

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450436

研究課題名(和文) 人犬共通の緑内障感受性遺伝子SRBD1の詳細なゲノム解析

研究課題名(英文) In-depth analysis of the SRBD1 gene region in canine glaucoma

研究代表者

印牧 信行 (Kanemaki, Nobuyuki)

麻布大学・大学病院・准教授

研究者番号：40139530

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)： 緑内障は視神経に障害をきたす進行性の難治性疾患である。本研究では、人犬共通の緑内障候補遺伝子であるSRBD1を対象に、多犬種を用いて詳細な遺伝子解析を実行した。

本研究の遺伝子解析により、柴犬とシー・ズー犬の緑内障と最も有意に相関を示すSNPを見出した。また、アメリカン・コッカー・スパニエル犬、ミニチュア・ダックスフンド犬、ビーグル犬においても、緑内障と相関を示唆するSNPを見出した。特定したSNPはいずれもSRBD1遺伝子発現量の変動に有意な影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Glaucoma is a degenerative optic neuropathy that is associated with elevated intraocular pressure. We previously reported a significant association between the SRBD1 SNPs and glaucoma in humans and dogs. The purpose of this study was to clarify the contribution of SRBD1 in the development of glaucoma and we performed an in-depth of the SRBD1 gene region in several dog breeds.

In this study, we identified the intronic SNP in SRBD1 which exhibited the strongest association with glaucoma in both Shiba-Inus and Shih-Tzus. We also identified another intronic SNP showing a suggestive association with glaucoma in American Cocker Spaniels, Miniature Dachshunds, and Beagles. The functional analysis suggested that these SNPs affect gene expression of SRBD1.

研究分野：獣医眼科学

キーワード：緑内障

1. 研究開始当初の背景

(1) 緑内障は視神経に障害をきたす進行性の難治性疾患であり、放置すると視野狭窄が進行し、最悪の場合、失明に至る。緑内障では一度失った視野(死んだ細胞)や視力は回復することはないため、その治療の基本は進行予防、進行抑制であり、早期発見、早期治療が非常に重要である。

(2) 緑内障は犬において罹患しやすい眼病の代表であり、犬種によっては高い有病率を示す。近年の調査において、日本在来犬種である柴犬の緑内障有病率が 29.0% (柴犬 145 頭中 42 頭が緑内障) と調査された 71 犬種の中で最も高値を示すことが報告されている (J Vet Med Sci 2006;68(8):853-858.)。したがって、これら犬種を飼育する上で緑内障の発症は臨床的に最も注意すべき点の一つである。

(3) 特定の疾患に罹患しやすいことにより、廃れた犬種もあるように、緑内障の有病率の高い柴犬などの犬種では、将来的な犬種保存が危惧される。緑内障の予防、治療に当たっては、疾患の早期発見が極めて重要であり、疾患の予防および治療に先立った疾患の発症要因の十分な解明が必要とされる。

(4) 緑内障は何らかの遺伝的要因が関与して発症する多因子疾患であると考えられているが、緑内障の遺伝的要因は未だ明確に決定されておらず、疾患の予防および適切な治療は進展していない。したがって、緑内障の遺伝的要因を同定し、遺伝子判定による犬緑内障の早期発見を確立することは、臨床的側面から、また犬種保存の側面から大変意義のあることである。

(5) 研究代表者の印牧が所属する麻布大学では、犬の疾患に対する予防、診断・治療技術を発展させ、獣医医療の充実を図るため、多くの動物病院の協力を得て、「バイオバンクシステム」を構築している。本バイオバンクでは、飼い主の同意を得たのち、対象となる疾患の患犬より血液検体および臨床情報の収集を行い、疾患の遺伝子解析に活用している。

(6) 研究分担者の水木および連携研究者の目黒は、ヒトの正常眼圧緑内障を対象としたゲノムワイド関連解析により、ヒトの 2 番染色体上に位置する SRBD1 (S1 RNA binding domain 1) 遺伝子内の SNP (single nucleotide polymorphism: 一塩基多型) が正常眼圧緑内障の発症リスクと有意に相関することを 2010 年に報告した (Ophthalmology 2010;117(7):1331-1338.)。本研究報告を受け、研究代表者の印牧は研究分担者の水木および連携研究者の目黒と共同で 2013 年に、バイオバンクにより収集した柴犬およびシー・ズー

犬の緑内障例・非緑内障例を対象とした遺伝子解析を実行し、犬の 10 番染色体上の SRBD1 遺伝子内の SNPs が両犬種の緑内障と有意な相関を示すことを報告した (PLoS ONE 2013;8(9):e74372)。

