

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 頼 昱璋

題 目 : microRNA application in bovine mastitis  
(牛乳房炎における microRNA の応用)

論文要旨 :

MicroRNAs (miRNA) in tissues and liquid samples can serve as biomarkers of many diseases. The primary aim of this thesis is to identify alternatively expressed miRNAs in mastitis milk compare to normal milk.

In the first chapter, the study is designed to decide the suitable reference miRNA in milk for qPCR assay. We chose miR-92a, miR-375, and let-7g as candidate reference genes on the basis of previous report of new generation sequencing dataset. The Normfinder software was identified miR-92a as the most stable reference gene. The candidates were then validated by normalizing the expression levels of miR-146a, the well-known inflammation associated miRNAs. The significance levels were most remarkable and reproducible when miR-92a used as the reference. Based on the results, miR-92a is the best reference gene for relative quantification of miRNA expression in bovine milk.

In the second chapter, the study is designed to identify the miRNA biomarkers of bovine mastitis. The expression levels were analyzed using qPCR and normalized to miR-92a. Eight miRNAs (miR-21, miR-29b, miR-122, miR-125b, miR-204, miR-205, miR-222, and miR-383) were compared to normal and mastitis cows. MiR-21, miR-122, miR-125b, miR-205, miR-222 and miR-383 were significant up-regulated and miR-29b was significant down-regulated in mastitis cows. We separated mastitis cow samples into non-inflammation quarter group (CMT-) and inflammation quarter group (CMT+). We found that MiR-21, miR-146a, miR-155, miR-222 and miR-383 were significant up-regulated in mastitis milk. These genes were further analysis using the Digital PCR System. The results of Digital PCR had a strong correlation with qPCR, and up-regulating of miR-21, miR-146a, miR-155, miR-222 and miR-383 were also confirmed in mastitis milk. MiR-21, miR-146a, and

(別紙様式第 3 号)

miR-155 are known to be associated with inflammation. In the second study, we discovered the new target miRNA as biomarkers of bovine mastitis milk.

In the third chapter, the study uses next generation sequencing technic to study miRNA in bovine mastitis milk. Twenty-five miRNA were differentially expressed, with 23 miRNA being upregulated and 2 downregulated in bovine mastitis relative to the normal milk. The upregulated mature miR-1246 was likely derived from U2 small nuclear RNA instead of miR-1246 precursor. The significantly upregulated miRNA precursors and RNU2 were significantly enriched in the bovine chromosome 19. Bovine chromosome 19 is homologous to human chromosome 17, the gene related with human breast cancer. Gene ontology analysis of significantly upregulated miRNA putative mRNA targets showed that the upregulated miRNA were involved in bind to target mRNA transcripts and regulate target gene expression, while KEGG pathway analysis showed that upregulated miRNA were mainly related to cancer and immune system pathways. Three of novel miRNA were related with bovine mastitis and relatively highly expressed in milk. We further verified that one of the mastitis related novel miRNA was significantly upregulated using a digital PCR system. The differentially expressed miRNA are known to involve in human cancer, infection and immune related diseases. The genome-wide views of miRNA profiles in the third study provide insights into bovine mastitis and inflammatory diseases.

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Lai Yu-Chang
審査委員	主査：鹿児島大学 准教授 三浦 直樹
	副査：鹿児島大学 教授 窪田 力
	副査：山口大学 教授 前田 健
	副査：鹿児島大学 教授 大和 修
	副査：鹿児島大学 教授 浅野 淳
題目	microRNA application in bovine mastitis (牛乳房炎における microRNA の応用)
審査結果の要旨： 牛の乳房炎は臨床畜産分野では非常に大きな問題であり、国内外を問わず多くの研究が行われてきた。近年では、炎症マーカーなどの解析も進んでいるが、早期の発症予測、治療に対する反応性、予後を評価する適切な診断法はない。さらに、乳房炎の病態や病因も様々な要因があり未解決な問題も多い。本学位論文では牛の乳房炎に対して、新規診断マーカーの探索と病態解析を目的とした。これまでに、組織や体液中の microRNA (miRNA) は疾患マーカーとして有用であることが報告されている。本研究では、牛の正常乳汁と比較して乳房炎乳汁で発現差が見られる miRNA の探索と発現変化する miRNA の乳房炎病態との関連性の解明を目的とした。 本学位論文の研究は、以下の 3 章より構成される。 【第 1 章】miRNA の発現量を測定する一般的な方法はリアルタイム PCR (qPCR) である。これまでに乳房炎乳汁を対象とした qPCR 解析する際の内在性コントロールは報告されていない。本研究では過去の牛乳汁中の miRNA の発現に関する次世代シーケンス (NGS) データに基づいて、miR-92a、miR-375 と let-7g を内在性コントロール候補とした。内在性コントロール遺伝子の発現の安定性は NormFinder を用いて in silico で分析した。次に内在性コントロールの実際の有用性を検証するため、乳房炎発症牛と非乳房炎発症牛の乳汁を用いて炎症に関連する miR-146a の発現比を確認した。以上の結果から、牛乳汁中の miRNA を相対定量する際の最適な内在性コントロールは miR-92a であることが判明し、牛の乳汁中の miRNA の発現解析のスタンダードが確定できたことになる。 【第 2 章】体液中の miRNA は、その由来組織の特徴や病態を反映し、体液中の miRNA の測定は Liquid Biopsy と呼ばれている。第 2 章では、牛の乳房炎乳汁における疾患特異的	

