

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580451

研究課題名(和文) 地方病性牛白血病の発生制御に関する開発研究

研究課題名(英文) Development research on the control of enzootic bovine leucosis

研究代表者

岡崎 克則 (Okazaki, Katsunori)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：90160663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：地方病性牛白血病の原因は牛白血病ウイルス(BLV)である。本ウイルスの転写活性化因子であるTaxの233番アミノ酸がPro(P233)のウイルスに感染した牛では、L233のそれに比べ白血病的発症が2年遅いことを報告した。また、ヒト癌関連遺伝子プロモーターに対する転写調節能及びヌードマウス皮下における発現細胞の腫瘍形成能を比較し、P233の低い腫瘍原性を実証した。従って、Taxの型別は白血病発症の予後診断に有用と考えられる。さらに、初乳の凍結によりBLVの感染性が失われることを示し、本操作が初生牛の感染防止に有効なことを報告した。これらの成績は、地方病性牛白血病の防除に極めて有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bovine leukemia virus (BLV) is a causative agent of enzootic bovine leucosis. Cattle infected with the virus carrying Tax with Pro at amino acid position 233 (P233-Tax) had 2-year longer incubation period for developing tumors than those with the virus carrying L233-Tax. P233-Tax significantly downregulated the human oncogene jun and had poorer transactivation activity against cdk4 promoter than L233-Tax. P233-Tax expressing cells also formed smaller tumors in murine xenograft study than L233-Tax expressing cells. It is, therefore, considered that Tax discrimination might be useful for determining the prognosis of cattle with inapparent infections of BLV. Freezing treatment on colostrum inactivated the infectivity of BLV-infected lymphocytes to prevent the transmission of BLV among neonatal calves. These findings are expected to be useful for the control of enzootic bovine leucosis.

研究分野：Virology

キーワード：enzootic bovine leucosis bovine leukemia virus control Tax colostrum

1. 研究開始当初の背景

(1) 家畜の届出伝染病である牛白血病は牛白血病ウイルス(BLV)を病因とする地方病型(EBL)と原因不明の散発型に大別されるが、その大部分は EBL が占める。感染牛の多くは無症状であり、約 3 割がリンパ球増多症を呈し、感染牛全体の 2~3% が 5~7 歳をピークとして B 細胞性の白血病を発症し、諸臓器にリンパ肉腫を形成する。日本における現状は症例の 7 割近くが食肉検査時の摘発例であり、この場合全廃棄処分となるため経済的な被害が大きい。

(2) EBL に対する有効なワクチンは存在しないが、デンマーク、ドイツなどのヨーロッパ諸国では、抗体調査に基づく感染牛の摘発・淘汰によって BLV の清浄化に成功した。一方、我が国における牛白血病の報告数は平成 10 年の 96 頭から平成 22 年の 1775 頭と急激に増加していた。そのため、ウイルス感染牛の淘汰による BLV の清浄化は困難になりつつあり、新たな対策の構築が急務となっていた。

(3) 平成 20~22 年度の厚生労働科学研究費補助金事業によって、ウイルスの転写活性化因子である Tax の変異が EBL 発症年齢と関連する可能性を見出した。

2. 研究の目的

(1) BLV 感染牛の EBL 発症前出荷によって食肉検査での摘発を防止するため、Tax の変異を検出することに依る感染牛の予後診断法を確立する。

(2) EBL の発症予防あるいは発症遅延を目的としたワクチンを開発するための基礎的知見を得る。

(3) BLV 感染拡大を防ぐための飼養管理方法を策定する。

3. 研究の方法

(1) EBL の疫学調査：2008 年~2012 年、北海道帯広、早来及び八雲食肉衛生検査所、青森県十和田食肉衛生検査所、岩手県食肉衛生検査所、宮城県食肉衛生検査所、栃木県北食肉衛生検査所、群馬県食肉衛生検査所、茨城県西及び県北食肉衛生検査所、静岡県東部食肉衛生検査所、横浜市食肉衛生検査所、岐阜県食肉衛生検査所、京都市衛生環境研究所、奈良県食品衛生検査所、岡山県食肉衛生検査所、香川県食肉衛生検査所、徳島県食肉衛生検査所、大分県食肉衛生検査所、熊本県食肉衛生検査所及び熊本市食肉衛生検査所において牛白血病あるいはその疑いと診断され、廃棄された腫瘍組織 428 検体から常法に従いゲノム DNA を抽出した。BLVtax 遺伝子第 2 エクソン部分を含む領域を増幅するプライマー対 BLVtaxFW 及び BLVtaxRV

