

平成27年度日本獣医生命科学大学若手研究者研究支援経費 (研究成果報告書)

1. 糖質コルチコイド受容体の遺伝子型による ストレス免疫反応への影響

研究代表者 動物生体防御学教室 講師 小柳 円
研究実績の概要

心理的・精神的ストレスによる免疫学的影響には、免疫抑制ないし感染の重症化、アトピーなどのアレルギー疾患の増悪、自己免疫疾患の発症などがあり、このような現象がどのように生じるのか明らかになっていない。そこで、本研究ではストレスに対する感受性が異なる BALB/c, C57BL/6 マウスを用いて、糖質コルチコイド受容体 (GR) 遺伝子型の相違によるストレス感受性の制御の解析を行った。これらの系統のマウスでは、ストレスに関する因子である GR の 75 番目のアミノ酸であるグルタミンの繰り返し回数が両系統により異なる。さらに、BALB/c, C57BL/6 マウスの GR コンジェニック (cg) マウスを作製し用いた。

1. in vitro における糖質コルチコイド添加による脾臓細胞機能解析

脾臓細胞浮遊液をデキサメサゾン (DEX) 存在下で TCR 刺激を行ったが、BALB/c, C57BL/6, GRcg マウス由来の脾臓細胞間での増殖能には差が見られなかった。さらに、サイトカイン産生などの免疫細胞分化に関わる検討を行っていくとともに、in vivo による刺激での影響を検討する。

2. in vitro におけるストレス関連遺伝子の誘導

脾臓細胞浮遊液をデキサメサゾン (DEX) 存在下で刺激を行い、拘束ストレス、もしくは DEX 投与により誘導されると報告のある幾つかの遺伝子の発現を RT-PCR により比較した。その結果、RTP801, MKP-1, GILZ などの遺伝子において DEX による発現の増加を認めたが、明らかなマウス系統間の差は見られなかったため、今後はより定量性の高いリアルタイム PCR を行い検討する。これらの遺伝子の発現をモニターすることで個々の免疫細胞中でのストレスの影響を調べることが可能になると考えられる。

研究発表

[雑誌論文]

Koyanagi M, Kawakabe S, Arimura Y, A comparative study of colorimetric cell proliferation assay in immune cells, *Cytotechnology*, 2016 **68** (4) : 1489-98, doi: 10.1007/s10616-015-9909-2.

2. 牛ウイルス性下痢ウイルスの感染戦略の 解明に向けた分子基盤の構築

研究代表者 獣医保健看護学基礎部門 助教 塩川 舞
研究実績の概要

非細胞病原性の牛ウイルス性下痢ウイルス (ncpBVDV) は、免疫学的特性によって END 陽性 (E⁺) と END 陰性 (E⁻) ウイルスに分けられる。前者は、感染細胞の自然免疫応答を抑制し、後者は感染細胞の自然免疫応答を促進する特徴を持つ。この2つのウイルス準種間では、アミノ酸配列が5か所異なっていることが明らかになっており、これらが自然免疫制御能の違いに関与していることが考えられる。本研究では、E⁺型及びE⁻型で異なるアミノ酸配列を有するウイルスタンパク質 NS5A 領域に着目し、研究を行った。

まず、E⁺型及びE⁻型の NS5A タンパク質の発現ベクターの構築を行い、培養細胞に各 NS5A タンパク質を発現させる系を確立した。さらに、各 NS5A タンパク質が発現している培養細胞にインターフェロンを感作させ、細胞内における自然免疫関連遺伝子の発現レベルを解析したところ、いくつかの因子においてその発現量に顕著な差が認められた。また、NS5A タンパク質と相互作用している宿主タンパク質を探索するために、各 NS5A タンパク質が発現した細胞をサンプルに免疫沈降法を試みた。その結果、NS5A 特異的に結合している宿主タンパク質の存在が示唆された。今後は、免疫沈降法によって得られたサンプルを質量分析法で解析し、宿主タンパク質の正体を明らかにする予定である。

本研究によって、NS5A タンパク質が BVDV の免疫制御能に関与している可能性が示唆された。また、NS5A タンパク質特異的に結合している宿主タンパク質の存在も示唆されたことから、これらの相互作用が BVDV の免疫応答において重要な役割を担っている可能性も考えられる。今後は、NS5A の免疫制御における機能だけでなく、ウイルスの増殖に対する関与も視野に入れて研究を展開する予定である。本研究によって BVDV の免疫制御及び増殖機構の分子メカニズムを明らかにすることで、BVDV のより有効なワクチン・診断薬の開発に有益な知見を提供できると考える。

研究発表

[学会発表]

塩川舞, 内山汐里, 安部優理, 田村友和, 迫田義博, 青木博史, 牛ウイルス性下痢ウイルスの免疫制御能の異なる準種を用いたウイルス動態の解析, 第22回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 2015年11月21日, 福岡国際会議場.

