

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660242

研究課題名(和文) 伴侶動物の高齢性慢性疾患に潜伏する遺伝子病の証明

研究課題名(英文) Identification of genetic diseases of aged companion animals

研究代表者

大和 修 (Yamato, Osamu)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授

研究者番号：80261337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、犬猫の高齢性慢性疾患に潜伏する遺伝子病の高頻度潜在性を証明しようとする研究である。

ライソゾーム病に含まれる数疾患をスクリーニングするために、犬猫の酵素活性の対照値を作成した。ハイリスクスクリーニングによって、猫ムコ多糖症VI型を診断し、新規原因変異を同定した。遅発型の神経セロイド・リポフスチン症の犬2症例および遺伝性拡張型心筋症の猫1症例を同定した。

また、猫のムコ多糖症VI型とビルビン酸キナーゼ欠損症、犬の網膜萎縮症と変性性脊髄症の分子疫学調査を実施した結果、これらの疾患は品種により非常に高い頻度で潜在しており、伴侶動物の臨床において重要な遺伝性高齢性慢性疾患であると判明した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to demonstrate that there are many adult-onset chronic genetic diseases in companion animals.

The reference range of canine and feline lysosomal enzymes was established to diagnose several lysosomal diseases. Using high-risk screening, mucopolysaccharidosis was diagnosed in three cats. One case was categorized in type VI by measurement of enzyme activities, and a causative mutation was identified in this cat. Adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis was diagnosed in two dogs. Early-onset hypertrophic cardiomyopathy was diagnosed in a cat.

Molecular epidemiological surveys were performed on feline mucopolysaccharidosis VI, feline pyruvate kinase deficiency, canine progressive retinal atrophy, and canine degenerative myelopathy. As a result, it was demonstrated that these diseases were present at a high frequency in the population of certain breeds, suggesting that these diseases are very important in veterinary clinics of companion animals.

研究分野：獣医臨床遺伝学

キーワード：高齢性慢性疾患 遺伝子病

1. 研究開始当初の背景

犬猫の遺伝子病は、ヒト疾患の理想的なモデルであり、新規治療法開発などのゲノム医学が抱える問題の解決に貢献する。一方、臨床獣医学においては、潜在する遺伝子病の分子基盤および集団内頻度を明らかにし、その知見を臨床現場にフィードバックすることが求められている。その中でも、高頻度の重要疾患については、遺伝子型検査法を用いた繁殖コントロールによる予防措置が必要とされる。

研究代表者は、以前から、各種動物のライソゾーム蓄積病を中心とする遺伝子病について精力的に研究し、数多くの動物遺伝子病を同定してきた。一方、ヒト医学研究の最近の動向によると、特定の遺伝子病（例えば、ライソゾーム病のひとつであるファブリー病など）のスクリーニングにより、これまで十数万人に1人とされていた患者が、実際は数千人に1人の高頻度で存在することが明らかにされてきた。このような動向から察すると、伴侶動物でも、高齢性慢性疾患を引き起こす遺伝子病がまだ多数潜伏していると推測される。

したがって、様々な症状を伴う高齢性慢性疾患を引き起こす遺伝子病を対象として、それら疾患を検索・同定し、有病率を明らかにする研究を立案した。この研究成果を基に疾患予防を実施すれば、伴侶動物の遺伝的な品質向上に大きく貢献することになる。

2. 研究の目的

近年、獣医療技術の進歩や動物飼料の品質向上などにより、伴侶動物の寿命が延びて高齢化が進み、診療対象として高齢動物が占める割合が高くなり、結果的に伴侶動物の高齢性慢性疾患は増加傾向にある。

本研究では、犬猫の各種高齢性慢性疾患、すなわち、循環器疾患（心不全）、腎泌尿器疾患（慢性腎臓病）、肝疾患（肝機能不全）、筋疾患（筋麻痺・運動障害）、骨関節疾患（特発性骨関節症）、神経疾患（運動障害）、血液疾患（貧血、免疫不全）、眼疾患（視覚障害、網膜萎縮）などに潜伏する遺伝子病の高頻度潜在性を証明しようとする研究である。

