

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 26 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450454

研究課題名(和文) 輸血副作用を惹起する血液型抗原エピトープ群の構造解明と遺伝子検査法の開発

研究課題名(英文) Molecular analysis and development of a DNA-testing method for erythrocyte blood group antigens

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：輸血副作用を惹起するイヌおよびネコの血液型物質に関する血清学的・分子遺伝学的解析を行い、イヌDEA1.1(陽性71.6%、陰性28.4%、282個体)およびネコAB式血液型(A型95.1%、B型4.9%、O型0%、772個体)の異型抗原分布を明らかとした。またイヌの遺伝子解析により、DEAと関連が示唆される抗原物質・候補遺伝子を見出した。さらに、ネコAB式血液型を担うCMAH遺伝子の解析により、これまでに報告されていないアミノ酸置換を伴う塩基多型(SNPs)を含む8SNPsを同定した。以上、本研究の課題の遂行により血液型遺伝子検査法の開発ならびに獣医臨床輸血医学的に重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：The dog erythrocyte antigen (DEA) and cat AB blood group system are important in transfusion-related research. Here we investigated the molecular basis of dog and cat erythrocyte blood group antigens. Of 282 dogs, 71.6% were positive and 28.4% were negative for DEA 1.1. Of 772 cats, 95.1%, 4.9%, and 0% of cats had the A, B, and AB blood group, respectively. To identify a candidate molecule expressed on the dog erythrocyte membrane associated with dog blood group, we performed the agglutination test using a lectin (anti-NeuGC). Dog RBCs were then divided into two types: positive and negative cells. Results suggested the CMAH gene associated with the NeuGC expression may be associated with the DEA system. In cat, the CMAH gene encodes the antigens in the cat AB blood group system. In the gene, we identified eight SNPs in blood type B cats, including four novel SNPs. These data provide information for developing a DNA-testing method to identify blood groups.

研究分野：動物生命科学

キーワード：輸血医療 遺伝子検査 血液型物質 小動物

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 輸血療法は有効かつ不可欠な治療であるが異型の輸血は、種々の副作用(副反応)を惹起する原因となるため、赤血球膜上に存在する血液型抗原エピトープの構造解明が積極的に研究されている(Anstee, Blood, 2009)さらに近年ヒトでは、血液型と腫瘍の関連(Amundadottir, Nat Genet, 2009)、あるいはiPS細胞からの赤血球作製(Ebihara et al., Int J Hematol, 2012)など臨床医学領域における血液型物質研究の重要性は益々高まっていると言える。

(2) 臨床獣医学領域で重要なイヌおよびネコにおいて、各種血液型抗原を担う血液型物質の責任遺伝子の同定や抗原エピトープの構造など未だ不明な点が多い。このことは適正な輸血血液を選択するために実施される輸血前検査における血液型判定を補完しうる遺伝子検査法の開発を妨げている要因の一つと考える。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、イヌおよびネコにおいて輸血後の急性あるいは遅延性溶血など輸血副作用の要因とされるイヌDEA式血液型およびネコAB式血液型について、現在我が国で飼養されているイヌおよびネコを対象に血液型の分布の調査および血液型別ゲノムDNA試料の収集・構築、さらに当該検体の分子遺伝学的解析手法により、各種血液型の判定を補完する遺伝子検査法を開発するために必要な血液型関連遺伝子探索ならびに遺伝子変異の同定を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 血清学的解析: イヌDEA1.1およびネコAB式血液型の判定は、市販されているラピッドベット-H犬血液型判定キットIIおよびラピッドベット-H猫血液型判定キット(共立製

薬)を用いて実施した。調査個体は同意が得られている血液サンプルを使用した。

(2) 分子遺伝学的解析: イヌDEA関連遺伝子候補探索は、すでに実施した網羅的ゲノム解析情報から絞り込んだ候補遺伝子のシングルキャンディデートジーン解析およびレクチンを用いたイヌ赤血球の分類による候補物質推定を行った。また、ネコAB式血液型については既報の関連遺伝子CMAH遺伝子(Bighignoli et al. BMC genetics, 2007)を標的に遺伝子変異が報告されているB型ネコについてエクソン領域の塩基配列を解析した。

## 4. 研究成果

(1) イヌDEA1.1判定キットを用いた抗体検査による赤血球膜抗原の分類を282個体について実施した。その結果、DEA1.1陽性は202個体(71.6%)、陰性は80個体(28.4%)であった。限定的イヌ集団中におけるDEA1.1陰性率はイヌの輸血医療に重要な情報を提供している。また本研究により当該血液型関連候補遺伝子解析の際に必要なDEA1.1陰性由来のゲノムDNA検体数を増加できた。

(2) ネコAB血液型判定キットを用いた抗体検査による赤血球膜抗原の分類を(当該研究期間前を含む)純粋種26品種を含むネコ個体772個体について実施した。その結果、A型734個体(95.1%)、B型38個体(4.9%)、AB型0個体(0%)であった。また、B型の出現頻度は品種差が存在(7品種解析例数が10個体以上)し、特にScottish Fold、Persian、Japanese domestic CatsはB型個体が多く、一方Russian BlueやAmerican Shorthairは少ない傾向にあることなどが明らかになった。ネコ血漿中にA型個体は抗B抗体をB型個体は抗A抗体を保有していることから、特にネコにおける異型輸血は輸血副作用(副反応)が惹起しやすい。本研究結果はネコの輸

血医療に重要な情報を提供している。

(3) イヌの DEA システムに関連する遺伝子探索において、すでに実施した網羅的ゲノム解析情報から絞り込んだ候補遺伝子の2次スクリーニングを行った。その結果、AQP4との関連性は認められなかった。現在他の候補遺伝子の解析を継続している。その一方で、新たに試みた、レクチンを用いたイヌ赤血球分類により、Neu5GCの発現の有無において多型が存在することを明らかとした。本結果より当該物質の発現に関与するCMAH遺伝子が既存DEAシステムに関連する可能性が示唆された。

