

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870118

研究課題名(和文) イヌの神経軸索ジストロフィーの原因遺伝子探索とヒト疾患モデルとしての応用

研究課題名(英文) Identification of Genetic Mutation in Papillon Dog Neuroaxonal Dystrophy, and Application as a Novel Animal Model for Human Infantile Neuroaxonal Dystrophy

研究代表者

坪井 誠也 (Tsuboi, Masaya)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：20721963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、パピヨン犬の神経軸索ジストロフィー(NAD)の原因遺伝子を明らかにすることを目的として実施した。まず、次世代型シークエンサーを用いた全エキソーム解析法により、PLA2G6 c.1516G>A変異を候補変異として同定した。次に、TagMan genotypingにより候補変異の浸透度を大規模にスクリーニング調査したが、本研究実施期間中にキャリア個体を摘発することはできなかった。また、NAD犬の神経組織にはLC3、p62、ATG5、ATG16L、Beclinなど、オートファジーに関与する様々なタンパク質が病変部のスフェロイドに蓄積していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to clarify the molecular pathogenesis of neuroaxonal dystrophy (NAD) in Papillon dogs. First, we carried out whole exome sequencing analysis against three NAD cases and five unaffected control Papillon dogs, and identified 10 candidate mutations. Among them, three candidates were determined to be “deleterious” by in silico pathogenesis evaluation, and only the PLA2G6 c.1516G>A mutation had an association with the presence or absence of the disease, suggesting that it may be a causal mutation of canine NAD. Although we performed massive screening mutation analysis, we could not expose any mutation-carrier dog, as the mutation penetrance was assumed to be extremely low. Further histopathological research revealed accumulation of autophagy-related proteins in the lesion, indicating aberrance in autophagy mechanism.

研究分野：獣医学

キーワード：イヌゲノム 神経軸索ジストロフィー 神経疾患 遺伝子病 パピヨン オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

次世代型シーケンサーの普及により、分子生物学的な研究手法は飛躍的な進歩を遂げた。特に、遺伝子の蛋白コード領域である exon に限定して塩基配列を決定する Whole exome sequence (WES) 解析は、

全ゲノムシーケンスと比較して安価で高深度なシーケンスが可能、ゲノムワイド関連解析と比較して少数の検体で解析できる、などの利点から、医学領域において頻繁に利用され、稀少疾患を含めた種々の遺伝性疾患の原因遺伝子が次々と明らかになってきている。一方、獣医学領域に関しては、イヌの遺伝性疾患については古くから犬種特異性が存在することが知られているものの、その遺伝的背景まで明確にされているものは少ない。

申請者は先行研究においてイヌの WES 法を新たに確立し、イヌの神経軸索ジストロフィー (Neuroaxonal dystrophy :NAD) という神経疾患の原因遺伝子を探索している。本疾患は小脳変性を特徴とする常染色体劣性遺伝の神経変性疾患で、国内ではパピヨンおよびその交雑種に 3 例報告されている。病理組織学的に小脳の神経細胞脱落と延髄、脊髄背角におけるスフェロイドの形成を特徴とし、ヒトの乳児型神経軸索ジストロフィー (Infantile neuroaxonal dystrophy:INAD) と類似した病態を示す。ヒトの INAD では *PLA2G6* (phospholipase A2 group 6) 遺伝子の異常が報告されているが、イヌの NAD の原因遺伝子はまだ特定されていない。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、パピヨン犬に発生する NAD の原因遺伝子を同定することを第一の目的とした。同時に、多症例スクリーニングによりキャリア個体を摘発し、新規

の発症予防を図ることを第 2 の目的とした。また、キャリアを摘発できた場合には、キャリア個体をコロニー化し、ヒト乳児型神経軸索ジストロフィーのモデルとして確立することも試みた。

## 3. 研究の方法

まず、NAD を発症したパピヨン犬の家系ゲノムから、WES 解析を実施した。

NAD 症例 3 例、うち 1 例の両親、およびコントロール群として未発症パピヨン犬 6 例の血液・凍結脳組織より gDNA を精製した。精製した gDNA から exome ライブラリを作製後、次世代型シーケンサー (SOLiD 5500xl) を用いて塩基配列を解読した。解読した塩基配列は既知のイヌゲノム配列 (Canfam3.1) ヘマッピング後、SNP 変異・indel 変異を抽出し、NAD 症例でホモ接合性・両親でヘテロ接合性変異を有し、コントロール群でホモ接合性変異がないものを抽出した。抽出した変異群に対して polyphen-2、PROVEAN、SIFT の解析ツールを用いて変異の毒性値を計算した。毒性値の高い変異に関しては TaqMan SNP genotyping assay を実施し、多検体のパピヨン犬について変異アレルの頻度を調査した。

上記解析によって同定された候補変異については、パピヨン犬を含む様々な犬種において多検体のスクリーニング調査を実施した。検体については麻布大学「犬の遺伝性疾患における原因遺伝子解析のための遺伝子 (DNA) バンク拠点形成」プロジェクト (平成 23 年度～平成 27 年度私立大学戦略的基盤形成支援事業) によって収集された DNA 検体を一部供与していただき、解析については上記の TaqMan SNP genotyping assay を利用した。

また、NAD の発症機序として、申請者らはオートファジーに着目して病理組織学

的検索を実施した。NAD を発症したパピヨン犬 5 例および同月齢のコントロールパピヨン犬 3 例の小脳を用い、オートファジーに関連する種々のタンパク質 ( Beclin、LC3 ( MAP1LC3 : microtubule-associated protein light chain 3 )、p62、ATG5、ATG16L、NBR1 および ubiquitin ) に対する免疫染色を実施し、その組織内分布を比較した。