(7) しかしながら研究開始当初の時点では、SRBD1 遺伝子内に多くあると推測される遺伝子変異のいずれが最も重要に緑内障の発症に関与しているのか、また SRBD1 遺伝子が緑内障の発症機序にどのように関与しているのかは不明なままであった。

2. 研究の目的

(1) 本研究において SRBD1 遺伝子領域を対象に詳細な遺伝子解析を進め、SRBD1 遺伝子領域内の遺伝子変異と犬緑内障の相関性を明確にする。

(2) また、特定された遺伝子変異情報をもとに SRBD1 遺伝子の機能解析を進めることで、SRBD1 遺伝子の関与する緑内障発症機序の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、柴犬 (緑内障 60 例、非緑内障 85 例)、シー・ズー犬 (緑内障 27 例、非緑内障 52 例)、アメリカン・コッカー・スパニエル犬 (緑内障 2 例、非緑内障 41 例)、ミニチュア・ダックスフンド犬 (緑内障 3 例、非緑内障 40 例) およびビーグル犬 (緑内障 2 例、非緑内障 39 例) を対象に、SRBD1 遺伝子領域を網羅する 19 個の SNPs (ID: SNP1 ~ SNP19) について緑内障との相関性を検討した。

(2) 本研究で用いる SRBD1 遺伝子領域を網羅する 19 個の SNPs の選択は、Ensembl データベース (<http://www.ensembl.org/index.html>) の情報をもとに実行した。

(3) 19 個の SNPs の遺伝子型判定は TaqMan アッセイを用いて実行した。TaqMan アッセイは Applied Biosystems 社のプロトコルに準拠して行い、StepOnePlus システム (Applied Biosystems) を用いて PCR 産物の蛍光強度を測定した。

(4) TaqMan アッセイにより得られた 19 個の SNPs の遺伝子型情報を緑内障群と非緑内障群の間で比較し、有意な頻度差を示す緑内障感受性 SNPs の検索を行った。

(5) その後、特定された緑内障感受性 SNPs を対象に、SRBD1 遺伝子の機能解析 (緑内障感受性 SNPs による SRBD1 遺伝子発現量の検討) を実行した。

4. 研究成果

(1) 柴犬において、5 個の SNPs (SNP8、SNP14、

SNP15、SNP16、SNP18)が緑内障と有意な相関 ($P<0.05$) を示した。これら 5 個の SNPs のうち、イントロン領域内の SNP18 において最も大きいオッズ比 (OR) が認められた (OR=3.00)。

(2) シー・ズー犬では、2 個の SNPs (SNP17、SNP18) が緑内障と有意な相関 ($P<0.05$) を示した。これらの 2 個の SNPs のうち、SNP18 において最も大きい OR が認められた (OR=6.93)。

(3) 柴犬の結果とシー・ズー犬の結果を統合したメタ解析により、SNP18 が両犬種の緑内障において最も重要であると考えられた ($P=0.000060$ 、OR=4.57)。

(4) アメリカン・コッカー・スパニエル犬、ミニチュア・ダックスフンド犬、ビーグル犬の 3 犬種を対象とした 19 個の SNPs 解析では、いずれの犬種においても、緑内障と有意な相関を示す SNP は認められなかった。

(5) 一方、アメリカン・コッカー・スパニエル犬、ミニチュア・ダックスフンド犬、ビーグル犬の 3 犬種の結果を統合したメタ解析により、緑内障と相関の可能性を示唆するイントロン領域内の 2 個の SNPs (SNP3、SNP6) を認めた ($P<0.10$)。柴犬およびシー・ズー犬で最も重要であると考えられた SNP18 はこれら 3 犬種において遺伝的多型性を示さなかった。

(6) SNP3、SNP6、SNP18 について、NCBI の BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて、犬とヒトの間でホモロジーを検索し、SNP3、SNP6、SNP18 が位置する犬の SRBD1 遺伝子領域に対応するヒト SRBD1 相同領域内の SNPs を対象に SRBD1 遺伝子の発現量を評価した。

(7) オンラインデータベース (Blood eQTL browser、GTE Portal) を用いてヒト SRBD1 遺伝子の発現量を評価した結果、ヒトの SRBD1 相同領域内の SNPs の多くが SRBD1 遺伝子の発現量の変動に有意な影響を与えていることが分かった。したがって、犬においても、SRBD1 遺伝子領域内の SNP3、SNP6、SNP18 が、SRBD1 遺伝子発現量の変動に有意な影響を与えている可能性が示唆された。

