様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ５ 月 １５ 日現在

機関番号：３０１０９
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ０６４２３

研究課題名（和文）次世代シークエンシングを用いた犬種特異的な炎症性腸疾患の原因遺伝子の探索

研究課題名（英文）Exploration of causative genes for breed-specific inflammatory bowel disease in dogs using next-generation sequencing

研究代表者
大田　寛（Ohta, Hiroshi）

酪農学園大学・獣医学群・准教授

研究者番号：５０４３１３３３

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）：本研究では、ミニチュア・ダックスフンド（MD）という特定の犬種に好発する炎症性腸疾患である炎症性結直腸ポリープ（ICRP）を対象とし、全エクソームシーケンス解析を用いて原因遺伝子の特定を試みた。解析の結果、MDに特異的なアミノ酸置換を伴う一塩基多型（SNP）が、プラスミノーゲンをコードするPLG遺伝子で特定された。上記のMDに特異的なPLG遺伝子のSNPによる影響を解析したところ、腸炎病変局所においてプラスミノーゲンの分解が促進されていた。また、腸炎病変におけるプラスミノーゲンの分解は、IL-6を介したマトリクスメタロプロテアーゼ-9の活性化によって生じていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ミニチュア・ダックスフンドの炎症性結直腸ポリープ（ICRP）という特定の犬種に好発する炎症性腸疾患の原因遺伝子の探索をおこない、候補遺伝子としてPLG遺伝子が抽出された。PLG遺伝子は炎症に関わる蛋白質であるプラスミノーゲンをコードする遺伝子であり、PLG遺伝子の一塩基多型が結直腸における慢性炎症を特徴とするICRPの病態発生に関わることが示された。本研究で得られた研究成果は、人の炎症性腸疾患の病態解析への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify the causative genes of inflammatory colorectal polyps (ICRP) in miniature dachshunds, a breed specific inflammatory bowel disease, using next generation sequencing. By whole exome sequencing analysis, a single nucleotide polymorphism (SNP) in the PLG gene, which codes for plasminogen, was identified, which is associated with amino acid substitutions specific to miniature dachshunds. Miniature dachshunds-specific PLG gens SNP promoted plasminogen degradation within the inflammatory colorectal lesions of ICRP. Furthermore, it was revealed that plasminogen degradation within the polyp lesion was caused by the activation of matrix metalloproteinase-9 through IL-6.

研究分野：伴侶動物内科学

キーワード：ミニチュア・ダックスフンド　炎症性結直腸ポリープ　炎症性腸疾患　SNP　次世代シークエンス　全エクソームシークエンス

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景
ミニチュア・ダックスフンドの炎症性結直腸ポリープ（ICRP）は、結直腸領域に原因不明の慢性炎症を生じてポリープ病変の形成に至る犬種特異的な炎症性腸疾患である。免疫抑制療法に良好な反応を示すことから、結直腸における食物抗原や腸内細菌抗原などに対する過剰な免疫応答が発症要因であると考えられている。過去の ICRP に関する研究では、ICRP のポリープ病変で様々な炎症性サイトカインの発現上昇が認められることや、糞便中細菌叢の変化が生じていることが報告されており、病態発生との関連性が示唆されている。しかしながら、MD という特定の犬種で結直腸に限局した炎症が生じる根本的な原因は明らかになっていない。

２．研究の目的
（１）本研究では、ICRP が犬種特異的に発生することに着目し、原因遺伝子の特定を目的とした。原因遺伝子の探索方法として、一塩基多型（SNP）の網羅的解析手法に着目した。
（２）また、網羅的解析手法で特定された ICRP 症例の SNP について、一塩基多型によるタンパク質機能への影響を解析した。

３．研究の方法
（１）本研究では、ミニチュア・ダックスフンドの ICRP の明らかな犬種特異性に着目し、大腸の慢性炎症の鍵となる遺伝子変異の同定を、SNP の網羅的解析手法の一つである全エクソームシーケンスを用いて試みた。
（２）網羅的遺伝子解析で特定された遺伝子変異によるタンパク質機能への影響を解析するために、培養細胞を用いた変異タンパク質の機能解析を行った。
（３）上記の解析に加え、ICRP の腸炎活動性のモニタリングマーカーの探索、ならびに結腸で産生される粘液の主成分であるムチンの発現解析を行った。
（４）ICRP の解析に加え、犬の代表的な慢性腸疾患である蛋白漏出性腸症の予後因子解析を行った。

