

氏名(本(国)籍)	前澤 誠 希(神奈川県)		
主指導教員氏名	帯広畜産大学 准教授 松本 高太郎		
学位の種類	博士(獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第571号		
学位授与年月日	令和2年9月18日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学		
学位論文題目	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		
審査委員	主査	帯広畜産大学 教授	古林 与志安
	副査	帯広畜産大学 准教授	松本 高太郎
	副査	岩手大学 教授	佐藤 繁
	副査	東京農工大学 教授	竹原 一明
	副査	岐阜大学 教授	大場 恵典
	副査	東京大学 教授	猪熊 壽

#### 学位論文の内容の要旨

地方病性牛白血病(enzootic bovine leukosis, 以下 EBL)は、牛白血病ウイルス(bovine leukemia virus, 以下 BLV)の感染により引き起こされる B 細胞性のリンパ腫であり、一般的に 3 歳以上の感染牛で発症するとされている。しかし近年、3 歳未満の肥育牛における EBL の多発が報告されており、その原因はわかっていない。そこで本研究では、3 歳未満の肥育牛における EBL 発症機序の解明を目的として、宿主ゲノム中の BLV プロウイルス組込み部位および骨形成タンパク質-6(以下、BMP-6)遺伝子のメチル化の解析を行った。

本研究において、EBL の迅速かつ正確な診断法が必要であったため、まず第 1 章では、クローナリティ解析を用いた EBL の診断について検討した。第 1 節では、PCR による免疫グロブリン重鎖(以下 IgH)遺伝子のクローナリティ解析を検討した。材料には、B 細胞性リンパ腫 108 頭、T 細胞性リンパ腫 13 頭、リンパ腫以外の腫瘍性疾患 5 頭、炎症性疾患 35 頭、非炎症性疾患 11 頭、および健常牛 30 頭を用いた。その結果、IgH 遺伝子のクローナリティ解析の感度は 74.1%、特異度は 100%であり、牛の B 細胞性リンパ腫の補助的な診断法として有用であると考えられた。また、第 2 節では inverse-PCR 法の EBL の診断への応用について検討した。検体には第 1 節で用いたもののうち、BLV への感染が確認されたもの、すなわち B 細胞性リンパ腫 98 頭、T 細胞性リンパ腫 5 頭、リンパ腫以外の腫瘍性疾患 4 頭、炎症性疾患 20 頭、非炎症性疾患 5 頭、健常牛 20 頭を用いた。感度は 72.4%、特異度は 100%であり、明瞭なバンドが確認された検体は BLV プロウイルス量が高値の B 細胞性リンパ腫であったことから、inverse-PCR 法は EBL の診断法として有用であると考えられた。

第3節では、EBLが疑われた3歳未満の疾患牛3頭に対してIgH遺伝子のクローナリティ解析およびinverse-PCRを行い、3頭ともEBLと確定診断することが可能であった。このことから、クローナリティ解析によりEBL発症を迅速かつ正確に診断できることが示された。

次に第2章では、3歳未満でのEBL発症の要因の1つとして、BLVプロウイルスの組み込み部位を解析した。材料には、第1章2節でinverse-PCRによりバンドが確認された、3歳未満のEBL牛34頭、および3歳以上のEBL発症牛30頭を用いた。その結果、3歳未満のEBL発症牛は、3歳以上のEBL発症牛に比べて、CpG island近傍およびレトロトランスポゾンであるLINEsへの組み込みが有意に多かった。しかしながら、3歳未満のEBL発症牛を肥育牛と乳用牛に分けて比較したところ、組み込み部位に有意差は認められなかった。これらの結果から、3歳未満の牛でのEBLの発症にBLVプロウイルスの組み込み部位が関与している可能性が示されたが、肥育牛において多発している理由は明らかにできなかった。

第3章では、肥育牛と乳用牛の違いがエピジェネティックな変異を引き起こす可能性に着目し、リンパ球の増殖、分化およびアポトーシスの調整に関与しているBMP-6遺伝子のプロモーター領域のCpG islandのメチル化を解析した。また、BMP-6遺伝子のメチル化の状態と遺伝子発現の関係を調べた。材料には、3歳未満の肥育EBL発症牛32頭、3歳未満の乳用EBL発症牛10頭、3歳以上の乳用EBL発症牛25頭、3歳未満の肥育健常牛20頭、3歳未満の乳用健常牛15頭、3歳以上の乳用健常牛15頭を用い、バイサルファイトシーケンス解析によりメチル化したシトシンの割合を求め、各群を比較した。その結果、3歳未満の肥育EBL発症牛のメチル化割合の中央値は8.9%であり、その他の牛群に比べて有意に高かった。さらに、メチル化割合に依存的なBMP-6遺伝子の発現抑制が認められた。これらの結果から、3歳未満の肥育牛のEBL発症に、BMP-6遺伝子プロモーター領域のメチル化とそれに伴う遺伝子発現の抑制が関与する可能性が示された。

以上の結果から、クローナリティ解析のEBL診断における有用性が示され、またBLVプロウイルスの組み込み部位の違いが3歳未満の牛におけるEBL発症に関係する可能性が示された。さらに、BMP-6遺伝子プロモーター領域のメチル化によるBMP-6遺伝子の発現抑制が、3歳未満の肥育牛でのEBLの多発に関与している可能性が示された。

