

令和元年5月22日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08062

研究課題名(和文) 輸血副作用を惹起する血液型物質の分子基盤構築と疾患感受性関連解析への展開

研究課題名(英文) Molecular basis of erythrocyte blood group antigen and its application in association study for disease

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、動物の輸血医療並びに予防医学に寄与するため、シアル酸分子種をエピトープとする小動物の血液型物質の分子基盤構築と疾患感受性関連解析への展開を試みた。その結果、非常に稀なネコAB (Neu5Gc/Neu5Ac)型個体のCMAH遺伝子の構造を決定し、ネコAB式血液型の産生機序を明らかにした。イヌにおいては、CMAH cDNAのORF構造、各組織の遺伝子発現分布、非同義置換 SNPの存在を明らかにした。また、ネコパルボウイルス感染個体の解析により、Neu5Gcの発現、標的ウイルスの塩基配列の決定を行い、血液型物質を指標とした疾患関連解析を行う基礎を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、我々がこれまで行ってきた血液型を担うCMAH遺伝子の解析を進め、遺伝子構造の違いが血液型を決める仕組みを明らかにした。その結果、血液型の遺伝子検査法が開発され、より安全で適正な輸血医療の向上が期待される。また、血液型や血液型の遺伝子を目印として、特定の感染症との関連を調べる基盤が整えられた。従って、本研究課題の遂行によって得られた研究成果は、動物の医療に寄与すると思われる。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular genetic basis of blood group system and sialic acid expression (Neu5Ac and Neu5Gc), we investigated the CMAH gene in cat and dogs. The CMAH variants of types B and AB showed that double haploids selected from multiple recessive alleles in the cat CMAH loci were highly associated with the expression of the Neu5Ac on erythrocyte membrane in types B and AB of the feline AB blood group system. In dog, we determined the nucleotide sequences of the coding region and tissue distribution of mRNA, and detected DNA polymorphisms in CMAH gene. Parvovirus DNA on serum and Neu5Ac on erythrocyte were detected in several cats infected with Parvovirus.

研究分野：動物生命科学

キーワード：血液型物質 CMAH遺伝子 イヌ ネコ 疾患感受性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小動物における輸血療法は有効かつ不可欠な治療であるが、異型（血液型不一致）輸血は、重篤な副作用を惹起する原因となるため、適合血の指標である血液型抗原エピトープの構造解明は、より安全な輸血医療を行う上で臨床学的に重要な課題である。そこで、我々はこれまでの科研費課題の遂行により、臨床獣医学領域で重要なイヌおよびネコにおいて、血液型判定を補完する遺伝子検査法の開発を目的に、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を行い、血液型関連遺伝子の変異を多数見出した。しかし、ネコ AB 式血液型における AB 型など極めて低頻度の血液型抗原を担う遺伝子の構造は、欧米の獣医学研究者においても未だ解明されておらず、血液型物質の分子基盤が十分明らかにされたとは言い難い。さらに近年、小動物の病態生理学的新知見としてイヌおよびネコのパルボウイルスが特定の血液型抗原に結合することが明らかになり (Löfling J, Virology. 2013) 血液型物質は、汎白血球減少症（伝染性腸炎）をはじめ当該ウイルスに起因する疾患（疾患感受性）の発症機序解明に繋がる標的分子として注目され、血液型物質に関する知見は医学・獣医学、生命科学領域において益々意義深いものとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、獣医輸血医療や予防医学の向上に寄与するため、これまで我々が明らかにした血液型を担う遺伝子変異を応用することで、輸血副反応を惹起する血液型物質の分子基盤を構築し、さらに血液型物質の研究を疾患との関連解析へと展開する基礎研究を行った。

3. 研究の方法

[1] 血液型物質の分子基盤構築

(1) 血液型情報付きゲノムバンクの構築

血液型抗原の違いを分子レベルで解析するため、既に構築した血液型情報付き小動物ゲノムバンク及び新規にイヌおよびネコの血液試料を収集し、血液型判定キット（共立製薬）を用いて血液型（血液型抗原）の分類後、血液型別ゲノムバンクを構築し遺伝子解析の材料とした。

(2) シアル酸分子種を抗原とするネコ AB 式血液型を担う *CMAH* 遺伝子解析

B 型ネコについては、*CMAH* の 8 個の非同義置換 SNP のジェノタイピングによるディプロタイプの分類を行った。未解明である非常に稀な AB 型については、比較的高頻度に認められるラグドールおよび研究協力機関の血液試料を用い、AB 型個体を同定した後、*CMAH* 遺伝子翻訳領域の塩基配列を決定した。

