

令和元年6月19日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15044

研究課題名(和文) エピジェネティクス解析による地方病性牛白血病の若齢発症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of early onset mechanism of enzootic bovine leukosis by epigenetics analysis

研究代表者

猪熊 壽 (Inokuma, Hisashi)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：70263803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：若齢肥育牛の地方病性牛白血病(Enzootic bovine leukosis: EBL)症例では、アポトーシス関連遺伝子BMP-6のプロモーター領域のメチル化が3歳以上の症例に比較して高頻度に生じていた。若齢肥育牛におけるEBL早期発症には肥育牛特有の飼養管理など、後天的な環境要因によるエピジェネティックな変化の関与が考えられた。また、若齢EBLでは牛白血病ウイルスがプロモーター領域や転写活性領域へ組み込まれる頻度が高く、組み込み部位の相違も早期発症に関与すると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

若齢肥育牛の成牛型牛白血病発症に発がん関連遺伝子であるBMP-6のエピジェネティックな変化が明らかにされたことにより、飼養管理、とくに栄養学的観点からウイルス発がんを制御する手掛かりを見出すことが期待される。また、研究成果は畜産・獣医学において牛白血病の発症予防に資するだけでなく、医学領域における成人T細胞型白血病の動物モデルとして、発症メカニズムの解明および発症予防に貢献できる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：The frequency of methylation of promoter region of the apoptosis related gene BMP-6 in enzootic bovine leukosis (EBL) cases of young fattening cattle less than 3 years was found to be higher compared to EBL cases more than 3 years old. In the early onset of EBL in young fattening cows, environmental factors such as feeding management specific to fattening cows were considered to be involved by affecting epigenetics change to the animal genome. Furthermore, bovine leukemia virus (BLV) was frequently integrated into the promoter regions and transcriptionally active regions of host genome in young EBL less than 3 years old. This finding also suggested that BLV integration sites are involved in the early onset of EBL.

研究分野：獣医内科学

キーワード：牛白血病 若齢発症 エピジェネティクス 牛白血病ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

地方病性牛白血病(Enzootic bovine leukosis: EBL)は牛白血病ウイルス(Bovine leukemia virus: BLV)感染が原因で生じる牛の感染性疾患である。BLVは発がん遺伝子を有しないため、発症に至るのは感染牛のうち数%であり、潜伏期も長い。このため一般には、EBLは3歳以上の牛で発症し、教科書的には「成牛型牛白血病」と呼ばれ、若齢牛発症は非常にまれである。近年、3歳未満の若齢肥育牛におけるEBL発生が増加しているが、この原因については明らかではない。肥育牛の生産者を中心に発症予防対策の確立が期待されている。

## 2. 研究の目的

EBL若齢発症には、BLV感染後の肥育という特殊な飼養管理と栄養状態が強く関与するのではないかと考えるに至った。すなわち、若齢EBL発症には、後天的な遺伝子修飾(エピジェネティクス)により発がん抑制遺伝子などの発現抑制が早期に生じるという仮説を考えた。本研究では若齢牛のEBL発症機構を解明するために、EBL発症牛のエピジェネティクス解析を中心として以下のことを明らかにすることを目的とした。

- (1) 若齢EBL発症牛における発がん抑制に関与する遺伝子修飾: 若齢EBL症例におけるがん抑制遺伝子、アポトーシス遺伝子などの発がん関連遺伝子のメチル化状況を解析
- (2) 若齢EBL発症牛におけるBLV-provirus挿入部位の特異性解析

## 3. 研究の方法

【材料】家畜診療施設及び食肉検査センターと連携し、若齢EBL発症牛の腫瘍化リンパ節または末梢血、または生体を材料とした。

### 【方法】

- (1) EBL発症の証明: inverse-PCRを用い、BLVのモノクローナルな組込みが認められた発症牛をEBLとした。
- (2) メチル化解析: EBL発症牛の特定ゲノム遺伝子をバイサルファイト処理し、PCR増幅後にシーケンス解析することで、各症例のメチル化割合を算定した。
- (3) BLV-provirus挿入部位解析: inverse-PCR産物の遺伝子解析による、BLV組込み部位を決定し、BLV-provirus挿入部位を解析した。

