

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660239

研究課題名(和文) 乳エキソソーム中のウイルス成分検出による農家単位での牛白血病診断手法の開発

研究課題名(英文) Development of a new diagnostic procedure for bovine leukemia virus infection using bovine milk exosomes

研究代表者

猪島 康雄 (Inoshima, Yasuo)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20355184

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)：牛の生乳エキソソームの効率的な分離・精製方法の確立と、生乳エキソソームを用いた牛白血病ウイルスの新たな感染診断法の開発を試みた。生乳エキソソームの分離には生乳中のカゼインを除去すれば市販のエキソソーム分離キットが利用可能であることを明らかにした。BLVに感染しているが発症していない若齢牛からの生乳エキソソームからはBLV蛋白や核酸が検出されず、エキソソーム中のBLV成分は感染牛の血中コピー数と相関する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tried to establish a method for efficient isolation and purification of exosomes from bovine raw milk and to develop a new diagnostic procedure for bovine leukemia virus (BLV) infection using milk exosomes. Our study revealed that commercially available exosome-isolation kits are applicable to isolate bovine milk exosomes after removal of milk casein by sequential ultracentrifugation. BLV antigens and DNA were not detected from milk exosomes from BLV-infected young cattle subclinically. These results suggest that detectability of BLV antigens and DNA in milk exosomes are conceivably related to the copy numbers in cattle.

研究分野：動物感染症学

キーワード：エキソソーム 生乳 バルク乳 牛白血病 牛白血病ウイルス 診断法

1. 研究開始当初の背景

細胞から分泌される膜小胞 (exosome、エキソソーム) は、細胞の老廃物として長い間見過ごされていた。2007 年、エキソソーム内に microRNA が含まれていることが発見されて以来、細胞間の情報伝達やガンの転移などにエキソソームが重要な役割を果たしていることが次第に明らかとなった。それからわずか 6 年 (申請時の 2013 年) の間にエキソソームは、ガンのバイオマーカーとして利用され、国際学会設立、国際専門学術雑誌創刊、米国国立衛生研究所 NIH で新しいグラント領域が作られるなど、世界的に熾烈な研究競争と製品開発競争が展開されている。

我々は獣医学領域でのエキソソーム活用の意義にいち早く着目し、以下の成果を得て世界に先駆け学術雑誌に発表した。1) 牛の生乳からエキソソームの分離・精製に成功した (Yamada et al., J. Vet. Med. Sci. 74: 1523-1525, 2012)。2) 牛白血病ウイルス (BLV) 感染牛の生乳エキソソーム内に、BLV 由来の蛋白や酵素を発見した (Yamada et al., PLoS One 8: e77359, 2013)。このことから、これまで採血してからウイルス遺伝子の検出や抗体検査に頼っていた BLV 感染の診断を、生乳エキソソームからウイルス蛋白や核酸が検出できれば、採血を必要とせず診断できるのではないかと考えた。しかし、ヒトと違い動物エキソソームの分離・精製方法は確立されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、1) 牛の生乳からエキソソームを効率よく分離・精製する方法を確立すること、2) バルク乳エキソソーム内の BLV 成分 (蛋白と核酸) を検出することにより、BLV 感染状況を農家単位で全頭一括診断する方法を確立すること、を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 生乳エキソソームの効率的な分離・精製方法の確立

我々は上述のように生乳エキソソームの分離・精製に成功しているが、以下のように繰り返しの超遠心操作が長時間必要である。超遠心 1 時間、より効率的な分離・精製方法の確立を検討した。

非感染牛 3 頭の生乳を用いて、ヒト用、および培養細胞用の市販エキソソーム分離キットの利用を試みた。用いたキットは以下の 5 種類であり、それぞれのプロトコールに従い使用した。ExoQuick, ExoQuick-TC, Total Exosome Isolation Kit, Exo-spin, Exo-spin blood。