(5'-AGCCCAGCAGAGACATTCC-3'及び 5'-TTCTCTGGCAGCTGACGTYT-3') 10 µM 各 1.5 µL、10X AccuPrime Pfx DNA polymerase buffer (Invitrogen) 5 µL、精製水 37 µL、鋳型 DNA 4 µL をマイクロチューブに取り、2.5U/µL AccuPrime Pfx DNA polymerase (Invitrogen) 1 µL を加えた。反応は 95°C で 2 分加熱後、95°C/15 秒、60°C/30 秒、68°C /1 分の反応を 35 回繰り返した後、68°C に 3 分間放置した。一部の PCR 産物は、5'-CGGGATCCATTACCTGATAACGA-3'、5'-CCGAGGGCAATTGGCATTGGTA-3'、5'-CCCGACGACTCTGGATCAACT-3'、5'-GGAAAGCGGCATATGGGGACAT-3'、5'-GCC CAGTTACTTGTATTCTACCC-3'、5'-GCG CCTAGGCCTGCATGATCTTTC-3' をプライマーとして用いたダイレクトシークエンスに供し、塩基配列を決定した。得られた配列を最尤法に供し、系統樹を作成した。

(2) tax 遺伝子変異検出マルチプレックス PCR：ゲノム DNA あるいは増幅した tax 遺伝子断片を 3 種のプライマー TaxF (5'-GGC GAGCCCTTCTCTCCTAA-3')、TaxRP (5'-CCGGGCGTTTGIATGG-3')、TaxPL (5'-TTAATTAATTATAATTACAGCCGGGCGT TTGIATAA-3') 各 0.5 µM 及び 1X KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (KAPA BIOSYSTEMS) を含む反応液に加えた。95°C で 2 分加熱後、95°C/30 秒、64°C /30 秒、の反応を 30 回繰り返した後、72°C に 2 分間放置した。産物を 4% アガロースゲル電気泳動によって確認した。

(3) Tax による BLV LTR 及びヒトがん関連遺伝子プロモーターの調節：L233-Tax 及び P233-Tax 発現プラスミドを構築するため、プライマー対 rTaxFw (5'-GGATCCGCC ACCATGGCAAGTGTGTTGGT-3') 及び rTaxRv (5'-CTCGAGTCAAAAAGGCGG GAGAGCCATTCATTTTC-3') を用いて PCR を行い、その産物を BamHI 及び XhoI で処理し、pcDNA3.1(+) の BamHI/XhoI サイトに挿入した。塩基配列を決定して 233 番アミノ酸以外は同一であることを確認し、各々を pcL233 及び pcP233 とした。

BLV LTR の下流にホタルルシフェラーゼ (FL) 遺伝子を挿入したレポータープラスミド pGL-LTRluc と pcL233 あるいは pcP233 をヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞にコトランスフェクとした。48 時間後に Dual-Glo Luciferase Reporter Assay System (Promega) に供した。FL による発光量を同時に細胞へ導入したウミシイタケルシフェラーゼ (LL) 遺伝子に依る発光量で除して FL 発現量を標準化した。

ヒトがん関連遺伝子 c-fos、c-jun、c-kit、c-myb、c-myc、IL-6、cdk4、Bcl-2、p53 及び p53AIP1 のプロモーター下流に FL あるいは LL 遺伝子を挿入したレポーターベクタ

一を RIKEN BRC から購入した。これらと pcL233 あるいは pcP233 を HeLa 細胞にコトランスフェクとした。上記と同様にしてレポーター遺伝子の発現量を求めた。レポーターに FL 遺伝子を用いた場合には LL による発光量で、LL 遺伝子を用いた場合には FL による発光量を用いてレポーターの発現量を標準化した。

(4) Tax の腫瘍原性評価：ラット株化線維芽 (Rat-1) 細胞に pcL233 あるいは pcP233 をトランスフェクとし、G418 耐性細胞を得た。各々に pGL-LTRluc をトランスフェクトして Tax の発現を確認した。これら及び pcDNA3.1(+) によって薬剤耐性となった細胞 5×10^6 コを 5 週齢♀BALB/c ノドマウスの後背部皮下に接種した。6 週後に安楽殺し、皮下に形成された腫瘍を摘出して重量を計測した。

(5) 18歳の白血病発症牛から分離された BLV のゲノム解析：220 ヶ月齢で EBL と診断された♀の黒毛和種牛由来肉腫からゲノム DNA を抽出した。これを鋳型に既報の塩基配列に基づいて合成したプライマーを用いて、重複する 5 断片に分けて PCR により BLV プロウイルスゲノムを増幅した。プライマー伸長法によって各断片の塩基配列を決定した。

(6) BLV 感染牛初乳の凍結融解処理：BLV 感染ホルスタイン初乳を -25°C で一晚凍結した後、融解した。凍結融解初乳及び未処理初乳からリンパ球を単離し、各々 4.8 及び 3×10^8 コをヒツジ静脈内に接種した。9 週間観察し、PCR によってウイルス遺伝子を、市販 ELISA キット及び受身赤血球凝集試験によって血中抗体を調べた。

4. 研究成果

(1) BLV *tax* 遺伝子の進化系統解析：BLV 国内流行株の遺伝的背景を明らかにするため、*tax* 遺伝子の進化系統解析を行った。全国の食肉衛生検査所から提供を受けた 428 検体の肉腫中 414 検体 (96.7%) から BLV 遺伝子が検出された。したがって、国内における牛白血病の大部分は BLV 感染による EBL であることが確認された。BLV 遺伝子陽性 414 検体のうち、50 検体について *tax* 遺伝子の塩基配列を決定して系統樹を作成した。

図 1 に示すように、国内分離 BLV は *tax* 遺伝子に基づき 4 群に分かれることが分かった。A、B 及び C 群は genotype 1 に属していたが、D 群のウイルスは genotype 3 に属すると考えられた。一方、C 群ウイルスの Tax は全て 233 番アミノ酸が Pro であったのに対し、その他はいずれも Leu であった。また、データベース上の Tax のアミノ酸配列を調べたところ、233 番アミノ酸は全て Pro か Leu のいずれかであった。したがって、BLV は genotype に関

わらず Tax の 233 番アミノ酸によって 2 つのアリル (P233-Tax 型及び L233-Tax 型) に分けられるものと考えられた。

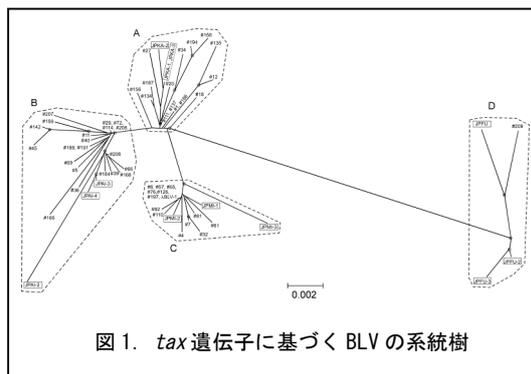


図 1. *tax* 遺伝子に基づく BLV の系統樹

(2) Tax の L233P 変異と白血病発症年齢：Tax の L233P 変異を迅速に検出するため、multiplex PCR を開発した。図 2 に示すように、A 群、B 群及び D 群に属する #1、#29 及び #209 では 120bp の断片が増幅され、C 群に属する #8 及び #110 では 100bp の断片が増幅された。さらに、これらの 5 検体を除く全ての C 群ウイルスでは 100bp 断片が、その他では 120bp 断片が増幅された。

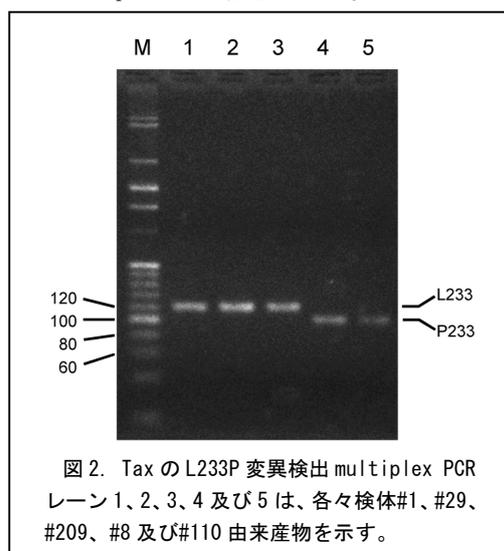


図 2. Tax の L233P 変異検出 multiplex PCR レーン 1、2、3、4 及び 5 は、各々検体 #1、#29、#209、#8 及び #110 由来産物を示す。

