

学 位 論 文 要 旨

氏名 城間 萌子

題 目 : Molecular study on the diagnosis, genotyping, and allele frequency of multiple inherited disorders in dogs and cats

(犬および猫の多種遺伝子病の診断法、遺伝子型判定ならびにアレル頻度に関する分子的研究)

論文要旨 : At present, inherited disorders in animals are not so rare. In the Online Mendelian Inheritance in Animals which is the database of inherited disorders and traits in animals, more than 3,000 disorders/traits have been registered in 243 animal species. The number of identified causative variants for inherited disorders/traits have been increased according to the advancement of animal genetics after the canine and feline whole genome sequence projects were completed approximately 15 and 10 years ago, respectively. In such situation, diagnostic and genotyping methods based on the causative mutations become more important and necessary in veterinary medicine. The molecular diagnosis enables veterinarians to choose the appropriate therapeutic methods and to know the accurate prognosis. The genotyping methods can be used for epidemiological study to prevent and/or control genetic disorders. The study on inherited disorders using animal models would contribute to human medicine as well as animal disorders. The objectives of this thesis are to identify inherited disorders in animals and their causative mutation, develop their rapid and easy diagnostic and genotyping methods, and perform epidemiological study to know the allele frequency in the animal population.

Gangliosidosis is one of the inherited disorders likely to occur in veterinary fields. GM1 and GM2 gangliosidoses are progressive neurodegenerative lysosomal storage diseases resulting from the excessive accumulation of GM1 and GM2 gangliosides in the lysosomes, respectively. The disorders are more likely to occur in many animal species and breeds compared to other lysosomal diseases. Naturally occurring GM1 gangliosidosis has been reported in dogs, cats, ruminants, and wild animals. Naturally occurring GM2 gangliosidosis has been reported in dogs, cats, Yorkshire pigs, Jacob sheep, a rabbit, Muntjak deer, and American flamingos. In the first chapter, the case report of GM2 gangliosidosis variant 0 in a mixed-breed dog was described. In this case, the diagnostic methods for GM1 and GM2 gangliosidosis were employed based on comprehensive findings, which include clinical, biochemical, histopathological, and genetic findings using various types of specimens. Subsequently, the auxiliary diagnosis methods of both gangliosidoses using in situ detection of GM1 and GM2 gangliosides were established for animal cases suspected with gangliosidosis in the future. These novel methods were considered as useful for the retrospective diagnosis of suspected cases of all animal species whose paraffin-embedded cerebral tissues are stored.

In the second chapter, the epidemiological study for more common genetic disorders of pure-breed dogs was performed. The epidemiological data is important for prevent and/or control genetic disorders by

establishing breeding strategies. First, canine degenerative myelopathy (DM) in the Collie breed was selected. Canine DM is an adult-onset, progressive neurodegenerative disease that occurs in multiple dog breeds. A DM-associated mutation of the canine superoxide dismutase 1 (*SOD1*) gene, designated c.118G>A (p.E40K), has been implicated as one of pathogenetic determinants of the disease in many breeds, but it remains to be determined whether the c.118G>A mutation is responsible for development or progression of DM in Collies. Previously, a Rough Collie was diagnosed clinically and histopathologically as having DM in Japan, suggesting the possibility that the Collie breed may be predisposed to DM due to the high frequency of c.118G>A in Japan. The formalin-fixed spinal cord from the dog was further investigated by immunohistochemical analysis and a molecular epidemiological survey of c.118G>A in a population of Collies in Japan was performed to determine the mutant allele frequency (0.138). Secondly, canine progressive rod-cone degeneration (PRCD) was selected. Canine PRCD is a middle- to late-onset, autosomal recessive, inherited retinal disorder caused by a substitution (c.5G>A) in the canine *PRCD* gene that has been identified in 29 or more purebred dogs. A TaqMan probe-based real-time PCR assay was developed and evaluated for rapid genotyping and large-scale screening of this mutation. Furthermore, a genotyping survey was carried out in a population of the three most popular breeds in Japan (Toy Poodles, Chihuahuas, and Miniature Dachshunds) to determine the current mutant allele frequency (0.09, 0.02, and 0.00, respectively).

