

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14868

研究課題名(和文) ウマストレス性疾患における神経成長因子の病因・診断パラメータとしての有用性解析

研究課題名(英文) Usefulness analysis of nerve growth factor in horse stress-related diseases as an etiology, the diagnosis parameter

研究代表者

松田 浩珍 (Matsuda, Hiroshi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80145820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、輸送性ストレスに続発する一連のウマ疾患群に対し、神経成長因子(NGF)に焦点をあて、その病因診断的意義を明らかにする。また、バイオマーカーとしての測定系を確立することを目的として実験を行なった結果、1)ウマNGFのクローニングに成功した。各種動物間の相同性が高いことを明らかにした、2)相同性情報を基に市販の抗体が有効であることを確認し、定量システムを構築した、3)輸送ストレスを与えたウマの血液のNGF量を測定したところ、上昇を確認した。以上、NGF定量システムを確立するとともに、ウマにおけるNGFの有用性が確認された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I focused on nerve growth factor (NGF) to clarify the etiology and diagnostic significance in horse diseases secondary to the transportation stress. In addition, I attempted to establish an assay system for horse NGF as the biomarker. The results are as follows: 1) the sequence of horse NGF was identified and homology was more than 90% in comparison to the other animals. 2) an ELISA system for horse NGF was developed with a commercial antibody. 3) NGF levels were increased in peripheral blood of transportation-stressed horses using the established ELISA. Thus, I established a NGF assay system and usefulness of the NGF in the horse was confirmed.

研究分野：免疫学・獣医学

キーワード：神経成長因子 ウマ ストレス 診断マーカー

1. 研究開始当初の背景

神経成長因子 (NGF) は末梢知覚神経および一部の中枢神経の栄養因子として発見・同定され、その功績が認められ、Levi-Montalcini 博士はノーベル賞を受賞した。他方、NGF は唾液や精液などに存在することが一部の研究者によって報告されていたが、その生理的意義は全く不明であった。研究代表者は、独自の視点から、この因子が創傷治癒に關与する可能性のあることを推測し、まず炎症担当細胞である好塩基球および肥満細胞を対象に研究を開始した。その結果、NGF がこれら細胞の生存、分化、機能を亢進させることを世界に先駆け発見した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988; J. Exp. Med., 1991)。さらに好中球や好酸球にも同様な効果を有する事を見出し、NGF が前炎症性サイトカインであり、創傷治癒促進効果のあることを証明した (Blood; J. Exp. Med. など複数報)。また、マウスにファイティングストレスを与えると末梢血の NGF 濃度が高まること、さらにウマに輸送ストレスを付加した場合、末梢血に NGF 様活性が認められることを明らかにした (J. Equine Sci., 1996)。これら研究成果から NGF がウマストレス疾患のトリガーとなる可能があると推測し着想に至ったもので、極めて独創性が高く、本研究の成功によって、他が未だ成し得ていないウマストレス性疾患の病因に基づく早期診断・病勢評価パラメータを確立でき、その基礎知見を基に予防および分子標的治療薬の開発を可能にするものである。

2. 研究の目的

長時間輸送によるストレスは、ウマの発熱、肺炎、疝痛、蹄葉炎などの疾病要因となり、時に極めて重篤な病態を引き起こす。しかし、これらストレス性疾患の病因の本質は未だ解明されていない。研究代表者は現在までに、NGF が神経栄養因子としてだけでなく、ストレス応答性の前炎症性サイトカインであることを世界に先駆け発見・報告してきた。NGF は免疫炎症担当細胞を広範囲に活性化させること、さらに血管内皮細胞の自律神経応答性にも影響することから、ストレス性疾患の発病に何らかの影響を与えているものと推測される。もし、この仮説が正しければ、末梢血 NGF は病因・診断パラメータとしての意義を有し、その制御法の開発によって、新たな予防治療戦略が生まれる。本研究の目的はその基礎的知見を得る事にある。

3. 研究の方法

本研究では、輸送性ストレスに続発する一連のウマ疾患群に対し、NGF に焦点をあてた全く新しい視点から、その病因診断的意義を明らかにする。また、バイオマーカー

としての測定系を確立し、NGF の分泌あるいは受容体を阻害することで予防・治療に向けた基礎的知見を得ることにある。具体的な研究は以下の通りである。

- (1) ウマ NGF のクローニングを行い、マウスなど各種動物間の相同性を明らかにする。
- (2) 大腸菌等を用いて、ウマ NGF 組換え体を作成し、さらに単クローン抗体を作成するとともに、酵素抗体法による診断系を確立する。
- (3) ウマに輸送ストレスを付加し、血液中の NGF 量をバイオアッセイと比較測定する。

