

学位論文要約

氏 名 前 澤 誠 希

題 目 若齢肥育牛における地方病性牛白血病発症機序解明に関する研究

地方病性牛白血病 (enzootic bovine leukosis: EBL) は牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus: BLV) の感染に起因し、B 細胞が腫瘍化する疾患である。EBL は一般的に 3 歳齢以上の感染牛で発症するが、近年、3 歳齢未満の若齢肥育牛における EBL 多発が報告されている。しかしながら、若齢肥育牛で EBL が多発する理由はわかっていない。そこで本研究では、3 歳齢未満の若齢肥育牛における EBL 発症機序解明を目的とし、BLV プロウイルス組込み部位および骨形成タンパク質-6 (bone morphogenetic protein 6: BMP-6) 遺伝子のメチル化に着目し、若齢牛における EBL 発症および飼養形態との関連を検討した。

若齢牛における EBL 発症機序を解明するためには、まず EBL の迅速かつ正確な診断方法が必要である。そこで、第 1 章では、クローナリティ解析の EBL 診断への有用性の検討を行った。第 1 節において PCR による免疫グロブリン重鎖 (immunoglobulin heavy chain: IgH) 遺伝子のクローナリティ解析による牛 B 細胞性リンパ腫診断への有用性を検討した。その結果、PCR による *IgH* 遺伝子のクローナリティ解析は感度が 74.1%、特異度が 100% であり、感度の改善が必要であるものの、高い特異度を有していることから、牛 B 細胞性リンパ腫の補助的な診断方法として有用であると考えられた。第 2 節では、EBL の腫瘍化リンパ球では BLV がモノまたはオリゴクローナルに組込まれていることに着目し、inverse-PCR 法の EBL 診断への有用性を検討した。その結果、inverse-PCR の感度は 72.4%、特異度は 100% であり、さらに inverse-PCR 法にて明瞭なバンドが確認されたものは BLV プロウイルス量が高値の B 細胞性リンパ腫のみであったことから、inverse-PCR 法は EBL の診断方法として有用であると考えられた。第 3 節では、BLV 陽性のリンパ腫で EBL を疑った 3 歳齢未満の 3 症例において、PCR による *IgH* 遺伝子のクローナリティ解析および inverse-PCR 法を EBL 診断に応用した。その結果、B 細胞のモノクローナルな腫瘍性増殖および BLV プロウイルスが単クローナル性に組込まれていたことが示され、3 症例とも EBL であると確定診断された。以上の研究により、クローナリティ解析を用いることで、EBL 発症を迅速かつ

正確に診断できることが示された。

第2章では、若齢牛における EBL 発症機序の1つとして、BLV プロウイルス組込み部位に着目し、3歳齢未満の EBL 発症牛における BLV プロウイルス組込み部位の解析を行い、3歳齢以上の EBL 発症牛と比較した。加えて、若齢肥育 EBL 牛および若齢乳用 EBL 牛における BLV プロウイルス組込み部位の比較を行い、BLV プロウイルス組込み部位と飼養管理の関係を検討した。

3歳齢未満の EBL 発症牛では3歳齢以上の EBL 発症牛に比べ、BLV プロウイルスの CpG islands 近傍およびレトロトランスポゾンである LINEs への組込みが有意に多かった。3歳齢未満の EBL 牛では、高いウイルス活性を有する細胞が短期間で腫瘍化した可能性および LINEs の活性化による宿主ゲノムの再編や不安定性が誘導された症例が多い可能性が考えられた。しかしながら、高いウイルス活性を有する細胞が腫瘍化する前に宿主免疫により排除されなかった理由については不明であった。また、若齢肥育 EBL 牛と若齢乳用 EBL 牛において、BLV プロウイルス組込み部位の違いは認められなかった。以上の知見より、若齢肥育牛において EBL が多発している理由を明らかにすることはできなかったが、若齢牛における EBL 発症に BLV プロウイルス組込み部位が関与している可能性が示唆された。

第3章では、若齢肥育牛における EBL 発症に *BMP-6* のメチル化が関与しているという仮説を証明するため、3歳齢未満の若齢肥育 EBL 牛における *BMP-6* プロモーター領域の CpG island のメチル化解析を行い、若齢乳用 EBL 牛、高齢乳用 EBL 牛、若齢肥育健常牛、若齢乳用健常牛および高齢乳用健常牛で比較した。

その結果、3歳齢未満の若齢肥育 EBL 牛のメチル化割合の中央値は 8.9%であり、その他の牛に比べ有意に高かった。また、若齢健常牛においても肥育牛は乳用牛に比べメチル化割合が有意に高値であった。さらに、メチル化依存的な *BMP-6* 遺伝子の発現抑制も認められた。したがって、肥育牛における濃厚飼料多給やビタミン A 抑制などの飼養管理によって *BMP-6* プロモーター領域のメチル化が引き起こされ、*BMP-6* 遺伝子の発現が抑制されることが、若齢肥育牛における EBL 発症に関与する可能性があると考えられた。

