

平成29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. Bウイルス感染症の早期診断法の確立

研究代表者 獣医学科 獣医公衆衛生学研究室
講師 高野貴士

研究実績の概要

感染者の80%が死亡するBウイルス感染症を早期に検出する血清診断法の開発を試みた。Bウイルス(BV)はマカク属サルを自然宿主とするヘルペスウイルスであり、この感染症については感染早期の治療が有効である事が示されている。しかし、ヒト単純ヘルペスウイルス(HSV)と遺伝的および構造的に類似しているため、血清診断では両者を区別するのが困難である。したがって診断法確立の基盤として、平成29年度は、両者を識別可能にするウイルス特異抗原を発現するプラスミドの作製を行った。

公表されているBVのゲノム情報から、レセプターと結合する糖タンパク(gD)をコードする遺伝子内に設定した4領域(約120~680塩基)をクローニングし、哺乳類細胞発現用プラスミド(pcDNA3.1)への組み込みを完了した。今回作製した領域とは異なる発現プラスミド2種類をすでに構築しているため、BVに関しては合計6種類の発現プラスミドを構築した。他方、HSVについては、HSV-1型、-2型の糖タンパク(gG)遺伝子内に各5領域(約200~700塩基)ずつ設定し、HSVについてもpcDNA3.1への組み込みを完了した。以上、HSVについては、HSV-1型、-2型を合わせて、合計10種類の発現プラスミドを構築した。

上記の発現プラスミドを構築する中で使用したプライマーは、各ウイルス特異的な配列になるように合成した。そこで、プライマーによる特異性を検討したところ、設定した6領域の中で、2領域でBVゲノムだけを特異的に増幅出来た。これらの領域は、HSV全長DNAをテンプレートとしたPCRでも増幅しなかった事から、BV特異的と判断でき、遺伝子診断に用いる事が可能であった。すでに論文発表している領域とも異なる事から、従来の遺伝子診断法と併用する事で、さらに特異性の高い遺伝子診断を実施することが可能となった。

2. 担がん犬における骨髄由来抑制細胞を 標的とした新規治療候補薬の探索

研究代表者 獣医学科 獣医臨床病理学研究室
助教 田村恭一

研究実績の概要

本研究計画では、種々のがんにより誘導されるMDSCによる免疫抑制機構を調節しているシグナル経路をin

vitroにおいて網羅的に解析するために大量のMDSCが必要であった。そこで、はじめに犬の骨髄細胞と種々の株化腫瘍細胞を用いてMDSCの分化誘導を試みた。具体的な方法としては、マウスの骨髄細胞や人の末梢血単核球からのMDSCの分化誘導法に基づいて、健常犬の骨髄単核球をGM-CSFおよびIL-6存在下で培養し、さらに種々の株化腫瘍細胞培養上清を添加し培養した。さらに、培養した細胞からフローサイトメーターを用いたソーティングによりCD11b+Gr-1+細胞を精製し、Arginase活性、一酸化窒素(Nitric Oxide: NO)、活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)およびIL-10産生能を検討した。その結果、培養後の骨髄細胞ではCD11b+Gr-1+細胞が有意に増加しており、それらの細胞にはMDSCに特徴的なArginase活性、NO産生およびROS産生などの免疫抑制機能の発現が認められた。また、これらの免疫抑制機能に関して、添加した腫瘍細胞株培養上清の種類によって差異が見られた。このことについては、腫瘍の種類によって分泌される液性因子の成分や量の違いにより分化誘導されるMDSCの機能が異なると推測された。以上の結果より、GM-CSFおよびIL-6と種々の株化腫瘍細胞培養上清を用いて、健常犬の骨髄単核球から効率的にMDSCを分化誘導できることが明らかとなった。本研究により、in vitroにおいて犬のMDSCを大量に精製することが可能となった。今後培養した細胞を用いて、その免疫抑制機構について詳細な解析を行うことで、担がん犬におけるMDSCの性質を明らかにすることができると期待される。現在、分化誘導したMDSCと同一個体の末梢血T細胞を抗犬CD3抗体存在下で共培養し、キナーゼ阻害剤ライブラリーを用いてMDSCに対する抗免疫抑制効果を有する薬剤を検討している。

研究発表

[雑誌論文]

Miyamoto R, Kurita S, Tani H, Kobayashi M, Sugiura S, Shigihara K, Sato Y, Tanaka Y, Tamura K, Bonkobara M, Establishment and characterization of a cell line from a feline histiocytic sarcoma, *Veterinary immunology and immunopathology*.201, 2018, 72-76, doi: 10.1016/j.vetimm.2018.05.011.

Ito K, Miyamoto R, Tani H, Kurita S, Kobayashi M, Tamura K, Bonkobara M, Effect of dasatinib in a xenograft mouse model of canine histiocytic sarcoma and in vitro expression status of its potential target EPHA2, *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 41,2017, e45-e48, doi: 10.1111/jvp.12449. Kobayashi M, Kuroki S, Kurita S, Miyamoto R,

Tani H, Tamura K, Bonkobara M, A decrease in ubiquitination and resulting prolonged life-span of KIT underlies the KIT overexpression-mediated imatinib resistance of KIT mutation-driven canine mast cell tumor cells, *Oncology reports*, 38, 2017, 2543-2550, doi: 10.3892/or.2017.5865.

