

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15005

研究課題名(和文) BLV-宿主遺伝子のキメラ転写産物を起点とした牛伝染性リンパ腫発症機序の検証

研究課題名(英文) Mechanism of tumorigenesis in bovine leukemia initiated by chimeric transcripts of BLV-host genes

研究代表者

岡川 朋弘 (Okagawa, Tomohiro)

北海道大学・獣医学研究院・特任助教

研究者番号：80829036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：地方病性牛伝染性リンパ腫(EBL)は牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)の感染を原因とするが、その発症機序は不明な点が多い。最近、EBLの腫瘍細胞ではBLVプロウイルスを起点としてアンチセンス転写が活性化され、BLVとその上流のドライバー遺伝子のキメラ転写産物が腫瘍化に寄与するという仮説が提唱された。そこで本研究では、EBL発症牛などの腫瘍検体を用いて、プロウイルス挿入部位を網羅的に解析し、腫瘍細胞のプロウイルス挿入部位の上流に位置するドライバー遺伝子を同定した。さらに、BLVと特定のドライバー遺伝子のキメラ転写産物を同定し、その発現と下流遺伝子の発現制御能を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本国内の農場では乳牛の41%、肉牛の29%がBLVに感染しており、この感染拡大に伴ってEBLの発生も国内で急増している。しかし、BLVの感染伝播や診断法に関する研究は盛んに進められている一方、BLVによるEBL発症機序に関する研究は限られている。本研究で得られた知見が、EBL発症リスクマーカーによる臨床診断やBLV感染牛の早期予後診断へと応用されれば、本疾病の制御による畜産被害の軽減につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Enzootic bovine leukosis (EBL) is caused by infection with bovine leukemia virus (BLV), but the tumorigenesis mechanism of EBL remains unclear. Recently, it was hypothesized that antisense transcription is activated in EBL tumor cells initiated from the BLV provirus and that chimeric transcripts of BLV and its upstream driver genes contribute to tumorigenesis. In this study, a comprehensive analysis of provirus integration sites in EBL tumor cells were performed to identify driver genes located upstream of the provirus insertion sites in tumor cells. Furthermore, chimeric transcripts of BLV and specific driver genes were identified and their expression and ability to regulate the expression of downstream genes were analyzed.

研究分野：感染症学

キーワード：牛伝染性リンパ腫 BLV キメラ転写産物 ドライバー遺伝子 腫瘍化機序

1. 研究開始当初の背景

牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV, 旧名 牛白血病ウイルス) はウシの B 細胞に持続感染し、持続感染牛の約 5% に地方病型牛伝染性リンパ腫 (EBL) を引き起こすが、EBL の発症機序は未だに不明な点が多い。

近年、日本国内の農場では BLV の感染が拡大しており、2009 ~ 2011 年の全国調査によると日本国内の乳牛の 41%、肉牛の 29% が BLV に感染している (Murakami et al., J. Vet. Med. Sci., 2013)。国内における BLV 感染率は極めて高く、全国規模での BLV 清浄化は困難である。BLV の蔓延に伴い、その感染に起因する EBL の発生も国内で急増している。農林水産省の統計によると、牛伝染性リンパ腫の発生数は 1998 年の 99 頭から 2021 年の 4,375 頭へと 44 倍に増加している。牛伝染性リンパ腫 (腫瘍) を発症した牛は、と畜場法により全部廃棄となる。食肉衛生検査所における牛の全部廃棄の原因の約 50% が牛伝染性リンパ腫であるという報告もある。また、家畜伝染病予防法に定められたウシの監視伝染病の中で、牛伝染性リンパ腫は群を抜いて発生が多く、その対策は急務である。しかし、BLV の感染伝播や診断法に関する研究は盛んに進められている一方、BLV による EBL 発症機序に関する研究は限られている。

最近、BLV プロウイルスを起点としてアンチセンス転写が活性化され、BLV と上流の宿主遺伝子がキメラ転写産物を形成することが発見された (Rosewick et al., Nat. Commun., 2017)。特に EBL の腫瘍細胞では、プロウイルスの上流にドライバー遺伝子がコードされているため、BLV とドライバー遺伝子のキメラ転写産物が腫瘍化機序に関与するという仮説が提唱された。しかしその後、本仮説の検証は進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、BLV とドライバー遺伝子のキメラ転写産物が EBL の腫瘍化に関与しているのかを検証する。まず、EBL 発症牛などの腫瘍検体を用いて、プロウイルス挿入部位を網羅的に解析し、キメラ転写産物を探索する。そして、腫瘍から同定したキメラ転写産物について、下流の遺伝子発現制御などを解析し、キメラ転写産物を起点とした EBL の新たな腫瘍化機序を検証する。

3. 研究の方法

EBL における BLV プロウイルス挿入部位の網羅的解析

EBL 発症牛 (n=230) の腫瘍・血液検体およびリンパ腫発症羊モデル (n=6) の腫瘍・血液検体を用いて、腫瘍細胞における BLV プロウイルス挿入部位を網羅的に解析した。まず、各検体の DNA を鋳型として、RAISING 法によりプロウイルス挿入部位を増幅し、シーケンス解析に供した。これらの増幅産物の配列について、ウシやヒツジのリファレンスゲノムとホモロジー解析を行い、宿主ゲノム上のプロウイルス挿入部位を特定した。そして、ゲノムのアノテーション情報を基にして、腫瘍細胞のプロウイルス挿入部位の上流に位置するドライバー遺伝子を同定した。

BLV-ドライバー遺伝子のキメラ転写産物の同定と発現解析

で特定されたプロウイルス上流のドライバー遺伝子を標的として、各腫瘍検体についてキメラ転写産物の同定と発現解析を実施した。まず、BLV-ドライバー遺伝子のキメラ転写産物を腫瘍検体の RNA から RT-PCR 法で増幅し、サンガーシーケンス法を用いてキメラ転写産物を同定した。次に、各腫瘍・血液検体におけるキメラ転写産物の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。

BLV-ドライバー遺伝子のキメラ転写産物の機能解析

で確認された BLV-ドライバー遺伝子のキメラ転写産物について、各腫瘍検体におけるドライバー遺伝子の下流で制御される遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により解析した。ドライバー遺伝子を介したシグナル経路が既知の場合は、データベースや先行研究をもとに下流の標的遺伝子を選抜した。またさらなる機能解析のために、各腫瘍検体から初代培養細胞の樹立を試みた。

