

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06392

研究課題名(和文) 組織血液型抗原とがん・感染症に関する基盤的研究

研究課題名(英文) Basic research of the relationship between histo-blood group and disease

研究代表者

近江 俊徳(Omi, Toshinori)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：40296091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：組織血液型抗原とがん・感染症に関する基盤的研究を行うため、血液型抗原を規定する遺伝子変異の検出・同定及び遺伝的マーカーを利用した疾患関連解析を行った。その結果、限定的ではあるが腫瘍培養細胞において、ネコCMAH遺伝子の変異との関連が示唆された。また、イヌのCMAH遺伝子構造とその変異解析、交差適合試験不適合症例(B型ネコ)のCMAH構造を明らかにした。さらに、B型・AB型のCMAHのジェノタイプング、イヌDEA1の責任遺伝子探索を実施した。本研究課題遂行により、血液型抗原の産生機序の解明と疾患関連解析の遺伝子マーカーを検討する上で重要な知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトでは、血液型は輸血医療のみならず感染症やがんとの関連研究が注目されている。これらの研究を小動物で行うには血液型遺伝子の解析が欠かせない。そこで、本研究では血液型に関連するCMAH遺伝子の解析を行い、イヌにおいては遺伝子構造を、ネコにおいては、一部遺伝子の違いと腫瘍培養細胞との関連、輸血不適合の原因を明らかにした。これらの結果の一部は、2編の国際的な学術雑誌に発表した(Uno Y.et.al., Canine Genet Epidemiol., 6, 2019, Uno et.al. Front. Vet. Sci., 8, 2021)。本研究結果は、獣医療への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed the basic research on blood tissue type antigens and cancer/infectious diseases and development blood type genetic testing methods by the genetic analysis of blood type in dog and cat. The CMAH gene structure of dogs and the results of mutation analysis were published in an international journal(Uno Y.et.al., Canine Genet Epidemiol., 6, 2019). In the case of cat blood types, serological analysis of unsatisfactory cases of cross-matching (type B cats) was published(Uno et.al. Front. Vet. Sci., 8, 2021). These results provide insight into the mechanism of production of the histo-blood group antigens Neu5Ac and Neu5Gc, as well as genetic markers for disease association analysis.

研究分野：動物生命科学

キーワード：血液型 イヌ ネコ 輸血 疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小動物における輸血療法は有効かつ不可欠な治療であるが、異型(血液型不一致)輸血は、重篤な副作用を惹起する原因となるため、適合血の指標である血液型抗原エピトープの構造解明は、より安全な輸血医療を行う上で臨床医学的に重要な課題となっている。輸血前検査で一般に行われるイヌの DEA1 血液型システムにおいては、抗原物質本体及びそれを担う責任遺伝子については未だ同定されていない。一方で、ネコにおいては抗原物質及び責任遺伝子は解明されて、我々のグループも含めこれまでの科研費課題の遂行により、血液型の分類を規定する遺伝子変異研究が精力的に進められ、血液型分類を補完する SNP も明らかにされた。しかし、いまだ表現型と遺伝子型の一致しないものもあり、精度向上の余地が残されている。また、細胞膜表面に存在する免疫原性の高い糖鎖やタンパク質である血液型物質は、ウイルスや細菌などの外来物質に暴露されやすく、またガン化で細胞膜の変化などを生じるため、ヒトでは、ABO 組織血液型など、血液型は輸血医療のみならず感染症やがんとの関連が注目されている。

2. 研究の目的

分子遺伝学手法を用いた血液型と疾患と関連解析においては、血液型特異的 SNP や Indel などの遺伝子マーカー重要となる。本研究では、これまでの科研費補助課題の遂行により得たイヌやネコにおける血液型物質の研究を基盤に、細胞表面に発現する抗原の種類を規定するイヌ及びネコの血液型関連遺伝子とその変異の継続的解析を行い、血液型分類の補完及び疾患関連解析に有効な血液型特異的 SNP やハプロタイプの同定することとともに、血液型物質のがんや感染症との関連研究を小動物に導入することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血清学的解析: 同意済みの検査残余より、国内で市販されているカード法によるイヌ及びネコの血液型判定キット(共立製薬)により、血液型の分類を分類し、ゲノム DNA 抽出用検体を収集した。また、イムノクロマト法による血液型判定 (Alvedia) を導入し、一部カード法との比較研究も実施した。交差適合試験不適合検体(ネコ)において、試験管法により自然抗体を用いた血液型物質の分類(血液型判定)を行った。必要に応じ、吸収試験を実施した。

