

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07203

研究課題名(和文) HTLV-1およびBLV感染による腫瘍化の比較解析

研究課題名(英文) Comparative analysis of tumorigenesis by HTLV-1 and BLV

研究代表者

谷 千賀子 (Tani, Chikako)

宮崎大学・医学部・研究員

研究者番号：60817047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ白血病ウイルス(BLV)は牛伝染性リンパ腫(EBL)の原因ウイルスである。本研究はBLVの発癌機構を明らかにし、BLVの対策に繋げることを目的とした。まず、BLVの性状を明らかにするため、BLV遺伝子の発現を調べた所、特に、複数のアンチセンス産物が転写されていることを見出した。次に、網羅的遺伝子発現解析より、キャリア牛からEBLと病態進行に伴い発現低下する分子を同定し、さらに、EBL牛で高発現する細胞表面抗原を同定した。このEBLマーカーに対する抗体を作製、免疫染色による診断系を構築した。本診断系は、牛白血病/リンパ腫の診断精度を向上させBLV感染制御の効率化を実現することが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

牛伝染性リンパ腫(EBL)は、ウシ白血病ウイルス(BLV)感染が原因で起こる。本研究では、まず、BLVの性状を明らかにするため、BLVの遺伝子解析を行い、BLVの発がん過程において重要な役割を果たす可能性があるウイルス因子を同定した。さらに、EBLの新規細胞表面マーカーを同定し、免疫組織染色による診断系を構築した。この診断系は、牛白血病/リンパ腫の診断精度を向上させBLV感染制御の効率化が図れる可能性があり、BLVの対策に寄与できるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：Bovine leukemia virus (BLV) is the causative agent of Enzootic bovine leukosis (EBL). The purpose of this study was to clarify the carcinogenic mechanism of BLV and to lead to countermeasures for BLV. First, to clarify the properties of BLV, the expression of the BLV gene was examined, and in particular, it was found that multiple antisense products were transcribed. Next, comprehensive gene expression analysis identified genes whose expression decreased during the disease progression, and we further identified cell surface antigens highly expressed in EBL cattle. An antibody against the identified marker was prepared, and a diagnostic system by immunostaining was constructed. This diagnostic system is expected to improve the diagnostic accuracy of EBL and improve the efficiency of BLV infection control.

研究分野：病態獣医学

キーワード：BLV 牛白血病 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) とウシ白血病ウイルス (BLV) は近縁の RNA 腫瘍ウイルスである。HTLV-1 はヒトに感染し、成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATL) を、BLV は牛に感染し牛伝染性リンパ腫 (EBL) を引き起こすが、その臨床像が非常に類似している。また、両疾患ともに日本で流行しており、EBL はここ 15 年で約 23 倍の急増を示している。BLV 牛感染症は全世界的に流行し、わが国の感染率は 35% にも及び、この感染症による被害額は数兆円と推定される。HTLV-1 に関しては、その発症機構が明らかになりつつあり、ATL の治療成績も向上している。一方で、BLV は、ウイルス自身の生化学的性状をはじめ未解明の部分が多い。BLV ウイルスの排除にはその増殖や発癌機構の解明が不可欠である。日本では現在、BLV 感染牛の隔離および淘汰による BLV 感染の清浄化が行われてきたが、未だに BLV 感染の経済的損失は非常に大きく、BLV の感染や発癌機構に基づいた予防、診断、治療法の開発が急務の課題となっている。

2. 研究の目的

現在日本の牛の約 30% が BLV に感染している。感染牛の約 30% は持続性リンパ球増多症 (PL) となり、乳房炎や肺炎等の日和見感染症を合併し、生産性の低下、傷病率の上昇につながっている。BLV 感染に対する有効な防疫対策が未だ確立されておらず、その感染は増加傾向にあり、BLV のウイルス的性状や発癌様式の詳細な解明が必要となってきた。本研究では、HTLV-1 の性状と比較しつつ、またその発癌機構を基盤に、BLV の増殖や発癌機構を明らかにし、BLV の総合的な対策につなげる。そこで、1) BLV の細胞感染の分子機構、及び EBL 発症機構を解明し、その感染予防や治療法の開発につなげること、2) BLV 多段階発癌の診断、治療薬の開発に向けて、BLV 感染細胞および腫瘍細胞のバイオマーカーを同定し、さらにその機能解明より発癌の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

