

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月7日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658263

研究課題名（和文）犬における遺伝性拡張型心筋症の発症機構の解明

研究課題名（英文）Studies on the outbreak mechanism of hereditary dilated cardiomyopathy in dogs

研究代表者

日笠 喜朗（HIKASA YOSHIKI）

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30165071

研究成果の概要（和文）：アメリカン・コッカー・スパニエル(ACS) 犬において拡張型心筋症と白内障を発症する家系における拡張型心筋症の病態解析および拡張型心筋症の発症への関与が予想される遺伝子解析と蛋白発現の解析を行った結果、拡張型心筋症の発生がみられる ACS 家系に拡張型心筋症の発症を明らかにし、その発症への関与が予想される  $\alpha$ B-クリスタリン(CRYAB)発現を骨格筋で調べたところ、その発現量の減少が関連している可能性が示唆できた。CRYAA と CRYAB 遺伝子多型の接合型と疾患発症についての関連性も認められた。

研究成果の概要（英文）：Clinical conditions of the dilated cardiomyopathy in the American Cocker spaniel (ACS) family developed dilated cardiomyopathy and a cataract were analyzed. Protein expressions and various gene analyses participating in outbreak of the dilated cardiomyopathy were analyzed. As a result, the outbreak of dilated cardiomyopathy in ACS family was found in this study. Outbreaks of cardiomyopathy and cataract were associated with the decrease of the expression level of Alpha B-crystallin (CRYAB) in the skeletal muscle. Single nucleotide polymorphisms of the amino acid non-coding regions of CRYAA or CRYAB gene were found, suggesting a relationship between cardiomyopathy and genetic polymorphism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：慢性心不全・拡張型心筋症・白内障・アメリカンコッカースパニエル・クリスタリン遺伝子・遺伝性疾患・犬

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、動物の高齢化に伴い、心筋症や血栓症のような循環器病に罹患した動物が増加しており、その治療法の確立は獣医臨床領域において急務となっている。しかし、ヒト医学臨床に比べ獣医臨床、特に小動物臨床では心筋症の根本的原因および発生機序が十

分に解明されていないため、早急な解明が必要である。そのためにはイヌやネコにおける循環器病の疾患モデルの確立が必須である。(2) 拡張型心筋症は小動物臨床における難病のひとつであり、古くから知られているにも係わらず、心筋症の根本的原因および発生機序は十分に解明されていない。犬の心筋症の

多くは拡張型心筋症であり、どの犬種も発生が見られるが、特に大型犬がよく罹患し、ボクサーやコッカー・スパニエル(ACS)など特定の犬種では遺伝的素因が認められている。心筋の変性は心筋細胞機能を侵す様々な障害の最終的な結果であり、タウリン、L-カルニチンのような代謝産物の不足、心筋炎、心筋虚血あるいは心筋の中毒性物質などの関連が認められている。しかし、未だにその発症の根本的原因は明らかにされていない。コッカー・スパニエルには、心筋症、脂漏性皮膚炎及び癩癧などの発生が起りやすいことが認められている。本研究室は、血統的につながりのある ACS のコロニーにおいて拡張型心筋症と白内障の合併症が存在している事を発見したが、現在までその因果関係については明らかになっていない。ACS の白内障はそのほとんどが遺伝的素因により発症すると言われており、常染色体劣性遺伝によることが明らかにされている。また、ヒトで遺伝性の拡張型心筋症と白内障が併発する家系が報告されており、心筋症と白内障の両者はデスミン関連性の $\alpha$ B-クリスタリン遺伝子の R120G の変異が原因で起こるとの報告がなされている。そのような心筋症と白内障の関連は犬では報告されていない。本研究で注目している拡張型心筋症と白内障の併発が見られる ACS の家系の維持及びモデルの確立に成功すれば世界で初めてのことになり、心筋症の根本的原因と病態を解明する上で極めて有用である。

(3) Alpha B-crystallin (CRYAB) は水晶体中に含まれる主要な水溶性タンパク質のひとつで、心筋や骨格筋中など水晶体以外の場所にも広く分布する。さらに CRYAB は small heat shock protein (sHSP) のひとつである HSP 27 と類似したアミノ酸配列を持ち、シャペロン活性を有する。CRYAB はこの作用によって水晶体や心筋などで変性タンパクなどの凝集を防ぎ、機能の維持に努めている。近年、ヒトでは CRYAB 遺伝子の点変異の存在が報告されており、この点変異によって心臓や水晶体に機能的異常が発生することが確認されている。