## 4. 研究成果

- (1) 若齢肥育牛の地方病性牛白血病(EBL)発症における発がん関連遺伝子のエピジェネティックな変異の有無を検証するため、アポトーシス関連遺伝子であるDAPK1およびBMP-6に着目し、そのメチル化解析を行った。DAPK1プロモーター領域CpG islandのメチル化割合はEBL牛0.0~12.1%、非EBL牛0.4~13.3%であり、両者に差が認められなかった。いっぽう、BMP-6プロモーター領域のCpG islandメチル化割合を解析したところ、EBL発症牛(5.4%)では健常牛(1.8%)より有意に高値を示した。また、3歳未満肥育EBL牛8.5%、3歳未満乳用EBL牛3.2%、3歳以上乳用EBL牛1.8%、3歳未満肥育健常牛2.1%、3歳未満乳用健常牛0.0%および3歳以上乳用健常牛2.1%であり、3歳未満の肥育EBL牛はその他の牛に比べ有意にメチル化割合が高かった。BMP-6プロモーター領域の高メチル化は若齢肥育牛におけるEBL早期発症に関与する可能性が示唆された。

- (2) BLV-provirus 挿入部位解析：3 歳齡未満 EBL34 頭、3 歳以上 EBL30 頭の BLV プロウイルスの組込部位及び組込部位周辺の宿主遺伝子を解析したところ、3 歳齡未満 EBL では特定の染色体や A/T 含量の特徴はないが、プロモーター領域や転写活性を持つ領域への組込頻度が 3 歳齡以上 EBL に比べ有意に高かった。転写に関わる領域への BLV プロウイルスの組込が早期発症に関与する可能性が示唆された。
- (3) 前白血病段階でのオリゴクローナル症例：EBL 発症牛症例を収集する過程で、迅速簡便な地方病性牛白血病証明法として B 細胞のモノクローナリティー PCR を検討していたところ、発症前の持続性リンパ球増多症の牛でも末梢血リンパ球のオリゴクローナルを示す個体が見出された。一部の感染牛では持続性リンパ球増多症の段階で既に腫瘍化していることが示唆された。
- (4) 地方病性牛白血病発症牛症例を収集する過程で、リンパ節の腫大がない非典型的な牛白血病、尿中に腫瘍細胞が認められた牛白血病、B 細胞型の胸腺型牛白血病、牛白血病との鑑別が必要な心膜由来中皮腫、子牛の赤芽球癆症例に遭遇した、いずれも臨床的にはたいへん希少であるため、症例報告として発表した。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Sakaguchi, K., Ougitani, N., Maezawa, M., Tanaka, Y., Watanabe, K., Horiuchi, N., Kobayashi, Y., Inokuma, H. A clinical case of enzootic bovine leukosis diagnosed by malignant lymphoma cells detected in urinary sediment. *Jap. J. Vet. Res.* (in press) 査読有

Maezawa, M., Watanabe, K., Horiuchi, N., Matsumoto, K., Kobayashi, Y., Inokuma, H. A clinical case of enzootic bovine leukosis in a 13 months old Holstein heifer. *Jap. J. Vet. Res.* 66: 209-213 (2018) 査読有

Maezawa, M, Koyama, K., Tanaka, Y., Horiuchi, N., Kobayashi, Y., Inokuma, H. Pure red cell aplasia in a Holstein calf. *Comp. Clin. Pathol.* 27: 253-255 (2018) [doi.org/10.1007/s00580-017-2586-0](https://doi.org/10.1007/s00580-017-2586-0) 査読有

Suzuki H., Watanabe, K., Horiuchi, N., Kobayashi, Y., Inokuma, H. Pericardial mesothelioma with severe congestive heart failure in a Holstein cow. *Jap. J. Vet. Res.* 65 (3): 167-172 (2017) 査読有

坂口加奈, 前澤誠希, 田中佑典, 互野佑香, 上沢 彩, 渡邊謙一, 堀内雅之, 古林与志安, 猪熊 壽. 体表リンパ節腫大のない地方病性牛白血病ホルスタイン種乳牛の 1 症例. 産業動物臨床医学雑誌. (2017) 査読有

猪熊 壽, 三浦沙織, 杉本和也, 古林与志安. ホルスタイン種乳牛に発生した T 細胞性皮膚型牛白血病の 1 症例. 産業動物臨床医学雑誌. 7(4): 179-183 (2016) 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