本研究では、BLV 持続産生羊腎臓細胞株である FLK-BLV 細胞を使用した。FLK-BLV 細胞株は、10% FBS および Penicillin-Streptomycin を含む DMEM 培地を使用した。細胞培養は、5% CO₂、37°C のインキュベーター内で行った。

(2) RACE-PCR

cDNA は、dNTP (各 1 mM)、0.125 μM オリゴ dT アダプタープライマー、および 10 ユニットの AMV 逆転写酵素 XL (Takara) を含む 40 μl の反応液で 5 μg のトータル RNA を使用して合成した。反応は 50°C で 30 分間行い、95°C で 5 分間加熱した後、氷上に置いた。PCR 増幅は、dNTP (各 600 μM) と 1 ユニットの Ex Taq DNA ポリメラーゼ (Takara) を含む 50 μl の混合液でテンプレートとして 5 μl の cDNA を使用して行い、PCR は次のサイクルで行った：94°C で 5 分の変性ステップ、94°C で 30 秒、55°C で 30 秒、および 72°C で 3 分の 30 サイクル、および 72°C で 10 分間の伸長反応。次に、1 マイクロリットルの PCR 反応液を、nested プライマーを用いて 1st PCR と同じ条件で 25 サイクル再増幅した。

(3) RT-PCR

トータル RNA は、TRIzol 試薬 (Life Technologies) を使用して、キットのプロトコルに従って抽出した。cDNA の合成は、ランダムプライマーを用いた RNA PCR キット (Takara) を使用した。PCR 増幅は、1 μL の cDNA、12.5 pmol の各プライマー、0.2 mM の各 dNTP、2.0 μL の MgCl₂ を

含む 10×PCR バッファー、および 1 ユニットの Taq ポリメラーゼ (Takara) を含む 20 μL の反応で行った。

(4) マイクロアレイ

網羅的遺伝子発現解析は、24,341 のプローブセットからなる GeneChip Bovine Gene 1.0 ST アレイ (ThermoFisher) を用いて実施した。GeneChip WT PLUS Reagent Kit (ThermoFisher) でトータル RNA を逆転写、増幅を行い、GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit (ThermoFisher) を用いて標識した。続いて、標識 cRNA を GeneChip Bovine Gene 1.0 ST アレイにハイブリダイズした。アレイを洗浄し、ストレプトアビジン-フィコエリトリンで染色し、プローブアレイスキャナーにてスキャンした。アレイ画像の取得と初期定量化は、GeneChip コマンドコンソールソフトウェア (Affymetrix) を使用し、GeneSpring GX ソフトウェア (Agilent Technologies) を用いて解析した。

(5) 免疫組織染色

組織を採取後、20% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィンに包埋 (開放型自動ティッシュプロセッサ TP1020 ライカ) 回転式マイクロトーム (MULTICUT ライカ) を用いて 4 μm に薄切した。作成したパラフィン切片に、ヘマトキシレン・エオジン (HE) 染色と免疫染色を実施した。免疫染色の抗原賦活化は、pH6.0 のクエン酸緩衝液を用いてオートクレーブ処理 (121 °C、10 分) により実施した。一次抗体として、ヒト CD3 (SIGMA USA 希釈倍率/1:800)、ウシ IgM (BETHYL USA 希釈倍率/1:800) に対するウサギポリクローナル抗体を用いた。二次抗体は、EnVision+ デュアル・リンク (HRP ウサギ/マウス DaKo USA) を用いた。発色剤は、Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (DaKo USA) を用いた。

4. 研究成果

(1) BLV アンチセンス RNA の発現動態

HTLV-1 では、HBZ はウイルス自身の転写制御や宿主のシグナル伝達等、多岐にわたって影響を及ぼし、発癌過程で持続的に発現し必須の役割を果たしている。そこで、BLV による発癌機構解明を目的として、そのアンチセンス鎖の転写に着目し、BLV プロウイルスの発現様式を RACE 法により網羅的に解析した。解析には、BLV 持続産生羊腎臓細胞株 FLK-BLV 細胞を使用し、5' -、3' -RACE PCR 法およびシークエンス解析を行った。その結果、BLV には、複数のアンチセンス転写産物が存在することがわかった。そのアンチセンス転写産物は、スプライス型 (SI) と非スプライス型 (US) の両方が産生されており、これらの発現様式は ATL の原因ウイルスである HTLV-1 のアンチセンス転写産物と似たものであった。特に、発がんに必要な HBZ の SI と US に相当するものであったことから、アンチセンス鎖の転写は BLV と HTLV-1 で保存されたメカニズムであることが示唆された。しかしながら、CPAT を用いた *in silico* の解析により HBZ とは異なり、BLV の SI と US は両者ともタンパク質として機能する可能性が低いことが示唆された。さらに、新鮮牛白血病検体を用いた RT-PCR 解析から、BLV US および SI RNA は EBL 細胞で発現することを確認した。