(4) 拡張型心筋症は心筋の収縮力低下と高度な心腔拡大を特徴とし、末期に重度の循環不全を引き起こす。白内障は視覚喪失の重要な要因であり、その発生機序は水晶体内におけるクリスタリン蛋白変性に伴う不溶性蛋白質の増加である。どちらも原因として遺伝性の素因があげられ、ヒトではこれら二つの疾患が CRYAB 遺伝子の変異によって同時に引き起こされるとの報告がある。また Alpha-A crystallin (CRYAA) も白内障発症に大きく関わっている。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究ではイヌにおける循環器疾患、特に遺伝性の拡張型心筋症モデルを確立し、このモデルを利用して拡張型心筋症の発症機序を解明することを目的とした。

(2) この目的に対して、最初にアメリカン・コッカー・スパニエル(ACS)における家系の交配により遺伝性拡張型心筋症モデルを確立し、そのモデルの発症過程を明らかにする。

(3) 次に、予想される原因遺伝子の変異と蛋白発現の異常を生化学的手法を用いて解析することにより、拡張型心筋症の発症機序の一端を明らかにすることであった。

(4) 特に、生化学的解析と遺伝子解析については、家族性の拡張型心筋症および白内障の合併発症がみられる ACS の家系から得られた個体を用いて、CRYAB のタンパク解析並びに CRYAB と CRYAA の遺伝子解析を行い、疾病との関連性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ACSにおいて拡張型心筋症と白内障を発症する家系犬と非家系犬における臨床学的診断による拡張型心筋症の病態解析、遺伝性拡張型心筋症犬における血漿アミノ酸およびカルニチンの動態解析を実施した。臨床学的診断は血液検査、血液生化学検査、心電図検査、レントゲン検査、心臓超音波検査および非観血的血圧測定を含む循環動態検査により実施した。ACSに対する対照犬としては、ビーグル犬を用いた。特に、心機能の評価は電子走査型カラー超音波診断装置を使用し、パルスドップラー法を用いて、各種血流パラメーター(E波速度、A波速度、A/E比、E波圧較差、A波圧較差、圧半減時間、流速積分値、僧帽弁口面積)、両心室壁の厚さ、左心内径短縮率等を計測し、心筋症の発症過程を調べた。

また、タウリンおよびカルニチンの不足は拡張型心筋症の発生要因のひとつと考えられているので、本家系犬における血漿中の全アミノ酸およびカルニチン濃度、筋肉内のカルニチン含有量を高速液体クロマトグラフィー法および分光光度法を用いてそれぞれ測定する。測定は各家系犬において生後1ヵ月目より定期的実施し、心筋症発症犬および非発症犬における血漿アミノ酸およびカルニチン濃度と組織含有量を調べた。血漿アミノ酸、カルニチン以外の項目として、レニン、アルドステロン濃度を同時に測定し、心筋症の病態解析も行った。

(2) 家族性心筋症を疑う家系から得られた ACS 7 頭、別家系の ACS 6 頭および対照群で

あるビーグル 3 頭を用いた。鎮静下にて各イヌから外側広筋の一部を採取し、タンパク質および mRNA を抽出した。抽出タンパクは SDS-PAGE を行った後、ウエスタンブロット法によって CRYAB を検出し、比較解析を行った。

ウエスタンブロット法では、15%ポリアクリルアミドゲルを用いて、タンパク抽出液を SDS-PAGE で分離し、polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に 2 mA/cm<sup>2</sup>、45 分の条件で転写した。SDS-PAGE を行う際は、タンパク量が 10 μg になるように調整した。転写後、PVDF 膜は 10%ブロッキング剤を含む TBS-T (25 mM トリス-HCl, pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.1% Tween20) でブロッキングした後、1 次抗体溶液として抗CRYAB抗体を、シーソーシェイカーを用いて室温で反応させた。反応後、PVDF 膜を TBS-T で洗浄し、続いて 2 次抗体溶液としてペルオキシダーゼラベル抗ウサギIgGを、シーソーシェイカーを用いて反応させた。反応後、TBS-T で洗浄し、3, 3', 5, 5' -テトラメチルベンジジンを用いて染色を行った。同時に 1 次抗体として Tubulin を使用し、これを内部標準とした。

また、骨格筋由来 cDNA は、CRYAB の ORF 領域に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、増幅産物のクローニングを行った。さらにプラスミドシークエンスにより塩基配列を確定し、既知のイヌのものと比較した。またウエスタンブロット法により、Ser59 リン酸化 CRYAB の検出ならびに比較解析も行った。

(3) 拡張型心筋症と白内障を若齢時に発症した ACS の末梢血由来ゲノム DNA (gDNA) を抽出し、これを用いて CRYAB 遺伝子のエキソン領域 (Ex) 1、2、3 および CRYAA 遺伝子の Ex1、2、3、4 のシークエンスを行った。異常が認められた Ex の塩基配列を、12 頭の ACS および健全なビーグル犬 3 頭にて確認した。カイ二乗検定を行い、遺伝子異常の発生と疾患との関連性を評価した。

