

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16006

研究課題名(和文)牛白血病ウイルス感染によるB-1a細胞選択的腫瘍化機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of selective tumorigenesis of B-1a cells by bovine leukemia virus infection

研究代表者

相原 尚之(Aihara, Naoyuki)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：50821732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)は、地方病性牛伝染性リンパ腫(EBL)の原因ウイルスであり、感染牛においてBリンパ球の1種であるB-1a細胞を選択的に腫瘍化する。本研究はBLV感染によるB-1a細胞選択的腫瘍化機構の解明を目的とした。BLV感染牛ではEBL非発症の段階で体腔内脂肪組織(大網、腸間膜、心冠部)に存在するリンパ球の集積Fat-associated lymphoid cluster(FALC)が腫大し、同部位でB-1a細胞が選択的に増殖していた。さらに同部位でBLV RNAの発現が確認され、BLV感染によるFALCに限定したB-1a細胞選択的増殖の存在が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EBLの発生は30年前の40倍以上に急増し、国内で飼養される牛約400万頭の30～40%がBLVに感染しているとされることから、EBL発症リスクを持つ牛は120万頭以上と推定される。発症機構の解明は発症予防法の確立のための喫緊の課題であり、B-1a細胞に着目した研究は新しいアプローチである。本研究により、BLV感染後、体腔内FALCにおけるB-1a細胞の選択的な増殖、BLV RNA発現が明らかになった。腫瘍化を促進する微小環境の解明は発症予防法の開発に貢献する知見である。

研究成果の概要(英文)：Bovine lymphoma virus (BLV) is the causative agent of bovine epidemic lymphoma (EBL) in infected cattle. Although BLV can infect not only B-cell but also T-cells, monocytes, and granulocytes, BLV causes the development of B-cell lymphoma derived from CD5-positive B-1a cells. This study aimed to elucidate the mechanism of B-1a cell-selective tumorigenesis in BLV-infected cattle. B-1a cells are mainly located in fat-associated lymphoid clusters in the body cavity, therefore, pathological findings of FALCs were observed in the present study. As a result, B-1a cells were selectively proliferating at FALC in BLV-infected cattle at the asymptomatic and persistent lymphocytosis stage. Furthermore, BLV RNA expression was confirmed in the same area. These findings were not observed in the lymph node. This study indicated that the existence of selective proliferation of B-1a cells is restricted to FALC due to BLV infection.

研究分野：獣医病理学

キーワード：牛伝染性リンパ腫ウイルス リンパ腫 B-1a細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) は、牛の地方病性牛伝染性リンパ腫 (EBL) の原因ウイルスであり、国内の 30~40%の牛が感染し、その被害は 30 年前の 40 倍以上と急拡大しており、BLV 感染による腫瘍化進展機構の解明が急がれている。BLV 感染は、B リンパ球の 1 種である B-1a 細胞を選択的に腫瘍化する。B-1a 細胞はその局在及び特性が特殊な B リンパ球であり、胸腔及び腹腔内の脂肪組織に存在するリンパ球の集積 Fat-associated lymphoid cluster (FALC) に少数が維持され体腔内免疫に重要な役割を果たす一方、異常増殖・活性化しやすい性質により自己免疫疾患や腫瘍の発生に関与することが知られる。

2. 研究の目的

BLV は、B-1a 細胞以外に、T 細胞、マクロファージ、顆粒球等の様々な細胞に感染するにもかかわらず、B-1a 細胞を選択的に腫瘍化させる。また、腫瘍化までの期間、BLV は循環血中でほとんど検出されず、感染牛の多くは臨床症状を示さないものの (無症状ステージ)、数年間の時間をかけて、約 30%の牛が持続性リンパ球増多症 (persistent lymphocytosis: 以下、PL ステージ) に、そして、約 1~5%の牛で腫瘍化する (腫瘍化ステージ)。本研究は、腫瘍化以前の B-1a 細胞の増殖部位を明らかにし、B-1a 細胞の異常増殖に働く要因を同定することで、B-1a 細胞選択的な腫瘍化機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BLV 感染牛における体腔内 FALC の解析

