

審査の結果の要旨

氏名 富田 彬正

細胞のクローン性評価は腫瘍性疾患の補助的な診断に有用だが、リンパ系腫瘍以外の犬の腫瘍では疾患特異的な遺伝子異常も含めて、分子生物学的にクローン性を示すことは困難である。

X染色体不活化パターン(X-chromosome inactivation pattern, XCIP)解析は、メスの体細胞が持つ2本のX染色体のうちの片方が胎生期にランダムにDNAメチル化を起こし、その形質が分裂後の細胞にも継承されることを用いたクローン性解析法である。メス個体に限定される一方、あらゆる細胞のクローン性解析に応用可能である。しかし、純粋品種個体の多い犬では、X染色体上のアンドロジェンレセプター(androgen receptor, AR)遺伝子におけるマイクロサテライト多型により各X染色体を区別することが不可能なホモ接合体が多いことが問題であった。

そこで本研究では、はじめに犬におけるXCIP解析システムの適用率を上げるための改良を行い、その後犬の造血器疾患におけるクローン性細胞集団の存在を実証した。

第1章

SLIT and NTRK-like family, member 4 (SLITRK4)遺伝子の多型解析の併用による犬のX染色体不活化パターン(XCIP)検査の改良

AR遺伝子を用いた犬のXCIP解析の系を改良するために、SLIT and NTRK-like family, member 4 (SLITRK4)遺伝子を併用したXCIP解析系を構築し、その有用性について検討した。

AR遺伝子とSLITRK4遺伝子を併用することで、ヘテロ接合性を示す症例をメス個体全体の83%へと上昇させることが可能となり、XCIP解析の適用率を上げることができた。次に健常メス犬の末梢血液DNAを用いて、非腫瘍性細胞集団における不活性アレル比(corrected inactivation allele ratio, CIAR)の基準範囲を4.0未満とした。さらに、XCIP解析におけるCIARに対する年齢の影響を検討するため、異なる年齢群の個体から採取した末梢血DNAにおけるCIARを求めたところCIARが4.0を超える個体は全体の6.8%(16/236)で見られたが、その出現頻度と年齢との間に関連は認められなかった。また、同一個体28頭由来の末梢血DNAと各種正常組織DNAについてCIARを比較したが、両者の間に相関は認められなかった。

本章では、SLITRK4遺伝子の解析を組み合わせることにより臨床的有用性の高いXCIP解析システムを開発することができた。

第2章

犬の真性赤血球増加症におけるX染色体不活化パターン(XCIP)解析を用いた血球のクローン性の評価

真性赤血球増加症(polycythemia vera, PV)は赤芽球系細胞の自律性増殖を特徴とし、犬においても

まれに発生が認められる。人の PV では 60%以上の症例において末梢血白血球にクローン性が、90%程度の症例で JAK2 遺伝子の変異 (V617F) が検出されるが、犬の PV ではクローン性に関する報告はなく、診断は赤血球増加症を引き起こす各種疾患の除外に基づいている。

本章では、犬の PV における臨床病理学的特徴の評価と、XCIP 解析を用いたクローン性細胞集団の検出を試みた。臨床的・血液学的に PV と診断した 8 例のうち、白血球増加症および血小板増加症の併発がそれぞれ 1 例および 2 例認められた。

XCIP 解析は 8 例のうち 6 例 (75%) で可能であり、末梢血液では 6 例中 5 例 (83%) で、骨髄では 3 例中 2 例で高い CIAR (>4.0) を示した。一方、T リンパ球における CIAR は低値 (<4.0) であった。また、JAK2 V617F 遺伝子変異についてはいずれも当該変異は認められなかった。

本研究により、犬の PV において異常な骨髄系幹細胞に由来するクローン性に増殖した細胞集団の存在が示され、臨床における XCIP 解析の利用が期待される。また、犬の PV では人の PV とは異なり汎血球増加症が稀である点や、同様の遺伝子変異が検出されないなどの差異が見られた。今後は病態の原因となる他の遺伝子変異を探索していく必要があるものと思われた。

第 3 章

犬の骨髄異形成症候群における X 染色体不活化パターン (XCIP) 解析を用いた血球のクローン性検出

骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome, MDS) は骨髄細胞およびそれに由来する成熟血球の異形成と無効造血を特徴とする疾患群である。人の MDS は 60 - 100% の症例でクローン性が検出される、前白血病段階の疾患とされている。犬においても類似した病態がしばしば観察されるが、その診断は形態学的異常に基づくために客観的な診断手法が求められている。

本章では、犬の MDS における臨床病理学的特徴の評価と、XCIP 解析を用いたクローン性細胞集団の検出を試みた。人における WHO 分類 (2008) を参考にして MDS と診断した 15 例のうち、12 例で非再生性貧血、2 例で好中球減少症、7 例で血小板減少症が認められ、非再生性貧血の 2 例では著しい血小板増加症の併発が見られた。異形成を示唆する形態異常は、分離多核巨核球 (6/15, 40%)、巨赤芽球様変化 (3/15, 20%)、微小巨核球 (4/15, 27%) などが観察された。

XCIP 解析が可能であった 12 例のうち、末梢血液では 11 例中 4 例 (36%)、骨髄では 9 例中 6 例 (67%) において高い CIAR (>4.0) が得られ、クローン性細胞集団の存在が示唆された。

この結果より犬の MDS は異常な造血管細胞に起因するクローン性増殖性疾患であることが示された。本解析は犬の MDS の診断および病態解析に新たな展開を与えるものと期待される。

一連の研究により、XCIP 解析によるクローン性解析を犬の造血器系腫瘍の診断に応用することが可能となった。本解析は、多彩な造血器系疾患における新たな検査手法を提供するとともに、病態解明など臨床腫瘍学の発展に寄与するものと考えている。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと思われた。