(2) 遺伝子解析: ネコ AB 式血液型を担う CMAH 遺伝子解析は、当研究の既報の方法(Omi T. et. al., PLoS One, 2016)に従い実施した。また、B 型特異的 SNP については、TaqMan 法による検査法の開発を試みた。イヌの DEA 1 血液型においては、責任遺伝子同定の予備的研究として、DEA 1.1 陽性と DEA 1.1 陽性の各 1 例の計 2 例のゲノム DNA を用い、次世代シーケンシング法により、全ゲノム配列を決定し、リファレンス配列と比較した。

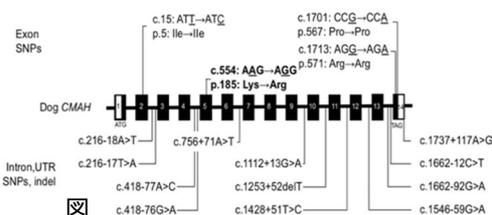
(3) 疾患関連解析: イヌ及びネコの CMAH 遺伝子変異とシアル酸分子種(組織血液型抗原)血液型の分類と疾患との関連について、がんや感染症検体を用いて限定的な検体数で実施した。

4. 研究成果

(1) 血液型別(疾患別)ゲノムバンクの構築: 当該研究期間に協力獣医療施設より、収集した血液型別(疾患別)ゲノムバンクの構築を実施した。イヌにおいては約 1500 例の検体を収集した。血液型は DEA1.1 陽性が約 85%、DEA1.1 陰性が約 15%であった。ネコにおいては約 700 例の検体を収集した。血液型は、A 型約 91%、B 型 5%、AB 型 4%であった。それぞれ、90%以上の検体は、疾患の診断がついていることから、今後血液型との関連あるいは、網羅的な遺伝子解析による疾患機序解明に有用な検体を得ることができた。

(2) イムノクロマト法による血液型分類(シアル酸分子種の同定): 近年、欧米では新しい血液型判定法として、イムノクロマト法やゲルカラム法などが導入されている。本研究においては、初めて当研究室に海外で市販されているイムノクロマト法による血液型判定 (Alvedia) を導入し、カード法との併用により、より正確な血液型抗原の分類の基盤を整えた。

(3) イヌ CMAH 遺伝子と疾患関連解析: 前年に終了した科研費課題の実施においてイヌ赤血球膜や各種細胞に発現するシアル酸分子種(Neu5Gc, Neu5Ac)を担う CMAH 遺伝子の cDNA クローニング、RT-PCR 法による組織発現分布、SNP 同定、SNP とシアル分子種との関連、SNP の品種差など、これまでの実験成果をまとめ、その成果を国際学術雑誌にて公表した(Uno Y. et. al., Canine Genet Epidemiol., 2019, 右図)。さらに、本研究課題ではイヌにおいて、腫瘍細胞(尿路上皮癌、線維肉腫、肝癌、肺癌、乳腺腫瘍)各 1 例について翻訳領域の全塩基配列を決定した。その結果、疾患特異的 SNP は見出されなかった。また、非同義置換 SNP である c.554A>G を含め変

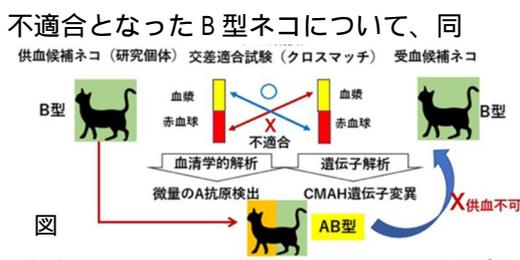


異は認められたもの腫瘍に関連付けられるものではなかった。c.554A>G は品種差はあるものの Neu5Gc と Neu5Ac の産生にどの程度関与しているかは不明であるため、本研究を進展させるためには、さらに CMAH 遺伝子の機能に影響を及ぼす遺伝子変異の同定が必要と考えられた。