病理解剖: BLV 陰性牛 10 頭、BLV 感染 EBL 未発症牛 14 頭 (無症状期 12 頭、持続性リンパ球増多症期 (PL 期) 2 頭)、BLV 感染 EBL 牛 3 頭を病理解剖し、大網、腸間膜、心嚢膜における FALC の腫大の有無、リンパ節、脾臓、扁桃等全身のリンパ装置を観察した。

病理組織学的解析: 大網、腸間膜、心嚢膜、リンパ節、脾臓、扁桃などの主要なリンパ組織を 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、定法に従ってパラフィンブロックを作製、3 μ m で薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。リンパ球の性状解析のため、Anti Bovine CD5 Mouse 抗体 (1:100; BIO RAD)、Anti CD20 Rabbit 抗体 (1:400; Thermo Fisher Scientific) を用いて CD5、CD20 に対する蛍光抗体法二重染色を行った。

BLV 局在解析: BLV に持続感染した培養細胞 (FLK-BLV) より抽出した RNA を用いて BLV Tax および AS1 領域に特異的なプローブを作製し、in situ hybridization (ISH) を実施した。大網、体腔リンパ節、体表リンパ節、脾臓、扁桃のパラフィン切片を用い、IsHyb In Situ Hybridization Kit (BioChain) により実施した。発色には ImmPACT Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate (Vector Laboratories) を用いた。

(2) EBL 発症牛の腫瘍発生部位の解析

当施設または食肉衛生検査所で病理解剖を実施した EBL 発症牛 120 頭について、臓器

ごとの腫瘍発生頻度を解析した。

4. 研究成果

(1) BLV 感染牛における体腔内 FALC の解析

病理解剖

陰性牛(10頭)では、大網、腸間膜、心嚢膜のいずれでも FALC の腫大は認められなかった(図 1A)。無症状期牛(12頭)では、83%で大網、83%で腸間膜、58%で心嚢膜の FALC の腫大が観察された(図 1B)。PL 期牛(2頭)では、いずれにおいても大網、腸間膜、心嚢膜の FALC の腫大が見られた。また、リンパ節の一部では、断面で限局的な乳白色部を認めた。発症牛(3頭)では、いずれにおいても大網、腸間膜、心嚢膜の FALC の腫大が見られ、多中心性にリンパ節が腫大していた。

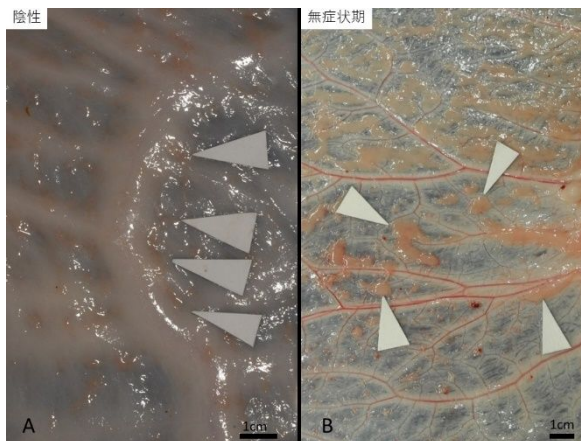


図 1 陰性牛及び無症状期牛の大網。無症状期牛では大網 FALC の腫大を認める。

病理組織学的解析

陰性牛では、大網において血管周囲に細胞集簇がみられるが、リンパ球だけでなく好酸球やマクロファージなど多様な細胞により構成されていた(図 2A)。無症状期牛では血管周囲を中心としてリンパ球の集簇がみられ、陰性牛と比較してリンパ球の比率が増加していた(図 2B)。PL 期牛では、大網 FALC でリンパ球の集簇を認め、血管周囲で高度であった(図 3)。リンパ節では発達したリンパ濾胞を認め、髄質側では核が大型で淡明なリンパ球が高頻度に分裂し増殖する像が島状にみられた。脾臓では、リンパ濾胞の高度な発達を認めた。濾胞内では高頻度な分裂像がみられた。扁桃では発達したリンパ濾胞が観察された。発症牛では、FALC において腫瘍性リンパ球が増殖し、リンパ節において既存の構造を置き換えるように腫瘍性リンパ球が敷石状に増殖していた。

