

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850202

研究課題名(和文)一塩基多型解析による犬の潜在精巣関連遺伝子の変異探索と遺伝子診断法の確立

研究課題名(英文) Single nucleotide polymorphism analysis of cryptorchidism-related genes and establishment of gene diagnosis method for cryptorchidism in dogs

研究代表者

小林 正典 (Kobayashi, Masanori)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：80600428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： 潜在精巣とは、片側または両側の精巣が陰嚢内に下降しない疾患である。犬の潜在精巣の発症には、遺伝、エピジェネティック、または環境要因が関与する。本研究では、精巣下降に重要な役割を果たしているRelaxin/insulin-like family peptide receptor 2 (Rxfp2)の一塩基多型(SNPs)と潜在精巣の発症の関連性について検討した。結果として、Rxfp2の5'末端からintron(int) 1、exon(ex) 3からint 4、int 6、int 7からint 9、int 11からint 18内において、潜在精巣に関連するSNPsが存在しないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Cryptorchidism is a disorder in which unilateral or bilateral testes fail to descend into the scrotum. The inheritance of canine cryptorchidism involves genetic (recessive or multifactorial inheritance), epigenetic, and environmental factors. In this study, we examined the relationship between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of relaxin/insulin-like family peptide receptor 2 (RXFP2), which plays an important role in testicular descent, and the inheritance of cryptorchidism. As a result, it was suggested that SNPs related to the inheritance of cryptorchidism were not present from 5' -end to intron (int) 1, from exon (ex) 3 to int 4, int 6, from int 7 to int 9, from 11 to int 18.

研究分野： 獣医臨床繁殖学

キーワード： 一塩基多型 犬 潜在精巣

## 1. 研究開始当初の背景

多くの哺乳動物の精巣は、左右の腎臓直下に形成され、胎生期から出生時にかけて腹腔から鼠径管、鼠径部皮下を通り、陰嚢内に下降する。精巣下降は、第一相の腹腔内下降相 (transabdominal migration) と第二相の鼠径陰嚢部下降相 (inguinoscrotal migration) に大別される。腹腔内下降相では、精巣を頭側に固定する頭側懸垂靭帯 (cranial suspensory ligament) の退縮と精巣導帯 (gubernaculum) の伸長による精巣の下方への牽引により、腹腔内から鼠径部への下降が起こると考えられており、精巣のライディッヒ細胞より分泌される Insulin-like peptide 3 (*Ins13*) と、精巣導帯の筋肉や結合組織の細胞膜や導管の内皮細胞において発現が認められる *Ins13* のレセプターである Relaxin/insulin-like family peptide receptor 2 (*Rxfp2*) が重要な役割を果たしていると考えられている。一方、鼠径陰嚢部下降相では、アンドロゲンによる精巣導帯への作用による精巣下降促進、陰部大腿神経から分泌される神経伝達物質である Calcitonin gene-related peptide の作用により、精巣は鼠径部から陰嚢底部まで下降し、精巣下降が完了すると考えられている。

潜在精巣は、片側または両側の精巣が陰嚢内に下降せず、腹腔内または鼠径部に停留する疾患と定義され、犬における潜在精巣の発生率は、純血種の犬で約 1~11%、雑種犬で約 2% とされる。両側性の潜在精巣に罹患した動物では、造精機能が消失し生殖不能となる。加えて、犬では陰嚢内の正常な位置にある精巣と比較し、腹腔内または鼠径部における潜在精巣の精巣腫瘍の発生率は約 10 倍になり、潜在精巣に発生する精巣腫瘍の多くは、悪性腫瘍の可能性のあるセルトリ細胞腫であり、临床上大きな問題となる。

潜在精巣の発症には、遺伝性 (劣性または多遺伝子性) エピジェネティック要因または環境要因が関与していることが報告されているが、その詳細は現在のところ不明である。以前の先行研究において、*Ins13* や *Rxfp2* における遺伝子変異が、精巣下降の腹腔内下降相における障害を引き起こすこと、潜在精巣に罹患した男児において、*Ins13* および *Rxfp2* の各遺伝子の変異頻度が高いこと、さらには、N-ethyl- N-nitrosourea を用いて、*Rxfp2* のロイシンリッチリピートにミスセンス変異を導入したマウスでは潜在精巣が起こることから、これらの遺伝子変異が潜在精巣発症のキー遺伝子である可能性が示唆されている。

