

# イヌのバイオバンクプロジェクト

## *Canine bio-resource banking project*

阪口雅弘, 川原井晋平

麻布大学大学院獣医学研究科獣医学専攻

Masahiro Sakaguchi, Shinpei Kwarai

Department of Veterinary medicine, Graduate School of Veterinary Medicine, Azabu University

**Abstract:** Following rapid progress in human genetics research, the importance of construction of bio-resource banking system grows in the world. Whole genome association studies can identify gene polymorphisms in human DNA that cause particular diseases or are responsible for effects of medicines. However, identification of these genetic factors need many clinical and control cases with the DNA and serum in blood sample. Bio-resource banking system has already established in humans and allows us to use the large population samples. Dogs share many diseases with humans and bio-resource banking system is also useful for genetics research in dogs.

The objective of this study is to develop canine bio-resource banking system in Japan. For extraction of DNA from blood samples, we compared the efficacy of DNA extraction kit between Genomix 2.4 blood and QIAamp DNA Blood Midi Kit.

Eleven referral veterinary animal hospitals agreed with canine bio-resource banking project in Japan. Following allowance of the use of blood samples and patient data from the owners, the veterinarian will send samples and patient data to our laboratory in Azabu University. Genomix 2.4 blood was selected for extraction of DNA from blood samples because Genomix 2.4 blood is superior to QIAamp DNA Blood Midi Kit in that the amount of DNA extraction from 2 ml of the blood sample.

The developed canine bio-resource banking system would be a key source for genetics research in dogs. Progress of the research would lead to prevention and therapy of the genetic diseases in dogs.

## 1. 目的

2003年のヒトゲノムプロジェクトによる全ゲノム配列情報の解読に伴い、2002年から国際ハップマッププロジェクトが発足し、現在、ヒトゲノムに一般的な遺伝子多型についてのデータベースが公開されている<sup>1)</sup>。一塩基多型 (SNP) やコピー数多型 (CNV) などのデータベースをもとに遺伝子多型を網羅的に解析可能なマイクロアレイ技術が開発され、疾患の発症や薬剤の感受性などの表現系に関わる遺伝子の解析も既に行われている<sup>2,3)</sup>。塩基配列を解

読する次世代高速シーケンサーの開発により<sup>3)</sup>、個人の全ゲノム配列が市場規模で解読可能になり、蓄積された表現系に関わる遺伝子情報を参照に、倫理面に配慮しながら個人の遺伝子情報に基づいたオーダーメイド医療の実現化が近づいてきている。

イヌの全ゲノム配列情報は2003年に報告され<sup>4)</sup>、2004年にはDNAマーカーを用いた遺伝子情報をもとに犬種毎を区別することが可能となった<sup>5)</sup>。2005年には犬種間のSNPを含めたより精密なイヌの全ゲノム配列情報が報告され、現在、イヌの遺伝子多型情報をもとに、ヒトのゲノム研究と同様な手法を用

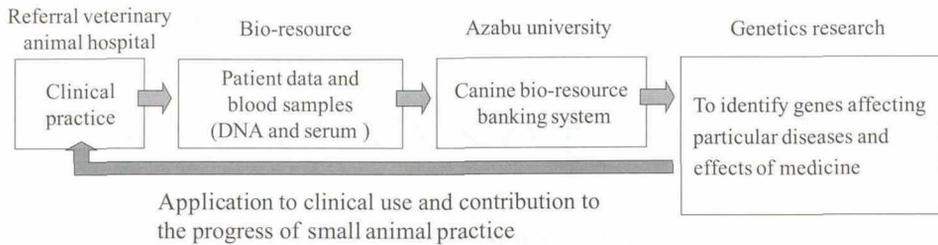


Fig. 1 Scheme of canine bio-resource banking project

いて、犬種内や犬種間の表現系の違いや疾患原因遺伝子の解析が行われている<sup>6)</sup>。

これら遺伝子情報の蓄積と解析技術の進歩によりゲノム研究は革新的に飛躍している。ヒトでは研究資源としての検体の重要性が高まり、研究資源の保管を目的にバイオバンクが設立されている<sup>7)</sup>。イヌにおいても、現在利用できなくとも近い将来に遺伝子解析技術を身近に利用できる機会が訪れることが予想される。すぐにその技術を研究に活用できるようにするために、これからの研究資源の確保が最重要課題となっている。

本研究は、大学発の先端獣医療としてイヌの遺伝情報を基にしたオーダーメイド獣医療を行うために、疾患原因遺伝子や症例の薬剤感受性に関わる遺伝子の解明を目標に、その解明に必要な日本国内におけるイヌの研究資源、特に疾患の発症に関する症例情報とDNAと血清について収集し、保管するシステムの構築を目的とする (Fig. 1)。今回は、全国からの検体収集保管システムと簡便なDNA、血清の抽出方法について検討を行った。

