

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成23年度博士課程入学

氏名 日吉 沙綾

指導教員名 辻本 元

論文題目 Studies on GeneScan analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes in canine lymphoproliferative diseases
(犬のリンパ増殖性疾患における免疫グロブリンおよびT細胞受容体遺伝子のGeneScan解析に関する研究)

リンパ系腫瘍における細胞のクローン性を解析するため、免疫グロブリン重鎖(immunoglobulin heavy chain, IgH)遺伝子およびT細胞受容体 γ 鎖(T-cell receptor γ chain, TCR γ)遺伝子の再構成を polymerase chain reaction (PCR)を解析する検査(PCR for antigen receptor gene rearrangement, PARR)が開発された。さらに、近年の人医学領域においては、従来のポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)法に代わって、複数の蛍光プライマーを用いて増幅したPCR産物をキャピラリー電気泳動で解析する GeneScan が用いられるようになってきている。本解析法はPAGEと比較して高い分解能を持ち、増幅産物の核酸長を正確に測定可能であることと同時に、多数のサンプル処理が可能であるといった利点を有している。獣医学領域においても、GeneScanの臨床への導入によって、リンパ系細胞のクローン性解析検査が格段に進歩するものと考えられた。

そこで本研究では、リンパ増殖性疾患に罹患した犬の症例から採取したサンプルについて GeneScan による PARR 解析を実施し、本解析法の臨床的有用性の検討と病態の解明を目的として以下の一連の研究を行った。まず第1章において、犬の胃腸管型リンパ腫の診断における本解析法の有用性を検討した。続いて第2章において、本解析法を犬のリンパ腫における血中循環腫瘍細胞の検出に応用した。最後に第3章では、悪性度の異なる2種類のリンパ系腫瘍を発症した症例において、それら腫瘍細胞クローンの由来を解析した。

第1章：犬の慢性腸症におけるリンパ球の抗原レセプター遺伝子再構成と病理組織学的評価との関連

犬では慢性の消化器症状を呈する疾患として、慢性腸炎と胃腸管型リンパ腫がしばしば認められる。両疾患の鑑別には病理組織学的評価が必要とされるが、内視鏡下生検材料を用いた場合にはリンパ腫が見落とされる危険性がある。近年では、その診断の一助として PARR 解析が実施されるが、組織学的に慢性腸炎と診断された症例においてもしばしばクローン性再構成が認められ、PARR 解析結果の解釈については不明な点が多かった。そこで本章では、胃腸管型リンパ腫診断における PARR 解析の有用性を検討するため、慢性の消化器症状を呈する犬の症例において、GeneScan による PARR の解析結果と病理組織学的評価および生存期間との関連を検討した。

慢性消化器症状を呈した 117 頭の犬に関して、消化管内視鏡下生検材料を用いた病理組織学的検討を行い、慢性腸炎(n = 96)と胃腸管型リンパ腫(n = 21)に分類した。さらに、慢性腸炎症例については、病理組織学的重症度を、軽度、中等度、重度[リンパ球の上皮向性なし]、重度[リンパ球の上皮向性あり]、の 4 群に分類した。次に、十二指腸生検組織を用いて GeneScan による PARR 解析を実施し、その両者の解析結果を比較検討した。その結果、病理組織学的に慢性腸炎と診断された症例においても、その 51%の症例でクローン性再構成が検出された。さらに、組織学的重症度が高くなるにしたがってクローン性再構成を示す症例の比率が上昇していた(軽度 29%、中等度 40%、重度[リンパ球の上皮向性なし]48%、重度[リンパ球の上皮向性あり]66%)。一方、胃腸管型リンパ腫症例におけるクローン性再構成陽性率は 76%であった。

これら症例の予後について検討したところ、慢性腸炎症例群と胃腸管型リンパ腫症例群との間、また、軽度/中等度慢性腸炎症例群と重度慢性腸炎症例群との間において、生存期間に有意差が認められた。一方、慢性腸炎症例のクローン性再構成の陽性群と陰性群との間において、生存期間に有意差は認められなかった。

本研究では、慢性腸炎症例において、クローン性再構成陽性群とその陰性群との間に生存期間に有意差が認められなかったことから、胃腸管型リンパ腫の診断における PARR の有用性に関しては依然として疑問が残る結果となった。ここで検出されたようなクローン性に増殖したリンパ球の存在が、特定の抗原刺激による反応性増殖によるものか、あるいは腫瘍性増殖(小細胞性胃腸管型リンパ腫)によるものかについては結論は得られず、今後のさらなる検討が必要と考えられた。

第2章：犬のリンパ腫における GeneScan を利用したリンパ球の抗原レセプター遺伝子再構成解析による血中循環腫瘍細胞の検出

血中循環腫瘍細胞(circulating tumor cells, CTCs)の検出は、犬のリンパ腫の診断や予後予測にお

いて有用である可能性が示唆されている。従来の PAGE による PARR 解析は、共通プライマーを用いるものであるため精度が不十分であった。一方、個々の症例での腫瘍細胞特異的なプライマーを用いたリアルタイム PCR による CTCs の定量は、正確かつ高感度である一方、症例ごとにプライマーを設計する必要がある、煩雑かつ高コストであった。そこで本章では、前者よりも精度が高く、また後者よりも臨床応用しやすい方法を開発するため、GeneScan を用いた CTCs 検出の有用性を検討し、また CTCs の有無による予後の比較を行った。

