

氏名 (本 (国) 籍)	Mohammad Monir Tawfeeq (アフガニスタン・イスラム共和国)
主指導教員名	帯広畜産大学 教授 猪熊 壽
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第420号
学位授与年月日	平成26年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学位論文題目	Studies on the Clinical Usefulness of Serum and Gene Biomarkers for Diagnosis of Bovine Leukosis (牛白血病診断のための血清および遺伝子バイオマーカーの臨床的有用性に関する研究)
審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 古林 与志安 副査 帯広畜産大学 教授 猪熊 壽 副査 岩手大学 教授 佐藤 繁 副査 東京農工大学 教授 竹原 一明 副査 岐阜大学 教授 前田 貞俊

学位論文の内容の要旨

牛白血病は最も一般的な牛の腫瘍性疾患であり、近年日本でその発生が増加している。牛白血病の臨床的診断は、末梢血液中のリンパ球増多症、異型リンパ球増加および腫大体表リンパ節中の腫瘍細胞の確認といった臨床病理学的所見に基づいて行われる。しかし、牛白血病発症例の中には、非典型的症例、すなわちリンパ球数増加や異型リンパ球出現がなく、体表リンパ節腫大が認められない症例がある。このような非典型的症例では臨床現場における牛白血病の確定診断が困難である。医学療域では腫瘍診断に様々なバイオマーカーが用いられているが、牛白血病の診断マーカーは少ない。そこで本研究では、血清チミジンキナーゼ活性 (TK) および末梢血中の遺伝子発現に着目し、牛白血病診断のためのバイオマーカーとしての有用性を検討した。

まず、第1章では、非典型的牛白血病の臨床診断における血清TKの有用性の検討を行った。血清TKは犬や人の血液腫瘍の検出に用いられており、近年、典型的牛白血病診断においても上昇することが知られている。しかし、生前に診断困難であった牛白血病症例にお

ける血清 TK の有用性はこれまで評価されていない。本章では、臨床的に診断可能であった牛白血病 36 頭、牛白血病以外の腫瘍性疾患 13 頭、および炎症性疾患の症例 14 頭において血清 TK を測定し、生前に診断困難であった牛白血病症例 24 頭のそれと比較検討した。生前に診断困難であった牛白血病群の血清 TK 中央値は 36.8 IU/L であり、臨床的に診断可能であった牛白血病群（同 39.4 IU/L）との間に有意な差は認められなかった。また、生前に診断困難であった牛白血病群では、牛白血病以外の腫瘍性疾患群（同 1.8 IU/L）および炎症性疾患群（同 1.4 IU/L）と比較し、有意に高い血清 TK 値を示した。これらの結果から、血清 TK の測定は臨床的に診断可能であった牛白血病同様、非典型的で生前の診断が困難な牛白血病の診断においても有用であることが示唆された。

次に第 2 章では、末梢血の遺伝子発現解析が牛白血病の新しい診断バイオマーカーとして利用可能かどうかを予備的に検討するために、子牛型、胸腺型、地方病型の 3 つの異なるタイプの牛白血病臨床例を材料に、腫瘍組織から mRNA を抽出し、各種遺伝子の発現状況を解析した。候補遺伝子としては、医学療域において血液腫瘍症例での発現増加が知られている interleukin-2 receptor (*IL2R*), thymidine kinase-1 (*TK1*), immunoglobulin-associated alpha 1 (*MB1*) の遺伝子に着目した。その結果、子牛型と地方病型の 2 症例では *IL2R* と *TK1* が過剰に発現していた。また、胸腺型と地方病型の 2 症例では *MB1* 発現が増加していた。これらの結果から腫瘍組織中の *IL2R*, *TK1*, *MB1* の発現状態は牛白血病の診断バイオマーカーとして有用である可能性が示された。

最後に第 3 章では、*IL2R*, *TK1*, *MB1* に加えて cytochrome P450 family 1-subfamily B-polypeptide 1 (*CYP1B1*), cyclin-dependent kinase-4 inhibitor (*CDKN2A*), Wilms' tumor 1 (*WT1*), high B-cell lymphoma/leukemia protein (*BCL2*), phosphodiesterase (*PDE7B*), 癌抑制遺伝子 *P53* の遺伝子発現量を定量 RT-PCR により解析し、とくに地方病型牛白血病の診断バイオマーカーとしての有用性を検討した。地方病型牛白血病発症牛 13 頭、健康牛 15 頭、および牛白血病以外の疾患牛 9 頭の末梢血の各遺伝子発現量を比較した。その結果、地方病型牛白血病症例の遺伝子発現量は個体により大きく差があるものの、地方病型牛白血病症例 13 頭中、4 頭の *IL2R* 発現量と 5 頭の *WT1* 発現量が、他群の中央値と比較し著明に高値を示した。また、地方病型牛白血病群の *IL2R* 発現量は他群と比べて有意に高かった。これらの結果から、*IL2* および *WT1* の発現は地方病型牛白血病診断のためのバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

