

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 25日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008 ～ 2011

課題番号：20380173

研究課題名（和文）：動物遺伝病（ライソゾーム蓄積病）の新規診断・予防法および新規治療法の開発

研究課題名（英文）：Development of novel methods for diagnosis, prevention and treatment in inherited diseases (lysosomal storage diseases) in animals

研究代表者：大和 修 (YAMATO OSAMU)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：80261337

研究成果の概要（和文）：

多数の新規および既知の動物遺伝病（特に、ライソゾーム蓄積病）について、診断・スクリーニング法を開発した。また、その一部の犬疾患（GM1 ガングリオシドーシスおよび神経セロイドリポフスチン症）については、予防法を確立・実践し、発症個体が出現しない程度にまで国内キャリア頻度を低下させることに成功した。さらに、猫の GM2 ガングリオシドーシスに対しては、抗炎症療法を試行し、本治療が延命効果を有する可能性を示唆した。一方、次の研究に継続発展する新規の動物遺伝病を数件同定した。

研究成果の概要（英文）：

Diagnostic and screening methods for a number of novel and known animal inherited diseases especially lysosomal storage disorders were developed in this study. For canine diseases such as GM1 gangliosidosis and neuronal ceroid lipofuscinosis, preventive strategies were planned and carried out. The preventive measures resulted in a decrease of carrier frequency without the occurrence of affected animals in Japan at the end of study period. Furthermore, anti-inflammatory therapy was carried out in a cat affected with GM2 gangliosidosis suggesting that this treatment might have a survival advantage. In addition, some novel inherited diseases were indentified in dogs and cats, which will be investigated in the next study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：ライソゾーム蓄積病、動物モデル、ガングリオシドーシス、サンドホフ病、セロイドリポフスチン症、遺伝病、スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

近年、国内外で、動物（特に犬猫）の遺伝病に対する関心が相当に高まってきた。動物遺伝病に関心が高まる理由の一つは、動物遺

伝病がヒト疾患の良いモデルとなり、これら難治性疾患の治療法の開発を含め、ヒト遺伝学上の問題解決に寄与する存在となり得るからである。そして、もうひとつの理由とし

て、動物の遺伝(病)情報そのものが、遺伝子診断や遺伝子療法などが一般化される近未来の高度獣医療に必要不可欠となるからである。

一方、現行の臨床獣医学の現場においては、遺伝病は予防・制御しなければならない対象である。人為的な理由で異常遺伝子の頻度が上がってしまった動物集団においては、人為的にその頻度を下げる措置、すなわち簡易迅速診断法の開発と繁殖コントロール(予防計画)が必要となる。

以上のように、獣医学的および医学的意義の両方において、動物遺伝病に関する研究が求められてきた。

2. 研究の目的

本研究では、多数の新規および既知の動物遺伝病(特に、ライソゾーム蓄積病)について、(1)診断・スクリーニング法を開発し、(2)各疾患の予防法を確立・実践し、さらに(3)治療法を開発することを目的として行う。

すなわち、(1)では、大規模集団に適応可能な簡易・迅速・安価な診断・スクリーニング法を開発するために、各疾患の分子基盤(原因遺伝子変異)を明らかにする。そして、これらの特徴を基にして、(2)では、実践可能な予防計画を立案・実行し、実行後の予防効果を評価する。また、(3)として、いくつかの疾患では、動物モデル(疾患モデル)として、これらの神経難病に対する有効な治療法を見出すために、その治療根拠となる病態メカニズムを明らかにして、実践可能な治療を試行する。これにより、動物疾患の治療法を確立すると同時に、人疾患の治療法への知見を提供する。

本研究では、遺伝病症例の発掘から予防まで、ならびに動物モデル化からその応用までの過程を各分野の専門家の連携・協力(ネットワーク)によって達成する。ここで立案する連携研究は、動物遺伝病に関する集約的研究の近未来モデルとなり得る。

3. 研究の方法

診断・スクリーニング法の開発には、主に従来型 PCR 法および Real-time PCR 法を中心とした分子生物学的手法を用いた。また、ライソゾーム病のスクリーニング法として、バフィーコート(白血球層)の電子顕微鏡観察を行った。さらに、その他の先天代謝異常症のスクリーニング法として、血中および尿中の代謝物を検出するために、タンデムマスおよびガスクロマトグラフィー-マススペクトルメトリー法を用いた。

疾患予防を目的とした遺伝子型調査の検体として、全血あるいは唾液を FTA カードに塗布した試料を収集し、この FTA カードの 1.2 mm 直径のパンチを用いて迅速遺伝子型