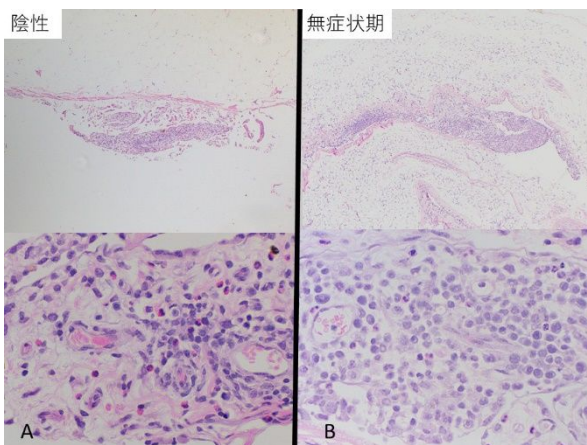


図 2 陰性牛及び無症状期牛の大網 HE 染色。

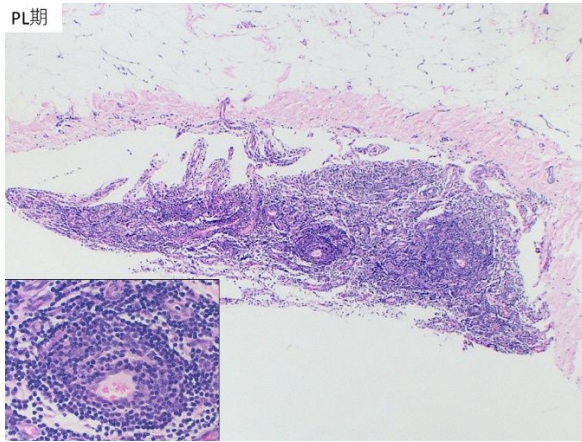


図3 PL期牛の大網 HE 染色。

BLV 局在解析

陰性牛の大網において、Tax、AS1 とともに陽性シグナルは認められなかった。無症状期牛では大網 FALC において Tax、AS1 とともに陽性であり、組織所見で示した血管周囲を中心としたリンパ球の集簇巣に一致して陽性を示した。体表リンパ節（浅頸リンパ節）、体腔リンパ節（腸間膜リンパ節、肺門リンパ節）は陰性であった（図4）。PL 期牛では大網、体表リンパ節（浅頸リンパ節、乳房上リンパ節）、体腔リンパ節（縦隔リンパ節）、脾臓、扁桃において Tax、AS1 とともに陽性を示した。リンパ節では、皮質において異型なリンパ球の増殖巣と一致した染色パターン、そしてリンパ濾胞の中心とその周囲を囲むような状的染色パターンが観察された。髄質においても強い陽性シグナルが認められた。脾臓、扁桃では、リンパ濾胞に一致して陽性シグナルが観察された。発症牛では腫瘍化した腸間膜リンパ節において、Tax、AS1 とともに強い陽性シグナルが観察された。

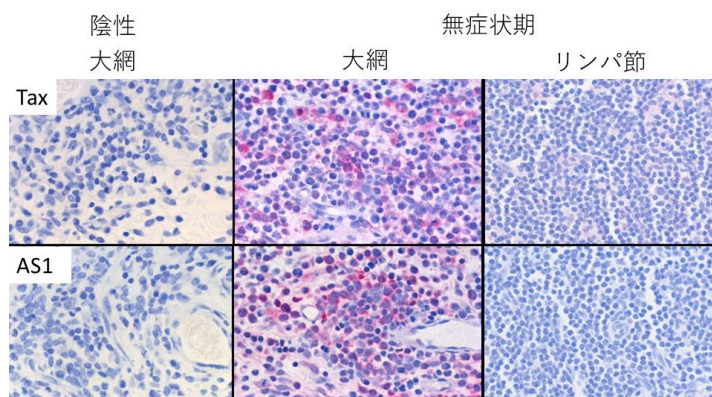


図4 陰性牛及び無症状期の大網 ISH。無症状期牛の大網 FALC において Tax、AS1 の陽性シグナルを認める。

リンパ球の性状解析

ISH で陽性シグナルが観察された無症状期牛の大網、PL 牛の大網およびリンパ節（浅頸リンパ節、乳房上リンパ節）で抗 CD5 及び抗 CD20 抗体による蛍光抗体法二重染色を実施した結果、ISH で観察されたウイルスの局在と一致して CD5/CD20 両陽性の B-1a 細胞の存在が認められた（図5）。