具体的な対象疾患は、ライソゾーム病では、ファブリー病、ゴーシェ病、ポンペ病、ムコ多糖症、遅発型の神経セロイド・リポフスチン症（NCL）などであり、その他に、赤血球解糖系酵素欠損症および変性性脊髄症（DM）など、成熟動物で発症あるいは診断される疾患も対象として調査した。酵素スクリーニングやその他の検査法を用いて各疾患症例を同定し、その分子基盤を明らかにし、それら疾患が獣医療に占める割合（有病率）を算出することを試みた。

本研究は、これら獣医療で未同定・不認識の様々な遺伝子病が、犬猫の高齢性慢性疾患の中に高い割合で潜在していることを証明するために実施した。

3. 研究の方法

(1) 酵素スクリーニング法

ライソゾーム病に含まれるファブリー病、ゴーシェ病、ポンペ病、ムコ多糖症については、ライソゾーム酵素活性の測定によるスクリーニングを実施することが可能であるため、犬猫における酵素活性の対照範囲を設定した。最初に、末梢血白血球ペレットによる酵素活性を測定し、次に乾燥濾紙血から簡易に採取した検体で酵素活性を測定して、これらを比較した。前者ではデキストランによる比重遠心で分離した白血球ペレットから得られたホモジネート、後者ではガスリーパー上の乾燥血液のパンチ（1.2 mm 径）から抽出した溶液を酵素源として用い、各人工基質（4-methylumbelliferil 誘導体）とともにインキュベートして、切断遊離した蛍光物質を検出して酵素活性を算定した。

(2) ハイリスクスクリーニング

臨床上の所見によって、遺伝性高齢性慢性疾患が疑われる症例について、(1)で作成した酵素測定法および各種遺伝子解析によって、確定診断を試みた。さらに、確定診断できた症例については、DNA のシーケンス解析によりその原因変異同定を試みた。

(3) 遺伝子型検査法開発および分子疫学調査

上記、(2)で同定された新規疾患（猫のムコ多糖症 VI 型）の原因変異ならびに高齢性発症の可能性がある既知遺伝子病 [猫のピルビン酸キナーゼ（PK）欠損症および犬の進行性網膜萎縮症（PRA）] の原因変異について、リアルタイム PCR 法による遺伝子型検査法の開発を試みた。開発した遺伝子型検査法を用いて、それぞれの関連集団の変異アレル頻度を調査した。また、以前の研究によって開発された高齢性発症の神経遺伝子病である DM の遺伝子型検査法を用いて、これまでに調査されていない犬種集団（コリーおよびボーダー・コリー）の変異アレル頻度を調査した。

4. 研究成果

(1) 酵素スクリーニング

全血から分離された白血球ペレットを用いた方法で、 α -ガラクトシダーゼ（ファブリー病）、グルコセレブロシダーゼあるいは β -グルコシダーゼ（ゴーシェ病）、 α -グルコシダーゼ（ポンペ病）、アシルスルファターゼ A および B（ムコ多糖症 VI 型等）の活性測定法を確立し、犬および猫の対照値を設定した。また、濾紙血を用いた簡易酵素スクリーニング法として、 α -ガラクトシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ（ β -グルコシダーゼ）および α -グルコシダーゼについて、犬および猫の対照値を作成した。本法に適用した酵素は、 α -ガラクトシダーゼ、グルコセレブロシダーゼおよび α -グルコシダーゼの3種類の酵素であった。これらの結果は、下記の表 1 および 2 にまとめた。

その結果、これらの酵素は動物により大きく活性が異なることから、スクリーニングにはそれぞれの動物に対しての至適条件を設定する必要があることが判明した。

表 1. 酵素活性 (白血球ペレット、平均 ± SD)

酵素 (μmol/hr/mg protein)	犬 (頭数)	猫 (頭数)
α-ガラクトシダーゼ	45.9 ± 17.2 (n=22)	49.4 ± 18.1 (n=14)
グルコセレブロシダーゼ (β-グルコシダーゼ)	40.9 ± 18.5 (n=22)	41.3 ± 11.4 (n=14)
アリルスルファターゼ A	53.0 ± 11.6 (n=22)	51.2 ± 14.3 (n=13)
アリルスルファターゼ B	273 ± 76 (n=20)	453 ± 107 (n=7)

表 2. 酵素活性 (濾紙血、平均 ± SD)

