

論文の 内容の要旨

獣医学専攻

平成 29 年度博士課程入学

氏 名 谷 章禎

指導教員名 辻本 元

論文題目 Molecular pathogenesis of bone marrow disorders in dogs
(犬の骨髓疾患における分子病態の解析)

骨髓疾患はさまざまな血液学的異常をきたす疾患であり、犬においても非再生性貧血をはじめ多彩な病態が認められ、その発症機序から腫瘍性疾患、低形成性疾患、および異形成性疾患に分類される。このうち非腫瘍性疾患には非再生性免疫介在性貧血 (NRIMA)、再生不良性貧血、赤芽球癆、骨髓異形成症候群 (MDS) などが含まれ、骨髓疾患全体のおよそ 6 割を占めると報告されている。これまでに報告されている犬の非腫瘍性骨髓疾患の病態解析に関する研究はおもに臨床病理学および病理組織学的な観点から行われており、その分子病態を解析した研究は限られている。

本研究では、まず本邦において犬に発生する非再生性貧血を主徴とする非腫瘍性骨髓疾患の臨床的特徴を検討した。その結果、好発犬種としてミニチュアダックスフント (MD) が同定され、免疫抑制治療に反応が認められた MD 症例(治療反応性 MD)と反応が認められなかった MD 症例(治療抵抗性 MD)の間には臨床病理学的特徴の相違点が示された (第一章)。そこで、MD に発生する非腫瘍性骨髓疾患は何らかの共通性のある分子生物学的異常によって生じているという仮説を立案し、ゲノム DNA 塩基配列異常の網羅的探索 (第二章)、DNA メチル化異常のゲノムワイドな探索 (第三章)、および遺伝子発現異常の網羅的解析 (第四章) といった一連の分子生物学的解析を行った。

第一章：犬に発生する非腫瘍性骨髓疾患の臨床的・臨床病理学的特徴の検討

まず本邦における犬の非腫瘍性骨髓疾患の特徴を明らかにするため、臨床情報を回顧的に検討した結果、MD では他犬種と比較して非腫瘍性骨髓疾患と診断される頻度が有意に高いことが明らかになった。この結果から、MD と他犬種に症例を分類し、その臨床病理学的特徴を比較したところ、MD では他犬種と比較して、血小板数が有意に増加していること

および末梢血液塗抹において血球に異形成所見が認められる頻度が有意に高いことが明らかになった。次に、非腫瘍性骨髄疾患に対する一般的な治療である免疫抑制治療に対する反応性によって治療反応性 MD と治療抵抗性 MD に分類して臨床病理学的特徴を比較したところ、治療抵抗性 MD において有意に血小板数が増加していること、末梢血液塗抹における血球の異形成所見がより高頻度に認められること、そして末梢血液細胞のクローン性が有意に高頻度に認められることが明らかになった。以上の結果から、MD には非腫瘍性骨髄疾患を好発する遺伝的素因があること、また治療抵抗性 MD は治療反応性 MD や他犬種とは異なる特徴を有することが判明した。また、治療抵抗性 MD に認められた臨床病理学的特徴は特定の遺伝子変異を有する MDS モデルマウスと類似していたため、これらの症例は何らかの分子異常に起因する疾患を有している可能性が示唆された。

第二章：非腫瘍性骨髄疾患に罹患した MD における網羅的な遺伝子変異の解析

第一章の結果を受けて、本章では末梢血由来 DNA を用いた全エクソーム解析(WES)によって、非腫瘍性骨髄疾患に罹患した MD の血液細胞における遺伝子変異の網羅的な探索を行った。まず、治療抵抗性 MD(n=4)と血液学的異常が認められない MD(コントロール MD, n=3)から得た末梢血液を WES に供した。その結果、3,377 のヘテロ遺伝子変異が治療抵抗性 MD において認められた。このうち 4 頭の治療抵抗性 MD に共通していた遺伝子変異に関して、コントロール MD(n=18)、治療反応性 MD(n=13)、および治療抵抗性 MD(n=12)における遺伝子変異の有無をサンガー法によって解析した。その結果、*UMODL1* 遺伝子変異が治療反応性 MD および治療抵抗性 MD において認められ、コントロール MD には認められなかった。次に、WES において 3 頭以上の治療抵抗性 MD に共通して認められていた遺伝子変異を抽出し、これらが関連する生物学的機能をエンリッチメント解析によって検討したが、非腫瘍性骨髄疾患との関連が示唆される遺伝子群は抽出されなかった。第一章において治療抵抗性 MD に認められた血液学的異常が MDS モデルマウスと類似していたことから、ヒトの MDS において高頻度に変異が認められる遺伝子に着目して検討した。WES では 4 頭の治療抵抗性 MD において *STAG2*、*BCORL1*、*NCOR2*、*FLT3* の 4 遺伝子における変異が認められたため、サンガー法によってこれらの遺伝子変異の有無をコントロール MD(n=18)、治療反応性 MD(n=13)および治療抵抗性 MD(n=12)において解析した。その結果、*STAG2* 遺伝子の変異が認められた症例は WES で変異が検出された治療抵抗性 MD 1 頭のみであった。本章における研究により、*UMODL1* 遺伝子変異が MD における非腫瘍性骨髄疾患の発症に関与している可能性が示唆された。一方、治療抵抗性 MD に特異的な遺伝子変異は同定されなかったため、治療反応性 MD と治療抵抗性 MD の病態の違いを明らかにするためにはさらなる探索が必要と考えられた。