な miRNA バイオマーカーを探索した。乳房炎発症牛と非乳房炎発症牛の乳汁の比較により、乳房炎発症牛の乳汁で、miR-21、miR-146a、miR-155、miR-222 と miR-383 が有意に発現上昇することを確認した。さらに、これらの miRNA の発現量を発現コピー数で測定できる Digital PCR により解析した結果も、qPCR と強い相関が確認された。また、これらの miRNA で乳房炎乳汁の診断能を検討したが、いずれも感度や特異度が非常に高いものであった。今回、有意に発現が上昇した miR-21、miR-146a と miR-155 は既に人の臨床サンプルで炎症に関連することが多く報告されており、乳房炎でも同様に炎症状態を反映するマーカーであると考えられる。さらに、他の発現が変化する miRNA も様々な病態との関連が報告されている。今後、これらの miRNA の関連する病態の解析と牛の臨床症状を重ねることで、乳房炎の Liquid biopsy として、優れた診断・治療バイオマーカーとなる可能性が期待される。

【第 3 章】乳汁中でも miRNA は安定して存在していることが判明したので、さらに、乳房炎の病態を解析するために、乳汁中に存在する全ての miRNA を NGS で網羅的に解析した。解析の結果、乳房炎の有無により発現量に変化が見られた miRNA は 25 種類であり、そのうち乳房炎乳汁で 23 種類の発現量が上昇し、2 種類の発現量が減少していた。また、興味深いことに上昇した miRNA の一つは miRNA 前駆体ではなく、U2 small nuclear RNA (RNU2) に由来するものと考えられた。RNU2 遺伝子群は miRNA とは異なる small non-coding RNA 分子であり、遺伝子発現の調節因子でもある。さらに、NGS 解析で乳房炎に関連して変化する miRNA と RNU2 群を染色体上へマッピングした結果、それらは 19 番染色体に有意に多く分布していた。牛の 19 番染色体は人の 17 番染色体に相同するが、人の 17 番染色体は乳癌の発生に関与することが知られている。今回の解析から牛の 19 番染色体は乳房や乳腺の病態に関連する遺伝子調節領域である可能性が示唆された。次に、NGS で上昇していた miRNA の予測標的遺伝子群に対する Gene ontology と KEGG pathway 解析を行った。Gene ontology 解析の結果では、核酸分子間の結合、遺伝子発現の調節に関与する遺伝子群、KEGG pathway 解析の結果では、癌と免疫システムパスウェイ関与する遺伝子群が、上昇した miRNA に影響を受けることが示された。本研究はゲノムワイドな miRNA 発現解析を人などの病態と比較解析することで、牛乳房炎に関する small non-coding RNA 分子解析の有用性を示すものである。また、このような比較病態解析により、牛の乳房炎病因の解明に有用な着眼点を見出すことが期待できる。

これら一連の研究は、適正な手法で実験を行われており、客観性のある科学的なデータが多く集積されていた。得られたデータは統計学的手法を用いて正しく解析されており、結果の意味するところも最新の文献を多数引用しながら適切に考察されていた。本研究の成果は獣医・畜産領域で長年問題となっている乳房炎の診断と病態解明に大いに役立つと期待される。以上により、本論文は博士（獣医学）の学位に十分に値すると判断された。