酵素 (pmol/hr/disk)	犬 (頭数)	猫 (頭数)
α-ガラクトシダーゼ	156 ± 12 (n=4)	168 ± 34 (n=4)
グルコセレブロシダーゼ (β-グルコシダーゼ)	43.5 ± 4.1 (n=4)	248 ± 74 (n=4)
α-グルコシダーゼ	1264 ± 371 (n=4)	14.6 ± 4.5 (n=4)

(2) ハイリスクスクリーニング

各種獣医専門学会に属する専門獣医師とコンタクトをとり、臨床症状によって遺伝性高齡性慢性疾患が疑われる症例候補を集めて、それらの症例についてハイリスクスクリーニングを実施した。候補となった疾患(症例)は、ファブリー病(犬 1 頭、猫 1 頭)、ゴーシェ病(犬数頭)、ポンペ病(犬 1 頭、猫 2 頭)、ムコ多糖症(猫 4 頭)、遅発型 NCL(犬 2 頭)であった。これらについて白血球ペレットを用いた酵素活性測定等の検査を実施した結果、これらの症例の内、猫の 3 例において新たなムコ多糖症を同定した。さらに、その内の 1 例については、VI 型であり ARSB 遺伝子エクソン 5 上に 1 塩基欠失の新規病原性変異を同定した。残りのムコ多糖症 2 症例については、生化学検査および遺伝子解析によってムコ多糖症のタイプおよび原因変異を解析中である。

また、ファブリー病が疑われた猫症例では、肥大型心筋症を発症していることが判明し、YMBPC3 遺伝子の既知の 3 変異の有無を解析中である。遅発型 NCL については、病理組織検査の結果、NCL であることは診断できたが、既知の変異はなく、新規 NCL として遺伝子解析を進めている。その他の症例については、推定された疾患の可能性は否定された。

(3) 遺伝子型検査法開発および分子疫学調査

本研究で同定した猫ムコ多糖症 VI の新規変異について、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法を開発して、純血種(400 頭余)および雑種猫集団(1000 頭程度)を調査した結果、本変異はこれら集団にはみとめられなかったため、本変異による疾患は猫集団の中に高頻度には存在しないことが明らかとなった。

また、既知の猫 PK 欠損症について、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法を開発して、同様に純血種および雑種猫集団を調査した結果、国内のアビシニアンおよびソマリの集団に高頻度に、ベンガルおよびアメリカンショートヘアならびに雑種猫の集団にも中等度の頻度で本疾患が潜在することが明らかになった。

また、既知の犬 PRA (PRCD 型 PRA) について、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法を開発して、純血犬集団(数百頭規模)を調査した結果、国内トイプードルの集団に高頻度に潜在すること、ならびにチワワの集団にも初めて本疾患が潜在することを証明した。

さらに、DM の調査をコリーおよびボーダー・コリーの集団で実施した結果、コリー集団には中等度の頻度で、ボーダー・コリーの集団には低頻度で潜在することが明らかになった。

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 8 件、すべて査読あり)

- (1) Oyake K, Shibata S, Sakai H, Saito M, Yamato O, Kushida K, Maeda S, Kamishina H. Changes in respiratory function in Pembroke Welsh Corgi dogs with degenerative myelopathy. *J Vet Med Sci* in press.
- (2) Kohyama M, Yabuki A, Ochiai K, Nakamoto Y, Uchida K, Hasegawa D, Takahashi K, Kawaguchi H, Tsuboi M, Yamato O. In situ detection of GM1 and GM2 gangliosides using immunohistochemical and immunofluorescent techniques for auxiliary diagnosis of canine and feline gangliosidosis. *BMC Vet Res* 12, 64, 2016.
- (3) Kohyama M, Tada N, Mitsui H, Tomioka H, Tsutsui T, Yabuki A, Rahman MM, Kushida K, Mizukami K, Yamato O. Real-time PCR genotyping assay for canine progressive rod-cone degeneration and mutant allele frequency in Toy Poodles, Chihuahuas and Miniature Dachshunds in Japan. *J Vet Med Sci* 78(3), 481-484, 2016.
- (4) Ogawa M, Uchida K, Yamato O, Mizukami K, Chamber A, Nakayama H. Expression of autophagy-related proteins in the spinal cord of Pembroke Welsh Corgi dogs with canine degenerative myelopathy. *Vet Pathol* 52(6), 1099-1107, 2015.
- (5) Nakamae S, Kobatake Y, Suzuki R, Tsukui T, Kato S, Yamato O, Sakai H, Urushitani M, Maeda S, Kamishina H. Accumulation and aggregate formation of mutant superoxide dismutase 1 in canine degenerative myelopathy. *Neuroscience* 303, 229-240, 2015.
- (6) Kushida K, Giger U, Tsutsui T, Inaba M, Konno Y, Hayashi K, Noguchi K, Yabuki A,