(3) イヌ *CMAH* 遺伝子解析

骨髄由来の市販 cDNA をテンプレートに PCR 法にて *CMAH* cDNA を増幅し、ダイレクトシーケンシング法によりイヌ *CMAH* cDNA の ORF の塩基配列を決定した。また、市販の各種 cDNA を用いて PCR 法による遺伝子発現の分布を解析した。さらに、ゲノム DNA を用いて翻訳領域内の SNP 検索、見いだされた SNP について、Neu5Ac の発現の有無との関連を調査した。

[2] 疾患関連解析への展開

パルボウイルス感染個体標本の収集と解析、腫瘍由来培養細胞の *CMAH* 遺伝子解析

研究協力と連携し、酵素免疫測定法による市販キットにてパルボウイルス検査陽性個体の標本を収集後、血液型の判定、パルボウイルスの核酸抽出、遺伝子増幅、塩基配列の決定を行った。また、腫瘍由来培養細胞については乳腺腫瘍由来の株化細胞を用いて、*CMAH* 遺伝子の一部を解析した。

4. 研究成果

シアル酸は全身の細胞に存在し、ネコやイヌの赤血球膜上には Neu5Ac や Neu5Gc が発現している。ネコにおいてはこれらのシアル酸分子種が A 型(Neu5Gc)、 B 型(Neu5Ac)、 AB 型(Neu5Gc/ Neu5Ac) で構成されネコ AB 式血液型を規定している。 Neu5Gc は *CMAH*(N-アセチルノイラミン酸水酸化酵素) により Neu5Ac に水酸基を一つ付加することで合成されることから、Bighignoli らは、ネコの *CMAH* 遺伝子解析を行い *CMAH* 遺伝子がネコ AB 式血液型を担っていること、および B 型に特異的なネコ *CMAH* 遺伝子変異を報告した (BMC Genetics 2007)。我々はこれまで Bighignoli らが報告していない新規 SNPs を含む 8 SNPs、ディプロタイプ新規 7 種類を含む 8 種類を見出し、B 型ネコの *CMAH* 変異遺伝子には多様性を明らかにした。しかし、非常に稀なネコ AB 型個体の遺伝子構造は未解明であった。そこで、本研究では、B 型解析例数を増やすと同時に、AB 型個体の遺伝子解析を試みた。その結果、 AB 型ネコにおいて、B 型のディプロタイプとは異なる 2 つの新規ディプロタイプを同定した。次に、Neu5Ac を発現している B 型と AB 型の遺伝子構造から、B 型、 AB 型ネコの産生機序を推測した結果、いずれも *CMAH* 変異遺伝子のホモ接合体であることが明らかにされた。したがって、Neu5Ac を発現する B 型と AB 型の *CMAH* 変異遺伝子のホモ接合体の形成により、*CMAH* 活性を減弱または消失することで、 B 型や AB 型が産生されることが示唆された。これらの知見も含め、ネコ AB 式血液型の分子基盤についてその研究成果を国際誌上で公表した (Omi T. et.al. PLoS One. 2016)。図 1 には、B 型、 AB 型で見出されたネコ *CMAH* 遺伝子変異部位一覧を、図 2 に遺伝子解析から予測されたネコ AB 式血液型の分子基盤の模式図を示した。

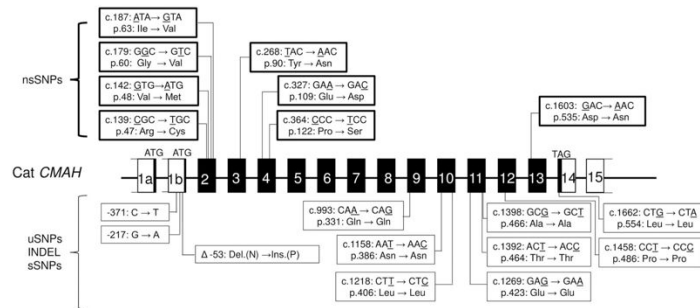


図 1. B 型、 AB 型で見出されたネコ *CMAH* 遺伝子変異部位 (Omi T. et.al. PLoS One. 2016)