４．研究成果
（１）ICRP の原因遺伝子の探索
　網羅的な遺伝子解析手法の一つである全エクソームシーケンス解析を用いて ICRP の原因となりうる SNP の特定を試みた。遺伝子解析の結果、ミニチュア・ダックスフンドに特異的なアミノ酸置換を伴う SNP が５つの遺伝子（*PLG, TCOF1, TG, COL9A2, COL4A4*）で抽出された。次に、５つの遺伝子の中から炎症に関わるタンパク質であるプラスミノーゲンをコードする *PLG* 遺伝子に注目し、*PLG* 遺伝子の SNP の頻度を、ICRP を発症したミニチュア・ダックスフンド、ICRP を発症していないミニチュア・ダックスフンド、他犬種の３群間で比較したところ、抽出された *PLG* 遺伝子の SNP の頻度は、ICRP を発症したミニチュア・ダックスフンドにおいて優位に高かった（図１）。
　上記のミニチュア・ダックスフンドに特異的な *PLG* 遺伝子の SNP による影響を解析したところ、プラスミノーゲンのアミノ酸配列の変化により、腸炎病変局所においてプラスミノーゲンの分解が促進されていた。また、腸炎病変局所におけるプラスミノーゲンの分解は、炎症性サイトカインである IL-6 を介したマトリクスメタロプロテアーゼ-9（MMP-9）の活性化によって生じていることが明らかになった。また、ミニチュア・ダックスフンドの ICRP で認められた MMP-9 の活性化によるプラスミノーゲンの分解は、人の炎症性腸疾患患者の腸炎病変局所でも認められる現象であることが明らかになった（発表論文 2023 年）。他の４つの遺伝子の一部についても、*PLG* と同様に ICRP を発症したミニチュア・ダックスフンドにおいて SNP 頻度が有意に高く、ICRP の腸炎病変局所における遺伝子発現が増加していることが明らかになった。

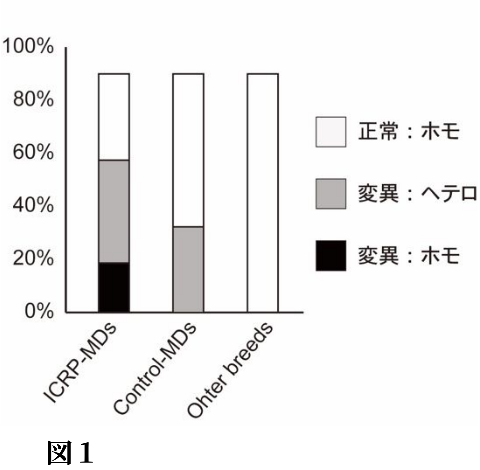

図１
ICRP 症例での *PLG* 遺伝子の SNP 頻度

（２）ICRP の結直腸粘膜におけるムチンの発現解析
ミニチュア・ダックスフンドの ICRP に特徴的な組織学的変化として、杯細胞の過形成と粘液の産生亢進が認められる。しかし、杯細胞の過形成ならびに粘液の産生亢進と ICRP の病態発生との関連性は明らかになっていない。そこで、杯細胞で産生される粘液の主成分であるムチンの発現動態を解析した。ICRP のポリープ病変部における、分泌型のムチン（MUC2，MUC5AC）の遺伝

子発現を解析し、ICRP 症例の非病変部の結腸粘膜ならびに健常犬の結腸での遺伝子発現と比較した。その結果、MUC2 の遺伝子発現は ICRP 症例と健常犬で有意差を認めなかった。一方で、MUC5AC の遺伝子発現は ICRP のポリープ病変部で有意に増加していた。また、ICRP の結直腸の腸陰窩における杯細胞の割合を計測したところ、ICRP 症例のポリープ病変部の腸陰窩下部において杯細胞の割合の減少を認めた（発表論文 2022 年)。これらの結果から、ICRP の結直腸の腸陰窩における杯細胞の構成の変化や MUC5AC 遺伝子の発現の増加が ICRP の病態形成に関わる可能性が示唆された。

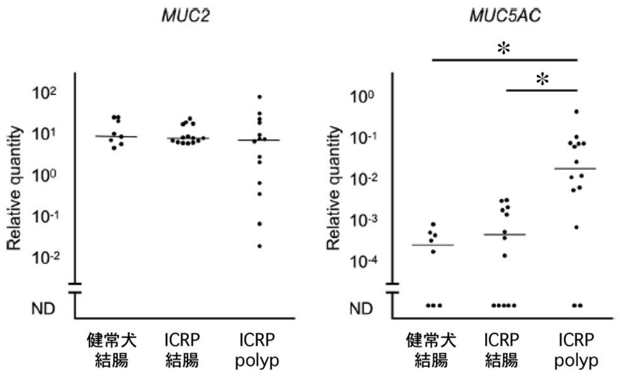

図２
ICRP 症例のポリープ病変、ICRP の正常結腸、健常犬結腸における MUC2 および MUC5AC 遺伝子の発現

（３）ICRP の結直腸粘膜における、Leucine-rich alpha-2 glycoprotein の発現解析

人の炎症性腸疾患患者の腸粘膜では Leucine-rich alpha-2 glycoprotein (LRG)という糖タンパク質の発現が上昇しており、疾患活動性を反映することが明らかになっている。