## 2. 研究の目的

雄犬の数が罹患するとされる潜在精巣の遺伝的背景についての詳細は、いまだ明らかにされていない。上記の通り、人や齧歯類における研究において、*Ins13* とそのレセプ

ターである *Rxfp2* は、精巣下降の腹腔内下降相において重要な役割を果たしており、これらの遺伝子の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms : SNPs) が潜在精巣のリスクファクターであることが推察されている。

本研究の目的は、健常犬および潜在精巣罹患犬の血液サンプルから抽出した genome DNA を用いて、*Rxfp2* の翻訳領域、非翻訳領域、および調節領域に存在する SNPs の網羅的スクリーニングを実施し、潜在精巣の発症に関連する可能性のある疾患関連 SNPs の同定を試みることである。

## 3. 研究の方法

はじめに、健常犬 (n = 7) および潜在精巣罹患犬 (n = 7) より血液を採取し、ゲノム DNA を抽出した。本研究において注目した *Rxfp2* は、第 25 染色体にコードされる、DNA 全長が約 60,000 bp、19 エクソンから構成される遺伝子である。*Rxfp2* における翻訳領域、非翻訳領域、および調節領域に存在する SNPs の存在と潜在精巣の発症との関連性について検討を行うため、1,200 から 1,800 bp の PCR 増幅産物が得られるように、*Rxfp2* 遺伝子全域に Primer を設計した。

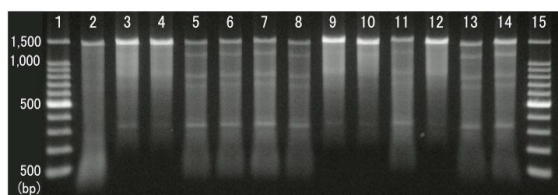
次に、任意の健常犬 (以下、コントロール犬という) 1 頭を選択し、抽出した DNA と目的領域の Primer を用いて PCR を実施し、増幅産物を得た。上記の Primer と先に使用した健常犬以外の健常犬 (以下、健常群という) と潜在精巣罹患犬 (以下、潜在精巣群という) のゲノム DNA を用いて PCR を行い、PCR 増幅産物を得た。

健常群および潜在精巣群の PCR 増幅産物に、コントロール犬の PCR 増幅産物を同量混和し、サーマルサイクラーにて DNA ハイブリダイズさせる。DNA ハイブリダイズ後、Transgenomic 社製の遺伝子変異検出キットである SURVEYOR を用いてヌクレアーゼ処理を行い、アガロースゲル電気泳動にてダイレクトフラグメント解析を行う。すなわち、ゲノム DNA に変異がヘテロに含まれる場合、目的とする領域を増幅した PCR 産物を DNA ハイブリダイズさせると、変異アレルと正常アレルからなるヘテロデュプレックが形成され、ヌクレアーゼ処理後に電気泳動を行うと、複数のフラグメントが検出されるが、正常あるいは変異アレルのいずれかのみからなる場合、ホモデュプレックスを形成し、ヌクレアーゼ処理後の電気泳動では、切断されない Band が検出されることになる。単一の Band のみ検出される場合、SNP がこの領域では存在しないか、あるいは変異が存在していたとしても潜在精巣の発症には関連のない SNP であることが示唆される。

## 4. 研究成果

*Rxfp2* の Intron (Int) 15 から Exon (Ex) 16

を増幅するように設計した特異的プライマーを用いて PCR を実施し、得られた PCR 増幅産物にコントロール犬の PCR 増幅産物を混和し、DNA ハイブリダイズさせ、スクレアーゼ処理を行なった後、アガロースゲル電気泳動にてダイレクトフラグメント解析を行なった結果、健常犬と潜在精巣罹患犬の間に、切断フラグメントのパターンに差異は認められなかった(図)。また、*Rxfp2* の 5' 末端から int 1、ex 3 から int 4、int 6、int 7 から int 9、int 11 から int 18 を増幅するように設計した PCR を用いて、同様のダイレクトフラグメント解析を実施した結果、健常犬と潜在精巣罹患犬の間に、切断フラグメントのパターンに差異は認められなかった。