#### 4 . 研究成果

WES 解析では *PLA2G6* c.1516G>A 変異が原因遺伝子として同定された。Canfam3.1 ヘマッピングでは、全てのサンプルで平均カバレッジ 3x 以上、マッピング率 85% 以上と良好なシーケンス結果が得られた。SNP 解析および Indel 解析では、11 個体で合計 173,849 個の SNP と 17,851 個の indel が抽出され、このうち 10 変異が NAD 症例でホモ接合性・両親でヘテロ接合性変異を有し、コントロール群でホモ接合性変異がなかった。 *in silico* 解析では、絞りこまれた 10 変異のうち、毒性度が高い変異が 4 つあった。この変異群に対し genotyping を行った結果、 *PLA2G6* c.1516G>A 変異アレルが発症の有無と対応していた。本変異は iPLA2B タンパク質の lipase motif 近傍の Ala を Thr に置換するが、この領域は種々の動物間で配列が保存されていた。今回特定された変異領域はアミノ酸配列が高度に保存されており、本変異がタンパクの酵素活性に影響を及ぼすことが示唆された。本研究は、国内の小動物獣医学分野で初めて新規変異が特定された事例であり、イヌゲノム研究においても WES 解析の有用性は高いと思われた。また、NAD の主病変であるスフェロイドにおいて、同定した遺伝子のタンパク質が発現することを免疫組織化学法により明らかにした。本研究の成果は 2014 年の学会発

表、および学術論文として公表した。

多症例における変異のスクリーニング調査では、主に未発症のパピヨン犬やその他犬種の DNA サンプルの収集にあたり、同定された *PLA2G6* c.1516G>A 変異についてジェノタイピングを行った。サンプル収集については麻布大学と鹿児島大学の協力もあり、短期間のうちに想定以上の DNA サンプル数を収集することが出来た。しかしジェノタイピング検査では、収集した未発症の個体はいずれも野性型のアレルを有することが分かり、全エキソーム解析法によって同定された変異アレルの浸透度は想定以上に低いことが示唆された。今回の研究ではキャリア個体は摘発できなかった。

NAD 症例におけるオートファジー関連分子の局在については、コントロール群ではブルキンエ細胞の細胞体に LC3 の顆粒状強発現像が認められたのに対し、NAD 群では細胞体における発現がランダムに減弱していた。また、NAD 群では、軸索近位のトルペドや、ブルキンエ細胞の投射先である深部小脳核 ( DCN ) のスフェロイドに LC3 の強発現像が見られた。ubiquitin に対する免疫染色では、コントロール群では有意な陽性像を認めなかったが、NAD 群ではトルペドやスフェロイドに顆粒状陽性像を多数認めた。神経細胞体における LC3 の発現が NAD 群で減弱していたことから、通常、オートファジーは神経細胞体で恒常的に機能しているが、NAD 群ではその機能が障害されている可能性が示唆された。また、トルペドやスフェロイド内には ubiquitin 化された変性タンパク質と、オートファゴソームの両者が局在するが、それらは分解されずに病変部に蓄積していることが示唆された。以上の成果は神経病理学会にて公表した。また追加検索の結果、一部のスフェロイドには ATG5、ATG16L、Beclin など、初期のオートファゴソーム形

成に關与するタンパク質の発現が認められ、NAD の病態発生にオートファジーの機能異常が生じていることが示唆された。これらの結果を併せて現在学術誌に投稿中である。

今回の研究の結果、WES 解析により候補遺伝子として挙がっていた *PLA2G6* c.1516G>A 変異を、パピヨン犬の NAD の原因変異として同定することができた。しかし、多症例について変異のスクリーニング調査を行ったものの、本研究実施期間中に変異キャリア個体を摘発することは出来なかった。今後さらに症例数を増やし、調査する必要があると考えられる。

#### 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1件)

1. Tsuboi M, Watanabe M, Nibe K, Yoshimi N, Kato A, Sakaguchi M, Yamato O, Tanaka M, Kuwamura M, Kushida K, Ishikura T, Harada T, Chambers JK, Sugano S, Uchida K, Nakayama H. (2017) Identification of the *PLA2G6* c.1579G>A Missense Mutation in Papillon Dog Neuroaxonal Dystrophy Using Whole Exome Sequencing Analysis. *PLoS ONE* 12(1): e0169002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169002>、査読有り

[学会発表](計2件)

1. 坪井誠也、渡邊学、二瓶和美、吉見奈津子、加藤明久、阪口雅弘、大和修、櫛田和哉、チェンバースジェームズ、菅野純夫、内田和幸、中山寛之：Whole Exome Sequence 法によるイヌ遺伝性神経疾患の原因遺伝子同定 第 11 回獣医内科学アカデミー、横浜、2014 年 2 月 19 日
2. 坪井誠也、二瓶和美、James Chambers、

内田和幸、中山裕之 神経軸索ジストロフィー犬の小脳におけるオートファジー関連分子の局在変化 第 55 回神経病理学会、東京都千代田区学術総合センター、2014 年 6 月 5 日・6 月 7 日

[その他]

ホームページ等

東京大学獣医病理学研究室

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/byouri/>

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

坪井 誠也 (TSUBOI, Masaya)

東京大学大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：20721963