

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660243

研究課題名(和文) 乳房炎の新バイオマーカーとしてのmicroRNAの研究

研究課題名(英文) Identification of the microRNAs for new biomarkers in bovine mastitis

研究代表者

三浦 直樹 (Miura, Naoki)

鹿児島大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：80508036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウシの乳房炎は経済動物として高泌乳牛を生産する過程で避けられない問題である。早期診断マーカーの発見が病気の管理、経済性向上ともに重要である。本研究では乳汁中のmicroRNA分子(miR：長さの短いRNA分子で生体液中でも安定している)の診断マーカーとしての可能性を研究した。研究では乳房炎の乳汁で発現変化を示すmiRが9種類同定できた。7種は発現が増加し、2種は発現が低下していた。発現が増加したmiRには炎症に関連するものも含まれていた。この結果は、乳房炎発症牛特異的発現microRNAの存在を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Bovine mastitis is major concern in livestock animal. The primary aim of this study was to identify alternatively expressed miRNAs as biomarker in mastitis milk compare to normal milk.

In this study, total 9 microRNAs were identify as alternatively expressed microRNA in mastitis. Seven of them were increased and two of them were decreased. There is inflammation associated microRNAs which increased in mastitis milk. These microRNAs may be the new target miRNAs as biomarkers of bovine mastitis milk.

研究分野：獣医比較病態解析

キーワード：乳房炎 ウシ microRNA バイオマーカー 炎症

1. 研究開始当初の背景

産業動物の経済的損失を最小限にするには、疾病の早期診断と予防が重要である。畜産業において乳房炎は繁殖障害と並び、経済動物として高泌乳牛を生産する過程で避けられない問題である。microRNAは in situ且つ on time で作用し幅広い生命現象(正常な個体発生から、生理的応答、病態の発生と転帰など)で重要な役割を果たし、1)病態のメカニズムを遺伝子発現からタンパク質合成の調節レベルで理解できる、2)組織病態特異性の高いmicroRNA分子が直接疾患のマーカーになる可能性があるという非常にユニークな分子である[Calin GA., Nat. Rev. Cancer. 2006]。つまり、microRNAは全く新しい概念の分子医学分野への導入であり、抗体が医学に応用された時のような衝撃を持って急速に基礎研究から臨床応用研究へと広がっている。

これまで、乳汁中のmicroRNAに関する報告はわずか4報のみあり、授乳期のヒト乳汁中と正常な牛の乳汁中のmicroRNAの存在が報告され [Chen X., Cell Res. 2010, Kosaka N., Silence. 2010]、その後、乳汁中に免疫関連microRNAの含有量が多いことが最近報告された。一方で、乳房炎牛の乳汁中のmicroRNAや罹患牛の血清中のmicroRNAに関する学術報告は存在せず、H24年度の日本獣医三学会九州地区学会(H24.10.14)の我々の発表が世界で初めてではあるが、未だ詳細な研究はなされていない。

2. 研究の目的

研究の最終目的は「牛の乳房炎の新しい分子診断マーカーとして microRNA を臨床応用すること」である。その長期的な目的達成の導入研究として、乳房炎の病態に関連する microRNA を同定し、病態との関連性を明らかにすることを目的として本研究を立案した。乳房炎は単に臨床獣医学的な課題であるのみならず、経済的にも大きな損失であり、乳房炎の撲滅や病状コントロールは社会ニーズも高い獣医療疾患の一つである。本研究では近年、注目されている microRNA というユニークな生物学的特性を持つ分子に着目して、乳房炎の診断マーカー、さらには病態解明のツールとしての

microRNAの可能性を明らかにし、臨床応用への発展を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

本申請研究は、乳房炎に直接関連する microRNA を探索解析することで新規のバイオマーカー候補を同定し、実症例を用いた解析を行い、microRNA の測定系を確立するために以下の実験を行った。

(1) 乳房炎診断書(CMT検査、細菌同定検査)の作成と乳汁からの全RNA抽出法の検討(最も実用的で安定した採取法の検討)

乳汁は罹患牛、対象牛共にすべての乳房から5-10ml採取
採取後は4度で保管し、解析に用いるRNAはmirVanaPARISで抽出
RNA抽出前の遠心法の検討

(2) TaqMAN PCRによるmicroRNAの発現解析の確率

発現補正用のリファレンス(ハウスキューピング)microRNAの検討
バイオマーカー候補 microRNA の発現をターゲット特異的プライマー&プローブを作成し TaqMAN PCR で解析
より正確な発現量の解析を目的としてデジタルPCR法による発現の解析

比較は以下の3群とした;