図： *Rxfp2* の Intron 15 から Exon 16 内の PCR 産物を用いた、ダイレクトフラグメント解析結果(アガロースゲル電気泳動)。レーン 1 および 2 は分子マーカー(100bp DNA Ladder)、レーン 2 はコントロール犬、レーン 3 から 8 は健常犬、レーン 9 から 14 は潜在精巣罹患犬のダイレクトフラグメント解析結果を示す。健常犬および潜在精巣罹患犬ともに、1,500、1,200、800、700 および 300 bp 付近に切断フラグメントが存在していた。

本研究の結果から、*Rxfp2* の 5' 末端から int 1、ex 3 から int 4、int 6、int 7 から int 9、int 11 から int 18 内において、潜在精巣に関連する SNPs が存在しないことが示唆された。

## 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 8 件)

Kobayashi M, Wada M, Hori T and Kawakami E. (査読有) Superoxide dismutase activity in the oviductal and uterine fluid of the bitch and the effects of the enzyme on viability, motility and hyperactivation of canine sperm in vitro. J. Vet. Med. Sci. 76, 741-743, 2014.

DOI:10.1292/jvms.13-0545

Kobayashi M, Hori T and Kawakami E. (査読有) Efficacy of Low-Dose Human Chorionic Gonadotropin Therapy in Dogs with Spermatogenic Dysfunction: A Preliminary Study. Reprod. Domest. Anim. 49, E44-7, 2014.

DOI:10.1111/rda.12366

Hori T, Atago T, Kobayashi M and Kawakami E. (査読有) Influence of different methods of collection from the canine epididymides on post-thaw caudal epididymal sperm quality. J. Vet. Med. Sci. 76, 741-743, 2015.

DOI:10.1292/jvms.14-0421

Kato Y, Ochiai K, Michishita M, Azakami D, Nakahira R, Morimatsu M, Ishiguro-Oonuma T, Yoshikawa Y, Kobayashi M, Bonkobara M, Kobayashi M, Takahashi K, Watanabe M and Omi T. (査読有) Molecular cloning of canine co-chaperone small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein (SGTA) and investigation of its ability to suppress androgen receptor signalling in androgen-independent prostate cancer. Vet. J. 206, 143-148, 2015. DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.08.002

DOI:10.1292/jvms.14-0421

Kawakami E, Kobayashi M, Hori T and Kaneda T. (査読有) Therapeutic effects of vitamin E supplementation in 4 dogs with poor semen quality and low superoxide dismutase activity in seminal plasma. J. Vet. Med. Sci. 77, 1711-1714, 2016.

DOI:10.1292/jvms.14-0421

Hori T, Ushijima H, Kimura T, Kobayashi M, Kawakami E and Tsutsui T. (査読有) Intrauterine embryo transfer with canine embryos cryopreserved by the slow freezing and the Cryotop method. J. Vet. Med. Sci. 78, 1137-1143, 2016.

DOI:10.1292/jvms.16-0037

Kobayashi M, Saito A, Tanaka Y, Michishita M, Kobayashi M, Irimajiri M, Kaneda T, Ochiai K, Bonkobara M, Takahashi K, Hori T and Kawakami E. (査読有) MicroRNA expression profiling in canine prostate cancer. J. Vet. Med. Sci. 79, 719-725, 2017.

DOI:10.1292/jvms.16-0279

Azakami D, Nakahira R, Kato Y, Michishita M, Kobayashi M, Onozawa E, Bonkobara M, Kobayashi M, Takahashi K, Watanabe M, Ishioka K, Sako T, Ochiai K and Omi T. (査読有) The canine prostate cancer cell line CHP-1 shows over-expression of the co-chaperone small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein. Vet. Comp. Oncol. 15, 557-562, 2017. DOI: 10.1111/vco.12199

[学会発表](計 3 件)

小林正典「犬の前立腺癌組織における

microRNA発現プロファイリングに関する研究」第 157 回日本獣医学会学術集会（北海道大学（北海道札幌市）2014 年 9 月 9 日）

小林正典「前立腺癌罹患犬における血清中循環 microRNA の発現プロファイリング」第 158 回日本獣医学会学術集会（北里大学（青森県十和田市）2015 年 9 月 7 日）

小林正典「犬の前立腺癌組織におけるガレクチン遺伝子の発現変化」第 159 回日本獣医学会学術集会（日本大学（神奈川県藤沢市）2016 年 9 月 6 日）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 正典 (KOBAYASHI, Masanori)  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師  
研究者番号：80600428

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし