

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25850205

研究課題名(和文)多角的アプローチによる犬種関連性肝胆道系疾患の遺伝子解析

研究課題名(英文)Gene analysis of canine breed-related hepatobiliary diseases by multifaceted approach

研究代表者

金本 英之(Kanemoto, Hideyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：70646728

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)：犬の胆嚢粘液嚢腫(GM)のゲノムDNAサンプルを用い、チワワ・ポメラニアンなど好発犬種において、一塩基多型(SNPs)に着目した候補遺伝子的アプローチ・網羅的アプローチによるゲノム解析を行ったが、統計学的に有意な関連遺伝子は同定されなかった。また、GMの病態と生体内の胆汁酸組成の変化について解析を行い、GMにおいて特定の胆汁酸の分画比が変化していることを明らかにした。また、脂質とGMとの関連についても検討を行い、犬において、脂質代謝の変化により胆汁酸組成の変化や胆嚢運動性の低下がおこることを明らかにした。これらの成果は今後GMの分子病態をあきらかにする上で有用な知見となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The investigator performed genomic analysis of candidate genes and genome-wide association study using genomic DNA sample derived from whole blood of dogs with gallbladder mucocele (GM). We focused on predisposed breeds i.e. Chihuahua and Pomeranian. No significant loci or gene was identified. We also assessed the relationship between GM pathophysiology and bile acid composition, finding that the specific bile acid composition was altered in GM. In addition, we studied the relationship between lipid metabolism and GM, showing that the disturbance of lipid metabolism leads to the bile acid compositional change and decreased gallbladder contractility. These results will help uncover the molecular pathogenesis of GM in future.

研究分野：獣医内科学

キーワード：胆嚢粘液嚢腫 遺伝子 胆汁酸 犬種

1. 研究開始当初の背景

犬の肝胆道系疾患は、その多くが原因不明であるが、犬種特異性や遺伝性が示唆されているものが多く、背景にある遺伝的な異常が病態発生に大きな役割を果たしていると考えられる。我が国においてこれまで犬の肝胆道系疾患の遺伝的解析は殆ど行われていないが、疾患の病理発生、最良の診断および治療法を確立するためには、このような研究は不可欠なものであると思われる。

胆嚢粘液嚢腫 (GM) は胆嚢上皮細胞の粘液腫様過形成を特徴とする疾患である。海外の研究においては、シェットランド・シープドッグなどの犬種において好発するとされている。近年、GM との強い関連が疑われる遺伝子変異が同定されたが、本遺伝子変異によって、どのように GM が発症するかは依然として不明である。さらに、これまでの申請者らの研究では、国内においては海外での報告と異なる犬種 (チワワ、ポメラニアン) において好発することが明らかとなっているが、これらの犬種における GM の遺伝的背景は不明である。

2. 研究の目的

犬の肝胆道系疾患のうち、遺伝的背景との関連が強く疑われる疾患における、病態とゲノムとの関連について検索を行う。また、これらの疾患について病態解析を行い、遺伝的背景との関連についてあきらかにする。

3. 研究の方法

GM 罹患犬の症例データの蓄積、全血サンプルの収集、ゲノム DNA の分離、ゲノム解析、病態解析からなる。ゲノム解析は、既知の遺伝子変異の解析 (シーケンシング)、疾患関連候補遺伝子の解析 (SNPs 解析) および網羅的ゲノム解析 (Genome Wide Association Study) を行った。病態解析については、GM 罹患症例の血清および胆汁サンプルの、高速液体クロマトグラフィーによる脂質・胆汁酸分画解析、高脂質食を給与されている犬の胆汁酸分画解析、超音波画像診断装置を利用した、食事誘発性・もしくはコレシストキニン誘発性胆嚢運動性測定を行った。

4. 研究成果

本研究は慢性肝炎、胆嚢粘液嚢腫 (GM)、肝血管異常という三つの疾患を対象にして研究を開始したが、研究期間前半までのサンプル収集の結果、GM に焦点をあてて研究を進めることとなった。

GM の疾患関連遺伝子については、これまで ABCB4 遺伝子の SNPs について報告があったため、当初、同 SNPs の検索を、シーケンス解析によって行った。しかし、報告のあった SNPs は GM 罹患症例由来のゲノムには認められなかった。その後、同遺伝子変異と疾患との関わりについては否定的な報告が複数なされ、これらのことから、本 SNPs・ある

いは遺伝子と GM 発症との関連性はない、との結論にいたった。

次に、これまでに知られている GM の病態をもとに新たに疾患関連候補遺伝子として考えられる遺伝子を選定し、ゲノム解析および病態解析を行った。具体的には、犬の胆嚢粘液嚢腫 (GM) の全血由来ゲノム DNA サンプルを用いた、一塩基多型を利用した疾患関連候補遺伝子解析を行った。多施設から収集した GM 症例群・対照群各 30 症例の全血を材料とし、ゲノム DNA のサンプルを抽出、文献検索による疾患関連候補遺伝子 3 種類 (ABCB11、CYP7A1、FXR1) の SNPs を、遺伝子領域ごとに 3 つ選定し、一塩基伸長反応を利用して解析した。総計 9 つの SNPs のうち 7 つの SNPs について、解析した症例における多型が確認された。結果として 3 遺伝子、合計 7 SNPs について症例対照研究を行ったが、いずれの SNPs についても症例・対照におけるアレル、ハプロタイプの割合に違いは認められなかった。これらのことから、候補遺伝子とした 3 つの遺伝子はいずれも GM の発症との関連は薄いと考えられた。

