

平成23年5月10日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19580373  
 研究課題名（和文）イヌの潜在精巢の原因遺伝子・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

研究成果の概要（和文）：本研究では、犬の潜在精巢の原因遺伝子・マーカー遺伝子を同定する目的で、潜在精巢に罹患した小型犬のエストロゲン受容体 $\alpha$ 遺伝子（*ESR1*）の一部（*ESR1*の3'側末端から70kbの領域の9カ所の多型を示す塩基）について解析し、正常例との比較を行った。その結果、ミニチュアダックスフンドとチワワの潜在精巢例の当該遺伝子領域の多型塩基は正常例と比較して顕著な差異はみられなかった。ただし、両側性潜在精巢例の同遺伝子領域の多型頻度は正常と異なっていたが、例数が少ないため、両側性例と*ESR1*当該多型との関連性についてはさらなる検討が必要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, in order to identify causative gene or marker gene for canine cryptorchidism, a part (9 single nucleotide polymorphisms in 70kb region from 3' terminal) of estrogen receptor  $\alpha$  gene (*ESR1*) was examined in cryptorchid dogs of small breeds and compared with normal animals. As the results, no clear differences of the frequency of the single nucleotide polymorphisms were found in Miniature Duchshunds and Chihuahuas between cryptorchid and normal dogs. However, frequencies of the polymorphisms of cryptorchid dogs differed with normal animals although the examined number of affected dogs was small, and thus further studies are required to determine the associations between bilateral cryptorchidism and the polymorphism in *ESR1*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：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 $\alpha$ 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. 研究開始当初の背景

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。本疾患では両側あるいは片側の精巣が停留するが、両側性の場合は造精機能の障害により不妊になることが知られている。停留した精巣は熟齢期 (4~5 才以上) に高い頻度で腫瘍化し、その一部はエストロゲンを多量に分泌するため、雌性化、脱毛や貧血などを起こす。そのため、発症犬は熟齢期に達する前に停留精巣を外科的に摘出することが勧められる。

精巣下降は精巣が腎臓の尾側から腹腔内を移動し、鼠頸管を通過して陰嚢内に納まるまで移動する過程であり、胎生期に開始する。精巣下降は主に精巣由来の因子により調節されると想定されており、以下の二つの段階からなる (Ivell R et al, Mol Hum Reprod, 2003)。第一段階では、腹腔内において、精巣から分泌されるインスリン様ペプチド3の作用で尾側の精巣導帯は肥大し、一方、精巣由来のアンドロジェンの作用で頭側懸垂帯は退化することにより、精巣は鼠径部の近くまで移動すると考えられている。第二段階では、鼠径部において、アンドロジェンの作用により、精巣導帯は萎縮して、精巣が鼠径管を通過し、陰嚢まで下降するとされている。

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については、国内はもとより、海外においても全く見当たらない。本疾患に罹患した男性 (ヒト) の約 15%において、エストロゲン受容体 $\alpha$  (*ESR1*) の非翻訳領域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 (Yoshida R et al, J Clin Endoc Metab, 2005)。潜在精巣発症動物の遺伝子変異あるいは遺伝子マーカーが明らかにされれば、遺伝子診断によって本疾患の発生を防止できる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

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。

## 3. 研究の方法

正常犬 (n=86) および潜在精巣犬 (n=46) の精巣を使用した。使用した犬種の内訳は、ミニチュアダックスフンド (MDH ; n=71)、チワワ (CHH ; n=37)、トイプードル (TP ; n=24) の 3 品種であった。

イヌの SNP データベース (Dog SNPs-CanFam 2.0 ; MDH, CHH, TP の 3 品種は含まれていない) を利用し、第 1 染色体の *ESR1* 内に SNP が 181 カ所あることを確認した。そのうち、ヒトにおいて特異ハプロタイプのみられた部位に相当する、3'末端より 70 Kb 以内の 13 カ所の SNP 候補 (#1~#13) を選択した。

