

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16008

研究課題名(和文)牛白血病の発症における突然変異誘導酵素AIDが果たす役割の解明

研究課題名(英文) Investigation on a role of activation-induced cytidine deaminase (AID) for development of enzootic bovine leukosis

研究代表者

西森 朝美 (Nishimori, Asami)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・研究員

研究者番号：80817578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：牛伝染性リンパ腫(BL)はレトロウイルス感染によって起こるウシのB細胞性リンパ腫であり、感染牛の約1～5%のみが発症へと至ることが知られているが、その詳細なメカニズムは明らかでない。本研究では、宿主の突然変異誘導酵素である活性化誘導シチジンデアミナーゼ(AID)に着目して、臨床検体および細胞株を用いてAID発現量および変異誘導に関わる活性を解析することで、BL発症とAIDとの関連性を検証した。その結果、両者に明瞭な関連は認められず、腫瘍形成におけるAIDの関与性は低いことが示唆された。一方、解析の過程でBL発症には癌関連遺伝子上のCpG部位への変異導入の影響が大きい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

これまでヒトの臨床検体や細胞株、およびマウスを用いた実験において、B細胞性リンパ腫とAIDの関連を示唆する報告がなされているが、ウシのリンパ腫との関連性は不明であった。本研究の結果から、BL症例におけるAIDの変異誘導因子としての関連性は低いと推察された。一方で、体細胞変異様式の解析により、BL発症牛では特定の癌関連遺伝子においてCpG部位のC(G) T(A)変異が高率に起こっていることが明らかになったため、今後より詳細な体細胞変異解析を進めることで、BL発症メカニズムに関して新たな知見が得られると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Bovine leukemia (BL) is a malignant B-cell lymphoma in cattle caused by the infection of the retrovirus. Although it is known that only 1-5% of the infected cattle develop lymphoma, a mechanism of tumor development in BL cattle is not fully understood. In this study, we focused on activation-induced cytidine deaminase (AID), a host-derived enzyme introducing point mutations to genomic DNA, and examined its relevance with BL onset by analyzing expression levels and functional activities of AID in clinical samples or cell lines. As results, no significant association was observed between them, suggesting that AID was irrelevant to tumor development in BL cattle. Interestingly, an offshoot of our research revealed that point mutations at CpG sites was highly observed within several cancer-related genes in BL cattle.

研究分野：獣医学

キーワード：牛伝染性リンパ腫 腫瘍発症機序 B細胞 AID

## 1. 研究開始当初の背景

牛伝染性リンパ腫 (BL, 2020 年に「牛白血病」より名称変更) はウシの B 細胞性リンパ腫であり、発症すると予後不良で死に至るほか、摘発された個体は食肉として全廃棄となることから、家畜衛生上重要な疾病の 1 つである。BL はレトロウイルス科に属する bovine leukemia virus (BLV) の感染によって起こり、感染牛の約 1~5% が発症へと至ることが知られている。現在のところ BL 発症メカニズムには不明な部分が多く、なぜ限られた感染牛のみが BL を発症するのか、最終的な腫瘍化のスイッチとして重要な因子が何かという点は明らかになっていない。

本研究では BL 発症のリスク因子として、宿主の突然変異誘導酵素である活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID) に着目した。AID は抗体産生細胞である B 細胞に局限して発現し、抗体の抗原認識部位に点突然変異を導入して抗原-抗体結合性を向上させる“体細胞高頻度突然変異”に重要な因子である。通常 AID の作用部位は抗体遺伝子領域に限定されているが、本来の標的とは別の部位に作用した場合には、癌関連遺伝子への変異導入による機能異常などを通じて細胞の癌化を引き起こす可能性を有している。これまでヒトの臨床検体や細胞株、およびマウスを用いた実験において、B 細胞性リンパ腫と AID の関連を示唆する報告がなされているが、BL 発症との関連性は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、臨床検体およびウシ B 細胞性リンパ腫由来細胞株を用いて AID の発現量、変異誘導に関わる活性を解析することで、BL 発症牛の腫瘍形成における AID の関与を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) AID 発現量の評価