- Mizukami K, Kohyama M, Endo Y, **Yamato O**. Real-time PCR genotyping assay for feline erythrocyte pyruvate kinase deficiency and mutant allele frequency in purebred cats in Japan. *J Vet Med Sci* 77(6), 743–746, 2015.
- (7) Mizukami K, **Yabuki A**, Endoh D, Chang HS, Lee KW, Nakayama M, Kushida K, Kohyama M, Lee JI, **Yamato O**. Investigation of parallel and simultaneous selection for Collie eye anomaly and ivermectin toxicosis. *Vet Rec* 175(7), 174, 2014.
- (8) Wakitani S, Torisu S, Yoshino T, Hattanda K, **Yamato O**, Tasaki R, Fujita H, Nishino K. Multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency (glutaric aciduria type II) with a novel mutation of electron transfer flavoprotein-dehydrogenase in a cat. *JIMD Rep* 13, 43–51, 2014.

〔学会発表〕(計 16 件)

- (1) 神山萌子, 枝村一弥, 兼子祥紀, 矢吹映, **大和修**. 長毛雑種猫のムコ多糖症 VI 型における新規病原性変異の同定. 日本獣医師会年次大会 (秋田キャッスルホテル, 秋田県秋田市, 2016 年 2 月 26–28 日).
- (2) **Osamu Yamato**. Inborn errors of metabolism in dogs and cats: invitation for research collaboration. In: The 7th Joint Symposium of Veterinary Research among Universities of Veterinary Medicine. (Green World Hotel, Tam Dao National Park, near Hanoi, Vietnam, 2016 年 2 月 22 日)
- (3) 疋田哲也, 田中彰人, 西峯健介, 下茂悠作, 齊藤遥, 高智正輝, 佐藤 遼, 萩清美, 中川正徳, 小山田和央, 井上理人, **大和修**. ホスホフルクトキナーゼ欠損症に類似した溶血性貧血を呈した日本スピッツの 1 例. 第 36 回動物臨床医学会 (大阪国際会議場, 大阪市, 2015 年 11 月 20–22 日).
- (4) 神山萌子, 枝村一弥, 兼子祥紀, 矢吹映, **大和修**. 長毛雑種猫のムコ多糖症 VI 型における新規病原性変異の同定. 日本獣医学会 (北里大学, 青森県十和田市, 2015 年 9 月 7–9 日).
- (5) 田中啓之, 矢中雄一郎, 杉浦雄一, 中村孝行, 牛草貴博, 鳩谷晋吾, 内田和幸, 神山萌子, 矢吹映, **大和修**. 雑種猫の同腹 2 例に認められた神経セロイド・リポフスチン症. 日本獣医学会 (北里大学, 青森県十和田市, 2015 年 9 月 7–9 日).
- (6) 山添比奈子, 青木琴代, 内田和幸, 近藤広孝, 鈴木誠, **大和修**. 同腹兄弟雑種犬 2 例のクラブ病における MRI 所見と病理学的所見の比較検討. 日本獣医神経病学会 (大手町ファーストスクエア, 東京都千代田区, 2015 年 7 月 6–7 日).
- (7) 清武典子, 飛田泰男, 松田広一, 張春花, 新井賢, 砂川一浩, 肥後隆志, 矢吹映, 神山萌子, 櫛田和哉, 遠藤泰之, **大和修**. 猫のβ-ウレイドプロピオナーゼ欠損症: その臨床, 分子基盤および分子疫学. 日本獣医内科学アカデミー (パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市, 2015 年 2 月 20–22 日).
- (8) 清武典子, 飛田泰男, 松田広一, 張春花, 新井賢, 砂川一浩, 肥後隆志, 矢吹映, 神山萌子, 櫛田和哉, 遠藤泰之, **大和修**. 猫のβ-ウレイドプロピオナーゼ欠損症: その臨床, 分子基盤および分子疫学. 日本獣医師会年次大会 (岡山コンベンションセンター, 岡山県岡山市, 2015 年 2 月 13–15 日).