目的の SNP 候補を含む 200~400 bp 程の *ESR1* の DNA 断片 5 種類を PCR で増幅した。PCR 産物をアガロース電気泳動で精製して、塩基配列の解析を、ダイレクトシーケンシング法により行った。

## 4. 研究成果

上記のイヌ *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。したがって、上記の CanFam2.0 データベースで SNP と報告されている #1~#4, #7, #8 と #10~#13 は、これらの小型品種では多型ではないことが示された。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)。

次に、正常例に限定してミニチュアダックスフンド (n=48)、チワワ (n=20) およびトイプードル (n=18) の品種間の *ESRI* のSNPおよびハプロタイプの差異について解析した。その結果、3品種間に共通のハプロタイプブロックが、4カ所のSNP (SNP #14~#17) に及ぶ約20-kbの領域に同定された。3つの小型品種間でアリル、遺伝子型およびハプロタイプの頻度の顕著な差異がみられた。特にトイプードルでは、ミニチュアダックスおよびチワワに比べて、その差異はより顕著であった。トイプードルの遺伝子型の特異性は*ESRI*以外の遺伝子でも報告されており、今回の結果はそれを裏付けるものと考えられる。

上記の結果から、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、*ESRI*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) と潜在精巢例 (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、小型品種の潜在精巢犬の精巢のアンドロジェン分泌に及ぼすエストロジェンの影響を正常例と比較・検討するため、精巢細胞を分散し、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-17β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、潜在精巢例 (停留精巢と陰嚢内精巢) および正常例の両方とも、hCG存在下ではエストラジオール-17βを36.7nMまたは367nMを加えても、無添加群に比べて、テストステロン分泌の顕著な差はみられなかった。一方、hCG非存在下では、正常例精巢と潜在精巢例の陰嚢内精巢では、367nMのE<sub>2</sub>添加により、テストステロンの

顕著な上昇がみられたが、停留精巢ではそのような上昇は生じなかった。

以上の成績から、上記の小型犬2品種の潜在精巢例の *ESRI* 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。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。潜在精巢犬の *ESRI* のSNPを解析した報告は現在まで全く見当たらず、新規性の高い報告と考えられる。今後、イヌの潜在精巢の原因遺伝子・マーカー遺伝を同定するには、両側性の例数を増やすとともに、他の因子の遺伝子も含めた全ゲノムレベルでのSNP解析を行うことが重要と考えられる。

一方、精巢内分泌機能へのエストラジオール-17βの影響については、黄体形成ホルモンの非存在下では、高濃度のエストラジオール-17βは、正常例精巢のテストステロン分泌を促進するが、停留精巢では、そのような促進はみられず、エストロジェンに対する反応性は、正常例とは異なる可能性が示唆された。これらの結果も、過去に報告が見当たらず、全く新しい知見である。潜在精巢に罹患したイヌの精巢内分泌機能の解析については、今後は、テストステロンに加えて、インスリン様ペプチド3の分泌を解析することによって、さらに興味深い知見が得られるものと考えられる。

#### 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10件)

①Pathirana IN, Tanaka K, Kawate N, Tsuji M, Hatoya S, Inaba T, Tamada H, Homozygosity of single nucleotide polymorphisms in the 3' region of the canine estrogen receptor 1 gene is greater in Toy Poodles than in Miniature Dachshunds and Chihuahuas. *Animal Science Journal*, 有, 2011, 印刷中

②Pathirana IN, Ashida Y, Kawate N, Tanaka K, Tsuji M, Takahashi M, Hatoya S, Inaba T, Tamada H, Comparison of testosterone and insulin-like peptide 3 secretions in response to human chorionic gonadotropin in cultured interstitial cells from scrotal and retained testes in dogs. *Animal Reproduction Science*, 124, 2011, 138-44