Mai Shiokawa, Hiroshi Aoki, Yuri Fujimoto, Yuri Abe, Tomokazu Tamura, Kaoru Nishine, Junki Mine, Akio Fukusho, Hiroshi Kida, Yoshihiro Sakoda, Recovery of noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus from cDNA constructs and characterization of the produced infectious particles, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 2015 年 11 月 22 日, 福岡国際会議場.

3. 犬におけるインスリンデグルデクの作用プロファイルの検討

研究代表者 日本獣医生命科学大学 助教 小田民美
研究実績の概要

糖尿病犬の治療の第一選択はインスリン療法である。しかしながら、現在の所日本の獣医学領域においては犬用に認可されたインスリン製剤がなく、ヒト用のインスリン製剤を用いて糖尿病治療を実施している。この問題点は、ヒトと犬のインスリン効果や作用発現時間が大きく異なり、既報のヒトのデータを犬に外挿できないことである。そのため、我々は人工膵臓装置という機械を用いて、各種インスリン製剤の犬における作用時間プロファイルを確認した後に、実際の糖尿病犬に使用している。

本研究では、新たにヒト用のインスリン製剤として開発された超持効型ヒトインスリン製剤「インスリンデグルデク」の犬における作用プロファイルを検討することを目的とした。

デグルデクは顕著な作用ピーク時間は認められず、非常に緩やかに投与後 20 時間以上血糖降下作用を示すことが明らかとなった。また、実際の糖尿病犬の治療に用いたところ、現在、獣医学領域において一般的に使用されている持効型インスリンであるグラルギン、デテミルと比較して、デグルデクは投与後 1～2 時間で明確な食後高血糖を呈した。また、他のインスリンと比べてデグルデクはやや血糖降下作用が弱く、インスリン投与量がより高用量となることが想定されたが、実際には食事による血糖流入よりもデグルデクの血糖降下作用の方が長時間持続することから、インスリン投与後長期に渡って血糖上昇を厳格に抑制していた。そして実際のインスリン投与量はグラルギンと同量程度からやや少量となることが明らかとなった。世界的にみても、人工膵臓装置を用いた犬のインスリン作用についての検討は我々の研究グループのみが行っており、これまで発表してきた各種インスリン製剤の効果やインスリン作用時間などの詳細データが、多くの糖尿病犬のインスリン治療選択のために利用されているものと考えられる。本研究結果も、糖尿病犬のインスリン治療における薬剤選択に有用な知見となり、また簡便かつ安全なインスリン治療の導入が可能となる。

研究発表

[学会発表]

小田民美, 犬における Insulin degludec の作用時間プロ

ファイルの検討, 第 30 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 平成 28 年 3 月 12 日, 大宮ソニックシティ. 小田民美, 石井聡子, 森昭博, 左向敏紀, 健常犬における Insulin degludec の作用時間プロファイルの検討, 第 158 回日本獣医学会学術集会, 平成 28 年 9 月 8 日, 北里大学獣医学部.

4. 横紋筋肉腫の増殖を制御する分子機構の解明

研究代表者 病態獣医学部門・病態解析学分野
講師 道下正貴

研究実績の概要

犬の横紋筋肉腫は、多彩な増殖パターンを示す難治性がんであり、化学療法や放射線療法に感受性が低く、臨床挙動が極めて悪い。さらに、それらの増殖に関わる分子機構は未だ解明されておらず、肉腫を撲滅できる効果的な治療法も確立されていない。本研究は、横紋筋肉腫の多彩な増殖パターンを制御する遺伝子異常および異常シグナル経路を同定することを目的とし、肉腫発症・病態維持の分子機構の解明を目指す基盤研究である。

近年、自己複製能と多分化能を有する正常幹細胞の研究が進展する中で、がんの根源となるがん幹細胞の存在が明らかになっており、ヒトの横紋筋肉腫においても肉腫幹細胞が存在し、腫瘍増殖の多様性が報告されている。それゆえ、犬の横紋筋肉腫幹細胞の同定および特性解析が重要と考えられる。本研究ではこれまで報告のない横紋筋肉腫幹細胞の同定および特性解析を行った。

犬の横紋筋肉腫株化細胞 CMSC 株を用いて、幹細胞の自己複製能を利用して特異的に増幅することができる sphere assay により肉腫幹細胞集団を濃縮することができた。それらの細胞集団は、sphere assay により継代可能であり、高い自己複製能を有していた。さらに、腫瘍形成能を評価するために、ヌードマウスへの皮下移植を行った結果、肉腫幹細胞集団は接着細胞に比べて高い腫瘍形成能を持っていた。

sphere assay により濃縮された細胞集団は幹細胞性および高い腫瘍形成能を有することから、犬の横紋筋肉腫においても肉腫幹細胞が存在することが明らかとなった。今後、犬の横紋筋肉腫の増殖様式や病態維持機構の解明に向けて肉腫幹細胞の網羅的な遺伝子解析を行う予定である。