- (9) 神山萌子, 矢吹映, 櫛田和也, **大和修**. 犬猫のガングリオシドーシスの回顧的診断法開発: パラフィン包埋試料を用いた免疫組織化学的診断法. 日本獣医師会年次大会 (岡山コンベンションセンター, 岡山県岡山市, 2015 年 2 月 13–15 日).
- (10) 櫛田和哉, Urs Giger, 因幡恵美, 今野喜夫, 林くれは, 野口佳那, 矢吹映, 水上圭二郎, 神山萌子, **大和修**. リアルタイム PCR 法を用いた赤血球ピルビン酸キナーゼ欠損症の遺伝子型検査法開発および国内猫集団における病原性変異アレル頻度. 日本獣医師会年次大会 (岡山コンベンションセンター, 岡山県岡山市, 2015 年 2 月 13–15 日).
- (11) 清武典子, 飛田泰男, 松田広一, 張春花, 新井賢, 砂川一浩, 肥後隆志, 矢吹映, 神山萌子, 櫛田和哉, 遠藤泰之, **大和修**. 猫のβ-ウレイドプロピオナーゼ欠損症: その臨床, 分子基盤および分子疫学. 九州地区獣医師会 (かごしま県民交流センター, 鹿児島県鹿児島市, 2014 年 10 月 4 日).
- (12) Yui Kobatake, Kanae Oyake, Toshihiro Tsukui, Hiroki Sakai, **Osamu Yamato**, Miyoko Saito, Makoto Urushitani, Shinsuke Kato, Jun Sakai, Sanae Shibata, Sadatoshi Maeda, Hiroaki Kamishina. Clinical, histopathological, and biochemical characterization of the canine model of SOD1-mediated amyotrophic lateral sclerosis. 第 37 回日本神経科学学会 (パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市, 2014 年 9 月 10–13 日).
- (13) 櫛田和哉, Urs Giger, 因幡恵美, 今野喜夫, 林くれは, 野口佳那, 矢吹映, 水上圭二郎, 神山萌子, **大和修**. 国内純血種猫集団における赤血球ピルビン酸キナーゼ欠損症の病原性変異アレル頻度. 日本獣医学会 (北海道大学, 北海道札幌市, 2014 年 9 月 9–12 日).
- (14) 吉野大輝, 脇谷晶一, 鳥巢至道, 八反田和寿, **大和修**, 田崎隆二, 藤田春雄, 西野光一郎. ETFDH 遺伝子点変異によるグルタル酸尿症 型発症ネコの解析. 日本獣医学会 (北海道大学, 北海道札幌市, 2014 年 9 月 9–12 日).
- (15) 小畠結, 酒井洋樹, **大和修**, 前田貞俊, 神志那弘明. 犬変異型 SOD1 遺伝子ヘテロ接合体の病理組織学的特徴. 中部地区獣医師会 (ホテルセンチュリー静岡, 静岡県静岡市, 2014 年 8 月 31 日).
- (16) 小宅香苗, 小畠結, 柴田早苗, **大和修**, 前田貞俊, 神志那弘明. 犬の変性性脊髄症

における呼吸機能の経時的変化. 中部地区
獣医師会 (テルセンチュリー静岡, 静岡県
静岡市, 2014年8月31日).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大和 修 (YAMATO, Osamu)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教
授

研究者番号: 80261337

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

川崎安亮 (KAWASAKI, Yasuaki)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教
授

研究者番号: 50211181

矢吹映 (YABUKI, Akira)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准
教授

研究者番号: 10315400

三浦直樹 (MIURA, Naoki)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准
教授

研究者番号: 80508036

(2) 研究協力者

岩永朋子 (IWANAGA, Tomoko)

鹿児島大学・共同獣医学部・動物病院・特
任助教