## 審査結果の要旨

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、一般的に3歳以上の感染牛で発症するとされている。しかし近年、3歳未満の肥育牛においてEBLの発症が多く報告されているものの、その理由については不明である。そこで本研究では、3歳未満の肥育牛におけるEBLの発症機序の解明を明らかにするために、BLV組み込み部位の解析およびBMP-6遺伝子のメチル化解析を行った。

まず第1章では、EBLを迅速かつ正確に診断するために、第1節にて免疫グロブリン重鎖（IgH）のクローナリティ解析およびinverse-PCRについての検討を行った。IgHクローナリティ解析は、感度が74.1%、特異度は100%であり、牛のB細胞性リンパ腫の補助的診

断に有用であると考えられた。第2節では inverse-PCR 法の検討を行った結果、感度 72.4%、特異度 100%であり、さらに BLV プロウイルス量が高値のもののみ明瞭なバンドが確認されたことから、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3歳未満の EBL が疑われた3症例に対して IgH クローナリティ解析と inverse-PCR 法を応用し、EBL 発症を迅速正確に診断できることを示した。

次に第2章では、EBL の早期発症と BLV の組み込み部位の関係を検討した。3歳未満の EBL 発症牛は、3歳以上の EBL 発症牛に比べて、CpG island 近傍および LINEs への BLV プロウイルスの組み込みが有意に多いことが示された。しかしながら、3歳未満の発症牛のうち、肥育牛と乳用牛を比較しても、BLV プロウイルス組み込み部位には違いが認められなかったことから、肥育牛において多発している理由は明らかにできなかった。

第3章では、リンパ球の増殖、分化およびアポトーシスの調整に関与しているとされる BMP-6 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を解析した。その結果、3歳未満の肥育 EBL 牛ではメチル化割合の中央値が 8.9%であり、3歳未満の乳用 EBL 牛、3歳以上の乳用 EBL 牛、3歳未満の肥育もしくは乳用健常牛、3歳以上の乳用健常牛よりも有意に高かった。このことから、メチル化による BMP-6 遺伝子の発現抑制が、3歳未満の肥育牛における EBL 発症に関与している可能性が考えられた。

これらの研究成果は、3歳未満の肥育牛に EBL が発生する要因の1つを提示したものであり、獣医臨床学的並びに獣医衛生学的に有用な学術情報を提供している。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分な価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : A clinical case of enzootic bovine leukosis in a 13-month-old Holstein heifer  
著 者 名 : Maezawa, M., Watanabe, K., Horiuchi, N., Matsumoto, K., Kobayashi, Y. and Inokuma, H.  
学術雑誌名 : The Japanese Journal of Veterinary Research  
巻・号・頁・発行年 : 66 (3) : 209-213, 2018
- 2) 題 目 : Analysis of bovine leukemia virus integration sites in cattle under 3 years old with enzootic bovine leukosis  
著 者 名 : Maezawa, M. and Inokuma, H.  
学術雑誌名 : Archives of Virology  
巻・号・頁・発行年 : 165 (1) : 179-183, 2020
- 3) 題 目 : Molecular diagnosis of bovine B-cell lymphoma using polymerase chain reaction for immunoglobulin heavy chain gene  
著 者 名 : Maezawa, M., Watanabe, K., Horiuchi, N., Matsumoto, K., Kobayashi, Y. and Inokuma, H.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 82 (1) : 61-63, 2020

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Pure red cell aplasia in a Holstein calf  
著 者 名 : Maezawa, M., Koyama, K., Horiuchi, N., Kobayashi, Y. and Inokuma, H.  
学術雑誌名 : Comparative Clinical Pathology  
卷・号・頁・発行年 : 27 (1) : 253-255, 2018
  
- 2) 題 目 : A clinical case of enzootic bovine leukosis diagnosed by malignant lymphoma cells detected in urinary sediment  
著 者 名 : Sakaguchi, K., Ougitani, M., Maezawa, M., Tanaka, Y., Watanabe, K., Horiuchi, N., Kobayashi, Y. and Inokuma, H.  
学術雑誌名 : The Japanese Journal of Veterinary Research  
卷・号・頁・発行年 : 67 (3) : 229-233, 2019
  
- 3) 題 目 : Disseminated thymic B-cell lymphoma in a Holstein heifer  
著 者 名 : Hishamnuri, W., Nakagun, S., Maezawa, M., Sakaguchi, K., Akiyama, N., Watanabe, K., Horiuchi, N., Kobayashi, Y. and Inokuma, H.  
学術雑誌名 : Journal of Veterinary Diagnostic Investigation  
卷・号・頁・発行年 : 31 (6) : 852-855, 2019
  
- 4) 題 目 : Quantitative analysis of the *BRAF* V595E mutation in plasma cell-free DNA from dogs with urothelial carcinoma  
著 者 名 : Tagawa, M., Tambo, N., Maezawa, M., Tomihari, M., Watanabe, K., Inokuma, H. and Miyahara, K.  
学術雑誌名 : PLOS ONE  
卷・号・頁・発行年 : 15 (4) : e0232365, 2020