(8) 本研究の成果は、簡便で迅速な犬の緑内障発症リスクの遺伝子診断を可能にし、緑内障の早期発見・早期治療の一助となることが期待される。現在未発症でも、将来ペット犬が緑内障に罹るリスクを事前に知ることができれば、飼い主の緑内障に対する意識改革が引き起こされ、定期診断においてペット犬の緑内障の早期発見が可能となる。

(9) 緑内障の早期発見は、緑内障の早期治療を可能とし、緑内障による視力障害も最小限に抑えられ、緑内障患犬の QOL (Quality Of Life: 生活の質) の向上に繋がると期待される。

(10) 特定の病気に罹りやすい犬種は敬遠されることが多く、このような犬種の保存は世界的な課題である。緑内障有病率の高い柴犬も例外ではなく、その有病率の高さが犬種保存の弊害となり得る。本研究の成果は、緑内障感受性 SNP のクリアな柴犬の育成を可能にし、柴犬の犬種保存および世界に向けた柴犬の輸出に繋がることが期待される。

(11) また、本研究の成果は、SRBD1 遺伝子およびその関連タンパク質を対象とした緑内障の発症・進行予防薬の開発を可能にすると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

Kanemaki N, Inaniwa M, Terakado K, Kawarai S, Ichikawa Y. Fundus photography with a smartphone in indirect ophthalmoscopy in dogs and cats. *Vet Ophthalmol* 2017;20(3):280-284. 査読有
DOI: 10.1111/vop.12399

Yamazoe K, Meguro A, Takeuchi M, Shibuya E, Ohno S, Mizuki N. Comprehensive analysis of the association between UBAC2 polymorphisms and Behçet's disease in a Japanese population. *Sci Rep* 2017;7(1):742. 査読有
DOI:10.1038/s41598-017-00877-3

Takeuchi M, Mizuki N, Meguro A, Ombrello MJ, Kirino Y, Satorius C, Le J, Blake M, Erer B, Kawagoe T, Ustek D, Tugal-Tutkun I, Seyahi E, Ozyazgan Y, Sousa I, Davatchi F, Francisco V, Shahram F, Abdollahi BS, Nadji A, Shafiee NM, Ghaderibarmi F, Ohno S, Ueda A, Ishigatsubo Y, Gadina M, Oliveira SA, Gül A, Kastner DL, Remmers EF. Dense genotyping of immune-related loci implicates host responses to microbial exposure in Behçet's disease susceptibility. *Nat Genet* 2017;49(3):438-443. 査読有
DOI:10.1038/ng.3786

Kawarai S, Fujimoto A, Nozawa G, Kanemaki N, Madarame H, Shida T, Kiuchi A. Evaluation of weekly bathing in allergic dogs with

methicillin-resistant Staphylococcal colonization. *Jpn J Vet Res* 2016;64(2):153-158. 査読有
<http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/62212/1/055.p153-158%20NOTE%20KAWARAI.pdf>

Levinson RD, Yung M, Meguro A, Ashouri E, Yu F, Mizuki N, Ohno S, Rajalingam R. KIR and HLA Genotypes Implicated in Reduced Killer Lymphocytes Immunity Are Associated with Vogt-Koyanagi-Harada Disease. *PLoS One* 2016;11(8):e0160392. 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0160392

Ogasawara M, Meguro A, Sakai T, Mizuki N, Takahashi T, Fujihara K, Tsuneoka H, Shikishima K. Genetic analysis of the aquaporin-4 gene for anti-AQP4 antibody-positive neuromyelitis optica in a Japanese population. *Jpn J Ophthalmol* 2016;60(3):198-205. 査読有
DOI:10.1007/s10384-016-0441-5

Nishisako M, Meguro A, Nomura E, Yamane T, Takeuchi M, Ota M, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Chin S, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. SLC1A1 Gene Variants and Normal Tension Glaucoma: An Association Study. *Ophthalmic Genet* 2016;37(2):194-200. 査読有
DOI:10.3109/13816810.2015.1028649

Kanemaki N, Meguro A, Yamane T, Takeuchi M, Okada E, Iijima Y, Mizuki N. Study of association of PAX6 polymorphisms with susceptibility to high myopia in a Japanese population. *Clin Ophthalmol* 2015;9:2005-2011. 査読有
DOI:10.2147/OPHTH.S95167

