

平成24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. 犬前立腺癌特異的マーカー遺伝子・分子の同定と臨床応用に向けた研究

研究代表者 獣医臨床繁殖学教室 助教 小林正典
研究実績の概要

前立腺癌はヒトと犬で認められる悪性腫瘍であり、局所浸潤性が強く転移率も高い。獣医領域における前立腺癌の診断には、穿刺吸引細胞診や超音波検査が行われるが、初期の前立腺癌において腫瘍と非腫瘍の鑑別が困難であること、また腫瘍細胞の播種の懸念がある。前立腺癌の確定診断には、前立腺組織の病理組織学的検査が必要となるため、非侵襲的に診断可能な特異的バイオマーカーの発見が望まれている。本研究では、犬の前立腺組織中におけるmicroRNA (miRNA) について網羅的発現解析を実施し、前立腺癌の診断に利用できる候補miRNAの絞り込みを行った。供試材料には、日本獣医生命科学大学獣医臨床繁殖学教室で飼育されている正常犬および良性前立腺肥大症罹患犬より採取した前立腺組織 (各1頭)、および同大学付属動物医療センターに来院し、前立腺癌と診断され、前立腺の外科的摘出手術を行った2症例より組織を採材した。その後の病理組織学的検査により、1症例は前立腺腺癌、もう1症例は前立腺移行上皮癌と診断された。miRNAの網羅的発現解析には、277種類のmiRNA発現解析が可能なDog miRNome miRNA PCR Array Kit (Qiagen) を用い、Real-time PCRにてmiRNA発現の比較検討を行った。miR-664の前立腺組織での発現は、Normal, BPHおよびTCCと比較し、PCaで顕著にアップレギュレートされ (Normalの47倍)、miR-142, 122, 33aおよび875は、TCC組織においてのみアップレギュレートしていた (それぞれNormalの32, 138, 5, 9倍)。また、miR-221, 222, 92bおよび371の腫瘍組織における発現は、非腫瘍性組織と比較し4倍以上のアップレギュレートが認められた。一方、miR-299, 135a-5p, 30a, 30d, 375, 381および582の発現は、非腫瘍性組織の発現と比較し、腫瘍組織で4分の1以下の発現にダウンレギュレートされていた。犬の前立腺癌におけるmiRNAの発現に関する研究はこれまでに報告がない。本研究結果は、犬の前立腺癌の診断や腫瘍の病態研究、ならびに分子標的薬の開発につながる研究であると思われる。

研究発表

[雑誌論文]

Kawakami E, Yagi T, Kobayashi M, Hori T., Therapeutic effect of frequent injections of GnRH analogue in a beagle with knobbed acrosome abnormality of sperm., *The Journal of Veterinary Medical Science*, 74, 201-204,

2012, doi:10.1292/jvms.11-0272.

[学会発表]

小林正典, 堀達也, 河上栄一, 犬の射精時における末梢血中および前立腺液中Prostaglandin E₂ 値の変化, 第154回日本獣医学会学術集会 獣医繁殖学分会, 平成24年9月15日, 岩手大学.

2. メタボロミクスを応用したイヌ肥満で誘発されたインスリン抵抗性とその補償作用の解明

研究代表者 生体分子化学教室 助教 佐藤稲子
研究実績の概要

本研究では以下の期間について下記の実施を計画した。
平成24年9月から平成25年3月まで
サンプルの入手
インスリン抵抗性の測定
質量分析装置による血中代謝産物のnon-targeted分析
多変量解析によるデータ解析

まず、質量分析計の分析によって得られるイヌ血清中で分析可能な代謝産物を把握する目的で、さまざまな疾患をもつイヌの血清について、質量分析装置LC-MS/MSによる網羅的な分析を試みた。サンプルは健康なイヌ (北山ラベス株式会社 本郷ファーム ♂38頭 8か月齢) の静脈血血清をコントロール群、日本獣医生命科学大学付属動物医療センター内科に来院したイヌ (♂14頭 ♀16頭 3~14歳) の静脈血血清を疾病群とした。疾病群には、糖尿病、肝細胞ガン等21種類の疾病が含まれる。