罹患牛の乳房炎発症乳房からの乳汁
罹患牛の非乳房炎乳房からの乳汁
非罹患牛の乳房からの乳汁

(3) 次世代シーケンサによる microRNA 発現変化の検討

乳房炎と非乳房炎の乳汁の比較
さらに、乳房炎罹患牛の非乳房炎乳房の乳汁(CMTでネガティブ反応)も比較(潜在性乳房炎の検出の可能性への発展)

4. 研究成果

(1) 乳汁の処理

乳汁採取後4度で保存した後にRNAを抽出して、qPCR解析を行っても十分発現量は確認できた。

液体からの全RNAの抽出は複数のキッ

トを比較検討したが、mirVanaPARIS が最も収量効率が高いことが確認できた。全 RNA の抽出前の乳汁の処理法は、2段階遠心 (1500-3000 g で 15 分遠心、上澄み (乳清) をさらに 10000-150000 g で遠心後クリアな上澄み (乳清) を使用する) が効率よく抽出できると考えられた。

(2) qPCR 解析用のリファレンス(ハウスキーパー) microRNA の確認

H25 は 9 種類の microRNA の発現を qPCR で解析し、各 microRNA の CT 値幅を測定した。一般にこの CT 値の幅が短いものが安定して発現している microRNA と考えられる。これまでの多くの報告では miR-26b が安定して発現しているとの報告であったが、今回の結果は miR-92a が最も安定していた (図 1)。

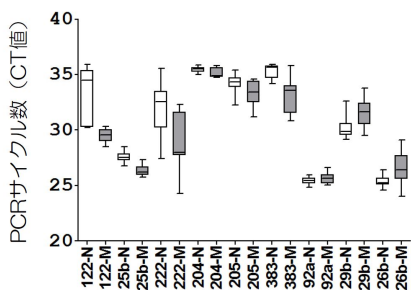


図1 miR-92aのCT値がN(非乳房炎乳汁)でもM(乳房炎乳汁)でも最もCT値のばらつきが少なく、安定して発現するmicroRNAであることが示された。

H26 年には最新の乳汁中の microRNA の発現を次世代シーケンスで解析した報告が発表された。その論文では乳房炎乳汁は確認されていなかったが、正常な乳汁で安定して発現していた miR-375m、let-7g、miR-92a、miR-26b を用いて再度、リファレンス microRNA を確認した。実験は単一農家で同日に採取された乳汁を利用した。最近の報告で使用される Normfinder にて最も安定した microRNA を確認した結果、H25 と同様に miR-92a が最も安定していた。さらに、miR-26b は乳房炎乳汁では発現が変化することが再度確認できた。

(3) レファレンス microRNA の確認と炎症関連 microRNA の発現変動

結果 2) のリファレンス microRNA の実際の有用性を確認する目的で既知の炎

症関連 microRNA である miR-21 と miR-146a の発現を乳房炎乳汁と正常乳汁で比較したが、やはり miR-92a をリファレンスとして補正した場合が最も安定して有意差を得られることが確認できた。

(4) バイオマーカー候補 microRNA の決定

miR-122、125b、222、205 と 383 は乳房炎発症牛の乳汁では非発症牛と比較して有意に発現の増加がみられた (図 2)。

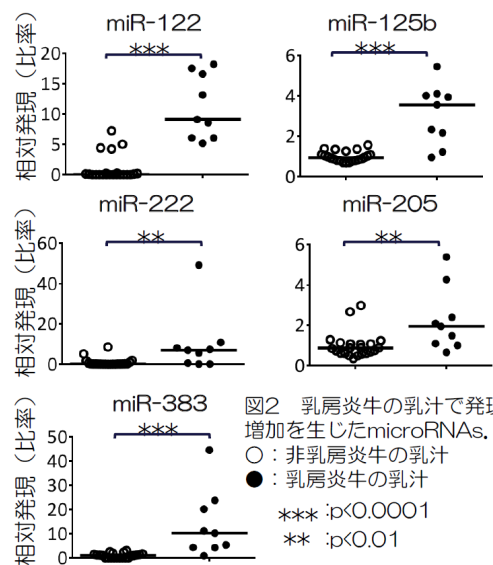


図2 乳房炎牛の乳汁で発現増加を生じたmicroRNAs.
○：非乳房炎牛の乳汁
●：乳房炎牛の乳汁
*** : $p < 0.0001$
** : $p < 0.01$

一方で miR-26b と 29b は乳房炎発症牛の乳汁で非発症牛と比較して有意に発現の低下がみられた。miR-204 は乳房炎に依存した変化は見られなかった (図 3)。