遺伝子解析のプラスミドシークエンスは、以下のように実施した。CRYAB、CRYAA 遺伝子のエキソン領域を解析するため QIAamp DNA Mini kit を用いて、ACS の末梢血から gDNA を抽出した。これを鋳型として PCR により CRYAB 遺伝子の Ex1-Ex4、CRYAA 遺伝子の Ex1-Ex3 の増幅を行った。gDNA に各プライマーを加え、さらに dNTP、DNA ポリメラーゼおよび精製水を加えて伸長反応を行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動後、エチレンブロマイドで染色し、UV で検出した。得られた PCR 産物は、キットを用いてプロトコールに従い精製し、その後のクローニングに用いた。クローニングとシークエンスは既存のキ

ットを用いて、プロトコールに従い、実施した。シークエンス結果は、解析ソフトを使用して解析し、既知の配列と比較した。

#### 4. 研究成果

(1) 白内障と心筋症の発症を持つ ACS 家系の臨床例と本家系由来の子犬において、正常ビーグル犬を対照として、血液検査、血液生化学検査、レントゲン検査、心電図および超音波検査を含む各種検査を実施した結果、本家系の心筋症発症犬では血漿タウリン濃度の顕著な低下がみとめられたが、血漿カルニチン濃度は正常範囲にあることが判明した。さらに、ACS 家系において拡張型心筋症の発生がみられる家系と血統的につながりのある ACS に拡張型心筋症と慢性心不全の発症を明らかにした。その際に、一部の犬において慢性心不全による肺高血圧症とうっ血性心不全への進行が惹起されたため、今後の病態解析の研究展開の一助にするため、PDGF 受容体阻害作用を有するイマチニブの効果も本研究の範疇で検討したところ、その有効性も示唆された。

(2) ACS における CRYAB の生化学的解析および遺伝子解析を実施した結果、心筋症および白内障発症家系群では別家系群と比較して CRYAB 発現量の有意な減少が認められた ( $P < 0.01$ )。さらに、心筋症を疑う個体群および白内障発症群においても、その他の健全 ACS 群と比較して CRYAB 発現比の減少傾向が確認された。しかし、CRYAB 遺伝子の ORF 領域における異常は認められなかった。Ser59 リン酸化 CRYAB に関しては個体による差が大きく、疾病群と健全 ACS 群およびビーグル群における有意な差は認められなかった。

今回の研究により、心筋症および白内障の発症と骨格筋における CRYAB の発現量の減少が関連している可能性が示唆された。

(3) CRYAB と CRYAA の遺伝子解析を行い、疾患との関連性を検討した結果、シークエンスにより CRYAB 遺伝子の 117G > T (Ex1)、46T > C (Ex2) および CRYAA 遺伝子の 273G > C (Ex3) が確認された。これらはいずれもアミノ酸非翻訳領域 (UTR) の一塩基多型 (SNP) であり、アミノ酸置換を伴うものではなかった。カイ二乗検定によりそれぞれの SNP と疾患との関連性を心筋症と白内障とで分類した場合、白内障で有意な関連性が示された ( $P = 0.029$ )。両疾患をまとめた場合ではさらに関連性は有意となった ( $P = 0.003$ )。117G > T は翻訳開始地点よりも上流に位置しており、翻訳の過程において何らかの異常を引き起こす可能性が考えられた。以上の研究成果により、ACS における拡張型心筋症の発症機序には CRYAB もしく

はCRYAAの遺伝子異常または発現異常が関連している可能性が示唆された。

#### 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 1 件)

(1) Arita, S., Arita, N., and Hikasa, Y.:  
Therapeutic effect of low-dose imatinib  
on pulmonary arterial hypertension in  
dogs. Canadian Veterinary Journal 54,  
255-261, 2013、査読有

<http://canadianveterinarians.net/publications/cvj-past-issues-toc.aspx?month=3&year=2013#.UbUo-ouUdFQ>

[学会発表] (計 1 件)

(1) 日笠喜朗、犬の肺高血圧症に対する低用量イマチニブ療法の改善効果、平成 23 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会、札幌コンベンションセンター (札幌市)、2012 年 2 月 3 日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

日笠 喜朗 (HIKASA YOSHIAKI)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30165071

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

有田 申二、山口大学大学院連合獣医学研究科臨床獣医学専攻生

中嶋 美記・阿波 利英、鳥取大学農学部  
獣医内科学研究室専攻生