分析結果を主成分分析したところ、スコアプロットでコントロール群と疾病群で明らかにグループが分離した (図1)。

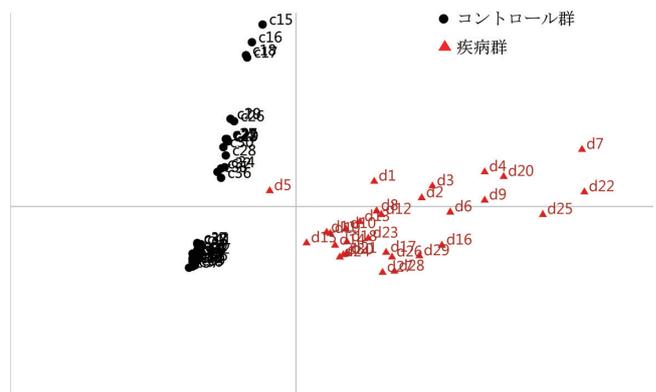


図1. イヌ健康群と疾病群の2群の代謝産物について主成分分析した結果をスコアプロットで示した。

主成分分析のスコアプロットでは、様々な疾病の集まりである疾病群について、コントロール群と混在する、あるいはコントロール群の周辺に散在する結果が得られると予測していたが、偏りのあるグループの分離を示した。これは疾病による代謝産物の変動がグループの分離に寄与したのではなく、飼育環境およびサンプル採取の条件の差異が大きく影響したものと考えられる。

本研究の目的は肥満したイヌについてのメタボロミクスであり、ボディコンディションスコア（BCS）を目安にし、学内動物医療センター等に来院したイヌから提供を受けることを予定していた。しかし、同じ飼育環境下での比較をしなければ、肥満による代謝産物の変動要因とその他の外因が混在し、解析が困難となる可能性が高い。

一方、LC-MS/MSで同定できた代謝産物として、肝細胞ガンでphosphatidylcholine、膀胱結石でtaurocholic Acid, betain, 糖尿病でvalineがコントロール群に対して増加している結果を得た。

変動を示す代謝産物を抽出し同定する方法は確立できたため、今後は動物飼育施設に対し飼育条件を提示し、肥満したイヌの血液を入手し、健常群と比較、検討を試みたい。

3. 犬のラフォラ病の疫学調査とその病態に関する基礎的研究

研究代表者 獣医保健看護学臨床部門 講師 皆上大吾
研究実績の概要

平成24年度は、Lafora病好発ミニチュア・ワイヤーヘアド・ダックスフント（MWHD）犬舎の繁殖群83頭（全頭血縁関係あり）を対象に、EPM2b遺伝子変異の有無を解析した。遺伝子型出現頻度は、Normal個体10頭（12.0%）、Carrier個体31頭（37.3%）、Affected個体42頭（50.6%）であった。集団内のEpm2bの対立遺伝子頻度は、正常遺伝子0.31に対し、変異遺伝子0.69となり、変異遺伝子が広く浸透していることが明らかとなった。この変異遺伝子が広く蔓延した理由として、本症が遅発型発症のため、早期の臨床診断が困難であることが考えられた。このことから、本繁殖群において繁殖を行う際に、本法による遺伝子解析を実施し変異遺伝子を排除することで、日本のMWHDのLafora病を減少させることが可能と考えられた。さらに、本集団には多数の未発症のAffected個体が含まれており、経時的に調査することにより、犬のLafora病の発症機序とそれに伴う臨床像を明らかにできると考えられた。

また、遺伝子解析により予め遺伝子型が明らかな個体で血液検査が可能であった40頭を対象に、Lafora病における血液学的異常の検討も行った。その結果、一般的に測定される多くの項目では、Control群およびAffected群間の測定値に有意差は認められなかったが、血清ALP値に関しては、統計学的に有意な差が認められた。血清ALP値は、Control群（ 54.4 ± 17.8 IU/L）に比べ、Affected群（ 396.8 ± 425.3 IU/L）が顕著に高値を示し、基準範囲（47-254

IU/L）を超える値であった（ $p=0.0183$ ）。この血清ALP値が上昇した原因を調べるため、血清COR濃度の測定を行ったが、両者に有意差は認められなかった。また、血清ALP値の変動を年齢別にみると、初期症状を発現する割合の低い若齢においてもControl群と比較して高い傾向にあり、加齢に伴い上昇することが明らかになった。しかし、Affected群の中でも、ミオクローヌ様発作を示している個体（ 319.9 ± 237.1 IU/L）と、そうではない個体（ 483.3 ± 577.1 IU/L）の間は、血清ALP値に有意な差は認められなかった。Lafora病における血液学的異常については、人を含めた他の動物種において報告はない。少なくとも犬においては、血清ALP濃度を測定することにより、Lafora病の発症や進行を推測できる可能性がある。

研究発表

〔学会発表〕

皆上大吾, Lafora病の遺伝的背景を持ったミニチュア・ワイヤーヘアド・ダックスフントの経時的観察とその血液生化学的異常について, 獣医神経病学会, 平成23年7月21日, 東京大学.