またこれらの候補遺伝子に関連して、生体内の胆汁酸組成の変化と GM の発症に関する検討を進めた。まず、血中胆汁酸分画と GM との関連について解析を行い、特定の胆汁酸 (タウロデオキシコール酸、TDCA) の分画比が GM 症例において低下していることをあきらかにした。さらに、胆嚢内胆汁における胆汁酸組成の GM との関連について解析を行い、血中と同様に、TDCA の胆汁酸分画比が GM において有意に低下していることをあきらかにした。

さらに、GM の発生に脂質代謝異常が関与しており、胆汁酸と脂質代謝に密接な関連があることから、高脂肪食を給与された犬における胆汁中胆汁酸分画の解析を行った。犬において高脂肪食の給与により高コレステロール血症、TDCA の低下および胆嚢運動性の低下が起こることがあきらかとなった。さらに、肝臓においては胆汁酸合成酵素である cholesterol 7 α -hydroxylase の mRNA 発現量の増加を認めた。

これらの結果は、GM の病態発生に胆汁酸代謝の変化が深く関与していることを示唆していたが、その背景となる遺伝的要因については同定されていなかった。

そこで、包括的なゲノム解析を目的として、GM のゲノムワイド関連解析を行った。我が国でもっとも GM の発生の多いチワワにおける、症例対象研究を行った。GM 罹患犬は外科的な摘出を行い、病理学的に GM と診断されている犬、または、超音波検査で GM と診断されている犬を選定し、これらの症例サンプルと年齢・品種をマッチングし、かつ超音波検査で GM の認められないチワワを対照群としてそのゲノムサンプルを収集した。

しかし、ゲノム上に有意に疾患と関連する SNPs は認められなかった。この理由として、

GMが多因子性の疾患であることから、より多数のサンプル数が必要であることが考えられた。また、犬種毎に病態が異なる可能性も考えられるため、他犬種で同様の検討を行う、あるいは多犬種由来のサンプルを利用したより大規模なゲノム解析が必要であると考えられた。

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)

[雑誌論文](計 5 件)

Kustunai M, Kanemoto H, Fukushima K, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. The Association between gallbladder mucocoeles and hyperlipidemia in dogs: a retrospective case-control study. The Veterinary Journal, 199(1), 2014, 76-79

Fukushima K, Kanemoto H, Ohno K, Takahashi M, Fujiwara R, Nishimura R, Tsujimoto H. Computed tomographic morphology and clinical features of extrahepatic portosystemic shunts in 172 dogs in Japan. The Veterinary Journal, 199(3), 2014, 376-381

Kakimoto T, Kanemoto K, Fukushima K, Ohno K, Tsujimoto H. Bile acid composition of gallbladder contents in dogs with gallbladder mucocoele and biliary sludge. Am J Vet Res 78, 2017, 223-229

Kakimoto T, Kanemoto K, Fukushima K, Ohno K, Tsujimoto H. Effect of a high-fat/high-cholesterol diet on gallbladder bile acid composition and gallbladder motility in dogs: an open, randomized, cross-over study. Am J Vet Res, 2017, in press

金本 英之、内科医・外科医が考える胆嚢疾患、月刊 CAP 2014年6月号、300、2014、8-14

[学会発表](計 4 件)

金本 英之、柿元 俊彰、中島 亘、中村 健介、浅野 和之、飯田 玄徳、堀切園 裕、福島 建次郎、大野 耕一、犬の胆嚢粘液嚢腫における疾患関連候補遺伝子の SNPs 解析、第12回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2016、横浜

柿元 俊彰、金本 英之、福島 建次郎、大野 耕一、辻本 元、犬の胆嚢疾患と胆嚢中胆汁酸分画との関連性についての研究、第12回日本獣医内科学アカデミー学術大会、

2016、横浜

柿元 俊彰、金本 英之、福島 建次郎、大野 耕一、辻本 元、犬の胆嚢疾患および血中脂質濃度と血中胆汁酸分画との関連性に関する基礎的研究、第11回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2015、横浜

Kakimoto T, Kanemoto K, Fukushima K, Ohno K, Tsujimoto H. Effect of Mosapride on Postprandial Gallbladder Motility and Plasma Levels of Motilin in Dogs, 2016 ACVIM Forum, 2016, Denver, Colorado

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金本英之 (KANEMOTO, Hideyuki)
東京大学大学院 農学生命科学研究科
獣医学専攻 獣医内科学研究室 特任助教
研究者番号：443406

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

沓内 統 (KUTSUNAI, Mitsuru)

小島 高 (Kojima, Ko)

柿元 俊彰 (Kakimoto, Toshiaki)

Frank van Steenbeek