検査が実施できるような方法を作成した。

また、新規疾患の同定には、ライソゾーム酵素測定、蓄積物質の薄層クロマトグラフィー分析、ダイレクト DNA シーケンス法、RT-PCR 法などを用いた。

4. 研究成果

(1) 診断・スクリーニング法開発

GM1 ガングリオシドーシス(柴犬、日本猫)、GM2 ガングリオシドーシス 0 亜型のサンドホフ病(日本猫 2 変異、トイプードル、雑種犬)、ニーマンピック病 C 型(シヤム猫)、セロイドリポフスチン症(ボーダーコリー、サルキー)、コリー眼異常(コリー、ボーダーコリー、北海道犬)、犬 *MDR1* 遺伝子変異(各種犬種)、猫多発性嚢胞腎(チンチラ、雑種猫)に関する各種新規遺伝子型検査法を開発した。また、血液バフィーコート電顕法を使ったライソゾーム病スクリーニング法を開発した。

(2) 予防法の確立・実践

上記遺伝子型検査法を用いた大規模調査を実施し、各種疾患の犬および猫集団における変異アレル頻度を算出して、予防すべき疾患であるかを評価した。同時に、予防すべき疾患については、繁殖ラインからキャリア動物を外す繁殖コントロールを実施し、変異アレル頻度を低下させた。

具体的には、柴犬の GM1 ガングリオシドーシスおよびボーダーコリーの神経セロイドリポフスチン症において、これらの疾患の国内キャリア頻度が予防を必要とするほど高いことを明らかにし、さらに実際に集団疫学調査を実施するとともに繁殖指導を行って、これらの疾患が発生しない程度まで国内キャリア頻度を低下させることに成功した。

また、猫の疾患では、GM1 ガングリオシドーシスおよび多発性嚢胞腎は、他の遺伝病(GM2 ガングリオシドーシス、ニーマンピックなど)と比較して、極めて高いキャリア頻度であり、臨床上重要な疾患であることを明らかにした。

(3) 病態メカニズム解明と治療法開発

柴犬の GM1 ガングリオシドーシスに関する経時的頭部 MRI 変化および病理組織学的変化を記録し、これらの変化が診断補助因子となりうることを明らかにした。また、MRI 画像上の変化の組織学的根拠(白質形成不全等)を明らかにした。一方、猫サンドホフ病症例に対する抗炎症療法を試行し、ステロイドによる延命効果を明らかにし、脳における炎症が増悪因子であることを証明した。

(4) 新規疾患および新規変異の発見

研究の過程で、新たな疾患を同定し、時期研究に繋げた。それらの疾患は、キサンチン尿症の猫 2 例、ジヒドロピリミジナーゼ欠損症の猫 1 例、チロシン血症の犬 1 例、シスチ

ン尿症のオオカミ 1 例、などである。現在、これらの分子基盤を解析中である。

以上の研究成果の一部は、下記の論文において報告済みである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線) *corresponding author