4. 研究成果

本研究の内容について特許出願を計画しているため、研究成果の詳細については一定期間公表を見合わせる。詳細な内容が公表可能となった場合に、最終的な研究成果報告書を再提出する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Okagawa Tomohiro, Shimakura Honami, Konnai Satoru, Saito Masumichi, Matsudaira Takahiro, Nao Naganori, Yamada Shinji, Murakami Kenji, Maekawa Naoya, Murata Shiro, Ohashi Kazuhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Diagnosis and Early Prediction of Lymphoma Using High-Throughput Clonality Analysis of Bovine Leukemia Virus-Infected Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e02595-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.02595-22	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 Wada Yusaku, Sato Tomoo, Hasegawa Hiroo, Matsudaira Takahiro, Nao Naganori, Coler-Reilly Ariella L. G., Tasaka Tomohiko, Yamauchi Shunsuke, Okagawa Tomohiro et al.	4. 巻 5
2. 論文標題 RAISING is a high-performance method for identifying random transgene integration sites	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03467-w	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 該当する
1. 著者名 Sajiki Yamato, Konnai Satoru, Watari Kei, Okagawa Tomohiro, Tanaka Akina, Kawaji Satoko, Nagata Reiko, Maekawa Naoya, Suzuki Yasuhiko, Kato Yukinari, Murata Shiro, Mori Yasuyuki, Ohashi Kazuhiko	4. 巻 90
2. 論文標題 Prostaglandin E2 -Induced Immune Suppression via Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 in Paratuberculosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e0021022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/iai.00210-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sajiki Yamato, Konnai Satoru, Okagawa Tomohiro, Maekawa Naoya, Isezaki Masayoshi, Yamada Shinji, Ito Takuya, Sato Kozue, Kawabata Hiroki, Logullo Carlos, Jr Itabajara da Silva Vaz, Murata Shiro, Ohashi Kazuhiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Suppressive effects of Ixodes persulcatus sialostatin L2 against Borrelia miyamotoi-stimulated immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ticks and Tick-borne Diseases	6. 最初と最後の頁 101963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ttbdis.2022.101963	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Okagawa Tomohiro, Konnai Satoru, Nakamura Hayato, Ganbaatar Otgontuya, Sajiki Yamato, Watari Kei, Noda Haruka, Honma Mitsuru, Kato Yukinari, Suzuki Yasuhiko, Maekawa Naoya, Murata Shiro, Ohashi Kazuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Enhancement of Vaccine-Induced T-Cell Responses by PD-L1 Blockade in Calves	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines11030559	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 Okagawa Tomohiro, Konnai Satoru, Goto Shinya, Sajiki Yamato, Ganbaatar Otgontuya, Watari Kei, Nakamura Hayato, Wang Cai-Xia, Tachibana Taro, Kato Yukinari, Kameda Yayoi, Kohara Junko, Terasaki Nobuhiro, Kubota Manabu, Takeda Akira, Takahashi Hirofumi, Suzuki Yasuhiko, Maekawa Naoya, Murata Shiro, Ohashi Kazuhiko	4. 巻 54
2. 論文標題 Development of a high-affinity anti-bovine PD-1 rabbit-bovine chimeric antibody using an efficient selection and large production system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13567-023-01213-6	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 Nakamura Hayato, Konnai Satoru, Okagawa Tomohiro, Maekawa Naoya, Sajiki Yamato, Watari Kei, Kamitani Kana, Saito Maya, Kato Yukinari, Suzuki Yasuhiko, Murata Shiro, Ohashi Kazuhiko	4. 巻 97
2. 論文標題 Combined Immune Checkpoint Blockade Enhances Antiviral Immunity against Bovine Leukemia Virus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e0143022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.01430-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikehata Mari, Konnai Satoru, Okagawa Tomohiro, Abe Kentaro, Honma Mitsuru, Kitamura Toru, Maekawa Naoya, Suzuki Yasuhiko, Murata Shiro, Ohashi Kazuhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 In vitro evaluation of Lactiplantibacillus plantarum HOKKAIDO strain, effective lactic acid bacteria for calf diarrhea	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 1145445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fvets.2023.1145445	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 Tiyamane Wisa, Konnai Satoru, Okagawa Tomohiro, Nojima Yutaro, Ganbaatar Otgontuya, Maekawa Naoya, Hasebe Rie, Kagawa Yumiko, Kato Yukinari, Suzuki Yasuhiko, Murata Shiro, Ohashi Kazuhiko	4. 巻 261
2. 論文標題 Molecular characterization of immunoinhibitory factors PD-1/PD-L1 in sheep	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Veterinary Immunology and Immunopathology	6. 最初と最後の頁 110609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetimm.2023.110609	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nao Naganori, Okagawa Tomohiro, Nojiri Naomi, Konnai Satoru, Shimakura Honami, Tominaga Misono, Yoshida-Furihata Hazuka, Nishiyama Eri, Matsudaira Takahiro, Maekawa Naoya, Murata Shiro, Muramatsu Masamichi, Ohashi Kazuhiko, Saito Masumichi	4. 巻 169
