

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 藤原 亜紀

P16, P15, P14は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。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。犬のリンパ系腫瘍においては、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* 遺伝子の不活化

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 *p15, p14* 遺伝子との exon の共有や高い相同性を認めたため、*p16* 全長を同定しそれぞれに特異的なプライマーを作製し発現解析を行った。またこれら遺伝子が座位する 11 番染色体の領域に設計したプライマーを用いたゲノム PCR を行った。6 種類の犬のリンパ系腫瘍細胞株においては 2 種類の T 細胞性リンパ系腫瘍細胞株において、*p16, p15, p14* 遺伝子すべての発現が消失、また当該領域のゲノム 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。リンパ系腫瘍症例より採取した腫瘍サンプルにおいては同様の異常が 2 例の T 細胞性リンパ系腫瘍症例で認められた。以上の所見から、これら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ジェネティック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において *p16* 遺伝子発現低下が認められたが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* 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、メチル化阻害薬である 5-Aza-2'-deoxycytidine(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細胞株においては、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 *p16* 遺伝子の不活化は犬のリンパ腫細胞におけるエピジェネティックな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。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。*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

本章では 4 種類の犬リンパ系腫瘍細胞株においてヒストン H3 低アセチル化による不活化機構について検討した。*p16* mRNA 低発現の 3 株では、*p16* mRNA 高発現株に比べて、*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。ヒストン脱アセチル化阻害薬である trichostatin A 存在下で培養したところ、2 種の細胞株では *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エピジェネティックな変化の一つと考えられた。

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。よって、審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値のあるものと認めた。