以上の結果から、本研究で検討した血清 TK およびいくつかの末梢血遺伝子発現量は、牛

白血病の発症診断のためのバイオマーカーとして有用である可能性が示された。

審 査 結 果 の 要 旨

牛白血病の臨床診断は、末梢血液中のリンパ球増多症、異型リンパ球増加および腫大体表リンパ節中の腫瘍細胞の確認といった臨床病理学的所見に基づいて行われる。しかし、臨床現場では、このような特徴的所見を示さず、確定診断が困難な非典型的症例も多い。そこで本研究では、血清チミジンキナーゼ活性 (TK) および末梢血中の遺伝子発現に着目し、牛白血病診断のためのバイオマーカーとしての有用性を検討した。

まず、申請者は生前に診断困難であった牛白血病群の血清 TK が、臨床的に診断可能であった牛白血病群と同程度であり、また、牛白血病以外の腫瘍性疾患群および炎症性疾患群と比較し、有意に高い値であることを明らかにし、血清 TK 測定が非典型的で生前診断が困難な牛白血病の診断に有用であることを示した。

次に、牛白血病の新しい診断バイオマーカーとしての遺伝子発現解析の利用可能性を予備的に検討するため、3つの異なる型の牛白血病臨床例を材料に、interleukin-2 receptor (*IL2R*), thymidine kinase-1 (*TK1*), immunoglobulin-associated alpha 1 (*MB1*) 各遺伝子の発現状況を解析した。その結果、子牛型と地方病型症例では *IL2R* と *TK1*, また、胸腺型と地方病型症例では *MB1* 発現の増加を確認し、これら遺伝子発現は牛白血病の診断バイオマーカーとして有用である可能性を示した。

最後に、*IL2R*, *TK1*, *MB1*に加えて、cytochrome P450 family 1-subfamily B-polypeptide 1 (*CYP1B1*), cyclin-dependent kinase-4 inhibitor (*CDKN2A*), Wilms' tumor 1 (*WT1*), high B-cell lymphoma/leukemia protein (*BCL2*), phosphodiesterase (*PDE7B*), 癌抑制遺伝子 *P53* の遺伝子発現量を定量 RT-PCR により解析し、とくに地方病型牛白血病のバイオマーカーとしての有用性を検討した。その結果、地方病型牛白血病症例の遺伝子発現量は個体により大きく差があるものの、*IL2R* と *WT1* 発現量は未発症群と比較して著明に高値を示すことを見出し、*IL2R* と *WT1* 発現が地方病型牛白血病の診断バイオマーカーとして有用である可能性を明らかにした。

以上、本研究では、血清 TK およびいくつかの末梢血遺伝子発現が、牛白血病の発症診断バイオマーカーとして有用である可能性が明らかとなった。これらの知見は我が国における牛白血病の診断および防疫の発展に大いに貢献するものである。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

1) 題 目 : Overexpression of interleukin 2 receptor, thymidine kinase and immunoglobulin-associated alpha-1 messenger RNA in a clinical case of enzootic bovine leukosis

著 者 名 : Tawfeeq, M.M., Tagawa, M., Itoh, Y., Sugimoto, K., Kobayashi, Y. and Inokuma, H.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 74(9):1203-1206, 2012

- 2) 題 目 : Calf form bovine leukosis with lameness in a holstein heifer
著 者 名 : Tawfeeq, M.M., Miura, S., Nakanishi Y., Sugimoto, Y., Kobayashi, Y.,
Furuoka, H. and Inokuma, H.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年 : 74(9) : 1225-1228, 2012
- 3) 題 目 : Thymic lymphosarcoma with brain involvement in a holstein heifer
著 者 名 : Tawfeeq, M.M., Miura, S., Sugimoto, K., Kobayashi, Y. and Inokuma,
H.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年 : 74(11) : 1501-1504, 2012
- 4) 題 目 : Utility of serum thymidine kinase activity measurements for cases
of bovine leukosis with difficult clinical diagnoses
著 者 名 : Tawfeeq, M.M., Miura, S., Horiuchi, N., Kobayashi, Y., Furuoka, H.
and Inokuma, H.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年 : 75(9) : 1167-1172, 2013
- 5) 題 目 : Evaluation of gene expression in peripheral blood cell as a potential
biomarker for enzootic bovine leukosis
著 者 名 : Tawfeeq, M.M., Horiuchi, N., Kobayashi, Y., Furuoka, H. and Inokuma,
H.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年 : 75(9) : 1213-1217, 2013

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Mechanistic study on liver tumor promoting effects of flutamide
in rats
著 者 名 : Tawfeeq, M.M., Hayashi, H., Shimamoto, K., Suzuki, K., Shibutani,
M., Inokuma, H. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 86(3) : 497-507, 2012