本研究により、BLV 組込み部位および *BMP-6* プロモーター領域のメチル化が若齢肥育牛における EBL の発症要因となり得ることが示された。

学 位 論 文 要 旨

氏 名 MAEZAWA, Masaki

題 目 Studies on Mechanisms of Onset of Enzootic Bovine Leukosis in Young Beef Cattle
(若齢肥育牛における地方病性牛白血病発症機序解明に関する研究)

Enzootic bovine leukosis (EBL), a B-cell lymphoma caused by bovine leukemia virus (BLV), is typically observed in cattle over 3 years old. However, the incidence of EBL in young beef cattle in Japan has been on the rise in recent years due to unknown reasons. In these studies, effects of BLV proviral integration sites and DNA methylation of the bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) gene on EBL onset in beef cattle under 3 years old were investigated, with the aim of elucidating mechanisms underlying the early onset of EBL in young beef cattle.

In order to examine mechanisms of early onset EBL in young cattle, a diagnosis of EBL needs to be made quickly and accurately. Accordingly, in Chapter 1, the usefulness of clonality analyses for EBL diagnosis was evaluated. First, the use of PCR to detect clonal immunoglobulin heavy chain (IgH) gene rearrangements as a diagnostic tool for B-cell lymphoma was evaluated. The sensitivity and specificity of PCR analysis for detecting IgH gene rearrangements in bovine B-cell lymphoma were 74.1% and 100%, respectively, suggesting that PCR-based clonality analysis may offer a useful and highly specific means to obtain an adjunctive diagnosis of bovine B-cell lymphoma, although its sensitivity needs to be improved. Next, the use of inverse-PCR as a tool to diagnose EBL was examined, revealing a sensitivity of 72.4% and specificity of 100%. Moreover, all cattle with clear bands had B-cell lymphoma with a high BLV proviral load. These findings support the usefulness of inverse-PCR as a method for diagnosing EBL. Finally, PCR-based clonality analyses were performed in 3 clinical cases of BLV-positive lymphoma in cattle under 3 years old with suspected EBL. PCR analysis for IgH gene clonality indicated monoclonal proliferation of B cells, and inverse-PCR detected monoclonal BLV proviral integration in the genomes of all 3 cattle. Thus, a definitive diagnosis of EBL was made in all cases. These results demonstrate that PCR-based clonality analysis is a useful method for diagnosing EBL.

In Chapter 2, sites of BLV proviral integration in the genomes of EBL cattle under 3 years old were analyzed and compared to those of EBL cattle over 3 years old. Comparisons of BLV proviral

integration sites were also performed between EBL beef cattle under 3 years old and EBL dairy cattle under 3 years old. Integration of BLV proviruses near CpG islands was more frequently observed in EBL cattle under 3 years old than in those over 3 years old. This finding suggests that BLV-infected cells with high viral gene activity were transformed into neoplastic cells in a short period of time. Moreover, BLV proviruses were found in long interspersed nuclear elements (LINEs), a group of retrotransposons, at a significantly higher frequency in EBL cattle under 3 years old than in those over 3 years old. These results suggest the possibility that the activation of LINEs by integration of BLV proviruses may increase chromosomal aberrations in EBL cattle under 3 years old. However, it is unclear why the host immune system failed to eliminate the infected cells with BLV proviral integration near CpG islands and in LINEs prior to EBL onset. Given that BLV integration sites did not differ between young EBL beef cattle and young EBL dairy cattle, integration sites do not appear to explain the increased incidence of EBL in young beef cattle. Nevertheless, EBL cattle under 3 years old were shown to have different BLV proviral integration sites from those of EBL cattle over 3 years old, suggesting that BLV proviral integration sites may be associated with the early onset of EBL.

In Chapter 3, the methylation status of the BMP-6 gene promoter region in EBL beef cattle under 3 years old was analyzed and compared with those of EBL dairy cattle and healthy cattle, based on a hypothesis that feed management practices specific to beef cattle may cause hypermethylation of the BMP-6 gene promoter region. In addition, the association between methylation rates of the BMP-6 gene promoter region and BMP-6 gene expression was examined. The median methylation rate of the BMP-6 gene promoter region in EBL beef cattle under 3 years old was 8.9%, which was significantly higher than that of EBL dairy cattle or healthy cattle. Moreover, methylation rates of the BMP-6 gene promoter region in healthy beef cattle under 3 years old were significantly higher than those of healthy dairy cattle under 3 years old. Furthermore, BMP-6 gene expression was inhibited in cattle with hypermethylation of the BMP-6 gene promoter region. These results suggest that hypermethylation of the BMP-6 gene promoter region due to feed management practices among beef cattle might be a contributing factor for the early onset of EBL in beef cattle.

In conclusion, the results from these studies suggest that BLV proviral integration sites and hypermethylation of the BMP-6 gene promoter region might contribute to the early onset of EBL in young beef cattle.