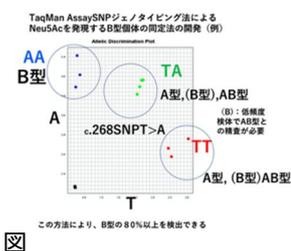
(4) ネコの CMAH 遺伝子と疾患関連解析：ネコ乳腺腫瘍細胞株(5例)とネコ腎由来株化細胞ゲノム DNA を用いて、CMAH 遺伝子の翻訳領域の塩基配列を解析した。その結果、我々のネコ一般集団の解析(800例以上)では極めてまれな SNP 座位とされている SNP が、当該細胞株において高頻度に検出されることを明らかとした。当該変異が、これらの腫瘍細胞株や株化細胞の特性とどのように関与するかは、まだ不明である。また、パルボウイルス罹患個体の由来の血液(5例)の CMAH 解析を行い、その結果すべて Neu5Gc を有する A 型の遺伝子型が推測された。パルボウイルスは Neu5Ac (B 型物質) より Neu5Gc (A 型物質) に吸着する報告があるが (Löfling J. et.al., Virology, 2013) 一般集団では A 型がほとんどであること、また近年のコロナ禍で十分な解析ができなかったことから、今後も、継続的な研究が必要と考える。

(5) イヌの DEA 1 血液型責任遺伝子探索：次世代シーケンスによる全ゲノム解析を行い、まだ世界で未解明であるイヌの輸血に重要な DEA1.1 抗原の責任遺伝子の探索を試みた。その結果、リファレンス配列に対し DEA1.1 陽性個体と DEA1.1 陰性個体で、非同義置換を含め SNPs と Indel を多数検出され、責任候補遺伝子の同定の予備的なデータが得られた。現在、解析を進めている。

(6) ネコ CMAH 遺伝子解析と血液型：交差適合試験にて、不適合となった B 型ネコについて、同種抗体による血液型分類及び吸収試験による抗原同定ならびに遺伝子解析を行いその原因を明らかにした (Uno et.al. Front. Vet. Sci., 8, 2021, 右図)。これまでの研究及び本研究課題において、B 型約 90 例、AB 型約 20 例の CMAH 遺伝子解析を実施し、新規 SNP の同定などを含め新たな CMAH 遺伝子変異データベースを構築した。



(7) 組織血液型抗原 Neu5Ac(B 型)の遺伝子検査法:組織血液型抗原 Neu5Ac(B 型)特異的 SNP c.268T > A の検出と簡便で迅速なタイピング法を開発 (右図) し、今後がんや感染症の多検体解析を行う基盤の一つを確立した。



以上、本研究課題遂行により、血液型と疾患との関連解析における基礎的な知見が得られた。

< 引用文献 >

Omi T. et.al. Molecular Characterization of the Cytidine Monophosphate-N-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase (CMAH) Gene Associated with the Feline AB Blood Group System. PLoS One, 11, 2016.

Uno Y.et.al. Molecular characterization of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) associated with the erythrocyte antigens in dogs Canine Genet Epidemiol., 2019.

Löfling J. et.al. Canine and feline parvoviruses preferentially recognize the non-human cell surface sialic acid N-glycolylneuraminic acid Virology, 2013.

Uno et.al. Front. Phenotypic and Genetic Characterization for Incompatible Cross-Match Cases in the Feline AB Blood Group System Vet. Sci., 8, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uno Yumiko, Yaguchi Masami, Kobayashi Tasuku, Onozawa Eri, Ochiai Kazuhiko, Yoshida Karin, Nakamura Chihiro, Udagawa Chihiro, Omi Toshinori	4. 巻 8
2. 論文標題 Phenotypic and Genetic Characterization for Incompatible Cross-Match Cases in the Feline AB Blood Group System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fvets.2021.720445	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Uno Yumiko, Kawakami Shota, Ochiai Kazuhiko, Omi Toshinori	4. 巻 6
2. 論文標題 Molecular characterization of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) associated with the erythrocyte antigens in dogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Canine Genetics and Epidemiology	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40575-019-0076-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 近江 俊徳 宇埜 友美子 中村 知尋 落合 和彦 青木 博史 宇田川 智野 浅野 潤三 土田 修一
2. 発表標題 ネコAB式血液型を担うCMAH遺伝子解析の臨床応用への検討
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近江 俊徳
2. 発表標題 血液型遺伝子検査の現状と課題
3. 学会等名 獣医輸血研究会 第2回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢口 雅美, 宇埜友美子, 落合和彦, 山根咲恵, 金子直博, 稲垣健志, 坂本敦司, 小野沢栄里, 土田修一, 近江俊徳
2. 発表標題 AB型が疑われたB型ネコに見出した新規CMAH遺伝子変異
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uno Y, Kawakami S, Ochiai A, Omi T
2. 発表標題 cDNA cloning and variant analysis of the canine CMAH gene
3. 学会等名 The 37th International Society for Animal Genetics Conference, (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	土田 修一 (Tsuchida Shuichi) (20217326)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授 (32669)	
研究 分担者	落合 和彦 (Ochiai Kazuhiko) (30550488)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授 (32669)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------