ウシ B 細胞性リンパ腫由来の細胞株および BL 発症牛の腫瘍臓器から抽出した RNA を用いて、リアルタイム PCR 法により AID mRNA の発現量を測定し、B 細胞以外の細胞株および非発症牛のリンパ節検体と比較した。また、BL 発症牛の腫瘍臓器における RNA-seq データを用いて、ウシゲノムの AID 遺伝子にマッピングされるリードを評価した。

### (2) ゲノム中ウラシル量を指標とした AID 活性の評価

AID は、DNA 中のシトシンをウラシルに転位させることで点突然変異を誘導することが知られている。そこでゲノム DNA 中に含まれるウラシル量を定量する系を構築し、BL 発症牛と非発症牛の臨床検体における DNA 中ウラシル量を比較した。

### (3) BL 症例における体細胞変異様式の解析

BL 発症牛のゲノム DNA から癌関連遺伝子における体細胞変異の有無と変異様式を解析するため、標的遺伝子の選抜、long-range PCR、およびアンプリコンシーケンスを実施した。ヒト B 細胞腫瘍で変異頻度が高い遺伝子を中心に 21 遺伝子を選択し、BL 発症牛の末梢血および腫瘍部から抽出したゲノム DNA を鋳型として、対象遺伝子のエキソン領域を long-range PCR により増幅した。作成した PCR アンプリコンについて NovaSeq6000 を用いた次世代シーケンス解析を行い、対象遺伝子の塩基配列全長を決定した。同定した塩基配列から SNP および Indel を抽出し、末梢血検体では認められず、腫瘍部検体でのみ認められる変異を体細胞変異として評価した。

#### 4. 研究成果

- (1) B 細胞由来細胞株において *AID* mRNA の著明な発現上昇は認められず、また BL 発症牛では非発症牛に比べて *AID* mRNA 発現が有意に減少していた (図 1)。BL 発症牛 4 症例の RNA-seq データをウシゲノムにマッピングしたところ、*AID* 遺伝子領域には全くリードが認められないことが分かった。
- (2) 構築した検出系において、1 塩基のウラシルを含む人工合成遺伝子 (スタンダード DNA) では濃度依存的な発色を示したが、臨床検体は全て検出限界以下となり、BL 発症牛におけるゲノム中ウラシル量の明らかな増加は認められなかった (図 2)。
- (3) 21 遺伝子中 5 遺伝子 (*TP53*, *CREBBP*, *KMT2D*, *KRAS*, *NOTCH1*) で体細胞変異が検出され、そのうち *TP53* 遺伝子では全症例の 83.3% (15/18 症例) に体細胞変異が認められた (図 3)。 *TP53* 遺伝子に変異がなかった 3 症例のうち、1 症例では *CREBBP* および *KRAS* 遺伝子に体細胞変異が検出された。BL 発症牛検体の変異解析の結果、合計 21 個の点突然変異が検出され、その変異様式は C(G) T(A) が 81.0% (17/21)、C(G) A(T) が 14.3% (3/21)、C(G) G(C) が 4.8% (1/21) であった (表 1)。また、点突然変異箇所の前後の塩基配列を指標にモチーフ解析を行ったところ、*AID* 特有のモチーフとされる WRC/GYW に一致する点突然変異は 28.6% (6/21) と少数であり、BL 症例における *AID* の変異誘導因子としての関連性は低いと推察された。一方で、C(G) T(A) 変異を引き起こす別の要因として知られる CpG モチーフに一致する点突然変異は 57.1% (12/21) であったことから、BL 発症過程には CpG 部位への変異導入の影響が大きいことが示唆された。

以上の結果から、BL 発症において *AID* が変異誘導因子として機能している可能性は低いと考えられ、腫瘍形成と *AID* との関連性は乏しいことが示唆された。一方で、体細胞変異様式の解析によって、BL 発症牛では特定の癌関連遺伝子において CpG 部位の C(G) T(A) 変異が高率に起こっていることが明らかになった。今後は、BL 発症牛における体細胞変異様式のより詳細な解析や、同定した点突然変異が及ぼす機能的影響の評価を進めることで、BL 発症メカニズムに関して新たな知見が得られることが期待される。

