

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 水上 圭二郎

題 目 : Comprehensive study on multiple genetic disorders in pure breed dogs  
(純血種犬の多種遺伝子病に関する包括的研究)

### 論文要旨 :

In veterinary medicine, it is necessary to prevent and control genetic disorders in pure dog breeds in order to preserve the quality of these companion animals. The entire canine genome sequence was completed approximately 10 years ago and more than 150 disease-causing or associated mutations have been found in dogs. This advancement in canine genetics has contributed to many preventive measures against genetic disorders in pure breed dogs. However, a comprehensive study of multiple genetic disorders has not yet been performed in pure breed dogs. The objectives of my thesis are to develop novel molecular genotyping methods for canine multiple genetic disorders and to collect clinical and epidemiological data using these methods. Its aim is to prevent and/or control genetic disorders in pure breed dogs.

The Border Collie breed was chosen as a target in the present study. In this breed, 6 kinds of molecularly defined genetic defects were reported: neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL), trapped neutrophil syndrome (TNS), Collie eye anomaly (CEA), a 4-bp deletion in the canine *MDR1/ABCB1* gene associated with ivermectin toxicosis (IT), degenerative myelopathy (DM), and a congenital ocular and auditory abnormality associated with a merle hair coat (MER). The Border Collie breed also has a single nucleotide polymorphism in the *MDR1/ABCB1* gene associated with phenobarbital resistant idiopathic epilepsy (FRE). These 7 genetic disorders were investigated in this study. In this study, several genotyping methods were newly developed for NCL, TNS, IT, and FRE. Previous genotyping methods were used for CEA, DM, and MER. These genotyping assays included polymerase chain reaction (PCR)-length polymorphism assay, PCR-restriction fragment length polymorphism assay, PCR-primer-induced restriction analysis assay, mutagenically separated-PCR assay, and SYBR Green- and TaqMan minor groove binder probe-based real-time PCR assays. These genotyping assays were used for diagnosis of affected animals and epidemiological survey in the population of 469 Border Collies randomly collected from all over Japan.

Regarding NCL, the number of affected Border Collies was surveyed, and their clinical characteristics were analyzed. In 4 kennels with affected dogs, the dogs were genotyped. The genetic relationships of all affected dogs and carriers identified were analyzed. Regarding TNS, clinical and clinico-pathologic findings in a Border Collie that was molecularly diagnosed as TNS for the first time in Japan were analyzed. CEA was examined molecularly and epidemiologically in Hokkaido dogs. In addition, the genetic relationship between CEA and IT was investigated using 10 canine breeds. Finally, a simulation analysis for prevention of multiple genetic disorders in pure breed dogs was performed on the basis of the

allele frequencies of 7 genetic disorders reported in Border Collies.

All assays developed for genotyping in this study were available to discriminate all 3 genotypes, i.e., wild-type, carrier and affected animals. Of all assays, real-time PCR methods were the most suitable for large-scale examination because of its high throughput. The genotyping survey among 469 Border Collies demonstrated that mutant allele frequencies of NCL, TNS, IT, and MER were 3.5%, 5.5%, 0.2%, and 1.5%, respectively. The epidemiological survey for NCL revealed 28 affected dogs, but there was a decreasing trend at the end of the study period. The clinical characteristics of these affected dogs were updated in detail. The genotyping survey demonstrated a high mutant allele frequency (34.8%) in the 4 examined kennels. The pedigree analysis demonstrated that all affected dogs and carriers in Japan are related to some presumptive carriers imported from Oceania and having a common ancestor. The current high prevalence in Japan might be due to an overuse of these carriers by breeders without any knowledge of the disease. TNS was first molecularly diagnosed in Japan in a dog with characteristic clinical and clinico-pathologic findings. A Hokkaido dog affected ophthalmologically with CEA was proven to possess the CEA-associated mutation. The genotyping survey and pedigree analysis demonstrated that the allelic frequency of the CEA-associated mutation is very high (64.7%) in Hokkaido dogs. However, there was no apparent genetic relationship between CEA and IT based on the data collected from 10 canine breeds including Hokkaido dogs. The simulation analysis of prevention of multiple genetic disorders in Border Collies demonstrated the following issues. In the 6 genetic disorders except for FRE, the ratio of animals having 1, 2, and 3 mutant alleles was 35.2%, 7.0%, and 0.4%, respectively. There was no animal that had more than 4 different mutant alleles. The resulting ratio of animals without all 6 mutant alleles was still high (57.4%). This finding suggested that the preventive control using dogs free from the 6 genetic disorders can be carried out without changing the breed characteristics of Border Collies. The allele frequency of FRE was very high (24.8%) in Border Collies, but this allele should not be removed because it may be a polymorphism.

In conclusion, genotyping assays and clinical and epidemiological findings described in the present study will contribute to the establishment of canine breeds free from multiple genetic disorders in the future as well as provide novel clinical information and diagnostic methods for veterinary practitioners and researchers.

