p15*, *p14* 遺伝子の発現およびその予後との関連

第 1 章および第 2 章における細胞株を用いた研究結果に基づき、高悪性度リンパ腫の症例から採取した腫瘍サンプルにおける *p16*, *p15*, *p14* 遺伝子の発現量を解析し、その予後への影響を検討した。本章では犬の高悪性度リンパ腫症例 71 例(B 細胞型 58 例、T 細胞型 13 例)を対象とした。*p16* CpG island のメチル化の解析には、3 組のプライマーを用いたメチル化特異的 PCR を行った。予後に関しては Kaplan-Meier 法による総生存期間の解析を行った。*p16*, *p15*, *p14* の各遺伝子の発現量および *p16* CpG island のメチル化の他、一般的な臨床的および病理学的な因子について、その予後への影響を解析した。犬の正常リンパ節における発現量と比較したところ、*p16* mRNA の発現は、62 例中 53 例で低下(うち 21 例で検出限界未満)しており、9 症例で上昇していた。この 62 例のうち、18 例で *p15* mRNA が検出限界未満であり、10 例で *p14* mRNA が検出限界未満であった。また、検討可能であった 68 例中 20 例において、*p16* 遺伝子 CpG island のメチル化が検出された。単変量解析では、*p16* 発現レベル、WHO 臨床サブステージ、免疫学的細胞系統、および解剖学的発生部位が予後に影響を与える因子として検出された。多変量解析の結果、*p16* 発現レベル(上昇)および免疫学的細胞系統(T 細胞系由来)といった 2 因子が負の予後因子として抽出された。しかし、*p16* CpG island のメチル化および *p15*, *p14* 遺伝子の発現量は生存期間に影響していなかった。また、*p16* 遺伝子の発現低下と同遺伝子 CpG island のメチル化との間には関連が認められず、その発現制御に DNA メチル化以外のエピジェネティックな機構も関与していることが推測された。

第 4 章：犬リンパ系腫瘍細胞におけるヒストン H3 アセチル化による *p16* 遺伝子の発現制御

第 3 章において、犬の高悪性度リンパ腫細胞において *p16* 不活化には DNA メチル化以外のエピジェネティックな機構が関与していることが示唆された。そこで、本章では 4 種類の犬リンパ系腫瘍細胞株 (CLBL-1, GL-1, UL-1, CL-1)においてヒストン H3 脱アセチル化による不活化機構について検討した。ヒストン H3 のアセチル化レベルの検討にはクロマチン免疫沈降法を用いた。また、ヒストン脱アセチル化阻害薬である trichostatin A (TSA) 存在下で培養し、その前後における *p16* 遺伝子発現量の変化を検討した。

その結果、*p16* mRNA 低発現の3株(CLBL-1, GL-1, UL-1)では、*p16* mRNA 高発現株(CL-1)に比べて、*p16* 遺伝子 exon 1 ゲノム領域が低アセチル化状態にあることが示された。TSA 存在下で培養したところ、2種の細胞株(GL-1, UL-1)では*p16* mRNA 発現量の有意な増加が認められ、当該ゲノム領域のアセチル化レベルの上昇が観察された。これら細胞株で認められたヒストン H3 の低アセチル化による*p16* 遺伝子の不活化も犬のリンパ系腫瘍における分子生物学的な変化の一つと考えられた。

以上のように、本論文では、犬のリンパ系腫瘍において複数の*p16*, *p15*, *p14* 遺伝子のジェネティックな異常およびエピジェネティックな制御について明らかにすることができた。これら研究成果は、犬のリンパ系腫瘍の病態解明の一助となるばかりではなく、将来的なエピジェネティック医薬品の開発にもつながる可能性もあり、臨床獣医学および比較腫瘍学に関する重要な知見を提供するものと考えられる。