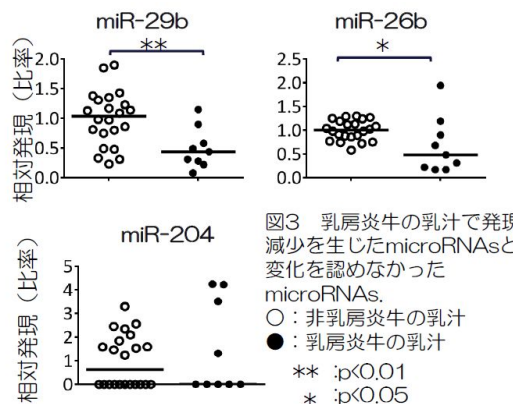


図3 乳房炎牛の乳汁で発現減少を生じたmicroRNAsと変化を認めなかったmicroRNAs.
○：非乳房炎牛の乳汁
●：乳房炎牛の乳汁
** : $p < 0.01$
* : $p < 0.05$

miR-205 と 222 は乳房炎発症牛でも CMT 陽性の乳汁でのみ発現上昇を示した。miR-383 は乳房炎が重度となるに従い発

現上昇が大きい傾向が見られ、今回測定した microRNA で最も著しい増加を示した。

これまで乳汁中の microRNA の発現に関する報告は少なく、乳房炎発症牛の乳汁の microRNA の発現に関する報告はない。今回、qRT-PCR 法にて乳房炎乳汁中の microRNA を測定することに成功し、7 種類の microRNA で乳房炎と関連性が示された。さらに、結果 3) で認められた炎症関連 microRNA を合わせると 9 種類の乳房炎関連 microRNA の同定に成功した。

特に乳房炎発症牛の乳汁中の miR-383 は非乳房炎発症牛で極めて低い発現であり、乳房炎発症牛特異的発現 microRNA の可能性が示唆された。

(5) デジタル PCR 解析

qPCR は遺伝子発現の相対的な解析法である、一方で近年、一般に使用され始めているデジタル PCR はサンプル中のコピー数で測定する。さらに、アッセイ間の誤差が少なく、感度も良い。今回、miR-383 で CMT の段階野異なるサンプルでデジタル PCR の測定をした結果、CMT の重症度判定に依存した発現増加を示した。さらに、正常乳汁ではほとんど発現が確認できないレベルであった (図 4)。

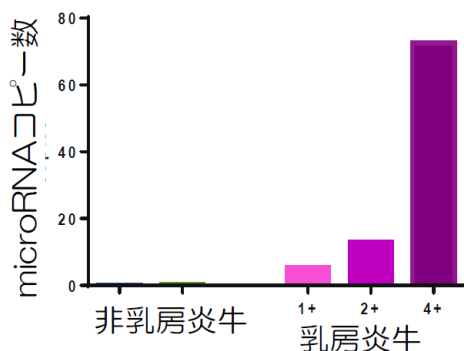


図4 miR-383は乳房炎重症度に依存して変化する

(6) 次世代シーケンサによる microRNA 発現変化の検討

次世代シーケンサ解析には比較的多量の RNA 分子が必要である。今回、研究期間内に抽出サンプルで何度か次世代

シーケンスを試みたが十分な量の RNA 分子が確保できていなかった。

現在、乳汁から抽出した RNA を濃縮したサンプルで次世代シーケンサ解析を継続中である。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

(1)三浦直樹(代表)、Lai Yu-Chang、藤川拓郎、安藤貴明、北原 豪、窪田 力. microRNA の発現解析による乳房炎の診断マーカーの可能性. 平成 26 年度 日本獣医師会 獣医学術学会年次大会.平成 27 年 2 月.岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

(2)三浦直樹.シンポジウム「産業動物獣医臨床における最新画像診断—主に運動器・神経系疾患—」『牛馬の CT 及び MRI 検査』平成 26 年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会.平成 27 年 2 月.岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

(3)三浦直樹、前村 忠、北原 豪、片野田祐介、宮本早紀子、鎌田 立、村田 望、安藤貴朗、桃井康行.乳房炎診断マーカーとしての特異的 microRNA 発現解析の可能性. 第 156 回 日本獣医学会. 2013 年 9 月 岐阜大学 (岐阜県・岐阜市)

(4)三浦直樹、前村 忠、鎌田 立、村田 望、北原 豪、桃井康行. 乳房炎の診断マーカーとしての microRNA の発現解析の可能性.平成 24 年度九州地区獣医師大会 日本産業動物獣医学会.2012 年 10 月.宮崎シーガイアコンベンションセンター(宮崎県・宮崎市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

三浦 直樹 (MIURA, Naoki)
鹿児島大学・共同獣医学部・准教授
研究者番号：80508036

(2)研究分担者

安藤 貴朗 (ANDO, Takaaki)
鹿児島大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：40406898

(3)連携研究者

北原 豪 (KITAHARA, Go)

宮崎大学・農学部獣医学科・助教

研究者番号：90523415