5. 優良国産鶏の作出にむけた階層的オミクス解析の基盤構築

研究代表者 動物生産化学教室 助教 白石純一

研究実績の概要

闘鶏用に品種改良されてきた大軍鶏は愛玩鶏であるのと同時に、その特徴から日本農林規格 (JAS) に準じた地鶏生産に用いられている。しかしながら、大軍鶏の成長速度は、増体を指標に改良された外国産の商用鶏 (ブロイラー

など）と比べると著しく低い。そして、大軍鶏をはじめとした在来鶏（日本鶏）の遺伝的類縁関係に関する研究報告は数多く存在するが、栄養生理学的観点からその特性を追究したものは数少ない。つまり、遺伝的要因のみならず環境的要因から大軍鶏の成長を高める作用機序を特定することができれば、効率的な地鶏生産が可能となる。本研究では、大軍鶏とブロイラーの初期成長の違いに着目し、成長に伴う代謝変動解析のための基盤構築を目的とした。

大軍鶏（OSH）およびブロイラー（チャンキー：CH）の種卵を導入し、温度 37.8℃、相対湿度 60% 以上で孵卵を開始し、それぞれのヒナを孵化させた。孵化直後（post hatch: P0）および孵化後 3 日（P3）のヒナを断頭屠殺した後に、全脳、心臓、肝臓、大腿筋、浅胸筋を採取し、重量を測定した。測定したすべての項目において大軍鶏のものはブロイラーのものとは低く、P3 での差は顕著であった。そして、各区の視床下部における発現変動遺伝子を調査するために、agilent 社製の Chicken DNA マイクロアレイを用いて、網羅的に半定量した。その結果、鶏種および日齢の 2 つの要因（① OSH P0 - CH P0, ② OSH P3 - CH P3, ③ OSH P0 - OSH P3, ④ CH P0 - CH P3）で変動している遺伝子を抽出したところ、① 719 個、② 776 個、③ 453 個、④ 537 個の遺伝子が発現変動していることが明らかとなった。さらに、パスウェイ解析を行ったところ、ホルモン活性やアミノ酸代謝、糖代謝などの代謝経路に属する因子が多数含まれていることが明らかとなった。

6. 下垂体 ACTH 産生腺腫を標的とした新規治療薬：カルベノキソロンの臨床応用への展開

研究代表者 臨床獣医学部門治療学分野 I 講師 手嶋隆洋
研究実績の概要

【研究内容】 本学付属動物医療センターに来院した犬クッシング症候群 6 症例に対して、6 週間にわたってカルベノキソロンを投与し（医療センター倫理委員会承認番号 26-

4）、血中 ACTH、コルチゾール、コルチゾン濃度および臨床症状の変化について検討した。

【研究結果】

① 内分泌学的検討結果：カルベノキソロン投与期間中は血中 ACTH、コルチゾール、およびコルチゾン濃度に有意な減少が認められた。また、6 週間の投与終了後には、投与開始前と同等の高値がみられたことから、カルベノキソロンによる効果であると考えられた。

② 臨床症状の変化：今回、対象とした 6 症例全てに多飲多尿がみられていたが、投与期間中に多飲多尿の改善はみられなかった。

【本研究の意義】 本研究の結果から、11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11HSD) 阻害薬であるカルベノキソロンには下垂体 ACTH 産生腺腫からの ACTH 分泌を抑制することで、副腎からのコルチゾール分泌を減少させることが実際の症例でも確認された。しかし、クッシング症候群に代表的な臨床症状である多飲多尿には改善がみられなかったことは、今後の検討課題である。内分泌学的には改善が認められているにもかかわらず臨床症状に改善がみられなかった原因のひとつに、腎臓における 11HSD の変化が考えられた。臨床症状の改善が得られなかったことから、新規治療薬としての臨床応用は現時点では難しい。しかし、カルベノキソロンによる下垂体 ACTH 産生腺腫への抑制効果と既存の治療薬とを組み合わせることで、本疾患の原因である下垂体 ACTH 産生腺腫への治療効果も有する新たな治療方針を確立できる可能性は十分あると考えられるため、今後は本研究をさらに発展させたいと考えている。

研究発表

〔雑誌論文〕

Teshima T, Matsumoto H, Okusa T, Uchiyama R, Koyama H, Carbenoxolone Disodium Treatment for Canine Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism, *PLoS One*, 2016; 11 (11) : e0166267.