[雑誌論文] (計 39 件) うち主要論文のみ記載。
すべて査読あり。

1. Rahman MM, Chang HS, Mizukami K, Hossain MA, Yabuki A, Tamura S, Kitagawa M, Mitania S, Higo T, Uddin MM, Uchida K, Yamato O*. A frameshift mutation in the canine *HEXB* gene in toy poodles with GM2 gangliosidosis variant 0 (Sandhoff disease). *Vet J* 2012 in press.
2. Mizukami K, Kawamichi T, Koie H, Tamura S, Matsunaga S, Imamoto S, Saito M, Hasegawa D, Matsuki N, Tamahara S, Sato S, Yabuki A, Chang HS, Yamato O*. Neuronal ceroid lipofuscinosis in Border Collie dogs in Japan: clinical and molecular epidemiological study (2000–2011). *Sci World J* 2012, 383174, 2012 in press.
3. Furusawa Y, Mizukami K, Yabuki A, Kuwamura M, Chang HS, Hossain MA, Rahman MM, Uddin MM, Mitani S, Yamato O*. Mutational analysis of the feline *CLN3* gene and an ultrastructural evaluation of lysosomal storage materials in a cat with neuronal ceroid lipofuscinosis: an investigation into the molecular basis of the disease. *Vet J* 2012 in press.
4. Mizukami K, Shoubudani T, Nishimoto S, Kawamura R, Yabuki A, Yamato O*. Trapped neutrophil syndrome in a Border Collie dog: clinical, clinico-pathologic, and molecular findings. *J Vet Med Sci* 74(6) 797-800, 2012 June.
5. Rahman MM, Kawaguchi H, Miyoshi N, Yabuki A, Nakamoto Y, Ozawa T, Yamato O*. Pathological features of salivary gland cysts in a Shiba dog with GM1 gangliosidosis: a possible misdiagnosis as malignancy. *J Vet Med Sci* 74(4), 485-489, 2012 Apr.
6. Chang HS, Shibata T, Arai S, Zhang C, Yabuki A, Mitani S, Higo T, Sunagawa K, Mizukami K, Yamato O*. Dihydropyrimidinase deficiency: the first feline case of dihydropyrimidinuria with clinical and molecular findings. *JIMD Reports* 6, 21-26, 2012 Mar.
7. Hasegawa D, Yamato O*, Nakamoto Y, Ozawa T, Yabuki A, Itamoto K, Kuwabara T, Fujita M, Takahashi K, Mizoguchi S, Orima H. Serial MRI features of canine GM1 gangliosidosis: a possible imaging biomarker for diagnosis and progression of the disease. *Sci World J* 2012, 250197, 2012 Mar.
8. Mizukami K, Chang HS, Ota M, Yabuki A, Hossain MA, Rahman MM, Uddin MM, Yamato O*. Collie eye anomaly in Hokkaido dogs: case study. *Vet Ophthalmol* 15(2), 128-132, 2012 Mar.
9. Mizukami K, Chang HS, Yabuki A, Kawamichi T, Hossain MA, Rahman MM, Uddin MM, Yamato O*. Rapid genotyping assays for the 4-base pair deletion of canine *MDR1/ABCB1* gene and low frequency of the mutant allele in Border Collie dogs. *J Vet Diagn Invest* 24(1), 127-134, 2012 Jan.
10. Satoh H, Yamauchi T, Yamasaki M, Maede Y, Yabuki A, Chang HS, Asanuma T, Yamato O*. Rapid detection of GM1 ganglioside in cerebrospinal fluid in dogs with GM1 gangliosidosis using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Vet Diagn Invest* 23(6), 1202-1207, 2011 Nov.
11. Mizukami K, Chang HS, Yabuki A, Kawamichi T, Kawahara N, Hayashi D, Hossain MA, Rahman MM, Uddin MM, Yamato O*. Novel rapid genotyping assays for neuronal ceroid lipofuscinosis in Border Collie dogs and high frequency of the mutant allele in Japan. *J Vet Diagn Invest* 23(6), 1131-1139, 2011 Nov.
12. Ogawa M, Uchida K*, Park E, Kamishina H, Sasaki J, Chang HS, Yamato O, Nakayama H. Immunohistochemical observation of canine degenerative myelopathy in two Pembroke Welsh Corgi dogs. *J Vet Med Sci* 73(10), 1275-1279, 2011 Oct.
13. Nakamoto Y, Yamato O*, Uchida K, Nibe K, Tamura S, Ozawa T, Ueoka N, Nukaya A, Yabuki A, Nakaichi M. Neuronal ceroid-lipofuscinosis in longhaired Chihuahuas: clinical, pathological, and MRI findings. *J Am Anim Hosp Assoc* 47(4), e64-e70, 2011 July.
14. Rahman MM, Shoubudani T, Mizukami K, Chang HS, Hossain MA, Yabuki A, Mitani S, Higo T, Arai T, Yamato O*. Rapid and simple polymerase chain reaction-based diagnostic assays for GM2 gangliosidosis variant 0 (Sandhoff-like disease) in Japanese domestic cats. *J Vet Diagn Invest* 23(2), 338-342, 2011 Mar.
15. Chang HS, Mizukami K, Yabuki A, Hossain MA, Rahman MM, Uddin MM, Arai T, Yamato O*. A novel rapid genotyping technique for Collie eye anomaly: SYBR Green-based real-time polymerase chain reaction method applicable to blood and saliva specimens on Flinders Technology Associates filter paper. *J Vet Diagn Invest* 22(5), 708-715, 2010 Sep.
16. Tamura S, Tamura Y, Uchida K, Nibe K, Nakaichi M, Hossain MA, Chang HS, Rahman MM, Yabuki A, Yamato O*. GM2 gangliosidosis variant 0 (Sandhoff-like disease) in a family of toy poodles. *J Vet Intern Med* 24(5), 1013-1019, 2010 Sep.
17. Chang HS, Arai T, Yabuki A, Hossain MA, Rahman MM, Mizukami K, Yamato O*. Rapid and reliable genotyping technique for GM1 gangliosidosis in Shiba dogs by real-time polymerase chain reaction with TaqMan-minor groove binder probes. *J Vet Diagn Invest* 22(2),

234-237, 2010 Mar.