高悪性度多中心型リンパ腫 17 症例、低悪性度多中心型リンパ腫 3 症例、胃腸管型リンパ腫 12 症例の診断時における病変部および末梢血単核球(PBMCs)を用いて PARR を行った。その結果、高悪性度多中心型リンパ腫症例の 76%(13/17)、低悪性度多中心型リンパ腫症例の 100%(3/3)、および胃腸管型リンパ腫症例の 33%(4/12) において、病変部と PBMCs の両方でクローン性遺伝子再構成が検出され、かつ共通の核酸長を持つ増幅産物が得られた。高悪性度多中心型リンパ腫と胃腸管型リンパ腫の各 1 症例について、両サンプルにおける増幅産物の塩基配列を比較したところ、PBMCs において前者では 7/7 クローン、後者では 5/12 クローンが腫瘍病変部と同一の塩基配列を有しており、CTCs の存在が確認された。続いて、高悪性度多中心型リンパ腫について CTCs の検出群と非検出群との間で生存期間を比較したが、有意差は認められなかった。また、胃腸管型リンパ腫 12 頭のうち 5 頭 (42%)では、病変部と PBMCs の両方でクローン性再構成が認められたものの、PBMCs において病変部とは異なる核酸長を持つ増幅産物しか検出されず、その両者の間に共通する増幅産物は認められなかった。

本研究では、多中心型リンパ腫症例の 80%、胃腸管型リンパ腫症例の 33%で GeneScan による CTCs の検出が可能であった。また、病変部と異なるリンパ球クローンが末梢血液中に検出される場合があることが示され、病変部および PBMCs におけるクローンの比較が必須であることが示された。今後は、本解析法を用いた治療開始後における CTCs モニタリングの臨床的有用性の検討が必要と考えられた。

第 3 章：悪性度の異なる 2 つのリンパ系腫瘍を発症した犬における GeneScan を利用したリンパ球クローンの由来の識別

低悪性度リンパ系腫瘍に罹患した症例において、その臨床経過中により悪性度の高いリンパ腫を発症する症例が人医学領域で報告されており、このような病態はリヒター症候群と呼ばれる。犬においても、これに類似した臨床経過をしばしば経験することがあり、症例報告もあるが、これら 2 つの腫瘍が同一のクローン由来か、あるいは別々のクローンに由来するかについては議論があった。そこで本章では、同一個体内に発生した悪性度の異なる 2 つのリンパ系腫瘍におけるリンパ球クローンの由来を GeneScan による PARR 解析によって検討した。

初診時に辺縁帯リンパ腫(marginal zone lymphoma, MZL; n = 1)、B 細胞性慢性リンパ性白血病

(B-cell chronic lymphocytic leukemia, B-CLL; n = 1)あるいはT領域リンパ腫(T-zone lymphoma, TZL; n = 2)と診断され、初診時から1年以上経過した後にB細胞性高悪性度リンパ腫を発症した合計4症例と、初診時にMZLと診断され、後に濾胞中心細胞リンパ腫(follicular center cell lymphoma, FCCL)を発症した1症例を用いた。MZLまたはB-CLLに罹患していた3症例においては、原発腫瘍と続発腫瘍の間で同一の核酸長を有するIgH遺伝子増幅産物を示す単一のピークが検出され、2つの腫瘍が同一のクローン由来であることが示された。塩基配列解析を行ったところ、いずれの症例についても半数以上のクローンが2つの腫瘍に共通していることが示された。TZLに罹患していた2症例においては、原発腫瘍においてはTCR γ 遺伝子のクローン性再構成を示す単一のピークが検出されたが、続発腫瘍においてはTCR γ 遺伝子のクローン性再構成は認められず、IgH遺伝子のクローン性再構成を示す単一のピークが検出され、2つの腫瘍が異なるクローンに由来することが示された。

本研究により、犬における悪性度の異なる2つのリンパ系腫瘍は、同一あるいは別々のクローンを由来として発生することが示された。GeneScanによるPARR解析は犬のリンパ系腫瘍においてそのクローンの由来を解析するために、簡便かつ精度の高い手法であると考えられた。

本研究では、リンパ増殖性疾患に罹患した犬の臨床例の様々な状況において、GeneScanによるPARR解析を実施し、それぞれの病態とリンパ系細胞クローンとの関連を調査した。これら一連の研究により、GeneScanによるPARR解析の臨床的有用性が実証されたが、それに加えて、犬のリンパ増殖性疾患における細胞のクローン性増殖の面から見た病理発生機序が明らかとなった。今後、本研究によって得られた成果を臨床現場にフィードバックすることにより、獣医臨床腫瘍学におけるトランレーショナルリサーチを促進できると考えている。