

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06433

研究課題名（和文）犬の肝胆膵疾患におけるCFTR遺伝子多型の解析

研究課題名（英文）CFTR gene polymorphism in hepatobiliary pancreatic diseases of dogs

研究代表者

馬場 健司（Baba, Kenji）

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：90452367

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、肝胆膵疾患を有する犬のCFTR遺伝子に5種類の一塩基多型を同定した。そのうち1種類の一塩基多型が胆泥症および胆嚢粘液嚢腫の発症と関連することが示唆された。さらに培養細胞を用いた解析により、この遺伝子多型によって生じる変異型CFTR蛋白は、陰イオン分泌能が低下していることが示された。以上の結果から、ある種のCFTR遺伝子多型が犬の胆嚢粘液嚢腫の病態に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、陰イオンチャネルであるCFTRの機能低下が犬の胆嚢粘液嚢腫の病態に関与することが示唆された。この結果は、本疾患の病態解明および新規治療法の開発に大いに貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, five single nucleotide polymorphisms (SNPs) of CFTR gene were identified in dogs with hepatobiliary pancreatic diseases. One of them was significantly related to accumulation of biliary sludge and gallbladder mucocele. The SNP caused a decrease in the ion channel activity of CFTR in cultured cells. SNPs of CFTR gene may be related to the pathogenesis of gallbladder mucocele in dogs.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：CFTR 遺伝子多型 肝胆膵 胆嚢粘液嚢腫 犬

1. 研究開始当初の背景

犬の肝臓・胆嚢/胆管・膵臓（肝胆膵）領域の疾患は様々であるが、悪性腫瘍の他、肝炎・胆管肝炎、胆嚢炎、胆石症、胆嚢粘液嚢腫および膵炎といった疾患がしばしば認められる。これらの肝胆膵疾患（本課題では悪性腫瘍以外を対象とする）の発生機序の詳細はいまだ不明な点が多い。一方、これらの疾患には好発犬種が存在すること、および複数の肝胆膵疾患が併発することが多いという共通した特徴がある。これらの臨床的特徴を踏まえて、本研究では、犬の肝胆膵疾患の発生に関連する遺伝的要因として *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) の遺伝子多型に着目した。CFTR は全身の上皮細胞に発現する陰イオンチャネルであり、陰イオン (Cl⁻ および HCO₃⁻) および水の輸送を制御し、粘液や分泌物の粘稠度を調節している。ヒトでは、CFTR 遺伝子変異を原因とする嚢胞性線維症が知られている。嚢胞性線維症では、粘液の粘稠度が過度に上昇し、管腔に粘液が閉塞することにより、呼吸器、消化器、肝胆膵などの様々な臓器に傷害が生じる。一方、イヌの CFTR 遺伝子変異・多型についてはほとんど知られておらず、疾患との関連性も不明である。

2. 研究の目的

本研究では、イヌ CFTR 遺伝子の多型を探索し、CFTR 遺伝子多型と肝胆膵疾患との関連性を明らかにする。また、変異型 CFTR の陰イオン分泌能を評価する。

3. 研究の方法

1) CFTR 遺伝子多型の探索

肝胆膵疾患を罹患した犬の末梢血より DNA を抽出し、次世代シーケンス法により CFTR 遺伝子のエクソン領域の塩基配列を解析した。また、治療を目的として摘出した胆嚢組織に発現する CFTR mRNA のスプライシング異常およびその異常の原因となるイントロン領域の遺伝子多型を解析した。

2) CFTR 遺伝子多型と肝胆膵疾患との関連性

上記 1) で検出されたアミノ酸置換を伴う複数の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) について検体毎に同時解析し、疾患との関連性を解析した。

3) 変異型 CFTR の陰イオン分泌能評価

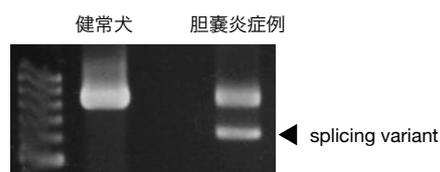
上記 2) で疾患との関連が認められた遺伝子多型によって生じる変異型 CFTR の陰イオン分泌能について培養細胞を用いて解析した。

4. 研究成果

1) CFTR 遺伝子多型の探索

次世代シーケンスにより 4 種類のアミノ酸置換を伴う SNPs (A, B, C, D) を同定した。さらに、胆嚢炎の 1 検体において CFTR mRNA のスプライシングバリエーションを検出した (図 1)。この mRNA スプライシングの原因となるイントロン領域の SNP (E) を同定した。