本研究においては、ICRP のポリープ病変部における LRG の遺伝子発現ならびに炎症性サイトカインの遺伝子発現との相関を解析した。その結果、ICRP のポリープ病変部において LRG の遺伝子発現が有意に増加していること（図３)、その発現はインターロイキン１βやインターロイキン６などの炎症性サイトカインの遺伝子発現と相関することが明らかになった。(発表論文 2020 年)。これらの結果から、ICRP のポリープ病変部では、炎症性サイトカインの産生が増加しており、腸炎局所における LRG の発現を誘導している可能性が示唆された。上記の結果から、LRG が ICRP 症例における腸炎の活動性をモニタリングするためのマーカーとなる可能性が示唆された。

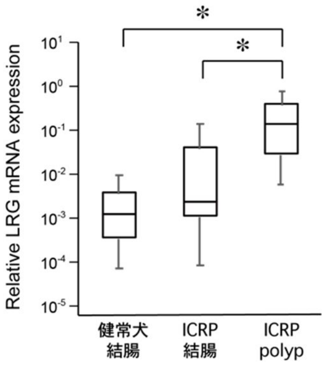

図３
ICRP 症例のポリープ病変、ICRP の正常結腸、健常犬結腸における LRG 遺伝子の発現

（４）犬の蛋白漏出性腸症の予後因子解析

ICRP の病態解析に加え、犬の代表的な慢性腸疾患である蛋白漏出性腸症の予後因子の解析を行った。蛋白漏出性腸症の症例の電子カルテから、臨床症状の重症度、血液検査所見、超音波検査所見を抽出し、各項目と予後との関連性を多変量解析にて解析した。その結果、「腸管の拡張」という超音波検査所見が予後不良と関連することが明らかになった（図４)。これらの結果から、「腸管の拡張」所見が、犬の蛋白漏出性腸症の予後を予測する一助となる可能性が示唆された（発表論文 2021 年)。

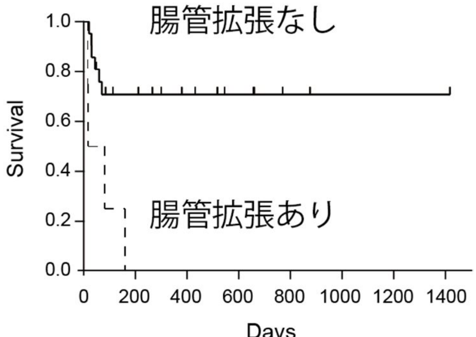

図４
蛋白漏出性腸症の症例の生存曲線
腸管拡張所見の有無による比較

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　4件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 OHTA Hiroshi、TAMURA Yu、YOKOYAMA Nozomu、NAGATA Noriyuki、OSUGA Tatsuyuki、SASAKI Noboru、KAGAWA Yumiko、MORISHITA Keitaro、TAKIGUCHI Mitsuyoshi	４．巻 82
２．論文標題 Gene expression of leucine-rich alpha-2 glycoprotein in the polypoid lesion of inflammatory colorectal polyps in miniature dachshunds	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	６．最初と最後の頁 1445～1449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.20-0242	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 OHTA Hiroshi、NAGATA Noriyuki、YOKOYAMA Nozomu、OSUGA Tatsuyuki、SASAKI Noboru、MORISHITA Keitaro、TAKIGUCHI Mitsuyoshi	４．巻 83
２．論文標題 Prognostic value of small intestinal dilatation in dogs with protein-losing enteropathy	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	６．最初と最後の頁 378～384
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.20-0489	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 NAGATA Noriyuki、OHTA Hiroshi、YOKOYAMA Nozomu、TEOH Yong Bin、SASAKI Noboru、NAKAMURA Kensuke、TAKIGUCHI Mitsuyoshi	４．巻 84
２．論文標題 Characterization of mucin gene expression and goblet cell proportion in inflammatory colorectal polyps in miniature dachshunds	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	６．最初と最後の頁 872～876
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.22-0076	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 Yamasaki Takeshi、Nagata Noriyuki、Atsumi Toru、Hasebe Rie、Tanaka Yuki、Ohki Izuru、Kubota Shimpei、Shinohara Yuta、Bin Teoh Yong、Yokoyama Nozomu、Sasaki Noboru、Nakamura Kensuke、Ohta Hiroshi、Katsurada Takehiko、Matsuno Yoshihiro、Hojyo Shintaro、Hashimoto Shigeru、Takiguchi Mitsuyoshi、Murakami Masaaki	４．巻 -
２．論文標題 Zoobiquity experiments show the importance of the local MMP9-plasminogen axis in inflammatory bowel diseases in both dogs and patients	５．発行年 2023年
３．雑誌名 International Immunology	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） 10.1093/intimm/dxad006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 Yong Bin Teoh、永田　矩之、大田　寛、佐々木　東、中村　健介、村上　正晃、滝口　満喜
２．発表標題 Identification of pathogenic Single Nucleotide Polymorphism in Inflammatory Colorectal Polyps if Miniature Dachshunds
３．学会等名 第１６４回　日本獣医学会学術集会
４．発表年 2021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
研究協力者	永田　矩之 (Nagata Noriyuki)		

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