

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2010
課題番号：19580373
研究課題名（和文）イヌの潜在精巣の原因遺伝子・マーカー遺伝子の探索と遺伝子診断への応用
研究課題名（英文）Exploration of causative or marker gene for canine cryptorchidism and application to the genetic diagnosis
研究代表者
川手 憲俊（KAWATE NORITOSHI）
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：80221901

研究代表者の専門分野：獣医繁殖学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：潜在精巣、イヌ、エストロゲン受容体 α 遺伝子、一塩基多型（SNP）、ゲノムDNA、培養精巣細胞、テストステロン分泌

1. 研究計画の概要

潜在精巣は精巣の下降が不完全で、腹腔ないし鼠径部に停留する疾患であり、イヌに多発する。本疾患の多くは遺伝する傾向があると報告されているが、イヌの潜在精巣の原因あるいはマーカー遺伝子を同定した報告は、見当たらない。本疾患に罹患した男性の一部では、エストロゲン受容体 α （*ESR1*）の一部に一塩基多型（SNP）の組み合わせ配列（ハプロタイプ）がみられ、このハプロタイプは正常男性には見られないことが報告されている。

本研究では、潜在精巣を発症したイヌにおいて、*ESR1*などの、精巣下降に影響を及ぼす因子の遺伝子の塩基配列を解析し、正常犬との比較を行い、それらの原因・マーカー遺伝子を探索する。潜在精巣犬および正常犬のサンプルのゲノムDNAから、候補因子の遺伝子の一塩基多型（SNP）の部位をPCR法で増幅し、発症個体と正常個体の塩基配列を比較して、本疾患の原因・マーカー遺伝子の同定を試みる。

2. 研究の進捗状況

イヌのSNPデータベースを活用して*ESR1*の3'末端から70kbの領域から、13カ所のSNP候補（#1～#13）を選択した。

イヌ*ESR1*の13カ所のSNP候補のうち、MDHとCHHでは、SNP#5、#6および#9は多型を示し、TPでは#5と#9のみが多型を示し、SNPであることが判明した。さらに、今回の研究で、前述のCanFam2.0データベースには報告のない新しいSNPを発見した

（SNP #14～#17）。

SNP多型の類似したミニチュアダックスフンドとチワワに限定して、*ESR1*の3'側末端から70kbの領域の9カ所SNPについて、正常例（n=68）と潜在精巣例（n=40）を比較した。その結果、正常例と一側性、腹腔内、鼠径部停留例との間にはそれらのSNPのアリル、遺伝子型およびハプロタイプの頻度に顕著な差異はみられなかった。一方、両側性例（n=5）のSNP#16と#17のSNPの遺伝子型ヘテロ接合型の割合は、正常例に比べて低く、ハプロタイプ（SNP #14～#17）のGTTAのホモ接合体の割合は正常例に比較して高かった。

また、小型品種の潜在精巣犬の精巣のアンドロゲン分泌に及ぼすエストロゲンの影響を正常例と比較・検討するため、精巣細胞を分散し、その細胞をヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG；黄体形成ホルモンと同じ作用を持つ）の存在あるいは非存在下で18時間培養し、エストラジオール-17 β のテストステロン分泌に及ぼす影響を解析した。その結果、hCG非存在下では、正常例精巣と潜在精巣例の陰嚢内精巣では、高濃度のE₂添加により、テストステロンの顕著な上昇がみられたが、停留精巣ではそのような上昇は生じなかった。

3. 現在までの達成度

達成度の区分は③「やや遅れている」と自己評価する。その理由を以下に述べる。

理由：これまでの研究によって、上記の小型犬2品種の潜在精巣例の*ESR1*の当該領域

の SNP は正常例と比較して顕著な差異はみられなかった。また、両側性例と *ESRI* 当該領域の SNP との関連についてはさらなる検討が必要である。このような知見は、現在まで見当たらず、新規性の高い報告と考えられる。しかしながら、本研究課題の当初の計画では、イヌの潜在精巣の原因遺伝子あるいはマーカー遺伝子を同定することであったが、上記の研究に取り組んだにもかかわらず、未だイヌの潜在精巣の原因・マーカー遺伝子の同定には至っていない。また、海外の研究グループからもイヌの本疾患の原因遺伝子を解明した報告は発表されていない。その原因の一つとして、本疾患は多因子性の遺伝性疾患であり、特定の遺伝子を個々に探索する方法では、原因遺伝子を同定するのが非常に困難である可能性が挙げられる。現在ヒトでは遺伝子チップ等を用いる全ゲノム領域の網羅的解析法も普及しつつあるが、イヌではそのシステムは確立されておらず、そのシステム確立には数千万円～数億円の莫大な費用を要するので、実施が極めて困難となる。