図1 胆嚢炎症例で検出されたCFTR mRNA スプライシングバリエーション



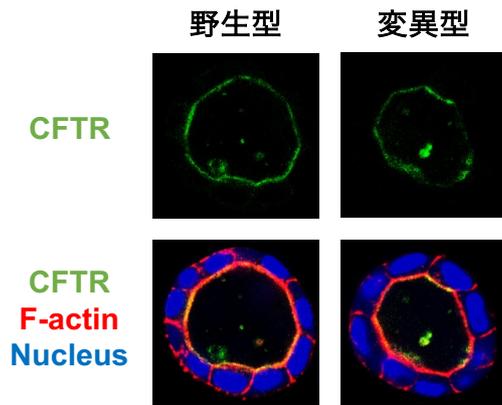
2) CFTR 遺伝子多型と肝胆膵疾患との関連性

上記 5 種類の SNPs について、胆泥症および胆嚢粘液嚢腫との関連性を解析した。その結果、SNP (C) は、胆嚢に異常を有さない犬と比較し、胆泥症および胆嚢粘液嚢腫の犬において有意に高率で認められ、疾患との関連が示唆された (正常 vs 胆泥症: 95%信頼区間; 1.22-79.39, P 値; 0.032, 正常 vs 胆嚢粘液嚢腫: 95%信頼区間; 1.07-64.51, P 値; 0.043)。胆泥症と胆嚢粘液嚢腫の比較では、有意差は認められなかった (95%信頼区間; 0.37-1.95, P 値; 0.693)。その他の疾患については、検体数不足で十分な解析が行えなかった。

3) 変異型 CFTR の陰イオン分泌能評価

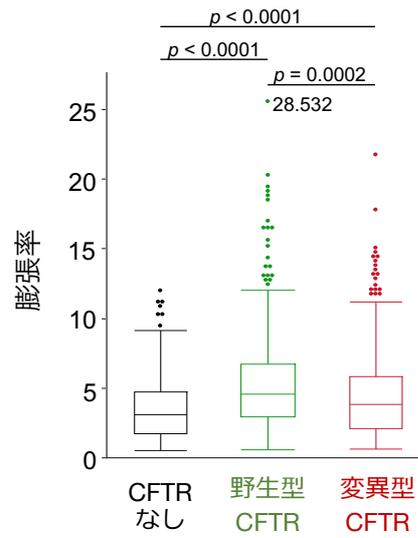
SNP (C) によって生じる変異型 CFTR をイヌの正常腎臓尿細管上皮細胞由来細胞株である MDCK 細胞に発現させ、その細胞内局在および陰イオン分泌能を解析した。シストを構成する MDCK 細胞において、変異型 CFTR は野生型 CFTR と同様に頂端膜側 (内腔側) に局在し、本変異によって細胞内局在は変化しないことが明らかとなった (図 2)。続いて CFTR の陰イオン分泌能をフォルスコリン添加後のシストの膨張率によって解析した結果、変異型 CFTR は野生型 CFTR と比較し、有意に陰イオン分泌能が低下していることが示された (図 3)。

図2 野生型CFTRおよび変異型CFTRの細胞内局在



以上の結果から、CFTR 遺伝子の SNP (C)は犬の胆泥症および胆嚢粘液嚢腫の発症と関連すること、および本 SNP によるアミノ酸置換により CFTR の陰イオン分泌能が低下することが示された。本 SNP は、これらの疾患の発症および病態形成に関与している可能性が考えられた。

図3 CFTR発現MDCK細胞シストのフォルスコリン刺激後の膨張率



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 NAGAO Itsuma, TSUJI Kanako, GOTO-KOSHINO Yuko, TSUBOI Masaya, CHAMBERS James K., UCHIDA Kazuyuki, KAMBAYASHI Satoshi, TOMIYASU Hirotaka, BABA Kenji, OKUDA Masaru	4. 巻 85
2. 論文標題 MUC5AC and MUC5B expression in canine gallbladder mucocoele epithelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1269 ~ 1276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.23-0174	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大崎優香, 大橋真治, 谷健二, 板本和仁, 中市統三, 砂原央, 堀切園裕, 長尾乙磨, 上林聡之, 富安博隆, 馬場健司, 奥田優
2. 発表標題 犬の胆嚢粘液嚢腫におけるCFTR遺伝子多型解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大崎 優香, 大橋 真治, 谷 健二, 板本 和仁, 中市 統三, 砂原 央, 堀切園 裕, 長尾 乙磨, 後藤 裕子, 上林 聡之, 富安 博隆, 馬場 健司, 奥田 優
2. 発表標題 犬の胆嚢疾患におけるCFTR遺伝子多型解析および変異型CFTRの機能的評価
3. 学会等名 第19回 日本獣医内科学アカデミー学術大会 (JCVIM 2023)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------