前澤誠希, 小川晴子, 猪熊 壽. 3 歳齡未満の地方病性牛白血病発症肥育牛における BMP-6 プロモーター領域のメチル化解析. 日仏獣医学会第 60 回研究例会 (2019.2.28 東京都渋谷区)

坂口加奈, 前澤誠希, 猪熊 壽. 牛白血病ウイルス感染による持続性リンパ球増多症牛の B リンパ球クローナリティー解析. 第 49 回日本家畜臨床学会学術集会 (2018.11.16 宮城県仙台市)

坂口加奈, 前澤誠希, 扇谷 学, 田中佑典, 渡邊謙一, 堀内雅之, 古林与志安, 猪熊 壽. 尿中への腫瘍細胞出現が臨床診断の一助となった地方病性牛白血病ホルスタイン種乳牛の 1 症例. 平成 30 年度北海道地区三学会 (産業動物獣医学会) (2018.9.26 北海道札幌市).

秋山奈緒, 前澤誠希, 田川道人, 渡邊謙一, 堀内雅之, 古林与志安, 猪熊 壽. 牛のミエログラム評価と病態解析への応用. 第 161 日本獣医学会学術集会 (2018. 9. 13 茨城県つくば市)

Wan Nor Amirah Diana Hishamnuri, 猪熊 壽, 中郡翔太郎, 前澤誠希, 坂口加奈, 渡邊謙一, 堀内雅之, 古林与志安. BLV 陽性のホルスタイン種育成牛にみられた胸腺への腫瘍浸潤を伴う牛白血病の 1 症例. 第 161 日本獣医学会学術集会 (2018. 9. 12 茨城県つくば市)

前澤誠希, 小川晴子, 猪熊 壽. 地方病性牛白血病発症若齡肥育牛におけるアポトーシス関連遺伝子のメチル化解析. 第 161 日本獣医学会学術集会 (2018. 9. 12 茨城県つくば市)

前澤誠希, 猪熊 壽. 3 歳未満の牛における地方病性牛白血病の発生状況. 日仏獣医学会第 58 回研究例会 (2018.3.5 東京都渋谷区)

坂口加奈, 前澤誠希, 猪熊 壽. マイクロチップ型核酸分離システムを用いた牛白血病ウイルス感染による持続性リンパ球増多症 B 細胞のクローナリティー解析. 日仏獣医学会第 58 回研究例会 (2018.3.5 東京都渋谷区)

猪熊 壽, 鈴木遥香, 上坂花鈴, 前澤誠希, 渡邊謙一, 堀内雅之, 古林与志安. ホルスタイン種乳牛にみられた心膜原発悪性中皮腫の 1 症例. 第 160 日本獣医学会学術集会 (2017.9.15 鹿児島県鹿児島市)

前澤誠希, 松本高太郎, 古林与志安, 猪熊 壽. 若齡牛における地方病性牛白血病の簡易診断法の検討. 第 160 日本獣医学会学術集会 (2017.9.14 鹿児島県鹿児島市)

前澤誠希, 鈴木遥香, 藤井沙希子, 太田 明, 渡邊謙一, 堀内雅之, 古林与志安, 猪熊 壽. 地方病性牛白血病を発症した 13 ヶ月齡ホルスタイン種育成牛の 1 症例. 平成 29 年度北海道地区三学会 (産業動物獣医学会) (2017.9.7 北海道江別市)

前澤誠希, 小山憲司, 田中優樹, 堀内雅之, 松本高太郎, 古林与志安, 猪熊 壽. ホルスタイン

ン種子牛にみられた赤芽球癆の1症例.第47回日本家畜臨床学会学術集会(2016.11.18 山形県天童市)

前澤誠希, 小熊圭祐, 泉対 博, 長谷部文子, 猪熊 壽. 若齢EBL発症牛におけるBLVプロウイルス組込み部位の解析.第159日本獣医学会学術集会(2016.9.7 神奈川県藤沢市)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2)研究協力者

研究協力者氏名: 前澤誠希、渡邊謙一、堀内雅之、古林与志安

ローマ字氏名: Masaki Maezawa, Ken-ichi Watanabe, Noriyuki Horiuchi, Yoshiyasu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。