

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22356

研究課題名(和文)レトロウイルス性心筋異常の病態解析と動物モデル化の検討

研究課題名(英文)Pathologic analysis of retroviral cardiomyocyte abnormality and the usefulness as an animal disease model

研究代表者

落合 謙爾(Ochiai, Kenji)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：80214162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：鳥白血病ウイルス(ALV)性心筋異常の形成機序を解明するため、ALV感染鶏胚からiPS細胞を作製した。このiPS細胞には複数のALV株が感染していることが判明し、RNA-seq解析を行うことができなかった。一方、黒毛和種牛の多発性先天性血管腫から無限分裂細胞を作製することができ、RNA-seq解析によって本腫瘍ではTNF signaling pathwayの異常とTNFRSF6B遺伝子の過剰発現が生じていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞および無限分裂細胞は異常な細胞を生きたまま保存できることから、原因不明の疾病研究や発がん機序解明への応用が期待されているが、ヒトを含め成功例は少ない。そこで、今回レトロウイルス性腫瘍からiPS細胞を、非ウイルス性腫瘍から無限分裂細胞を作製し解析を試みた。ウイルス性腫瘍の解析には改良が必要であるが、少なくとも無限分裂細胞化技術は動物疾病、特に稀な動物腫瘍の細胞レベルの解析を容易にすることから、今後の応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathogenesis of cardiomyocyte abnormality caused by avian leukosis viruses, iPS cells were produced from chick embryo. But, these cells were unuseful for further RNA-seq analysis because the cells were infected with multiple ALV strains. Meanwhile, immortalized cell lines derived from multiple congenital hemangioma in a Japanese Black calf was established. RNA-seq analysis demonstrated TNF signaling pathway anomalies and over expression of TNFRSF6B gene in the cell lines.

研究分野：獣医病理学

キーワード：鳥白血病ウイルス 先天性血管腫 iPS細胞 無限分裂細胞 RNA-seq

1. 研究開始当初の背景

ヒトの特発性心筋症は原因不明の難病で、このうち特発性拡張型心筋症は遺伝性と後天性両者の因子が関与する混合性心筋症に分類される。後天性因子にはヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV)、コクサッキーウイルスやC型肝炎ウイルスといったウイルスの関与が推察されている。これらのうち、HIVによるエイズ(AIDS)に随伴する拡張型心筋症はHIVの心筋細胞への直接作用またはHIVによって誘発される自己免疫過程と他の心臓親和性ウイルスの関与が推察されている。しかし、レトロウイルスと心筋症との関連は実験的に証明されていない。

申請者らは神経膠腫(星細胞腫)誘発能を持つ鳥白血病ウイルス(ALV)の一株、Km_5666が心筋線維の肥大、異型巨細胞化や心臓横紋筋腫を誘発することを見出し、以下の仮説を考えた。すなわち、仮説)本心筋異常はALVがプロウイルスとして挿入された後、鳥白血病の癌遺伝子として知られる*c-myc*以外の遺伝子の発現異常が招来された結果引き起こされると推察した。この仮説を検証するには異常心筋細胞を単離する必要がある。そこで病巣からの細胞培養や鶏ES細胞へのALV感染を試みたが、いずれも成功しなかった。こうした中、2018年に鶏体細胞からのiPS細胞作製法が報告された。そこで、この最新技術を上記の心筋異常の解析に応用しようと考えた。

2. 研究の目的

申請者はグリオーマを誘発するALVの病原性を解析する過程で、そのうちの一株が異常心筋線維と心臓横紋筋腫を誘発することを実験的に証明した。ヒト医学分野では特発性心筋症の発生にはHIV、HTLVといったヒトレトロウイルス感染症の関与が推察されている。しかし、これらウイルスとの因果関係は実験的に証明されていない。そこで、本研究課題ではiPS細胞作製技術を応用してALV誘発性心筋異常の発生機序を解明すること、これら成果に基づいて本実験系がレトロウイルス性心筋症モデルになりうるか、その可能性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 野外で飼育されている鶏からALVを新たに分離し、分離ウイルスの心臓病原性と分子生物学的特徴を解析した。また、感染実験を行い心筋異常の有無と好発部位を病理学的に解析した。
- (2) ALV感染鶏胚から細胞を採取し、これらの初代培養細胞にヒト変異型CDK4、サイクリンD1遺伝子を発現させるトランスポゾンベクターをリポフェクション法により導入して無限分裂細胞を作製した。また、iPS細胞の作製にはOct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、Lin28、Nanogの6つの転写因子を含むトランスポゾンベクターをリポフェクション法で導入した。
- (3) リアルタイムPCRによるALVプロウイルス定量法を確立し応用した。
- (4) 牛の先天性血管腫の腫瘍組織から細胞を採取し、この初代培養細胞にヒト変異型CDK4、サイクリンD1遺伝子を発現させるトランスポゾンベクターをリポフェクション法により導入した。得られた無限分裂細胞を用いてRNA-seqにより遺伝子の発現量を網羅的に解析した。