第三章：非腫瘍性骨髓疾患に罹患した MD における全ゲノム DNA メチル化解析

第二章の研究において、治療感受性 MD と治療抵抗性 MD の間に存在する遺伝子変異は同定されなかった。そこで本章では、とくに治療抵抗性 MD の病態にはゲノム塩基配列の変化を伴わないエピジェネティック機構が関与しているという仮説を立て、最も一般的なエピジェネティック異常である DNA メチル化異常をゲノム網羅的に探索することとした。3 頭の健常犬と 2 頭の治療感受性 MD、1 頭の治療抵抗性 MD の骨髓液を用い、DREAM (DNA methylation by digital restriction enzyme analysis of methylation)法によってゲノム網羅的な DNA メチル化解析を行った。その結果、健常犬と比較して治療感受性 MD および治療抵抗性 MD において 28 遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化変動が認められた。そこで、この DNA メチル化異常に伴う遺伝子発現変化を検討するため、健常犬 (n=5)、治療感受性 MD (n=5) および治療抵抗性 MD (n=5) から得た骨髓液を用いてこれらの mRNA 発現量を RT-qPCR 法にて定量し比較した。その結果、健常犬、治療感受性 MD と比較して治療抵抗性 MD では *SFRP2* 遺伝子の発現が有意に低下していることが明らかになった。そこで、バイサルファイト・パイロシーケンス法を用いて *SFRP2* 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を解析したが、健常群、治療感受性 MD 群、治療抵抗性 MD 群の間に統計学的に有意な変化は認められなかった。本章では、DNA メチル化異常およびそれに伴う遺伝子発現抑制を検討したところ、治療抵抗性 MD に特異的な変化は認められなかった一方で、偶発的に *SFRP2* 遺伝子の発現が治療抵抗性 MD 群で有意に低下していることが明らかになった。この発現低下には当該遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化異常とは異なる機構が関与しているものと考えられた。

第四章：非腫瘍性骨髓疾患に罹患した MD における骨髓細胞の網羅的な遺伝子発現解析

本章では治療抵抗性 MD における遺伝子発現変化を RNA シーケンス (RNA-seq) によって網羅的に探索した。材料として健常犬 (n=3) から得た骨髓液と治療抵抗性 MD (n=3) から得た骨髓液を用い、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、健常犬と治療抵抗性 MD の間で発現量が異なる遺伝子 (DEG) として 179 遺伝子が抽出された。これらの DEG を用いたエンリッチメント解析の結果、Wnt シグナリング経路に関わる遺伝子群が有意に多く含まれることが示された。そのため、Wnt シグナリング経路に関わる遺伝子群の発現量に関して、健常群 (n=5)、治療感受性 MD 群 (n=5)、治療抵抗性 MD 群 (n=5) の間で RT-qPCR を用いて比較した結果、治療抵抗性 MD 群において *SFRP2* 遺伝子と *AXIN2* 遺伝子の発現低下、および *CCND2* 遺伝子の発現上昇が認められた。*SFRP2* および *AXIN2* は Wnt シグナリングの負の制御因子であり、*CCND2* は Wnt シグナリング経路の

活性化により発現が上昇するため、本章の結果は治療抵抗性 MD 群の骨髄において Wnt シグナリングが活性化していることを示すものと考えられた。

MD に発生する非腫瘍性骨髄疾患の病態を解明するため、一連の分子生物学的解析を行ったところ、まず *UMODL1* 遺伝子変異が MD における非腫瘍性骨髄疾患の発症に関与している可能性が示唆された。続いて、治療感受性 MD と治療抵抗性 MD の比較では Wnt シグナリングの活性化状態が異なることが示された。また Wnt シグナリングの活性化は人の MDS においても報告されており、治療抵抗性 MD はヒトの MDS に類似した疾患であることが示唆された。さらに今回検出された Wnt シグナリングの活性化は、今後、治療抵抗性 MD の新規治療標的となる可能性も考えられた。本研究によって得られた成果は、獣医学領域における骨髄疾患の客観的診断法の提唱および新規治療法の開発に有用であるとともに、人における近縁疾患の病態解明のための比較医学的知見を提供しうるものと考えられる。