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	水上 圭二郎
審査委員	主査： 鹿児島大学 教授 大和 修
	副査： 鳥取大学 教授 森田 剛仁
	副査： 鹿児島大学 教授 川崎 安亮
	副査： 鹿児島大学 准教授 矢吹 映
	副査： 鹿児島大学 准教授 三浦 直樹
題目	Comprehensive study on multiple genetic disorders in pure breed dogs (純血種犬の多種遺伝子病に関する包括的研究)

### 審査結果の要旨：

純血種犬の遺伝的質を維持するためには、集団内に潜在する遺伝子病の予防・制御は不可欠である。犬全ゲノム配列の解読や近年の遺伝子解析技術の進歩により、数多くの犬遺伝子病の原因変異あるいは関連変異が明らかにされてきたため、純血種犬の遺伝子病の予防・制御はよりいっそう現実的な課題になってきた。しかしながら、これまで同一犬種において複数の遺伝子病を包括的に分析した研究は存在しない。そこで申請者は、比較的多種の遺伝子病の分子基盤が解明されているボーダーコリーを主な対象犬種として、複数の遺伝子病に対する新規検査法を開発するとともに疫学調査を実施し、それら疾患に対する包括的な予防・制御法を検討した。

ボーダーコリーにおいて分子基盤が解明されている 8 種類の疾患あるいは形質を対象とした。すなわち、神経セロイドリポフスチン症 (NCL)、捕捉好中球症候群 (TNS)、イベルメクチン中毒 (IT)、コリー眼異常 (CEA)、コバラミン吸収不良 (SCM)、変性性脊髄症 (DM)、マール毛色関連先天性視聴覚障害 (MER) およびフェノバルビタール耐性特発性てんかん (PRE) であった。これらの内、NCL、TNS、IT、SCM および PRE については新規の遺伝子型検査法を開発し、CEA、DM および MER については既存の方法を用いて、それぞれの疾患あるいは形質の遺伝子型頻度を明らかにした。また、NCL に関しては詳細な疫学調査を実施し、TNS に関しては発症例の臨床病理学的解析を行った。一方、CEA 病変を有する北海道犬において CEA 関連変異の有無を解析し、北海道犬集団における CEA の疫学調査を実施した。さらに、CEA と IT の遺伝的関連性について、コリー関連犬種および日本犬を含む 10 犬種の試料を用いて調査した。最後に、PRE を除く 7 疾患の変異アレル

を保有しない個体の割合を算出し、包括的遺伝子病予防の可能性と必要性について検討した。

本研究で開発された遺伝子型検査法は、各変異に関わる 3 つの遺伝子型（野生型ホモ接合、キャリアおよび変異型ホモ接合）を明確に識別できた。その中でもリアルタイム PCR を応用した遺伝子型検査方法が、大規模疫学調査に最も適していた。また、ボーダーコリー集団 (478 頭) に潜在する 8 種類の疾患関連変異のアレル頻度が明らかになった。すなわち、3.5% (NCL)、5.7% (TNS)、0.2% (IT)、14.5% (CEA)、1.5% (SCM)、0.7% (DM)、1.5% (MER) および 24.9% (PRE) であった。NCL の疫学調査では、これまでに日本国内で 28 頭の犬が発症していることが判明した。また、それらの NCL 疾患犬の一部を産出した 4 犬舎への追加調査によって、これらの犬舎では変異アレル頻度 (34.8%) が極めて高いことが明らかとなった。さらに、家系解析によって、NCL 疾患犬の大部分はこのような犬舎で産出されていることが判明した。そのため、遺伝子病の予防・制御は、病原性アレルを有する犬が多数飼育されている犬舎を検出し、そのような犬舎での繁殖を制御することが重要であると考えられた。また、国内で初めて TNS と診断された症例について、臨床病理学的特徴を明らかにした。一方、CEA の眼底所見および関連変異を有する北海道犬を同定し、初めてコリー関連犬種以外での CEA の存在を証明した。また、疫学調査により、北海道犬集団では、CEA 関連変異のアレル頻度 (64.7%) が極めて高いことが明らかになった。続いて、CEA と IT の遺伝的関連性について調査した結果、CEA 頻度の高い北海道犬が IT 関連変異を有しておらず、琉球犬が IT 関連変異のみを有することが明らかとなった。このため、CEA と IT には遺伝的関連性がないことが示唆された。最後に、疾患の発症に直接関与しない PRE を除くと、残りの 7 疾患の変異アレルを保有しないボーダーコリーは、集団全体の 56.1% を占めることが明らかになった。したがって、これらの 7 疾患を包括的に予防・制御した場合でも、一般に懸念されるような遺伝的多様性を喪失させるリスクは低いと考えられた。そのため、申請者は、純血種犬に潜在する遺伝子病を予防・制御するために、積極的かつ持続的な予防活動を実践する必要があると結論づけた。

以上のように、申請者は、ボーダーコリーの 5 種類の遺伝子病に関連する変異を検出する新規遺伝子型検査法を開発し、8 種類の遺伝子病に関連する分子疫学調査を実施して各疾患あるいは形質の変異アレル頻度を明らかにした。また、CEA や IT が日本の在来犬種にも存在することを明らかにした。さらに、純血種犬における多種類の遺伝子病の分析を行い、包括的予防に関する有用な方法を提案した。これらの知見は、純血種犬の遺伝的質の維持に大きく貢献すると考えられた。

以上により、本論文は博士（獣医学）の学位に十分に値すると判断された。