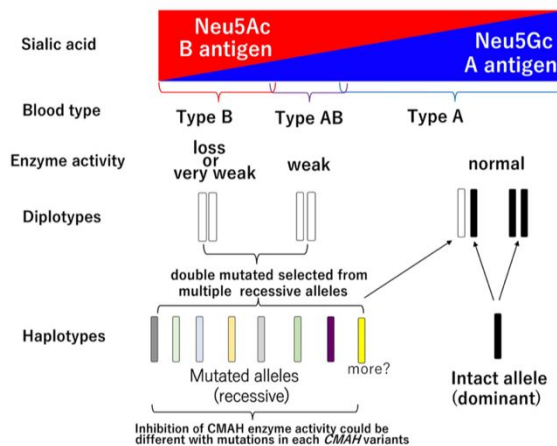


図 2. 遺伝子解析から予測されたネコ AB 式血液型の分子基盤

(Omi T. et.al. PLoS One. 2016)

さらに、Gandolfi ら (PLoS One. 2016) が同年同誌に報告した c.364C>T SNP の変異ホモ接

合体を有する AB 型のネコについても初めて我が国の飼養ネコで 1 例同定し、ネコ AB 式血液型と *CMAH* 遺伝子変異の関連を明らかにした。

イヌにおいては、赤血球膜上に Neu5Gc を発現する個体と Neu5Ac を発現する個体が存在することが報告され、今後新しい血液型システムとして規定されて行くものと思われる。しかし、現在のところ *CMAH* の遺伝子解析は殆ど行われていない。そこで、本研究では、イヌ *CMAH* 遺伝子の翻訳領域の塩基配列の決定、市販の各種 cDNA を用いた PCR 法による遺伝子発現の分布、ゲノム DNA を用いた翻訳領域内の SNP 検索、見いだされた SNP と Neu5Ac の発現の有無との関連を調査した。その結果、イヌ *CMAH* の翻訳領域の塩基配列を決定し、当該塩基配列は GenBank に登録(LC382414)した。ネコとの比較においては、アミノ酸レベルで 90%以上の相同性を示した。次に、当該遺伝子発現の組織分布を解析した。その結果、約 30 種類由来の組織 cDNA を用いた PCR では、イヌ *CMAH* 遺伝子はコピキタスに発現していることを明らかにした。SNP 検索では、翻訳領域内に 1 個の非同義置換 SNP と 3 つの同義置換 SNP を見出した。なお、非同義置換 SNP については、複数のイヌ犬種間で分布に違いがあることが認められた。また、Neu5Ac を発現している個体と発現していない個体間で当該 SNP の遺伝子型に有意差が認められたが、当該 SNP のみでシアル酸分子種を規定することまでは明らかに出来なかった。本研究成果の一部を記した要旨は、2019 年 7 月にスペインで開催される ISAG(国際動物遺伝学会)国際学会にアクセプトされた(ID80143,2019 年 3 月受理)。

Löffling らによりイヌおよびネコパルボウイルスは Neu5Gc に吸着することが報告されている(J, Virology. 2013)。疾患感受性関連解析への展開では、動物病院にてネコパルボウイルス陽性と判定された検体について、当研究部門にて血液型判定によるシアル酸分子種発現、各ゲノム DNA 用いた *CMAH* 遺伝子解析、*FPV* 遺伝子解析のシステムを構築し、5 症例について、*FPV* 遺伝子の塩基配列(VP、約 1800bp)、血液型(A 型)、シアル酸分子種(Neu5Gc)などの結果を得た。今回解析した罹患度個体はいずれも Neu5Gc 型であったが、ネコにおける Neu5Gc 型頻度は非常に高いため、Neu5Ac 型(B 型)に比べ Neu5Gc 型(A 型)がパルボウイルスに感染しやすかどうかを証明するには、今後さらなる解析が必要である。また、*CMAH* 遺伝子とがんとの関連については、複数種類の乳腺腫瘍由来の株化細胞において、特定の SNP が見出され、今後の研究により *CMAH* 遺伝子が腫瘍関連候補遺伝子となる可能性も示唆された。

以上、本研究課題の遂行により、輸血副作用を惹起する血液型物質の分子基盤構築が構築され、本研究成果はより安全で適正な輸血前検査法の開発や輸血不適合の機序の解明に役立つと思われる。さらに、血液型物質を疾患感受性関連解析に展開する基礎研究が実施され、さらなる研究により予防医学への貢献が期待される。

<引用文献>

Löffling J, Lyi SM, Parrish CR, Varki A.

Canine and feline parvoviruses preferentially recognize the non-human cell surface sialic acid N-glycolylneuraminic acid.

Virology. 2013. 440(1):89-96. doi: 10.1016/j.virol.2013.02.009.

Bighignoli B, Niini T, Grahn RA, Pedersen NC, Millon LV, Polli M, Longeri M, Lyons LA. Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) mutations associated with the domestic cat AB blood group.

BMC Genet. 2007.;8:27.