BLV 感染が確認された白血病肉腫 414 検体全てを本 multiplex PCR に供したところ、329 検体 (79.5%) が L233-Tax 型に属し、75 検体 (18.1%) が P233-Tax 型に属することが分かった。次いで、各アリル毎に白血病発症月齢の頻度分布を調べた。Kolmogorov-Smirnov 検定の結果、両アリル共に発症月齢は対数正規分布することが分かった (図 3)。この成績は、生後特定の時期 (恐らく生後間もなく) に BLV に感染したウシが一定の潜伏期を経て白血病を発症するというを示唆する。さらに、両アリル間で白血病発症月齢の相乗平均を比較した。その結果、L233-Tax 型ウイルスに感染したウシでは 74 ヶ月であったのに対し、P233-Tax のそれは 96 ヶ月であった。両者間には有意差 ($p < 0.01$) が認められたことか

ら、Tax の L233P 変異の検出は BLV 感染牛の予後診断に有用と考えられる。

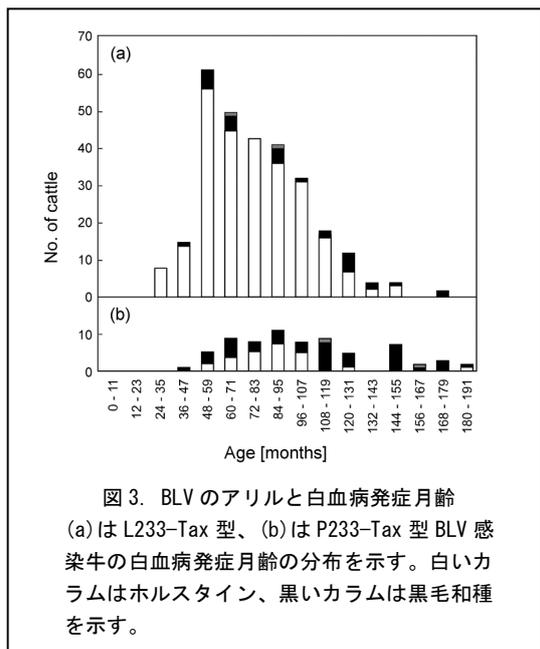


図 3. BLV のアリルと白血病症月齢
(a)は L233-Tax 型、(b)は P233-Tax 型 BLV 感染牛の白血病症月齢の分布を示す。白いカラムはホルスタイン、黒いカラムは黒毛和種を示す。

(3) Tax によるヒトがん関連遺伝子プロモーターの転写調節：地方陽性牛白血病の肉腫形成における BLV Tax の役割を推定するため、レポーターアッセイによってヒトがん関連遺伝子プロモーターに対する Tax の転写調節能を調べた。図 4(a)に示すように、L233-及び P233-Tax 共に転写調節因子をコードする *c-fos* 遺伝子プロモーターを有意に ($p < 0.05$) 活性化した。また、細胞増殖制御に関わる *cdk4* 遺伝子プロモーターに対しては L233-Tax は有意に活性化した ($p < 0.05$) のに対し、P233-Tax では対照との有意差は認められなかった。一方、*jun* 遺伝子プロモーターに対しては両者とも抑制的に働き、P233-Tax は抑制的に作用した ($p < 0.05$)。ヒトのがん原遺伝子 *Bcl-2* プロモーターに関しては P233-Tax は有意に抑制した ($p < 0.05$) が、L233-Tax では対照との有意差は認められなかった [図 4(b)]。 *myc* 及び *c-myb* 遺伝子プロモーターに対しては両者ともに有意な抑制作用を示した ($p < 0.05$)。 *c-kit* プロモーターに対しては両者とも抑制傾向にあったが、対照との有意差は認められなかった。がん抑制遺伝子 *p53* 及び *p53AIP1* 遺伝子に対しては、両者とも対照に対して有意な差は認められなかった。以上の成績から、BLV による肉腫形成には、Tax の *cdk4* 及び *c-fos* 遺伝子プロモーターの活性化が重要である可能性が示された。また、P233-Tax の *cdk4* 遺伝子プロモーターに対する活性化の低下ならびに *jun* 遺伝子プロモーターに対する抑制効果が、白血病症遅延の原因となっているのかもしれない。さらに、*Bcl-2* 遺伝子プロモーターに対する抑制作用も P233-Tax 型ウイルス感染牛の白血病症遅延に関与している可能性がある。