以上、NGF のクローニングと組換え体作成を行い、その定量システムを確立するとともに、ウマにおける有用性を評価する。

4. 研究成果

(1) ウマ NGF のクローニング：サラブレッド及び温血種合計 10 頭の末梢血白血球から得られた cDNA と NGF の前駆体の配列に特異的なプライマーセットを用いて、RT-PCR を実施した。また、多型性についても検討したが、10 頭全て同一結果であり、個体間に差は認められなかった (図 1)。多種類の動物との比較を実施したが、いずれの種との間においても、90% 以上の相同性が確認された。これまで、ウマの配列の推測はされていたものの明確に証明されておらず、その意味で世界で初めて配列を決定した。

```

1 atgtccatgt tgtttctaac tctgattaca gctcttttga tcggcacaca ggcagaaccc
  H S H L F Y T L I T A L L I G T Q A E P
61 cacacagaga gcaatgtccc agcaggacac gccatccccc aagccactg gactaaactt
  H T E S N V P A G H A I P Q A H W T K L
121 cagcattegc ttgacacage cctccgcaga gccctagcgc ccccgccag ggcgatagct
  Q H S L D T A L R R A R S A P A R A I A
181 gcaagggtgg cagggcagac ccgcaacatc actgtggacc ccaactttt taanaagcgg
  A R V A G Q T R N I T V D P K L F K K R
241 cgactggctt caccocggct gctgttttagc acccagcccc caactgtgcg tgcgatagct
  R L R S P R V L F S T Q P P P V A A D T
301 caggatctgg actttgagc cgggggtgcc gcctcctca acaggactca caggagcaag
  Q D L D F E A G G A A S F N R T H R S K
361 cggtcttctt cccacccgct ctccacaggg ggggagttct ccgtgtgcga cagcgtcagc
  R [ S S S H P V F H R G E F S V C D S V S
421 gctcgggtgg gggataagac caccgccaag gacatcaagg caaaggaggt gatggtgttg
  V W V G D K T T A T D I K G K E V H V L
481 ggagaggtag acattaacaa cagtgtatcc aagcagtact tttttgagac caagtccgg
  G E V N I N N S V F K Q Y F F E T K C R
541 gaccccaate ccgtggacag cgggtgccgg gccattgact cgaaggactg gaactcctat
  D P N P V D S G C R G I D S K H W N S Y
601 tgaccacaaa cccacacctt cgtcaaggcg ctgacatagg acggcaagca ggctgcctgg
  C T T T H T F V K A L T M D G K Q A A W
661 cggttcatcc gnatcgacac ggccctgtgtg tgcctgctca gcaggaaac cgggagaaaa
  R F I R I D T A C V C V L S R K T G R ] K
721 gactga
  A stop
    
```

図 1 ウマ -NGF シークエンス

(2) 測定方法：得られた配列が NGF であるかどうかを確認するために、ウマ NGF 組換え体を発現する CHO 細胞を作成した。まず、ウマ NGF 配列の相同性が一番高かったのがヒトであったことから、すでに市販されている抗ヒト NGF 抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、図 2 のように陽性反応を示すことが明らかとなった。従って、本抗体によるウマ NGF の定量が可能と判断された。

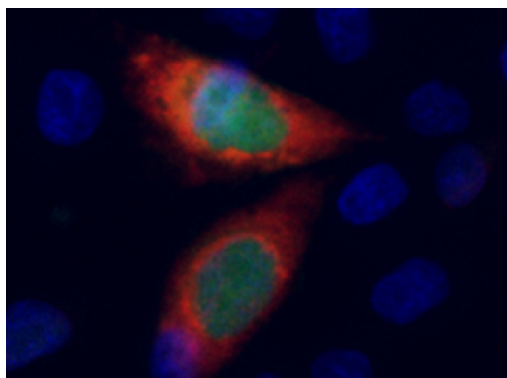


図 2 . pIRES2-NGF-AcGFP をトランスフェクトされた CHO 細胞 抗 NGF 抗体陽性反応が観察される (赤)

(3) 市販の NGF 抗体 10 種類チェックをして、ELISA 用に最も感度の高い抗体を選出した(図 3)。また、その抗体を用いて、馬運車による輸送ストレスを与えたウマから得られた末梢血中の NGF 量を測定した。その結果、ストレスによって高濃度の NGF が検出された。

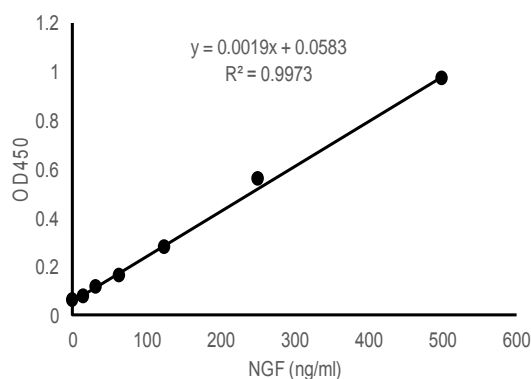


図 3 . ウマ NGF を用いた NGF 定量用 ELISA の検量線

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Sato, H., Matsuda, H., Amagai, Y., Tanaka, A, Matsuda, H., Suppressive effect of bortezomib on LPS-induced

inflammatory responses in horses, J. Equine Vet. Sci., 査読有, in press.

DOI:10.1016/j.jevs.2017.05.003

Amagai, Y., Sato, H., Ishizaka, S., Matsuda, K., Aurich, C., Tanaka, A., Matsuda, H., Cloning and expression of equine beta-nerve growth factor, J. Equine Vet. Sci., 査読有, 45, 28-31, 2016

DOI:10.1016/ j.jevs.2016.06.001

[学会発表](計 1 件)

松田 浩珍, 神経成長因子が末梢血由来ウマ好中球の細胞障害性に及ぼす影響、第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 10 日、北海道大学(北海道札幌市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

http://web.tuat.ac.jp/~mol_path/

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

松田 浩珍 (MATSUDA, Hiroshi)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 80145820

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

石坂 さおり (ISHIZAKA, Saori)

佐藤 宏昭 (SATO, Hiroaki)

登石 裕子 (TOISHI, Yuko)