[学会発表]

田村恭一, 獣医領域におけるがん免疫抑制機構に関する最新知見, 第14回日本獣医内科学アカデミー学術大会, 平成30年2月18日, 神奈川県横浜市.

田村恭一, 骨髄検査の方法と解釈, 第14回日本獣医内科学アカデミー学術大会, 平成30年2月18日, 神奈川県横浜市

3. 猫糖尿病の病態評価におけるグルカゴン濃度測定の有用性

研究代表者 獣医保健看護学科 獣医保健看護学臨床部門
講師 小田民美

研究実績の概要

インスリン作用の不足は、インスリン分泌障害、インスリン抵抗性、あるいはその両者によるもので、その臨床評価は糖尿病の治療方針を決定する上で重要であると考えられている。近年、ヒトの医学分野において、糖尿病患者の膵β細胞機能低下（インスリン分泌能低下）だけではなく、膵α細胞機能異常（グルカゴン分泌異常）による耐糖能異常からの糖尿病進展が指摘されている。猫は真性の肉食性動物であり、元々、糖代謝が不得意である一方で、グルカゴンによって糖原性アミノ酸からエネルギー産生を行う能力に長けている。そのため、グルカゴンが猫の糖代謝に与える影響についてはヒトや犬よりも大きいと考えられ、その血中動態の把握は糖尿病猫の病態評価において重要である。そこで本研究では健常猫、および糖尿病猫におけるグルカゴンの血中動態を明らかにし、グルカゴンが糖尿病進展にどの程度影響をおよぼすのかを検討した。

N群（健常猫7頭）およびDM群（インスリン治療中の糖尿病猫3頭）の食前0時間から食事後10時間までの血中グルカゴン濃度を測定した。各群の平均グルカゴン濃度（Mean ± SD）はN群 113.3 ± 3.4、DM群 188.3 ± 2.6 (pmol/L) とDM群で高値を示したが、グルカゴン血中濃度変動および曲線下面積AUCは、有意差は認められなかったものの、N群よりもDM群で全ての時間高値を推移した。また、血糖変動が高値を推移した糖尿病猫ほど、血中グルカゴン濃度も高値を推移する傾向にあった。

以上より本研究では、ヒトと同様猫においても高グルカゴン血症からの耐糖能異常、そして糖尿病進展の可能性が示唆された。よって、今後小動物臨床において、猫の食後グルカゴン濃度測定が糖尿病の病態評価として応用できる

可能性が示された。

4. 軍鶏の初期成長と代謝調節因子の分子間相互解析における基盤構築

研究代表者 動物科学科 動物生産化学教室
助教 白石純一

研究実績の概要

地鶏(特定JAS規格)生産のための家系造成には、軍鶏(大軍鶏、大和軍鶏、小軍鶏や八木戸など)がしばしば用いられる。軍鶏は一般的な商用の肉用鶏(ブロイラー)と比べてIIa型の筋繊維(赤筋)の含量が多いなど、特徴的な筋肉の形質を示す。さらに、我々は軍鶏(八木戸)と肉用鶏の骨格筋に含まれる低分子代謝産物を網羅的に比較(メタボローム解析)したところ、TCA回路に関連する代謝産物が大きく変動していることを見出した。本研究では、軍鶏の末梢器官における特徴的な代謝調節と中枢メラノコルチンシステムの発現動態との関連について検討した。

軍鶏(八木戸、大和軍鶏、小軍鶏)と商用鶏(肉用鶏、卵用鶏)の種卵を孵化させ11日齢(P11)まで飼育した。P11における成長指標(体重、摂食量、浅胸筋および大腿筋重量)を計測し、鶏種間で比較した。採取した全脳から間脳を切り出し、メラノコルチンペプチド(AGRP: agouti related protein, POMC: pro-opiomelanocortin) mRNA発現量をqPCRで相対定量した。

軍鶏の成長指標は、肉用鶏のものより4~8倍低く、卵用鶏のものより1.5~2倍低かった。一方、間脳のAGRP, POMC mRNA発現量は軍鶏のものが商用鶏のものより高かった。さらに、AGRP, POMC mRNA発現量と成長指標にはやや強い負の相関があった。

以上のことから、中枢メラノコルチンシステムは幼雛期の成長指標と深く関連していることが明らかになり、軍鶏のそれら発現は商用鶏のものとは比べ上方制御され、鶏種特異的な調節機構の存在が明らかになった。すなわち、幼雛期の中枢メラノコルチンシステムは、地鶏生産の飼養管理技術構築において有用なマーカー遺伝子であることが推察され、今後は飼料や光線管理、環境温度などの環境要因と中枢メラノコルチンシステムの発現制御との関連性について検討が必要と考察された。

研究発表

[学会発表]

Jun-ichi Shiraishi, Shozo Tomonaga, Harutaka Watanabe, Takahisa Ichikawa, Takashi Bungo, Yoshiyuki Ohta, Comparative plasma metabolomic analysis between Japanese native chicken breed (YAKIDO) and commercial broiler line, 11th ASIA Pacific Poultry Conference, March 25-27, 2018, Bangkok, Thailand.