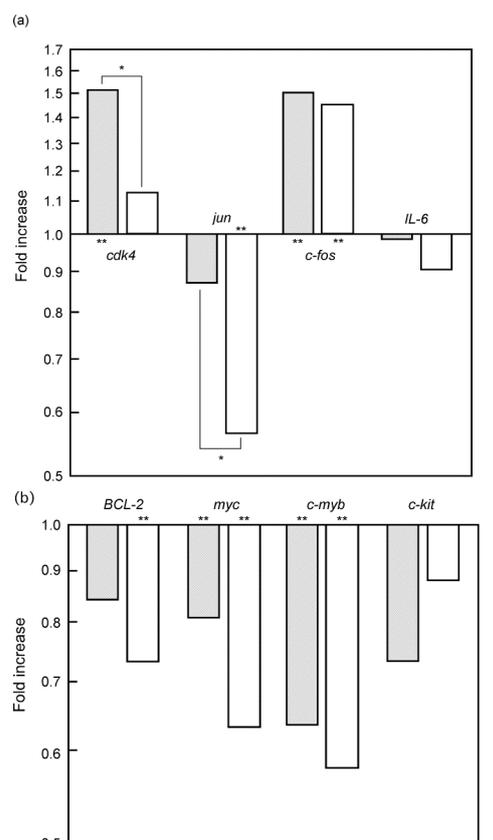


図 4. Tax によるヒトがん関連遺伝子プロモーターの転写調節

斜線カラムは L233-Tax、白カラムは P233-Tax を示す。pcDNA3.1 (+) をコトランスフェクトした際の発光量を 1 とした。**は対照に対して有意差有 ($p < 0.05$)、*は両 Tax 間で有意差有 ($p < 0.05$)。

(4) Tax の L233P 変異と腫瘍原性：BLV Tax の腫瘍原性を明らかにするため、Tax 発現 Rat-1 細胞をヌードマウスの皮下に接種した。対照を含む 3 種の G418 耐性 Rat-1 細胞は、接種した全てのマウスで腫瘍を形成した (図 5)。P233-Tax 発現細胞の平均重量は 0.57 ± 0.10 g ($n=7$) であったのに対し、L233-Tax 発現細胞のそれは 3.23 ± 0.83 g ($n=7$) であった。また、対照は 0.25 ± 0.15 g ($n=8$) であった。L233-Tax 発現細胞由来腫瘍は P233-Tax のそれに比べ有意 ($p < 0.01$) に重量が大きかったことから、L233-Tax は P233-Tax に比べ腫瘍原性が高いものと考えられる。また、P233-Tax 発現細胞由来腫瘍の平均重量と対照のそれとの間には有意差が認められなかった ($p > 0.05$) ことから、P233-Tax の腫瘍原性は極めて低いことが示唆された。以上の成績は、P233-Tax 型 BLV に感染したウシの白血病症平均年齢が L233-Tax 型のそれに比べ有意に高い事実と良く一致する。P233-Tax 型 BLV は EBL 発症予防のための弱毒生ワクチンへの応用が期待される。