Omi T, Nakazawa S, Udagawa C, Tada N, Ochiai K, Chong YH, Kato Y, Mitsui H, Gin A, Oda H, Azakami D, Tamura K, Sako T, Inagaki T, Sakamoto A, Tsutsui T, Bonkobara M, Tsuchida S, Ikemoto S.

Molecular Characterization of the Cytidine Monophosphate-N-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase (CMAH) Gene Associated with the Feline AB Blood Group System.

PLoS One. 2016.11(10):e0165000. doi: 10.1371/journal.pone.0165000.

Gandolfi B, Grahn RA, Gustafson NA, Proverbio D, Spada E, Adhikari B, Cheng J, Andrews G, Lyons LA, Helps CR.

A Novel Variant in CMAH Is Associated with Blood Type AB in Ragdoll Cats.

PLoS One. 2016.11(5):e0154973. doi: 10.1371/journal.pone.0154973. eCollection 2016.

Erratum

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

近江俊徳、中澤 翔太、宇田川智野、落合 和彦、多田 尚美、三井 寛子、筒井 敏彦、土田 修一。

ネコ AB 式血液型を担う CMAH 遺伝子の構造と変異。

DNA 多型. Vol.26. No1, 2018 (集会発表論文)。

Omi T, Nakazawa S, Udagawa C, Tada N, Ochiai K, Chong YH, Kato Y, Mitsui H, Gin A, Oda H, Azakami D, Tamura K, Sako T, Inagaki T, Sakamoto A, Tsutsui T, Bonkobara M, Tsuchida S, Ikemoto S.

Molecular Characterization of the Cytidine Monophosphate-N-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase (CMAH) Gene Associated with the Feline AB Blood Group System.

PLoS One. 2016.11(10):e0165000. doi: 10.1371/journal.pone.0165000.

査読あり

〔学会発表〕(計7件)

Yumiko Uno, Shota Kawakami, Kazuhiko Ochiai, Toshinori Omi.

cDNA cloning and variant analysis of canine CMAH gene

37th International Society for Animal Genetics Conference. 2019(ID80143,2019年3月受理)

宇埜 友美子、川上 翔太、落合 和彦、近江 俊徳。

イヌ CMP-Neu5Ac 水酸化酵素遺伝子翻訳領域の1次構造決定と非同義置換 SNPs の同定。

第27回日本 DNA 多型学会。2018。

近江 俊徳、宇埜 友美子、川上 翔太、土田 修一、浅野 潤三、落合 和彦、皆上 大吾、稲垣 健志、坂本 敦司、小林 輔。

交差適合試験不適合 B 型ドナーネコの血清学的・遺伝学的解析。

第27回日本 DNA 多型学会。2018。

金岡 春央梨、中村 知尋、佐藤 茉水、本田 安里紗、矢口 雅美、川上 翔太、宇埜 友美子、坂本 敦司、皆上 大吾、盆子原 誠、落合 和彦、土田 修一、近江 俊徳。

ネコ AB 式血液型を担う CMAH 遺伝子のジェノタイピング:c.364C>T 変異型ホモ接合体を有する AB 型ネコの同定

第 161 回日本獣医学会学術集会。2018。

近江 俊徳、中澤翔太、宇田川智野、多田尚美、三井寛子、落合 和彦、筒井 敏彦、土田 修二。

ネコ AB 式血液型を担う CMAH 遺伝子の構造と変異

日本 DNA 多型学会第 26 回学術集会。2017。

近江 俊徳、中澤 翔太、宇田川 智野、多田 尚美、三井 寛子、落合 和彦、加藤 由比子、皆上 大吾、左向 敏紀、筒井 敏彦、盆子原 誠、土田 修一。

CMAH 遺伝子解析による猫 AB 式血液型の分子基盤。

第 160 回日本獣医学会学術集会。2017。

近江 俊徳、中澤 翔太、多田 尚美、三井 寛子、加藤由比子、落合 和彦、銀 梓、松原孝子、皆上 大吾、妻井 雅美、浅野 潤三、土田 修一、筒井 敏彦。

非常に稀なネコ AB 型の検出とその遺伝子構造の特徴。

日本動物看護学会第 25 回大会。2016。

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：土田 修一

ローマ字氏名：Tsuchida, Shuichi

所属研究機関名：日本獣医生命科学大学

部局名：獣医学部

職名：教授

研究者番号：20217326

研究分担者氏名：落合 和彦

ローマ字氏名：Ochiai, Kazuhiko

所属研究機関名：日本獣医生命科学大学

部局名：獣医学部

職名：准教授

研究者番号：305505488