Carapito R, Shahram F, Michel S, Le Gentil M, Radosavljevic M, Meguro A, Abdollahi BS, Inoko H, Ota M, Davatchi F, Bahram S. On the genetics of the Silk Route: association analysis of HLA, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions with Behçet's disease in an Iranian population. *Immunogenetics* 2015;67(5-6):289-293. 査読有
DOI:10.1007/s00251-015-0841-6

Miyake M, Yamashiro K, Tabara Y, Suda K, Morooka S, Nakanishi H, Khor CC, Chen P, Qiao F, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Gotoh N, Tsujikawa A, Meguro A, Kusuhashi S, Polasek O, Hayward C, Wright AF, Campbell H, Richardson AJ, Schache M, Takeuchi M, Mackey DA, Hewitt AW, Cuellar G, Shi Y, Huang L, Yang Z, Leung KH, Kao PY, Yap MK, Yip SP, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Mizuki N, MacGregor S, Vitart V, Aung T, Saw SM, Tai ES, Wong TY, Cheng CY, Baird PN, Yamada R, Matsuda F; Nagahama Study Group, Yoshimura N. Identification of myopia-associated WNT7B polymorphisms provides insights into the mechanism underlying the development of myopia. *Nat Commun* 2015;6:6689. 査読有
DOI:10.1038/ncomms7689

Toyoda H, Miyagawa T, Koike A, Kanbayashi T, Imanishi A, Sagawa Y, Kotorii N, Kotorii T, Hashizume Y, Ogi K, Hiejima H, Kamei Y, Hida A, Miyamoto M, Imai M, Fujimura Y, Tamura Y, Ikegami A, Wada Y, Moriya S, Furuya H, Takeuchi M, Kirino Y, Meguro A, Remmers EF, Kawamura Y, Otowa T, Miyashita A, Kashiwase K, Khor SS, Yamasaki M, Kuwano R, Sasaki T, Ishigooka J, Kuroda K, Kume K, Chiba S, Yamada N, Okawa M, Hirata K, Mizuki N, Uchimura N, Shimizu T, Inoue Y, Honda Y, Mishima K, Honda M, Tokunaga K. A polymorphism in CCR1/CCR3 is associated with narcolepsy. *Brain Behav Immun* 2015;49:148-155. 査読有
DOI:10.1016/j.bbi.2015.05.003

Ochiai H, Kanemaki N, Sato R, Onda K. Distribution, molecular structure and functional analysis of carnitine transporter (SLC22A5) in canine lens epithelial cells. *Exp Anim* 2014;63(4):467-473. 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/63/4/63_14-0020/_pdf

Kawarai S, Matsuura S, Yamamoto S, Kiuchi A, Kanemaki N, Madarame H, Shiota K. A case of cutaneous sterile pyogranuloma/granuloma syndrome in a maltese. *J Am Anim Hosp Assoc* 2014;50(4):278-283. 査読有
DOI: 10.5326/JAAHA-MS-6009

Maruo T, Kanemaki N, Onda K, Sato R, Ichihara N, Ochiai H. Canine amino

acid transport system Xc(-): cDNA sequence, distribution and cystine transport activity in lens epithelial cells. J Vet Med Sci 2014;76(4):523-530. 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/76/4/76_13-0170/_pdf

Bakir-Gungor B, Remmers EF, Meguro A, Mizuki N, Kastner DL, Gul A, Sezerman OU. Identification of possible pathogenic pathways in Behçet's disease using genome-wide association study data from two different populations. Eur J Hum Genet 2015;23(5):678-687. 査読有
DOI:10.1038/ejhg.2014.158

〔学会発表〕(計 2 件)

Meguro A, Nomura E, Inoue R, Inoue Y, Mizuki N. Whole-exome sequencing identifies novel genes for late-onset developmental glaucoma. ARVO-Asia 2017 (アジア視覚・眼科研究協会会議 2017) オーストラリア・ブリスベン、2017年2月5日。

目黒 明. 発達緑内障家系を対象としたエクソーム解析. 第69回日本臨床眼科学会、眼科DNAチップ研究会、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市) 2015年10月22日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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

印牧 信行 (KANEMAKI, Nobuyuki)
麻布大学・大学病院・教授
研究者番号：40139530

(2) 研究分担者

水木 信久 (MIZUKI, Nobuhisa)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：90336579

(3) 連携研究者

目黒 明 (MEGURO, Akira)
横浜市立大学・医学研究科・特任准教授
研究者番号：60508802

(4) 研究協力者

遠藤 理紗 (ENDO, Lisa)

南波 玲子 (NANBA, Reiko)