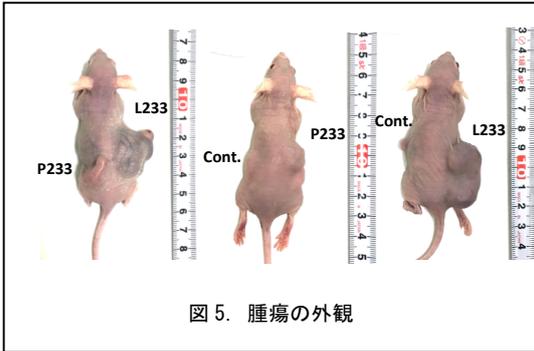


図 5. 腫瘍の外観

(5) 18歳で白血病を発症したウシから分離された BLV のゲノム解析：BLV による白血病発症機構を明らかにするため、その好発年齢から大きく外れた高齢白血病牛由来ウイルスの全ゲノム解析を行った。ダイレクトシーケンシングによって 5 断片の塩基配列を決定したところ、*pro-pol* 遺伝子を含む断片において特定部位から塩基の重複が認められた。そこで、本断片をプラスミドにクローニングして塩基配列を決定したところ、正常な逆転写酵素 (RT) 及びインテグラーゼをコードするクローンと RNaseH ドメインを欠く RT をコードし、インテグラーゼ ORF を欠くクローンが混在していることが分った。さらに、肉腫細胞が発現している μ 鎖遺伝子可変部の解析結果から、調べた腫瘍は単一クロンの B 細胞からなることが分った (図 6)。即ち、この高齢白血病牛は野生型 BLV と RNaseH(-)RT をコードし、インテグラーゼを欠く変異ウイルスに重感染した B 細胞腫を発症していたことが示された。市販の Moloney マウス白血病ウイルス RNaseH(+)-RT の DNA ポリメラーゼ活性を RNaseH(-)RT 存在下で測定したところ、著しい活性の低下が認められた。このようなドミナントネガティブ現象が重感染細胞内でも生じ、その結果野生型 BLV の増殖が抑えられたのかもしれない。感染初期の BLV は RT 依存性の cell-to-cell 感染によって増殖する。この初期増殖の遅れが EBL 発症遅延の原因となったのかもしれない。本変異型 BLV も弱毒生ワクチンへの応用が期待できる。

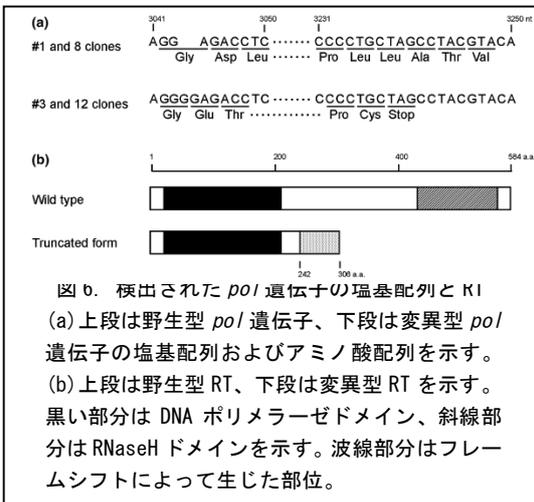


図 6. 検出された *pol* 遺伝子の塩基配列と RT
(a) 上段は野生型 *pol* 遺伝子、下段は変異型 *pol* 遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を示す。
(b) 上段は野生型 RT、下段は変異型 RT を示す。黒い部分は DNA ポリメラーゼドメイン、斜線部分は RNaseH ドメインを示す。波線部分はフレームシフトによって生じた部位。

(6) BLV 感染牛初乳の凍結融解処理によるウイルスの不活化：未処理初乳由来リンパ球を接種されたヒツジは、4 週目で BLV 遺伝子陽性、5 週目で抗体陽性になった。一方、凍結融解処理リンパ球を接種されたヒツジでは、観察期間中ウイルス、抗体共に検出されなかった。次いで、後者に別の BLV 感染牛初乳リンパ球を凍結融解処理なしで接種したところ、4 週目にウイルス陽性、6 週目に抗体陽性となった。本成績は、凍結融解処理によって初乳中の BLV が不活化されることを示している。初乳の凍結融解処理は、初生牛の BLV 感染予防に極めて有効と考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Watanabe T, Inoue E, Mori H, Osawa Y, Okazaki K. Delayed-onset enzootic bovine leukosis possibly caused by superinfection with bovine leukemia virus mutated in the *pol* gene. Arch Virol. 2015. 160(8):2087-91. doi: 10.1007/s00705-015-2457-4. 査読有。
- ② Fukai K, Morioka K, Yamada M, Nishi T, Yoshida K, Kitano R, Yamazoe R, Kanno T. Comparative performance of fetal goat tongue cell line ZZ-R 127 and fetal porcine kidney cell line LFBK- α ν β 6 for Foot-and-mouth disease virus isolation. J Vet Diagn Invest. 2015. 27(4):516-21. doi: 10.1177/1040638715584156. 査読有。
- ③ Onozato H, Fukai K, Kitano R, Yamazoe R, Morioka K, Yamada M, Ohashi S, Yoshida K, Kanno T. Experimental infection of cattle and goats with a foot-and-mouth disease virus isolate from the 2010 epidemic in Japan. Arch Virol. 2014. 159(11):2901-8. doi: 10.1007/s00705-014-2135-y. 査読有。
- ④ Morioka K, Fukai K, Sakamoto K, Yoshida K, Kanno T. Evaluation of monoclonal antibody-based sandwich direct ELISA (MSD-ELISA) for antigen detection of foot-and-mouth disease virus using clinical samples. PLoS One. 2014. 9(4):e94143. doi: 10.1371/journal.pone.0094143. 査読有。
- ⑤ Kanno T, Ishihara R, Hatama S, Oue Y, Edamatsu H, Konno Y, Tachibana S, Murakami K. Effect of freezing treatment on colostrum to prevent the transmission of bovine leukemia virus. J Vet Med Sci. 2014. 76(2):255-7. doi: 10.1292/jvms.13-0253. 査読有。
- ⑥ Kanno T, Ishihara R, Hatama S, Uchida I. Antigenic variation among recent Japanese isolates of bovine coronaviruses belonging to phylogenetically distinct genetic groups. Arch Virol. 2013.