4. 今後の研究の推進方策

イヌの潜在精巣の原因遺伝子・マーカー遺伝子を同定する研究を継続するならば、上述した様に、全ゲノムの網羅的解析を行う必要があるが、それは莫大な経費を要し、現実的ではない。それよりも、新しい精巣下降因子のインスリン様ペプチド (*INSL*) 3 の潜在精巣罹患動物の血中濃度や培養精巣細胞からの同ホルモンの分泌を解析することによって、潜在精巣の病態や発生機構の解明、ならびに発生原因となる因子の同定を進めていけると考えられる。そこで、本科研費の最終年度の前年度に、「イヌとウシの血中インスリン様ペプチド 3 の免疫測定法の確立と精巣機能検査への応用」という題目で前年度応募したところ、新規採択された。そこで、今後は、イヌおよびウシの *INSL3* の血中濃度を測定できる免疫測定法を開発し、その測定系を用いて、潜在精巣罹患動物の血中動態を解析する。また、イヌの培養精巣細胞を用いて、様々な因子の *INSL3* 分泌に及ぼす影響を検討することで、本疾患の原因となる因子の解明に取り組む。

5. 代表的な研究成果

(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 3 件)

①Pathirana IN, Tanaka K, Kawate N, Tsuji M, Kida K, Hatoya S, Inaba T, Tamada H, Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 3' region of the estrogen receptor 1 gene in normal and

cryptorchid dogs of Miniature Dachshunds and Chihuahuas. Journal of Reproduction and Development, 有, 73, 2010, 印刷中

②Kida K, Maezono Y, Kawate N, Inaba T, Hatoya S, Tamada H, Epidermal growth factor, transforming growth factor- α , and epidermal growth factor receptor expression and localization in the canine endometrium during the estrous cycle and in bitches with pyometra, Theriogenology, 有, 73, 2010, 36-47

③Hatoya S, Sugiyama Y, Nishida H, Okuno T, Torii R, Sugiura K, Kida K, Kawate N, Tamada H, Inaba T, Canine oocyte maturation in culture: significance of estrogen and EGF receptor gene expression in cumulus cells, Theriogenology, 有, 71 2009, 560-567

[学会発表] (計 4 件)

①芦田ゆきの、パシラーナ・インドニル、鳩谷晋吾、稲葉俊夫、喜田加世子、玉田尋通、川手憲俊、潜在精巣罹患犬の培養精巣細胞におけるアンドロゲン分泌能の検討、第 148 回日本獣医学会学術集会、2009 年 9 月 25 日、とりぎん文化会館

②Pathirana I, Tanaka K, Tsuji M, Kida K, Hatoya S, Inaba T, Tamada H, Kawate N, Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 3' region of estrogen receptor alpha gene in small breed dogs with cryptorchidism, 第 102 回日本繁殖生物学会大会、2009 年 9 月 12 日、近畿大学農学部

③田中 翔、辻 誠、喜田加世子、鳩谷晋吾、杉浦喜久弥、稲葉俊夫、玉田尋通、川手憲俊、潜在精巣罹患犬のエストロゲン受容体 α 遺伝子の一塩基多型解析、第 146 回日本獣医学会学術集会、2008 年 9 月 25 日、ワールドコンベンション・サミット (宮崎)

④川手憲俊、山中尚子、吉川裕亮、辻 誠、喜田加世子、稲葉俊夫、玉田尋通、潜在精巣罹患犬における黄体形成ホルモン受容体およびインスリン様ペプチド 3 の遺伝子塩基配列の解析、第 144 回日本獣医学会学術集、2007 年 9 月 2 日、酪農学園大学