## 2. 方法

### 1) 検体の収集

全国11の大学付属動物病院 (東京大、農工大、岐阜大、鹿児島大、山口大、鳥取大、大阪府大、北里大、日獣大、日大、麻布大) に所属する先生方にイヌのバイオバンクについての趣旨を説明した後、プロジェクトへの参加に関する賛同を得た。各動物病院に来院し、確定診断のついた症例について、同意書による飼い主の理解を得た後、症例情報と血液を収集することとし、検体は麻布大学微生物学第1研究室において保管する。

### 2) 症例情報

犬種間における遺伝的多様性は人為的な品種改良に伴うボトルネック効果によって小さい<sup>6)</sup>。このため、疾患原因遺伝子を解明するには同一犬種間における遺伝子を比較することが必須である。症例情報は、犬種、性別、年齢、性格、体重、飼育環境とワクチン歴などに加えて、血統書の有無、疾患の確定診断名とその根拠および家族歴について収集を行うこととし、収集した症例情報はデータベース管理ソフト (FileMarker Pro9) (FileMarker, Santa Clara, CA, USA) を用いて保管する。

### 3) 血液

イヌの犬種別による大きさを考慮して、採血量は1頭あたり5 mlとした。5 mlの血液のうちDNA抽出用に2 mlをEDTA加採血管 (Venoject II) (Terumo, Tokyo, Japan) に入れ、血清用に3 mlを血清分離管 (Sepaclean-A-5) (Eikenkagaku, Tokyo, Japan) に入れ、検体の送付はヤマト運輸のクール便を利用し、採血後3日以内にDNA抽出および血清の採取を行う予定である。

### 4) DNA抽出

数万症例のDNAを抽出することを考慮して、抽出効率とコスト面についての比較をQIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen KK, Tokyo, Japan) (以下Qiagen) と個人の遺伝情報に応じた医療の実現化プロジェクトに利用されているGenomix 2.4 ml blood (Talent SRL, Trieste, Italy) (以下Genomix) を用いて行った。血液より抽出したDNAの純度 (A260/280比) と濃度 (白血球数  $1.0 \times 10^7$  個当たりのDNA量) を吸光度計 (Nanodrop ND-1000) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) により測定し、DNAの断片化がないことを0.5%アガロースの電気泳動

により確認した。電気泳動像はゲル撮影装置 (BioDoc-It System) (UVP, Upland, CA, USA) を用いて撮影した。抽出したDNAは $-30^{\circ}\text{C}$ バイオメディカルフリーザー (MDF-U538) (Sanyo, Tokyo, Japan) に保存する予定である。

#### 5) 血清採取

3500 rpm 15分間の遠心分離により、上清を回収後、 $-80^{\circ}\text{C}$ フリーズ超低温槽 (CLN-50CW) (Nihon freezer, Hyogo, Japan) に保存する。

### 3. 結果

#### 1) DNA抽出キットの比較

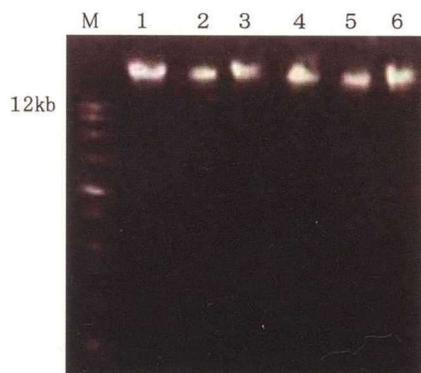
健康犬3頭より血液を各2 ml, 1 ml, 0.5 ml採血し、それぞれQiagenとGenomixを用いてDNAを抽出した。血液量2 ml, 1 ml, 0.5 mlにおける白血球数 $1.0 \times 10^7$ 個当たりの平均DNA収量 ( $\pm$  S.D.) は、それぞれQiagenでは $18.3 \pm 9.9 \mu\text{g}$ ,  $26.6 \pm 5.3 \mu\text{g}$ ,  $28.4 \pm 2.4 \mu\text{g}$ であり、Genomixでは $56.0 \pm 41.6 \mu\text{g}$ ,  $53.2 \pm 47.5 \mu\text{g}$ ,  $19.4 \pm 16.4 \mu\text{g}$ であった。血液2 mlと1 mlではGenomixのDNA収量が多く、血液0.5 mlではQiagenのDNA収量が多かった。血液2 ml, 1 ml, 0.5 mlにおけるDNAの純度はA260/280吸光度比の平均値 ( $\pm$  S.D.) がそれぞれQiagenでは $1.88 \pm 0.03$ ,  $1.86 \pm 0.07$ ,  $1.85 \pm 0.09$ であり、Genomixでは $1.91 \pm 0.03$ ,  $1.91 \pm 0.03$ ,  $1.88 \pm 0.05$ であった。両キットともにA260/280吸光度比の平均値はDNAの純度として適切な1.8~2.0の間であった。アガロース電気泳動の結果、両キット間にDNAの断片化は認められなかった (Fig. 2)。以上の結果より、イヌのバイオバンクでは血液2 mlからDNAを抽出するこ

