

生体環境の変化に伴い変動するエクソソーム内包核酸の意義解明

岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科・教授 猪島 康雄

■ 目的

牛伝染性リンパ腫(Enzootic bovine leukosis, EBL、以下リンパ腫)は、ヒトには感染しない牛伝染性リンパ腫ウイルス(Bovine leukemia virus, BLV)の感染を原因とするB細胞性リンパ腫であり、世界中の牛で発生しているが、いまだBLVのワクチンもなく、リンパ腫の治療法もない。BLVに感染してもリンパ腫を発症するのはわずか1~5%であり、BLV感染牛の約70%は発症せずに健康なまま一生を終える。発症要因はいまだ明らかになっていないため、リンパ腫を発症する前に予測することができない。そこで本研究では、生乳を用いてリンパ腫を発症前に予測する技術を確立することを目的とし、BLVに感染していない健康牛と、リンパ腫発症牛の生乳エクソソームに内包される核酸について網羅的に比較解析を行い、生体環境の変化に伴い変動するエクソソーム内包核酸の意義を明らかにし、リンパ腫バイオマーカーの探索を試みた。

■ 方法

BLVに感染していない健康な乳牛4頭、および酪農場、と畜場でリンパ腫と診断された発症乳牛4頭、計8頭の生乳を用いた。生乳からエクソソームを分離し、電子顕微鏡、粒子径測定、ウェスタンブロットにより分離を確認後、エクソソームからトータルRNAを抽出した。マイクロアレイにより生乳エクソソームが内包するmRNAの種類と量を網羅的に同定し、比較解析した。次に、同定したmRNAの生体内での機能について解析した。続けて、それらの中からリンパ腫に関連すると思われるmRNAをリンパ腫のバイオマーカー候補として選出し、定量リアルタイムPCRによる検出診断系の確立を試みた。最後に、検出診断系が確立できたmRNAについて、健康乳牛7頭、リンパ腫発症乳牛10頭、計17頭の生乳エクソソームを新たに分離し、リンパ腫バイオマーカーとしての有用性を検証した。

■ 結果および考察

電子顕微鏡観察、粒子径測定、ウェスタンブロッティングにより、生乳からエクソソームを分離、精製できていることが確認できた。マイクロアレイ解析により、リンパ腫発症乳牛の生乳エクソソームにおいて、健康乳牛と比べ有意に内包量が多いmRNAを475種選出した。それらの中には、ヒトにおいて各種のがんや細胞間相互作用への関与が報告されているmRNAが含まれており、リンパ腫発症に関連しエクソソームの内包量が増加したことが強く示唆された。それらの中からリンパ腫のバイオマーカーとして有力と思われたmRNAを14種絞り込み選出した。そのうち9種のmRNAについて定量リアルタイムPCRによる検出診断系の確立に成功した。健康乳牛7頭、リンパ腫発症乳牛10頭の生乳エクソソームを用いた検証では、8種のmRNAが発症牛で有意に増加していた。

■ 結語

今回選出した生乳エクソソームが内包する8種のmRNAは、リンパ腫発症に関連して内包量が増加し、リンパ腫発症のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。これらのmRNAを定量することでリンパ腫を発症前に予測可能になることが期待される。今後は、尿や唾液エクソソームにも発展させ、肉牛でも活用可能な技術を目指している。