(4) ネコ AB 式血液型関連遺伝子 CMAH 遺伝子解析において、遺伝子変異が報告されている B 型ネコをターゲットに、(2) で収集したゲノム DNA を用いて、エクソン領域の塩基配列を解析した (35 検体)。その結果、Bighignoli らが報告していない新規 4 SNPs を含む 8 SNPs を同定した。また、ディプロタイプは新規 8 種類を含む 9 種類を見出した。これらの結果から B 型ネコの CMAH 変異遺伝子には多様性があることが明らかとされた。同時に、本研究課題の遂行により、ネコ AB 式血液型の遺伝子検査法開発に重要な遺伝子マーカーを同定した。今後、非常にまれな AB 型のネコの遺伝子解析を含めさらなるネコ CMAH 遺伝子解析が必要であると考えられた。

ディプロタイプ	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6	SNP7	SNP8
D1	C/C	A/A	G/G	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A
D2	C/T	G/A	G/T	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A
D3	C/C	G/A	G/G	A/A	T/A	A/C	C/T	G/A
D4	C/C	G/A	G/G	A/A	T/A	C/G	C/C	G/A
D5	C/T	G/G	G/T	A/A	T/T	A/C	C/T	G/G
D6	C/C	G/A	G/G	A/A	T/A	C/C	C/C	G/A
D7	C/T	G/G	G/T	A/A	T/T	C/G	C/C	G/G
D8	C/C	G/G	G/G	A/A	T/A	A/A	C/T	G/A
D9	C/C	G/G	G/G	A/G	T/T	A/A	C/T	G/G

図 B型ネコのCMAH遺伝子に見出したアミノ酸置換を伴う一塩基多型 (SNP)。赤：既報と一致。緑：新規。白：野生型。その他の色：各遺伝子座の SNP (濃：変異遺伝

子ホモ型、淡：ヘテロ型) 太字：変異。

以上、本研究課題である「輸血副作用を惹起する血液型抗原エピトープ群の構造解明と遺伝子検査法の開発」の遂行により、イヌおよびネコの血液型抗原エピトープの発現頻度、血液型物質を担う遺伝子の変異部位が明らかにされ、獣医臨床輸血医学的に重要な知見が得られた。

< 引用文献 >

Anstee DJ. Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. Blood, 2009, 114(2):248-56.

Amundadottir L, Kraft P, Stolzenberg-Solomon RZ, et.al. Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. Nat Genet, 2009, 41(9):986-90.

Ebihara Y, Ma F, Tsuji K. Generation of red blood cells from human embryonic/induced pluripotent stem cells for blood transfusion. Int J Hematol, 2012, 95(6):610-6.

Bighignoli B, Niini T, Grahn RA, et.al. Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) mutations associated with the domestic cat AB blood group. BMC genetics, 2007.8:27.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

宇田川 智野、片桐 紗貴子、橘 早紀、蒔田 莉菜、古関 純也、江添 沙耶、谷口 ひろみ、落合 和彦、盆子原 誠、土

田 修一、近江 俊徳、DNA 多型、査読なし(プロシーディング)、Vol.22、No.1、2014、pp.45-47。

[学会発表](計 9 件)

蒔田 莉菜 他、ネコの AB 式血液型における各抗原の出現頻度について、第 44 回日本比較臨床医学会、2013 年 11 月 9 日、自然科学研究機構(岡山県・東岡崎市)。

宇田川 智野 他、ネコ AB 式血液型における抗原出現頻度と DNA タイピング、日本 DNA 多型学会第 22 回学術集会、2013 年 11 月 22 日、戦災復興記念館(宮城県・仙台市)。

近江 俊徳 他、ゲノムワイド関連解析によるイヌ赤血球型(DEA1.1)責任候補遺伝子探索の試み、日本獣医臨床病理学会 2014 年大会、2014 年 6 月 1 日、日本獣医生命科学大学(東京都・武蔵野市)。

Omi T et.al. Phenotypic and molecular genetic analysis of the cat AB blood group system、34th International Society for Animal Genetics Conference、27 July -1 August、2014、Xi'an (China)。

近江 俊徳 他、ネコ AB 式血液型を担う CMAH 遺伝子の変異部位の解析、第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 11 日、北海道大学(北海道・札幌市)。

Omi T et.al. Genomic analysis of CMAH gene in a blood group B cat. 40<sup>th</sup> World Small Animal Veterinary Association Congress. 15-18 May、2015、Bangkok (Thailand)。

近江 俊徳 他、B 型ネコの CMAH 遺伝子解析：新規変異遺伝子の cDNA 単離とディプロタイプ、第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月 7 日、北里大学(青森県・十和田市)。

中澤 翔太 他、輸血副作用を惹起するネコ AB 式血液型を担う CMAH 遺伝子の変異部位同定、第 2 回獣医生命科学会、2015 年

11 月 7 日、日本獣医生命科学大学(東京都・武蔵野市)。

近江 俊徳、イヌおよびネコの血液型研究、第 46 回日本比較臨床医学会学術集会(招待講演)、2016 年 3 月 13 日、日本獣医生命科学大学(東京都・武蔵野市)。

[その他]

ホームページ等

<http://www.nvlu.ac.jp/veterinary-nursing/members/002.html/>

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

土田 修一 (TUCHIDA, Shuichi)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授  
研究者番号：20217326

### (3) 研究分担者

盆子原 誠 (BONKOBARA, Makoto)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授  
研究者番号：50343611