とから、よりDNA収量が多く、DNAの純度に問題がないGenomixをDNA抽出方法として用いることにした。

### 4. 考察

本研究では、イヌのバイオバンクプロジェクトに必要なDNA抽出方法について、第一に検討を行い、次に検体の収集に関するシステムを構築した。DNA抽出方法に関して、市販され広く用いられているQiagenとヒトのバイオバンクに使用されているGenomixの比較を行った。Qiagenは血液量に合わせて200  $\mu\text{l}$ , 2 ml, 10 mlと異なるキットが販売されており、今回は血液2 ml (DNA量として最大60  $\mu\text{g}$ まで) 処理可能なQIAamp DNA Blood Midi Kitを用いた。血液1 mlと2 mlのDNA抽出量がGenomixより少なかったことについて、処理可能なDNA量を超えていた可能性が考えられた。QIAamp DNA Blood Maxi KitはDNA収量が最大600  $\mu\text{g}$ までと多いが1検体あたりの費用が約2000円であり、Genomixが約800円であることに対して高価である。カラムを用いずにDNAを抽出するGenomixは、DNAの純度が高いとされるカラムを用いたQiagenと同程度のDNAの精製効率であり、DNA抽出法をさらに改良することにより1検体あたりの費用をさらに1/4の約200円にすることも可能であることから (データ未記入)、Qiagenより多検体からのDNA抽出に適していると考えられた。

ヒトのバイオバンクプロジェクト<sup>7)</sup>は、ヒトの生物学としての医学、生命科学の研究と発展のために必要な生物検体と検体に関する情報を保管することを目的とする。日本では30万人を目標に、インフォ



The integrity and size of canine DNA was checked by agarose gel electrophoresis. DNA fragments were not observed under 12 kb in any lanes. M, DNA marker. 1-3 lanes, DNA extracted by Qiagen. 4-6 lanes, DNA extracted by Genomix.

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of canine DNA extracted from blood samples

ームド・コンセントの後に病歴と血液 (DNA と血清) を収集し、その集団を追跡することが試みられている (コホート研究)。日本では、2003年に理化学研究所ゲノム医科学研究センターと東京大学医科学研究センターヒトゲノム解析センターを中心に12の協力医療機関とともに個人の遺伝情報に応じた医療の実現化プロジェクト (略称: オーダーメイド医療実現化プロジェクト) が文部科学省の支援のもとに開始され、解析に多数の症例が必要な癌、糖尿病、心筋梗塞など多因子遺伝子疾患と難病を含め約40疾患を対象に①疾患原因遺伝子の解明、②エビデンスに基づく薬剤、診断法の開発、③個々の患者に最適のオーダーメイド治療の確立、④個人のリスクに基づく、個人の責任による疾患予防を目的に研究が行われており、現在20万人の患者の検体が収集されている。その成果としてインスリン抵抗性とインスリン分泌低下により成人に発症する2型糖尿病の原因遺伝子が近年報告されている<sup>8)</sup>。ヒトのバイオバンクに続いて、イヌにおいても、NIHのOstranderらとイヌのSNPデータベースを作成したBroad instituteのLindblad-Tohらは、アメリカケネルクラブ、獣医系研究者と協力をしてイヌのゲノムプロジェクトを行い、癌や免疫疾患、心不全など14疾患を対象に2005年までに2295症例 (98犬種) の検体を収集している<sup>9)</sup>。収集した検体をマイクロアレイによりSNPの遺伝子多型解析を行い、これまでにイヌの大きさに関する遺伝

子、皮毛の発育や毛色に関する遺伝子、進行性網膜萎縮症の疾患原因遺伝子など成果をあげている<sup>6)</sup>。日本におけるイヌのバイオバンクプロジェクトはこれから開始される予定である。ヒトのマイクロアレイ解析には1回のDNAの必要量がおよそ1 $\mu$ gであり、今回抽出されたDNA量は材料的に十分である。今回構築したイヌのバイオバンクシステムは将来的にヒトのバイオバンクやアメリカのイヌのゲノムプロジェクトと同様の成果を発信できることが考えられる。

### 参考文献

- 1) 国際HapMap計画ホームページ  
(<http://www.hapmap.org/index.html.ja>)
- 2) Ionita-Laza *et al.* *Genomics* 18 (2008) In press.
- 3) Applied Biosystems社ホームページ  
(<http://www.appliedbiosystems.co.jp/website/jp/home/index.jsp>)
- 4) Kirkness EF *et al.* *Science* 301(5641): 1898-1903 (2003)
- 5) Paker HG *et al.* *Science* 304(5674): 1160-1164 (2004)
- 6) Karlsson EK and Lindblad-Toh K, *Nat Rev Genet.* 9(9): 713-725 (2008)
- 7) 中村祐輔著, ゲノム医学からゲノム医療へ, 改訂新版第1刷, 羊土社, 東京, 2005年
- 8) Yasuda K *et al.* *Nature Genetics* 40: 1092-1097 (2008)
- 9) Dog Genome sequencing project homepage  
(<http://www.broad.mit.edu/mammals/dog>)