4. 研究成果

- (1) 骨化石症や粘液肉腫、横紋筋肉腫といった間葉系腫瘍とともにグリオーマを誘発するALV、GifN_001株の病原性とウイルスゲノムを感染実験により解析した。感染実験では孵化後75日齢までに45%の鶏に神経膠腫が、36%に小脳低形成が誘発され、接種したALVが脳から検出された。非化膿性心筋炎と心筋細胞内基質封入体の発生頻度は各々54%、36%であったが、異常心筋細胞は認められなかった。次にGifN_001のウイルスゲノム全長の塩基配列を決定後(GenBank accession #MK757486)、分子系統樹解析を実施した。envSUに基づく分子系統樹ではGifN_001は既知の神経病原性ALVとは異なるクラスターに分類された。以上の成績から、間葉系腫瘍と関連するALVの神経病原性が初めて確認された。この神経病原性ALV株は心筋内で増殖するものの、心筋には著しい形態変化を引き起こさなかった。
- (2) Km5666株は実験的に心臓横紋筋腫を誘発させることがわかっている。Km5666が分離された日本鶏群の鶏48羽(初年度と次年度の2年間の合計羽数)を新たに検索し8株のALVを分離した。解析の結果、この鶏群には現在もグリオーマが発生していること、envSUに基づく分子系統樹ではFGV変異株は2~3つのクラスターに分かれて拡散していること、Km5666近縁株はマイノリティであることが明らかとなった。また、感染鶏の一部には複数のALV株が重感染していることが推

察された。

(3) 野外例と感染実験例を用いて心筋異常の心臓内好発部位を探索した。野外の鶏41羽のうち9羽に神経膠腫が存在し、これらのうち4羽の心臓に心筋線維の離開および錯綜が見つかった。しかし、病変の分布はさまざま好発部位の特定には至らなかった。

(4) リアルタイムPCRを応用してALVの定量法を確立した。次に、心臓病原性株Km_5666あるいは神経周膜腫誘発株Km_6594を4または5日目の鶏卵に接種し、鶏胚18日目の心臓と脳を病理学的に検索するとともに、組織内のウイルス量とプロウイルス量を測定した。これら実験鶏でも野外例と同様に心筋線維の形態異常の好発部位は特定できなかった。しかし、ALV接種量、さらに心筋組織内のウイルス複製量によって心筋異常の出現頻度に差が生じていることが明らかとなった。

(5) 不死化細胞の作出を心筋細胞よりも扱いやすい星状膠細胞で試みた。鶏胚から脳を採取し初代培養細胞に、ヒト変異型CDK4、サイクリンD1遺伝子を発現させるトランスポゾンベクターをリポフェクション法により導入した結果、神経膠細胞を継代5~7代目まで維持できることがわかった。次に、14日胚のALV感染細胞を用いてiPS細胞の作製を試みた。その結果、鶏胚から得た神経膠細胞または心筋細胞の初代培養細胞からiPS細胞のコロニー24個を作製することができた。これらのうち、検索した12個のコロニーの培養上清すべてからALVが検出され、6個のコロニーは、アルカリフォスファターゼ染色陽性となり未分化な状態であることが確認された。また、同様にALVを接種した18日鶏胚の心臓心筋細胞内には基質封入体が形成されていた。

(6) 一方、上記のALV感染鶏胚から作製したiPS細胞を用いて、感染しているALVのシーケンス解析を行った結果、複数株のALVがこの細胞に感染していることが判明した。この結果は新知見であるが、これらiPS細胞を利用してALV株それぞれの病原性を解析することは難しいと思われた。