4. 幼雛期の代謝調節機構における脳一末梢の情報ネットワークの解明

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

本研究では、初期成長期の摂食・エネルギー代謝調節における脳と末梢の情報ネットワークシステムの総体を理解することを目的として、代謝制御が異なる鶏種間で脳を移植した「脳キメラ鶏」の作出、インスリンシグナルを軸とした「脳-末梢のクロストーク」についての解析を試みた。

2種類の商用鶏（LayerおよびBroiler）の種卵を入手した。温度38℃、湿度70%に設定された孵卵器に授精卵をセットし、Hamburger and Hamiltonらの報告をもとに、ニワトリ胚をStage 10（孵卵開始後約33-38時間）まで発生を進め、10体節前後の胚を得た。卵殻に小さな穴を開け、実体顕微鏡下で観察しながら胚直下の卵黄内に黒インクを注入して胚を可視化した。作成したマイクロナイフを用いて前脳の先端から菱脳を含んだ第一体節の前まで脳原基（全脳移植）を取り出し、もう一方の供試胚の相同位置に入れ替えて移植した。施術後、卵殻にあけた穴にテープを張り、孵卵器に戻し、孵化させた。脳原基移植に供試する鶏種のグルコース応答性を検討するために、孵化直後および10日齢において経口ブドウ糖負荷試験を行った。その結果、糖負荷後のBroilerの血漿グルコース濃度および血糖総面積は両ステージともにLayerに比べ低値を示すことが明らかとなった。

本研究によって、前脳+間脳の組合せの脳キメラ鶏が作出されるとともに、BroilerはLayerにくらべ孵化後の増体は高く、それら関連形質は顕著に異なること、そして孵化直後においてGlucoseに対する感受性はBroilerのものが

Layerに比べて高いことが明らかになった。このように脳と体の形質が異なる鶏個体の作出が可能となったことから、今後、脳キメラ鶏の作出数を増やすことで組織間における詳細なエネルギー代謝ネットワーク解析が遂行できると考察された。

研究発表

〔雑誌論文〕計 (3) 件 うち査読付論文 計 (3) 件

Maekawa F, Sakurai M, Yamashita Y, Tanaka K, Haraguchi S, Yamamoto K, Tsutsui K, Yoshioka H, Murakami S, Tadano R, Goto T, Shiraishi J, Tomonari K, Oka T, Ohara K, Maeda T, Bungo T, Tsudzuki M, Ohki-Hamazaki H. A genetically female brain is required for a regular reproductive cycle in chicken brain chimeras. *Nature Communications*, 4, 2013, doi: 10.1038/ncomms2372.

Takawaki M, Tanizawa H, Nakasai E, Shiraishi J, Kawakami S, Oka T, Tsudzuki M and Bungo T. Comparison of Plasma Amino Acid Levels of Two Breeds of Japanese Native Chicken and a Commercial Layer Line. *International Journal of Poultry Science*, 12, 90-93, 2013

Tanizawa H, Shiraishi J, Kawakami S, Tsudzuki M and Bungo T. Effect of Short, Early Thermal Conditioning on Physiological and Behavioral Responses to Acute Heat Exposure in Chicks. *The Journal of poultry science In press*

〔学会発表〕計 (4) 件 うち招待講演 計 (1) 件

Shiraishi J-i, Yanagita K, Tanizawa H, Isobe N, Fujita M, Kawakami S-I, Bungo T. Brain insulin signaling controls feed passage in chicks. 10th International Symposium on Avian Endocrinology 2012. 2012.6 岐阜市

白石純一, 福森理加, 杉野利久, 太田能之, 豊後貴嗣, 浜崎浩子 幼雛期における成長指標とグルコース応答性に関する研究. 日本家禽学会2012年度秋季大会 2012.9 高松市

白石純一 幼雛期のエネルギー代謝ネットワークとメラノコルチンシステム. 日本家禽学会 第1回若手研究会. 2012.9 高松市

白石純一. 幼雛期のエネルギー代謝における脳機能解析とその展望.