158(5):1047-53. doi: 10.1007/s00705-012-1587-1. 査読有.

- ⑦岡崎克則. 牛白血病ウイルスによる白血病発症機構に関する最近の知見. 獣医畜産新報. 2013. 66(9):667-71. 査読無.
- ⑧Inoue E, Matsumura K, Soma N, Hirasawa S, Wakimoto M, Arakaki Y, Yoshida T, Osawa Y, Okazaki K. L233P mutation of the Tax protein strongly correlated with leukemogenicity of bovine leukemia virus. *Vet Microbiol.* 2013. 167(3-4): 364-71. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.09.026. 査読有.

[学会発表] (計 8 件)

- ①森宏, 大澤宜明, 岡崎克則. 牛白血病ウイルス(BLV)Tax 蛋白質によるラット線維芽細胞の形質転換. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会. 2015 年 11 月. 福岡市.
- ②富安貴史, 森宏, 大澤宜明, 岡崎克則. 日本国内における牛白血病ウイルスの分子疫学. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会. 2015 年 11 月. 福岡市.
- ③森宏, 大澤宜明, 岡崎克則. 牛白血病ウイルス(BLV)Tax タンパク質による株化ラット線維芽細胞の形質転換. 第 158 回日本獣医学会学術集会. 2015 年 8 月. 十和田市.
- ④森宏, 井上恵美, 大澤宜明, 岡崎克則. 牛白血病ウイルス(BLV)HBZ 遺伝子ホモログの検出. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 10 月. 横浜市.
- ⑤宮前祐士, 大澤宜明, 井上恵美, 岡崎克則. 233 番アミノ酸が異なる牛白血病ウイルス(BLV)Tax タンパク質によるヒトがん関連遺伝子の転写調節. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 2014 年 8 月. 札幌市.

- ⑥渡邊忠暁, 井上恵美, 大澤宜明, 岡崎克則. 晩発性の白血病から分離された牛白血病ウイルスに認められた pol 遺伝子の変異. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 10 月. 神戸市.
- ⑦大澤宜明, 宮前祐士, 井上恵美, 岡崎克則. 牛白血病ウイルス(BLV)Tax タンパク質によるがん関連遺伝子の発現調節. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013 年 10 月. 神戸市.
- ⑧渡邊忠暁, 井上恵美, 大澤宜明, 岡崎克則. 地方病性牛白血病の晩発例から分離された BLV に認められた pol 遺伝子の変異. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 2013 年 8 月. 盛岡市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 克則 (OKAZAKI, Katsunori)
北海道医療大学・薬学部・教授
研究者番号: 9 0 1 6 0 6 6 3

(2) 研究分担者

大澤 宜明 (OSAWA, Yoshiaki)
北海道医療大学・薬学部・准教授
研究者番号: 2 0 4 1 5 5 5 8

菅野 徹 (KANNO, Toru)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・主席研究員
研究者番号: 8 0 3 5 5 2 0 5

井上 恵美 (INOUE, Emi)
北海道医療大学・薬学部・助教
研究者番号: 8 0 4 3 3 4 2 3