(7) 項目(2)、(4)、(6)の成績を踏まえ、最終年度には宿主のDNA上に挿入されたALVプロウイルス量を心筋細胞の核1個当たりのプロウイルス量として算出し、これらと心筋異常との相関を野外感染鶏を用いて解析した。日本鶏25羽中10羽(40%)に神経膠腫が認められ、4羽(16%)に心筋異常が認められた。神経膠腫罹患鶏10羽のうち、単一のウイルス株が分離された症例は3例で、これら3株はいずれも過去に分離された神経病原性株Km_6249に高い相同性を示した(99.3~100%)。残りの7例からは複数の塩基配列が検出された。配列が重複し解析不可能であった1例を除く6例では、得られた配列のうち一方はKm_6249に、もう一方はKm_5666に高い相同性を示した(90.4~99.7%)。これら鶏の心臓の核1個あたりのプロウイルスコピー数は心筋異常を欠く鶏で2コピー以下であったのに対し、心筋異常を持つ4例では4~16コピーで、心筋異常の発生頻度とプロウイルス量は相関した。これら成績から、心筋異常は単独または複数のALV株の感染にかかわらず、心臓内のALVプロウイルス量に依存することがわかった。Km_5666の分子クローンが作製できれば、動物モデル化は可能と思われる。また、本研究で確立したALVプロウイルス定量法は生前のウイルス量測定(モニタリング)から病変解析、ALV発癌機序解析に至るまで応用が期待できる。

(8) 病的な細胞からiPS細胞や無限分裂細胞を得ることは難しく、疾病研究への応用はこれからの課題となっている。そこで、本課題では黒毛和種の子牛に発生した多発性先天性血管腫を病理学的に解析するとともに、腫瘍組織から樹立した無限分裂細胞を用いて原因遺伝子の探索を試みた。遺伝子を導入した腫瘍細胞は20継代(約80日)以上にわたって増殖活性が維持された。無限分裂細胞はvWF陽性、 α -SMA陰性で、核型検査では染色体異常は検出されなかった。無限分裂腫瘍細胞のRNA-seq解析では、TNF signaling pathwayに異常が認められ、特にCXCケモカイングループの発現量低下およびTNFRSF6Bの発現量増加が見られた。また、染色体異常が検出されなかったことから、本腫瘍は遺伝子突然変異によるものと推察される。この成績により、動物の非ウイルス性腫瘍の分子生物学的解析には無限分裂細胞技術が有用であることが明らかになった。さまざまな動物種での応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishiura Hayate, Kubota Ikuko, Kondo Yui, Kachi Masayuki, Hatai Hitoshi, Sasaki Jun, Goryo Masanobu, Ochiai Kenji	4. 巻 49
2. 論文標題 Neuropathogenicity of newly isolated avian leukosis viruses from chickens with osteopetrosis and mesenchymal neoplasms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Avian Pathology	6. 最初と最後の頁 1~25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/03079457.2020.1757621	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 津島 文, 西浦 颯, 竹内颯人, 佐々木淳, 落合謙爾
2. 発表標題 鳥白血病ウイルス性心筋異常の発生と分子疫学
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西浦 颯, 竹内颯人, 津島 文, 佐々木淳, 落合謙爾
2. 発表標題 無限分裂神経膠細胞の試験的作出
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤太一, 西浦 颯, 竹内颯人, 津島 文, 中島冬萌, 佐々木淳, 落合謙爾
2. 発表標題 牛の先天性多発性血管肉腫に由来する腫瘍細胞の単離
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内颯人, 中島冬萌, 西浦 颯, 佐々木淳, 落合謙爾
2. 発表標題 鳥白血病ウイルス誘発心筋病変とウイルス量との関連
3. 学会等名 第8回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津島 文, 佐藤太一, 西浦 颯, 佐々木淳, 落合謙爾
2. 発表標題 新たに見出された心臓病原性鳥白血病ウイルスの分子生物学的特徴
3. 学会等名 第8回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西浦 颯, 竹内颯人, 佐藤太一, 中島冬萌, 佐々木淳, 落合謙爾
2. 発表標題 鳥白血病ウイルス感染鶏胚からのiPS細胞の樹立
3. 学会等名 第8回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩本毅, 西浦颯, 若山映令彩, 佐々木淳, 御領政信, 落合謙爾
2. 発表標題 熊本地方の日本鶏と国内のプロイラーのALV発生状況
3. 学会等名 日本獣医師会日本産業動物獣医学会(東北地区)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西浦颯, 岩本毅, 近藤佑衣, 竹内颯人, 津島文, 佐々木淳, 落合謙爾
2. 発表標題 トリ白血病ウイルスK亜群に類似する日本分離株の分子系統解析
3. 学会等名 第7回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岩手大学獣医病理学研究室（共同獣医学科） http://www.agr.iwate-u.ac.jp/lab/

6. 研究組織			
	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------