18. **Yamato O***, Funk H, Kawahara N, Funková M, Entlerová Z, Petrusová H, Hayashi D, Satoh H, Yamasaki M, Maede Y, Yabuki A, Arai T. Mutation screening of canine GM1 gangliosidosis for preventive measures: absence of the mutant allele in breeding shiba dogs in the Czech Republic. *Jpn J Prophylactic Vet Med* 1(2), 63-68, 2009 Oct.
19. Masoudi AA, **Yamato O**, Yoneda K, Tsuji T, Mikami O, **Kunieda T***. Exclusion of *NEU1* and *PPGB* from candidate genes for a lysosomal storage disease in Japanese black cattle. *Anim Sci J* 80(5), 611-615, 2009 Oct.
20. Kuwamura M*, Nakagawa M, Nabe M, Yamate J, Inoue M, Satoh H, **Yamato O**. Neuronal ceroid-lipofuscinosis in a Japanese domestic shorthair cat. *J Vet Med Sci* 71(5), 665-667, 2009 May.
21. 中本裕也*, **大和 修**, 小澤 剛, 長谷川大輔, 板本和仁, 方伯部健吾, 塚根美穂, 中市統三. 遺伝子検査により GM1 ガングリオシドーシスと確定診断された柴犬 3 症例の頭部 MRI 所見. *日獣誌* 62(3), 219-224, 2009 Mar.
22. Nagayasu A, Nakamura T, **Yamato O**, Tsuzuki K, Hosaka Y, Ueda H*, Tangkawattana P, **Takahana K**. Morphological analysis of corneal opacity in Shiba dog in GM1 gangliosidosis. *J Vet Med Sci* 70(9), 881-886, 2008 Sep.
23. **Yamato O***, Hayashi D, Satoh H, Shoda T, Uchida K, Nakayama H, Sakai H, Masegi T, Murai A, Iida T, Hisada H, Hisada A, Yamasaki M, Maede Y, Arai T. Retrospective diagnosis of feline GM2 gangliosidosis variant 0 (Sandhoff-like disease) in Japan: possible spread of the mutant allele in the Japanese domestic cat population. *J Vet Med Sci* 70(8), 813-818, 2008 Aug.

[学会発表] (計 37 件) うち招待講演のみ記載

1. **大和 修**. ペットの遺伝病 — どうして問題なのか、どうすれば減らせるか—. In: JSVCP 市民公開講演 (ペットの遺伝病とペットロス). 日本獣医内科学アカデミー/日本獣医臨床病理学会 2012 年大会, 横浜, 2012, Feb 19.
2. **大和 修**. 水上圭二郎. 新興・再興の遺伝子疾患: TNS, CEA, MDR1 など. In: JSVCP シンポジウム 1 (伴侶動物の遺伝子疾患 update). 日本獣医内科学アカデミー/日本獣医臨床病理学会 2012 年大会, 横浜, 2012, Feb 18.
3. **大和 修**. 伴侶動物の先天代謝異常症. In: JSVCP シンポジウム 1 (伴侶動物の遺伝子疾患 update). 日本獣医内科学アカデミー/日本獣医臨床病理学会 2012 年大会, 横浜, 2012, Feb 18.
4. **大和 修**. ライソゾーム病 Update. 第 35 回獣医神経病学会. 京都, 2010, Dec 12.
5. **大和 修**. ボーダーコリーの視覚異常を伴う遺伝病: セロイドリポフスチン症・コリー眼異常・X 染色体性進行性網膜萎縮. In: 比較眼科学会シンポジウム「ここまで来た眼・神経疾患の診断」. 日

本獣医内科学アカデミー/日本獣医臨床病理学会 2010 年大会, 東京, 2010, Feb 14.

6. **大和 修**. 犬猫のライソゾーム病とその他関連疾患のスクリーニングについて. In: 司祭機関・獣医臨床遺伝研究会共催シンポジウム ポストシークエンス時代を迎えて — 動物の遺伝性疾患をめぐる最近の話題—. 第 147 回日本獣医学会, 宇都宮, 2009, Apr 2.
7. **大和 修**. 日本獣医臨床病理学会大会セミナー 臨床徴候から診断へのアプローチ: 運動失調 (遺伝性). 日本獣医内科学アカデミー/日本獣医臨床病理学会 2009 年大会, 東京, 2009, Feb 15.
8. **大和 修**. 牛の先天のおよび後天的代謝異常症: ライソゾーム病と乳熱の話. 第 75 回鹿児島県家畜疾病診断研究会, 鹿児島, 2008, Jul 17.
9. **大和 修**. 動物の遺伝病について: 柴犬の GM1 ガングリオシドーシス. 平成 20 年度日本犬保存会審査部研究会, 東京, 2008, Jun 8.