(2) 分離の評価系に用いる抗体の検索

効率よく生乳からエキソソームが分離・精製されているか、ウェスタンブロッティングにより評価する系の確立を試みた。牛の生乳エキソソームの表面抗原マーカーを認識する抗体は、我々が以前に使用した抗 Milk fat globule (MFG) E-8 モノクローナル抗体 (Yamada et al., J. Vet. Med. Sci. 74: 1523-1525, 2012) 以外は不明である。そこでヒトエキソソームの表面抗原マーカーとして用いられている CD9、CD63、CD81、Flotillin を選択し、それぞれの市販抗牛抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

(3) 生乳エキソソームを利用した BLV 感染診断方法の確立

超遠心の繰り返しの超遠心分離試薬を併用することで得られた生乳エキソソームから、BLV のエンベロップ、gag 蛋白を認識する 3 種類の抗体を用いたウェスタンブロッティングにより BLV 蛋白の検出を試みた。また、エキソソームから核酸を抽出し、PCR や LAMP 法により BLV 遺伝子の検出も試みた。

4. 研究成果

(1) 生乳エキソソームの効率的な分離・精製方法の確立

用いた 5 種類の市販エキソソーム分離キットは、いずれも牛の生乳から直接エキソソームを分離することはできなかった。そこで超遠心の繰り返しの超遠心により生乳に含まれるカゼインを除去後、分離キットを用いたところ、いずれのキットでも生乳エキソソームが回収できることを、抗 MFG-E8 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認できた。このことから、牛の生乳蛋白の 80% を占めるカゼインを取り除けば、市販キットを利用し生乳エキソソーム分離が可能であることが明らかとなった (図 1)。

従来の精製方法 キットとの併用方法

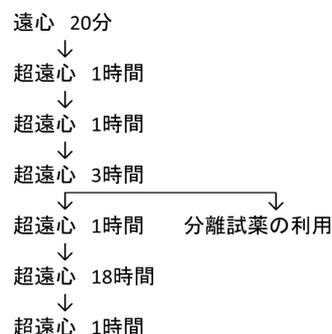


図 1 効率的な分離・精製方法

カゼインの除去が重要であることが分かったため、現在超遠心を使わずにカゼインを除去する方法を検討している。

(2) 分離の評価系に用いる抗体の検索

用いた市販の抗牛抗体はいずれもフローサイトメトリーに利用可能なものを選択したが、精製したエキソソームを用いたウェスタンブロッティングでは、従来使用している抗 MFG-E8 モノクローナル抗体以外は、用いたいずれの抗体も生乳エキソソームの検出に利用できなかった。

このことから、牛エキソソーム研究において、我々が保有している抗 MFG-E8 モノクローナル抗体の優位性が示され、今後の生乳エキソソーム解析にとって世界的にも重要なツールとなることが示唆された。

(3) 生乳エキソソームを利用した BLV 感染診断方法の確立

我々は以前、BLV 感染牛の生乳中に BLV 蛋白の存在を確認している。そこで、BLV に感染していればどの牛でも生乳エキソソーム中に BLV 蛋白が検出されるか、感染しているが発症していない若い牛を選別し検討した。超遠心の繰り返しと、エキソソーム分離試薬を併用することで得られた生乳エキソソームからは、ウェスタンブロッティングにより BLV のエンベロップ、gag 蛋白は検出できなかった。さらに、PCR と LAMP 法では BLV のエンベロップ、tax 遺伝子は検出できなかった。

このことから、生乳エキソソーム中の BLV 蛋白や核酸の存在は、感染牛の血中 BLV コピー数と相関する可能性が示唆された。

以上より、生乳エキソソームを利用した新たな BLV 感染牛のモニタリング手法・農家単位での一括診断手法の開発に向けた基礎的なデータを得ることに成功した。今後は、ウイルス蛋白や核酸だけでなく、BLV 感染によりエキソソーム中に特異的に現れる細胞由来の蛋白や核酸をターゲットとした BLV 感染の診断方法についても検討する予定である。

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 12 件)

Inoshima, Y., Ishiguro, N.: Evaluating the stability of loop-mediated isothermal amplification reagents at irregular storage temperature for on-site diagnosis. JARMAM 26: 7-12, 2015. (査読有)

Takahashi, K., Inoshima, Y., Ishiguro, N.: Role of cell death in the

propagation of PrP^{Sc} in immune cells. Arch. Virol. 160: 693-399, 2015. (査読有) DOI: 10.1007/s00705-014-2320-z