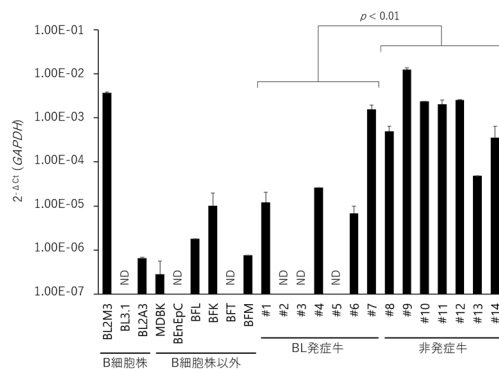


図 1 細胞株および臨床検体における *AID* mRNA 発現

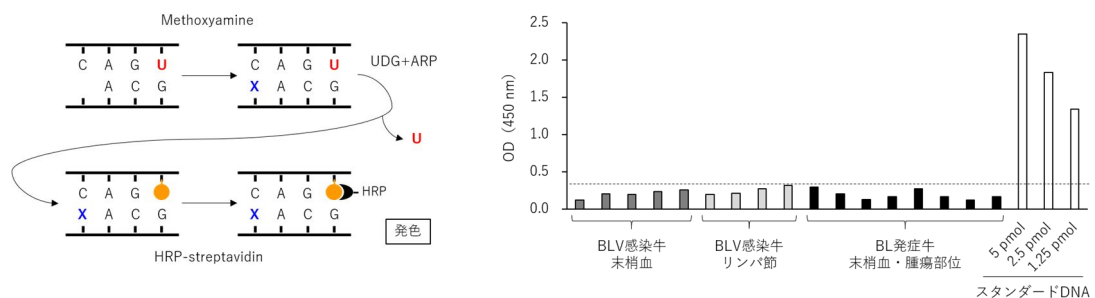


図 2 ゲノム中ウラシル検出系の構築と臨床検体におけるウラシル量

遺伝子名	症例番号																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
TP53	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	83.3%
CREBBP					■														5.6%
KMT2D				■															5.6%
KRAS					■														5.6%
NOTCH1						■													5.6%

■ 体細胞変異あり

図 3 BL 発症牛における癌関連遺伝子の体細胞変異の検出

表 1 本研究で認められた BL 発症牛の点突然変異様式

Case	Gene	Position	Info	REF	ALT	CpG CG/CG	AID GYW/WRC
2	TP53	4039	missense	C	T	○	○
3	TP53	3084	missense	C	T	○	×
4	KMT2D	34679	missense	G	T	×	×
	TP53	4723	nonsense	C	T	×	×
5	KRAS	6238	missense	G	A	×	×
	CREBBP	8303	nonsense	G	A	×	×
6	CREBBP	94947	nonsense	G	A	×	×
	NOTCH1	12794	missense	C	T	○	○
7	TP53	3527	missense	C	T	×	×
8	TP53	4039	missense	C	T	○	○
9	TP53	3512	missense	C	T	○	×
10	TP53	3486	nonsense	C	A	×	×
11	TP53	3513	missense	G	A	○	×
12	TP53	3516	missense	G	A	○	×
13	TP53	4039	missense	C	T	○	○
14	TP53	3550	missense	G	T	×	×
15	TP53	3512	missense	C	T	○	×
16	TP53	4039	missense	C	T	○	○
17	TP53	2402	missense	G	A	○	○
	TP53	4046	missense	C	G	×	×
18	TP53	3516	missense	G	A	○	×

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 西森朝美
2. 発表標題 牛白血病の発症における突然変異誘導酵素AIDが果たす役割の解明
3. 学会等名 第22回日本レトロウイルス研究会夏期セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西森朝美、安藤清彦、松浦裕一
2. 発表標題 牛伝染性リンパ腫の発症機構解明を目的とした体細胞変異の解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------