[図書] (計 5 件) うち代表的図書のみ記載

1. **大和 修**. 遺伝症 (ガングリオシドーシス), 遺伝病 (コリー眼異常). In: 予防動物医学研究会編集. 新しいデータで読む犬と猫の疾病早期診断マニュアル. チクサン出版 (緑書房), 東京, pp 104-111, 112-117, 2011 Jul.
2. **大和 修**. 監修. よくみる犬と猫の品種好発性疾患 (Breed predispositions to disease in popular dogs and cats). (SA Medicine 73 号 定期購読者限定付録) インターズー, 東京, 2011 Jun.
3. **大和 修**. 糸球体腎症, 脳の疾患 変性性疾患, 脳の疾患 先天性疾患, 貧血と赤血球増加症. In: 岩崎利郎, 辻本 元, 長谷川篤彦 監修, 獣医内科学 (小動物編) 改訂版, 文永堂出版, 東京, pp 271-272, 351-354, 421-429, 2011 May.

[その他] 商業誌総説・解説 (計 9 件)

1. 田村慎司, **大和 修**. 犬の遺伝性神経変性性疾患における臨床獣医師の役割: ライソゾーム病症例の経験に基づいた考察. 広島県獣医学雑誌 26, 1-6, 2011 Aug.
2. **大和 修**. 犬の先天代謝異常症 — ライソゾーム病・スフィンゴリピドーシス—. J-VET No. 289, 59-70, 2011.
3. **大和 修**. 治療シリーズ—私はこうしている— 神経・筋肉・関節疾患 ライソゾーム (蓄積) 病. SA Medicine 12(6), 10-13, 2010.
4. 中本裕也, 小澤 剛, 矢吹 映, **大和 修**. 柴犬の GM1 ガングリオシドーシス — 早期診断を導くために必要な知識—. Clinic Note No. 58, 71-82, 2010.
5. **大和 修**. 治療シリーズ—私はこうしている— 血液疾患 ホスホフルクトキナーゼ (PFK) 欠損症. SA Medicine 12(1), 23-24, 2010.
6. **大和 修**. 治療シリーズ—私はこうしている— 血液疾患 ピルビン酸キナーゼ (PK) 欠損症. SA Medicine 12(1), 22-23, 2010.
7. **大和 修**. 蓄積病の臨床・生化学. 日本獣医病理学会および日本獣医病理専門家協会会報, 7月号,

6-10, 2008.

8. **大和 修**. DAMNIT-V で学ぶ神経病学各論 第4回「ライソゾーム病」. CAP (Companion Animal Practice) No. 229, 51-62, 2008.
9. **大和 修**. 動物の先天代謝異常症：ライソゾーム病および関連疾患について. 鹿児島県獣医師会会報 第41号, 20(1), 2-7, 2008.

6. 研究組織

(1)研究代表者

大和 修 (YAMATO OSAMU)
鹿児島大学・農学部・教授
研究者番号：80261337

(2)連携研究者

遠藤 大二 (ENDO DAIJI)
酪農学園大学・獣医学部・教授
研究者番号：40168828

国枝 哲夫 (KUNIEDA TETSUO)
岡山大学・自然科学研究科・教授
研究者番号：80178011

竹花 一成 (TAKEHANA KAZUSHIGE)
酪農学園大学・獣医学部・教授
研究者番号：80137413

山中 正二 (YAMANAKA SHOJI)
横浜市立大学・大学病院・准教授
研究者番号：80264604

落合 謙爾 (OCHIAI KENJI)
北海道大学・獣医学研究科・准教授
研究者番号：80214162

内田 和幸 (UCHIDA KAZUYUKI)
東京大学・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：10223554

長谷川 大輔 (HASEGAWA DAISUKE)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師
研究者番号：20366793

松木 直章 (MATSUKI NAOAKI)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号：40251417

中市 統三 (NAKAICHI MUNEKAZU)
山口大学・農学部・教授
研究者番号：60243630

板本 和仁 (ITAMOTO KAZUHIRO)
山口大学・農学部・准教授
研究者番号：50379921