以上、BLV のセンス鎖の転写は、EBL 細胞で不活化されることが知られていることから、BLV アンチセンス RNA は発がん過程において重要な役割を果たしている可能性が推測された。更なる BLV アンチセンス RNA の機能解析により、BLV 感染やがん発症における生理的役割を明らかにする必要があると考えられる。

(2) BLV 牛白血病の新規マーカー分子の同定

EBL の病態解明の促進には、EBL 細胞に特異的なマーカーの単離は必須である。BLV 感染 B 細胞の表面抗原として IgM や CD5/B 細胞マーカーが用いられているが、現在の診断法では EBL 細

胞を正常 B 細胞と分離することができない。このため病態解析や病理診断には大きな問題があると懸念される。しかしながら、これまで BLV/EBL の網羅的遺伝子発現解析の報告がない。我々は、EBL の新規バイオマーカーを開発するため、BLV 感染牛、EBL 発症牛、および健康牛の末梢血およびリンパ節検体を用いて cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。宮崎県の黒毛和種およびホルスタイン種から末梢血または腫瘍組織を採取し、BLV 感染細胞が濃縮する IgM+細胞をセルソーターで分取し、マイクロアレイに供した。

その結果、無症候性キャリア牛、PL 発症牛、EBL 発症牛と病態進行に伴い発現低下する細胞表面分子を複数同定し、さらに、EBL 発症牛で高発現する細胞表面抗原を同定した。Single experiment analysis (SEA)解析では、EBL は、細胞周期や DNA 複製経路の活性化とともに癌に特異的なシグネチャーを示した。また、CADM1 や CCR4 などの ATL に特徴的な遺伝子群は、EBL では発現変動しておらず、HTLV-1 と BLV は異なる遺伝子異常を引き起こし、発がんを導いていることが示唆された。

(3) 新規表面マーカーを用いた BLV 牛白血病の新規診断系の開発

牛白血病/リンパ腫の診断精度を向上させ BLV 感染制御の効率化を実現するため、同定した新規バイオマーカーを用いて世界初となる BLV 牛白血病・リンパ腫診断系を確立することを目的とした。宮崎県内の食肉衛生検査所や畜産農家の協力の下、牛白血病/リンパ腫検体、BLV 感染牛の検体を収集し、網羅的遺伝子発現解析を行った結果、新規表面抗原として膜タンパク質を同定した。この膜タンパク質は BLV 感染牛、PL 牛で発現がほとんどなく、EBL で 50 倍以上発現増加する。

診断系開発として、ウサギ抗体を作製し、EBL 検体を用いて免疫組織染色による診断系を構築した。その結果、解析した全ての症例において EBL 細胞に強く反応することを見出した。確立した診断系は、牛白血病/リンパ腫の診断精度を向上させ BLV 感染制御の効率化を実現するものと期待される。また、この膜タンパク質は、解析した全ての EBL 発症牛の腫瘍細胞で高発現していることから、BLV による B リンパ腫発症機構において重要な役割を持つ可能性が推測される。さらに、この膜タンパク質は、ヒトで創薬のターゲットとして注目されており、B リンパ腫における高発現の意義の究明もまた重要な課題となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shingo Nakahata, Chikako Tani, Tomonaga Ichikawa, Hirohisa Mekata, Kazuhiro Morishita
2. 発表標題 Identification of novel antisense RNAs in the genome of bovine leukemia virus (BLV)
3. 学会等名 第30回世界牛病学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	森下 和広 (Morishita Kazuhiro) (80260321)	宮崎大学・医学部・教授 (17601)	
研究分担者	中畑 新吾 (Nakahata Shingo) (80437938)	宮崎大学・医学部・准教授 (17601)	

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
---------	---------