2. 論文標題 Chimeric provirus of bovine leukemia virus/SMAD family member 3 in cattle with enzootic bovine leukosis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-024-05970-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岡川 朋弘	4. 巻 40
2. 論文標題 牛伝染性リンパ腫の免疫学的手法による制御 (特集 これからの牛伝染性リンパ腫対策)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床獣医	6. 最初と最後の頁 32 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 今内 覚, 岡川 朋弘	4. 巻 41
2. 論文標題 牛伝染性リンパ腫の現状から最後の砦: 発症予測法について	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床獣医	6. 最初と最後の頁 46 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 今内 寛, 岡川 朋弘	4. 巻 73
2. 論文標題 牛のリンパ腫発症を予測する「がん検診技術」を開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 DAIRYMAN	6. 最初と最後の頁 64 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岡川 朋弘	4. 巻 28
2. 論文標題 新規 BLV クローナリティ解析技術を用いた EBL 発症予測法の開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会ニュースレター	6. 最初と最後の頁 23 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 今内 寛, 岡川 朋弘, 斎藤 益満	4. 巻 51
2. 論文標題 One HealthアプローチにもとづくBLV/HTLV-I感染症におけるリンパ腫の診断と早期発症予測法の開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床とウイルス	6. 最初と最後の頁 192 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 今内 寛, 岡川 朋弘	4. 巻 70
2. 論文標題 牛伝染性リンパ腫診断の新技術・早期発症予測診断法RAISINGとは	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 家畜診療	6. 最初と最後の頁 259 ~ 266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 今内 寛, 岡川 朋弘	4. 巻 11
2. 論文標題 ウシ伝染性リンパ腫の早期発症診断による経済損失低減の実現	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JATAFFジャーナル	6. 最初と最後の頁 45 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 今内 寛, 岡川 朋弘	4. 巻 67
2. 論文標題 牛のリンパ腫発症を予測するがん検診技術を開発 ~ 発症予測法の実用化による畜産被害の軽減に期待 ~	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 北海道獣医師会誌	6. 最初と最後の頁 10 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 今内 寛, 岡川 朋弘	4. 巻 42
2. 論文標題 子牛用ワクチン効果の新規増強法の試み	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 臨床獣医	6. 最初と最後の頁 38 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 岡川 朋弘
2. 発表標題 新規 BLV クローナリティ解析技術を用いた EBL 発症予測法の開発
3. 学会等名 動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会 2023年度シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡川 朋弘
2. 発表標題 牛のリンパ腫発症を予測するがん検診技術の開発
3. 学会等名 第 166回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomohiro Okagawa
2. 発表標題 From Bench to Farm: Development of Immunotherapy and Clonality Analysis Technologies for BLV Control
3. 学会等名 The 1st International All Things Bovine Leukemia Virus Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomohiro Okagawa, Satoru Konnai, Hayato Nakamura, Otgontuya Ganbaatar, Yamato Sajiki, Kei Watari, Haruka Noda, Mitsuru Honma, Yukinari Kato, Yasuhiko Suzuki, Naoya Maekawa, Shiro Murata, Kazuhiko Ohashi
2. 発表標題 PD-L1 blockade enhances T-cell response to vaccination in calves
3. 学会等名 13th International Veterinary Immunology Symposium（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 富永 みその, 今内 覚, 岡川 朋弘, 神谷 可菜, 齋藤 麻矢, 安富 一郎, 目堅 博久, 前川 直也, 村田 史郎, 大橋 和彦
2. 発表標題 牛伝染性リンパ腫の診断と早期発症予測法の開発
3. 学会等名 令和5年度 日本産業動物獣医学会（北海道）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 富永 みその, 岡川 朋弘, 嶋倉 穂南, 斎藤 益満, 松平 崇弘, 直 亨則, 山田 慎二, 村上 賢二, 前川 直也, 村田 史郎, 大橋 和彦, 今内 覚
2. 発表標題 クローナリティ解析による地方病性牛伝染性リンパ腫に対する発症予測法の開発
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 隼人, 今内 覚, 岡川 朋弘, 前川 直也, 村田 史郎, 大橋 和彦
2. 発表標題 牛伝染性リンパ腫ウイルス感染症における免疫チェックポイント因子TIM-3およびPD-L1を標的とした抗ウイルス効果の検討
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wisa Tiyananee, Satoru Konnai, Tomohiro Okagawa, Naoya Maekawa, Shiro Murata, Kazuhiko Ohashi
2. 発表標題 Molecular characterization of immunoinhibitory factors PD-1/PD-L1 in sheep
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 直 亨則, 岡川 朋弘, 野尻 直未, 今内 覚, 嶋倉 穂南, 富永 みその, 吉田 初佳, 西山 依里, 松平 崇弘, 前川 直也, 村田 史郎, 大橋 和彦, 斎藤 益満
2. 発表標題 地方病性牛伝染性リンパ腫における牛伝染性リンパ腫ウイルス/SMAD3融合遺伝子の検出
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

牛のリンパ腫発症を予測するがん検診技術を開発 ～発症予測法の実用化による畜産被害の軽減に期待～（2022年10月21日）
https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/221021_pr6.pdf
プレスリリース・論文掲載情報（2022年10月21日）
<https://lab-inf.vetmed.hokudai.ac.jp/news/221021/>
メディア掲載情報（2022年11月8日）
<https://lab-inf.vetmed.hokudai.ac.jp/news/221108/>
メディア掲載情報（2022年12月22日）
<https://lab-inf.vetmed.hokudai.ac.jp/news/221222/>
総説掲載情報（2023年2月1日）
<https://lab-inf.vetmed.hokudai.ac.jp/news/230201/>
受賞報告（2023年6月20日）
<https://lab-inf.vetmed.hokudai.ac.jp/news/230620/>
受賞報告（2023年10月13日）
<https://lab-inf.vetmed.hokudai.ac.jp/news/231013/>
BLVクロナリテ解析サービス（2023年12月27日）
<https://lab-inf.vetmed.hokudai.ac.jp/news/231227-2/>

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