Muhammad, N., Murakami, T., Inoshima, Y., Ishiguro, N.: Long-term kinetics of AA amyloidosis and effects of inflammatory restimulation after disappearance of amyloid depositions in mice. Clin. Exp. Immunol. 181: 133-141, 2015. (査読有) DOI: 10.1111/cei.12615

Murakami, T., Inoshima, Y., Ishiguro, N.: Systemic AA amyloidosis as a prion-like disorder. Virus Res. 207: 76-81, 2015. (査読有) DOI: 10.1016/j.virusres.2014.12.019

Ogawa, S., Murakami, T., Inoshima, Y., Ishiguro, N.: Effect of heating on the stability of amyloid A (AA) fibrils and the intra- and cross-species transmission of AA amyloidosis. Amyloid 22: 236-243, 2015. (査読有) DOI: 10.3109/13506129.2015.1095735

下田智彦、竹馬工、中山季大、鈴木義久、中西運悦、小畑晴美、猪島康雄：新生子豚にみられた感染後期の豚痘。家畜診療 62: 167-173, 2015. (査読有)

井口陽香、小島久美子、鈴木幹一郎、山本由美子、尾川誠次郎、芝原友幸、猪島康雄：徳島県で確認された離乳豚での豚痘。日本豚病研究会報 66: 26-29, 2015. (査読有)

Inoshima, Y., Ishiguro, N.: On-site visual diagnosis of parapoxvirus infection using a portable cordless incubator. Anal. Sci. 30: 1169-1172, 2014. (査読有) DOI: <http://doi.org/10.2116/analsci.30.1169>

Shigemura, H., Ishiguro, N., Inoshima, Y.: Up-regulation of MUC2 mucin expression by serum amyloid A3 protein in mouse colonic epithelial cells. J. Vet. Med. Sci. 76: 985-991, 2014. (査読有) DOI: <http://doi.org/10.1292/jvms.14-0007>

Matsumura, S., Inoshima, Y., Ishiguro, N.: Reconstructing the colonization history of lost wolf lineages by the

analysis of the mitochondrial genome. Mol. Phylogenet. Evol. 80: 105-112, 2014. (査 読 有) DOI: 10.1016/j.ympev.2014.08.004

Kamatari, Y. O., Ohta, S., Inoshima, Y., Oda, M., Maruno, T., Kobayashi, Y., Ishiguro, N.: Identification and characterization of a multispecific monoclonal antibody G2 against chicken prion protein. Protein Sci. 23: 1050-1059, 2014. (査 読 有) DOI: 10.1002/pro.2491

Ishiguro, N., Murakami, T., Elhelaly, A. E., Inoshima, Y.: Surveillance of amyloid deposition and bacterial contamination in chicken liver from meat market. J. Poult. Sci. 51: 104-107, 2014. (査 読 有) DOI: 10.2141/jpsa.0130028

〔学会発表〕(計 14 件)

猪島康雄、石黒直隆. 簡易 DNA 抽出と LAMP 法による野外でのパラポックスウイルス感染症診断. 第 27 回臨床微生物迅速診断研究会. 2015 年 7 月 4 日. 金沢商工会議所 (石川県・金沢市).

猪島康雄、重村洋明、石黒直隆. 腸管上皮における血清アミロイド A3 によるムチン産生の亢進. 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会. 2014 年 6 月 19 日. 北海道大学 (北海道・札幌市).

猪島康雄、石黒直隆. パラポックスウイルス感染症の野外での迅速診断法の開発. 第 157 回日本獣医学会. 2014 年 9 月 10 日. 北海道大学 (北海道・札幌市).

ほか 11 件

〔図書〕(計 2 件)

猪島康雄. 文永堂出版. ポックスウイルス、アスファウイルス、イリドウイルス (コアカリ獣医微生物学). 2015 年. P.134-138.

猪島康雄. 文永堂出版. 牛丘疹性口炎、偽牛痘 (獣医公衆衛生学 II). 2014 年. P.51.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~naishigu/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

猪島 康雄 (INOSHIMA, Yasuo)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：20355184