日本畜産学会第116回大会 若手企画懇親・交流会「サイエンスナイト in 広島」2013.3 広島市

5. 精製ラクトフェリン画分から分離した酸性ホスファターゼの生理活性について

研究代表者 乳肉利用学教室 講師 三浦孝之

研究実績の概要

【研究背景および目的】ラクトフェリンは1960年に乳中から発見されて以来「抗菌性」や「抗ウイルス性」など幅広い機能性を有する成分として健康食品や医療への応用など様々な分野で注目されているタンパク質である。申請者らはこれまでに牛乳から精製したラクトフェリン画分（または市販ラクトフェリン標品）の中に「酸性ホスファターゼ」(AcP) 活性を有する分子が存在する可能性を示し、昨年度 (23年) にはその分子が酒石酸耐性型ホスファターゼ (TRAP) ファミリーに属する「ウテロフェリン様タンパク質 (UF-AcP)」であることを明らかにした。

TRAPは破骨細胞の増殖・分化に関わる分子として以前から知られているが、生体組織や体液にも広く分布しているため、その働きについては不明な部分も多く、UF-AcPについての知見も殆どない。

そこで本研究計画ではUF-AcPが「破骨細胞の増殖・分化」に関わるかどうかを検討することを目的とし、UF-AcP存在下で破骨細胞の増殖・分化を検討した。

【方法】破骨細胞 (ラット破骨前駆細胞, プライマリーセル社) は、AcP活性を示す精製ラクトフェリンまたはUF-AcPのみを添加した培地で5日間培養した。培養後の細胞形態ならびに破骨細胞への分化を細胞染色法によって調べた。なお、本試験で用いたUF-AcPは本研究室で精製ラクトフェリンから単離・精製したものをを用いた。

【結果】始めに、精製ラクトフェリンまたはUF-AcPを同濃度含む培地で培養した後、破骨細胞染色によって分化の様子を観察したところ、コントロールおよび精製ラクトフェリンを添加した試験区では破骨細胞への分化が認められたが、UF-AcP添加試験区では分化せず、単核細胞の状態に培養容器に接着していた。

次に、両試験区のAcP活性を0.3 unitに調整した培地で培養したところ、精製ラクトフェリン添加区では細胞増殖が阻害されていたが、UF-AcP添加区はコントロールと同様に増殖した。両試験区を破骨細胞染色すると精製ラクトフェリン添加区では殆どの細胞が剥がれ落ちたが、UF-AcP添加区では未分化細胞の状態に培養容器に接着していた。

以上の結果は、精製ラクトフェリン中に含まれるUF-AcPは単独または共存するラクトフェリンと協同的に破骨細胞の分化・増殖に関わる可能性が示唆している。

研究発表

〔学会発表〕

三浦孝之, 阿久澤良造, ウシ乳由来ラクトフェリン精製画分に存在する酸性ホスファターゼ分子とその機能について, 日本ラクトフェリン学会第5回学術集会, 2012年10月27日, 昭和大学 (品川).

6. 植物酵素パpainを用いたチロシン含有機能性ペプチドの合成および機能性の評価

研究代表者 農産食品学教室 講師 奈良井朝子

研究実績の概要

重合度2～4のTyrオリゴペプチドは抗血圧上昇活性ペプチドとして、機能性食品素材への活用が期待される。しかし、ペプチドの化学合成品は高価なため、機能性評価を容易に行うことができない。本研究ではTyrオリゴペプチドを、特殊溶媒を用いない緩衝液中にてPapainとTyrエチルエステルとの反応から簡便かつ効率的に合成するための反応条件を探るため、既に調べた基質濃度の影響に加えてpHの影響を調べた。一般的に、弱アルカリ条件はPapainの加水分解酵素としての働きを抑制し、ペプチド合成に有利であるが、今回の反応ではTyrの高重合化を防ぎつつ重合度2～4のオリゴペプチドを高収量で得る至適pHは6.5付近であることが明らかとなった。さらに、反応液成分の経時的な挙動を解析したところ、酵素によって生成して蓄積したオリゴペプチドはPapainの好適基質として伸長反

応に利用され、バッチ式の反応システムでは収量に限界があることを見出した。このことは、反応生成物を酵素と同一環境から分離・回収することを可能にする固定化酵素の導入が効果的であることを示唆する。

固定化酵素による連続式反応システムでは、酵素エリアを通過した反応液中からTyrオリゴペプチドを吸着・除去する装置が必要である。疎水の相互作用を利用する吸着剤が候補として考えられるが、過度な吸着能を発揮する素材を用いた場合、未反応のTyrエチルエステルをも反応液から排除し、結果的にペプチドの収量が低下する可能性がある。さらに、吸着したペプチドを溶出する際に大量の有機溶剤が必要になることも懸念される。そこで、敢えて疎水力の弱い吸着剤を利用することを検討したところ、現時点ではノビアス（日立ハイテック）ODタイプがTyrモノマーとTyrオリゴペプチドとの一定の分離を可能にすることを見出した。今後は実際にペプチド生産効率の高い連続式ペプチド合成システムを組み立て、得られたペプチドの機能性評価を試みる。