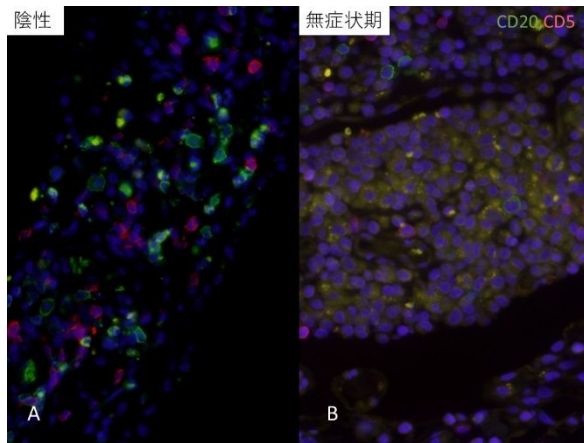


図5 陰性牛及び無症状期の大網蛍光抗体法二重染色。無症状期の大網 FALC において CD5 及び CD20 に両陽性を示す細胞の増殖を認める。

(2) EBL 発症牛の腫瘍発生部位の解析

発症牛では、多中心性のリンパ節の腫瘍化に加え、94%で心臓、83%で第四胃、51%で腎臓、48%で子宮、41%で肺、38%で膀胱、34%で小腸、10%で結腸にも腫瘍形成が見られた。心臓では心耳、心基底部分で腫瘍形成が多く見られた。

5. 総括

無症状期において、BLV 感染に関連した B-1a 細胞選択的な増殖は、体腔内 FALC で部位特異的に起こることが示された。同部位では BLV RNA が検出され、BLV 刺激が選択的増殖機序に関与することが示唆された。PL 期では、B-1a 細胞の増殖が FALC に加えリンパ節でも見られ、BLV RNA も FALC 及びリンパ節で観察されたことから、ウイルス増殖、B-1a 細胞増殖の場が全身のリンパ組織に広がることを示唆された。腫瘍発生部位は B-1a 細胞増殖部位と一致し、発症前における B-1a 細胞の選択的増殖部位で腫瘍化が進展することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamada Kazutaka, Yokoyama Taiki, Aihara Naoyuki, Une Yumi, Sato Reiichiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Role of autopsy imaging computed tomography in the post mortem study of farm animals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary Record Open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/vro2.1	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 -

1. 著者名 AIHARA Naoyuki, MOMOKI Anna, HATTORI Nanase, MURAKAMI Hironobu, OISHI Motoharu, GOTO Yoshiaki, SATO Reiichiro, NAGAI Makoto, YAMADA Kazutaka, KAMIIE Junichi	4. 巻 84
2. 論文標題 Congenital malformations of the external and middle ear accompanied by temporal bone anomaly in a calf	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 302 ~ 305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0446	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 -

1. 著者名 SATO Reiichiro, MERCIER Christoph Koch, AIHARA Naoyuki, KAWAI Kazuhiro, MURAKAMI Hironobu, YASUDA Rie, SATOH Hiroyuki, YOKOYAMA Taiki, YAMADA Kazutaka	4. 巻 82
2. 論文標題 Diagnosis of a sublingual abscess in a Japanese Black calf using computed tomography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1497 ~ 1501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.20-0384	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 桃木 杏奈, 服部 七星, 相原 尚之, 風間 啓, 村上 裕信, 佐藤 礼一郎, 上家 潤一
2. 発表標題 牛伝染性リンパ腫ウイルス感染牛におけるB-1a細胞選択的増殖の解析
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 服部七星, 相原尚之, 風間啓, 村上裕信, 佐藤礼一郎, 上家潤一
2. 発表標題 牛伝染性リンパ腫ウイルス感染牛におけるウイルスの局在に関連したB-1a細胞選択的増殖の解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021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

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