③Kawate N, Watanabe K, Uenaka K, Takahashi M, Inaba T, Tamada H, Comparison

of Plasma Concentrations of Estradiol-17 $\beta$  and Progesterone, and Conception in Dairy Cows with Cystic Ovarian Diseases between Ovsynch and Ovsynch plus CIDR Timed AI Protocols. *Journal of Reproduction and Development*, 57, 2011, 267-72

④Pathirana 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, 405-410

⑤Kida K, Maezono Y, Kawate N, Inaba T, Hatoya S, Tamada H, Epidermal growth factor, transforming growth factor- $\alpha$ , 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

⑥Hatoya 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

⑦Kawate N, Sakase M, Watanabe K, Fukushima M, Noda M, Takeda K, Ueno S, Inaba T, Kida K, Tamada H, Sawada T, Ovsynch Plus CIDR Protocol for Timed Embryo Transfer in Suckled Postpartum Japanese Black Beef Cows, *Journal of Reproduction and Development*, 有, 53, 2007, 811-817

⑧Sakase M, Kawate N, Nakagawa C, Fukushima M, Noda M, Takeda K, Ueno S, Inaba T, Kida K, Tamada H, Sawada T, Preventive effects of CIDR-based protocols on premature ovulation before timed-AI in Ovsynch in cycling beef cows, *The Veterinary Journal*, 有, 173, 2007, 691-693

〔学会発表〕(計 15 件)

①Indunil Pathirana, Yukino Ashida, Kakeru Tanaka, Makoto Tsuji, Shingo Hatoya, Toshio Inaba, Masahiro Takahashi, Hiromichi Tamada, Noritoshi Kawate, Comparison of secretory responses of insulin-like peptide 3 and testosterone to hCG in cultured testicular cells of cryptorchid and normal dogs, 第 150 回日本獣医学会学術集会講演要旨集, 2010 年 9 月

16 日, 帯広畜産大学

②Indunil Pathirana, Yukino Ashida, Kakeru Tanaka, Makoto Tsuji, Shingo Hatoya, Toshio Inaba, Masahiro Takahashi, Hiromichi Tamada, Noritoshi Kawate, 第 103 回日本繁殖生物学会大会講演要旨集, 2010 年 9 月 4 日, 北里大学

③芦田ゆきの、バシラーナ・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, 潜在精巢罹患犬の培養精巢細胞におけるアンドロジェン分泌能の検討, 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

④Pathirana 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

⑤川手憲俊, 反芻家畜の卵巣における黄体形成ホルモン受容体の発現調節と性ホルモン剤による卵巣の人為調節, 第 147 回日本獣医学会学術集会・獣医繁殖学分科会・シンポジウム「家畜における生殖内分泌研究の現状」, 2009 年 4 月 2 日, 栃木県総合文化センター

⑥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, 潜在精巢罹患犬のエストロジェン受容体  $\alpha$  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センター・サミット (宮崎)

⑦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, 潜在精巢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

〔図書〕(計 1 件)

玉田尋通、川手憲俊、喜田加世子, 文永堂, 獣医繁殖学マニュアル (第 2 版), 2007, 297 (第 4 章犬および猫の 6~8 の項目 p241~257 を分担執筆)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/reprod/kawate-j.html>

6. 研究組織

(1) 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：8022 1901

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
玉田尋通 (TAMADA HIROMICHI)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号：10155252  
稲葉俊夫 (INABA TOSHIO)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号：00137241  
喜田加世子 (KIDA KAYOKO)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教  
研究者番号：50405362

(4)研究協力者  
パシラーナ インドニル ニシヤンタ  
(PATHIRANA INDUNIL NISHANTHA)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・大学院  
生  
田中 翔 (TANAKA KAKERU)  
大阪府立大学・農学部獣医学科・学部生  
芦田ゆきの (ASHIDA YUKINO)  
大阪府立大学・農学部獣医学科・学部生