

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 谷 章 禎

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、再生不良性貧血、赤芽球癆、骨髓異形成症候群などが含まれ、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た。本研究は犬の非腫瘍性骨髓疾患の病態を臨床病理学的解析および分子生物学的解析によって明らかにすることを目的として実施された。

第 1 章では、ミニチュアダックスフント (MD) が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を明らかにしている。次に、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 に分け、その臨床病理学的特徴を比較した。治療抵抗群においては、有意に血小板数が増加していること、血球の異形成所見がより高頻度に認められること、さらに血球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となった。以上の結果から、MD には非腫瘍性骨髓疾患を好発する遺伝的素因があること、また治療抵抗群は治療反応群とは異なる臨床病理学的特徴を有することが示された。

第 2 章では、第 1 章の結果を受け、末梢血由来 DNA を用いた全エキソーム解析(WES)によって、非腫瘍性骨髓疾患に罹患した MD の血液細胞における遺伝子変異の網羅的な探索が行われた。4 頭の治療抵抗性 MD と血液学的異常が認められない 3 頭のコントロール MD 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 *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。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 3 章では、第 2 章の結果を受け、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の一つとして DNA メチル化の変化をゲノム網羅的に探索している。3 頭の健常犬、2 頭の治療感受性 MD、および 1 頭の治療抵抗性 MD の骨髓由来 DNA を用い、ゲノム網羅的な DNA メチル化解析が行われた。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 27 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。また、メチル化変動遺伝子の mRNA 発現量を RT-qPCR 法によって定量し、治療抵抗性 MD においては高メチル化が認められた *SFRP2* 遺伝子の発現が有意に低下していることを示している。

第 4 章では、第 3 章の結果を受け、治療抵抗性 MD に特徴的な遺伝子発現変動が存在するという仮説のもと、健常犬 3 頭と治療抵抗性 MD 3 頭より採取した骨髓由来 RNA を用い、RNA シーケンスが行われた。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。エンリッチメント解析により、これら DEG には 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。また、RT-qPCR を用いて他症例を含めて比較した結果、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ことが知られているため、本章の結果は治療抵抗性 MD の骨髓においては Wnt シグナリングが活性化が存在することを示していた。

以上の研究において、申請者は犬の非腫瘍性骨髓疾患は MD において好発すること、また、その治療反応性群と治療抵抗群の間で異なる臨床病理学的特徴が存在することを明らかにした。次に、申請者は非腫瘍性骨髓疾患に罹患した MD に関する網羅的な分子生物学的解析を行い、*UMODL1* 遺伝子の変異が MD における非腫瘍性骨髓疾患の発症に関与している可能性があること、また治療感受性 MD と治療抵抗性 MD との間で Wnt シグナリング活性化状態が異なることを示した。これら研究成果は、獣医学領域における骨髓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り、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認めた。