In conclusion, clinical and immunohistochemical diagnosis methods developed in the first chapter will contribute to the further expansion of understanding gangliosidosis. Furthermore, molecular epidemiological findings and data obtained in the second chapter will provide the novel and useful information of most popular pure-breed dogs in Japan for veterinary practitioners, researchers, and breeders.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	城間 萌子
審査委員	主査：鹿児島大学 教授 大和 修
	副査：鳥取大学 教授 保坂 善真
	副査：鹿児島大学 教授 田仲 哲也
	副査：鹿児島大学 准教授 矢吹 映
	副査：鹿児島大学 准教授 畑井 仁
題目	Molecular study on the diagnosis, genotyping, and allele frequency of multiple inherited disorders in dogs and cats (犬および猫の多種遺伝子病の診断法、遺伝子型判定ならびにアレル頻度に関する分子的研究)
審査結果の要旨：	
<p>本研究の目的は、犬および猫における遺伝子病およびその原因変異を明らかにし、その分子的特徴を応用した診断法や遺伝子型判定法を開発し、さらに分子疫学調査を実施して動物集団内でのアレル頻度を決定することである。この目的を達成するために、パラフィン包埋脳組織試料から作成した薄切組織切片において、免疫組織化学的方法で GM1 および GM2 ガングリオシドの蓄積を証明し、GM1 および GM2 ガングリオシドーシスを回顧的に診断する方法を開発した。また、その方法を一部応用することで雑種犬の GM2 ガングリオシドーシス 0 亜型（サンドホフ病）を新規に同定した。さらに、純血種犬集団内に高頻度に存在することで繁殖上の問題となっている遺伝子病 2 疾患について、それらの分子疫学調査を実施して、特定の犬種において高い変異アレル頻度で存在すること証明した。</p> <p>第一章：ガングリオシドーシスは、ライソゾーム酵素あるいは活性化蛋白の欠損に起因して、ガングリオシドが神経細胞内で過剰蓄積することにより、進行性の神経変性を引き起こす致死性のライソゾーム蓄積病である。GM1 および GM2 ガングリオシドーシスをあわせると、動物における報告数が比較的多い遺伝子病である。GM1 ガングリオシドーシスは、これまでに犬、猫、反芻動物、野生動物で報告されている。GM2 ガングリオシドーシスは、犬、猫、ヨークシャー種豚、ヤコブ種羊、ウサギ、ホエジカ、ベニイロフラミンゴで報告されている。本研究では、各種動物に潜在する未同定のガングリオシドーシスを回顧的に診断する方法を確立するために、薄切組織切片上の GM1 および GM2 ガングリオシドを免疫組織化学的に検出する技術を開発した。これらの新規手法はパラフィン包埋脳組織が保存されているすべての動物個体に適応可能であるため、ガングリオシドーシスの発症が疑われる症例の回顧的な補助診断に有</p>	

用であると考えられた。さらに、ここで確立した補助診断法を応用して、雑種犬における GM2 ガングリオシドーシスを新たに同定し、その他の生化学的検査所見等と総合して、最終的に本症例が新規の犬サンドホフ病を発症していることを証明した。

第二章：純血種犬においては、特定の品種内で頻繁に遭遇する遺伝子病がいくつか存在し、繁殖上の大きな問題になっている。本研究では、これらの遺伝子病の中から変性性脊髄症 (DM) および進行性杆体-錐体変性 (PRCD) を選択し、これらの遺伝子病の分子疫学調査を実施した。犬の DM は多犬種におこる成犬発症型の進行性神経変性疾患である。犬スーパーオキシドディスムターゼ 1 (SOD1) 遺伝子における DM 関連変異 c.118G>A (p.E40K) により、SOD1 蛋白凝集物が脊髄神経細胞内に蓄積することで、DM 発症を引き起こすことが明らかになっている。この DM 関連変異は、すでに多くの犬種 (ウエルシュ・コーギー、ジャーマン・シェパード、ボクサー等) において、DM の病原性決定因子の一つであることが明らかになっているため、それらの犬種は DM 好発犬種と考えられている。しかし、これまで国内のコリー犬種においては、同変異が DM 発症の主要な原因であることやコリーが DM 好発犬種であることは証明されていなかった。本研究では、以前に臨床的および病理組織学的に DM と推定されていたラフ・コリー孤発症例のホルマリン浸漬脊髄組織を用いて、犬 SOD1 蛋白凝集物が蓄積していることを免疫組織化学的に証明した。また、日本国内のコリー集団における c.118G>A の分子疫学調査を実施して、コリーにおける高い変異アレル頻度 (0.138) を証明した。これらの結果から、コリーも DM 好発犬種であることが明らかとなった。一方、犬の PRCD は中年齢から高年齢で発症する常染色体性劣性の遺伝性網膜疾患であり、犬 PRCD 遺伝子における 1 塩基置換 (c.5G>A) が原因となり、29 犬種以上の純血種犬で同定されている。本研究では、PRCD の遺伝子型を判別する TaqMan プロブを用いたリアルタイム PCR 法を開発した。さらに、日本国内において最も人気のある 3 犬種 (トイ・プードル、チワワ、ミニチュア・ダックスフンド) の集団を用いて分子疫学調査を実施し、各犬種における変異アレル頻度 (それぞれ 0.088、0.019、0) を算出した。これら結果から、トイ・プードルは国内においても PRCD 好発犬種であり、チワワでは初めて PRCD が存在していることが明らかとなった。

本研究で明らかとなった多くの知見は、犬および猫を含む動物の遺伝子病の診断に応用されて、新規遺伝子病の同定に寄与すると考えられた。さらに、将来的な純血種動物の繁殖に応用されて、健全な動物個体の生産にも寄与すると考えられた。

以上より、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。