

新規の遺伝性疾患である

ジャック・ラッセル・テリアの

遺伝性消化管ポリポースに関する研究

2021 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

(岐阜大学)

吉寄響子

新規の遺伝性疾患である

ジャック・ラッセル・テリアの

遺伝性消化管ポリポシスに関する研究

吉寄 響子

目 次

序 文	4
第 1 章 ジャック・ラッセル・テリアの遺伝性消化管ポリポーシスの病態解 析と原因遺伝子変異の検索	6
はじめに	7
材料および方法	10
結 果	19
考 察	29
小 括	35
図 表	36
第 2 章 ジャック・ラッセル・テリアの遺伝性消化管ポリポーシスの遺伝子 診断法の確立	61
はじめに	62
材料および方法	65
結 果	69
考 察	73
小 括	76
図 表	77
第 3 章 遺伝性消化管ポリポーシスに関する分子疫学的解析：ジャック・ラ ッセル・テリアにおける <i>APC</i> 遺伝子変異の保有率および犬種特異性 の検討	87
はじめに	88

材料および方法-----	90
結 果 -----	94
考 察 -----	100
小 括 -----	104
図 表 -----	105
総 括 -----	138
謝 辞 -----	140
参考文献 -----	142
要 旨 -----	154
英文要旨 -----	157

序 文

ペットブームや獣医療の高度化を背景に、ヒトと同様にイヌやネコにおいても遺伝性疾患が一般に、認識されつつある。動物の遺伝性疾患が登録されているシドニー大学のデータベースである OMIA (Online mendelian inheritance in animals) にはイヌで約 480 種類が登録されており (65), 100 種類以上の疾患において原因遺伝子変異が同定されている (58, 65)。純血種のイヌは、血統を維持するために同じ犬種の個体同士で交配されるため、遺伝性疾患が犬種を超えて拡がることは少なく、遺伝性疾患は犬種特異的な疾患として発生するケースが多い。また、ドッグショーのチャンピオン犬など優良な形質を有する特定の個体を繁殖に多用することがあり、繁殖用個体が遺伝性疾患の原因となる遺伝子変異を保有していた場合、特定の遺伝性疾患が犬種内に急速に拡がることもある (17)。

近年、小動物臨床の現場でも遺伝子検査が普及し (27, 58, 68), 遺伝性疾患が疑われる症例については、遺伝子検査により確定診断が得られるようになっている。また、繁殖に用いる個体の遺伝子検査を行うことにより、遺伝子異常を有する個体が繁殖から除かれることから、次世代に疾患原因遺伝子が受け継がれることを防ぐことが可能となる (11, 27, 68)。近年、変性性脊髄症、進行性網膜萎縮症、GM1 ガングリオシドーシスなどイヌのいくつかの遺伝子疾患についてはこのような取り組みが進みつつある。

イヌでは消化管上皮性腫瘍の発生はまれであるが、約 10 年前から、国内のジャック・ラッセル・テリアで消化管腫瘍性ポリープの症例が増加しており、犬種特異的な発生から遺伝性疾患が疑われている (54)。ジャック・ラッセル・テリアの消化管腫瘍性ポリープは、多発性に発生し、再発が多く、比較的若齢の個体において

も発生が見られるなど、一般的な犬の消化管上皮性腫瘍とは明らかに異なる特徴がみられる。これに類似する疾患としてヒトでは結腸や直腸に多発性に腺腫性ポリープが発生する遺伝性疾患として家族性大腸腺腫症 (Familial adenomatous polyposis, 以下 FAP) がよく知られている (14, 15)。FAP はがん抑制遺伝子である *Adenomatous polyposis coli* (以下 APC) 遺伝子の生殖細胞系列変異を原因とする常染色体顕性 (優性) 遺伝性疾患である (14, 15)。FAP の患者では腺腫性ポリープが 10 から 20 代といった比較的若い年齢で発生し、年齢とともにポリープの発生数は増加し、50 歳まで 90 %以上の患者で大腸癌が発生する (14, 15, 69)。

本研究では、ジャック・ラッセル・テリアで近年増加している消化管ポリポーシスを研究対象とし、第 1 章ではその臨床的および病理学的特徴を解析するとともに、ヒトの FAP の類似疾患であるという仮説を立て、APC 遺伝子の生殖細胞系列変異の検索を行った。また、ジャック・ラッセル・テリアに発生した消化管上皮性腫瘍を分子生物学的に解析し、腫瘍発生メカニズムの解析を行った。第 2 章では、第 1 章において原因遺伝子変異として同定された APC 遺伝子の生殖細胞系列変異 (c.[462_463delinsTT]) を検出するための 2 種類の遺伝子検査法を確立した。さらに、第 3 章では、第 2 章で開発した遺伝子検査法を用いて、日本国内のジャック・ラッセル・テリアにおける APC 遺伝子変異の保有率を明らかにするとともに、消化管上皮性腫瘍を発症した他犬種の症例について APC 遺伝子変異の有無を解析し、本疾患の犬種特異性について検討した。

第 1 章

ジャック・ラッセル・テリアの遺伝性消化管ポリポーシスの
病態解析と原因遺伝子変異の検索

I. はじめに

ヒトと異なり、イヌでは消化管上皮性腫瘍の発生はまれである (19, 36, 44)。米国の動物病院 (Animal Medical Center, New York) で病理解剖された 1 万頭以上のイヌを回顧的に解析した研究によると、胃および腸の上皮性腫瘍の発生率はそれぞれ 0.31% および 0.33% であったと報告されている (51)。一方、近年、日本国内のジャック・ラッセル・テリアにおいて、胃や大腸に腫瘍性ポリープが生じる症例が増加している (54)。ジャパンケンネルクラブの報告によると、ジャック・ラッセル・テリアの登録頭数にここ 10 年大きな変動はない (23)。したがって、疾患の増加は飼育頭数の増加に起因するものではないと考えられる。

純血種のイヌでは、血統を維持するために同じ品種の個体同士が交配され、また、近親交配や連続戻し交配などの繁殖方法が用いられることにより遺伝的多様性が低下する (13, 16, 17)。このため、近年、純血種の遺伝性疾患は、深刻な問題となっている (13) が、遺伝性疾患は品種を越えて拡がることは少なく、特定の犬種で高い頻度で発生することが多い (13, 16)。また、ドッグショーのチャンピオン犬など優良な形質を有する特定の雄を繁殖に多用することがあり、その犬が遺伝性疾患の原因となる遺伝子変異を保有していた場合、犬種内に遺伝性疾患が急速に広がることもあり、**Popular sire effect** と呼ばれている (13, 16)。したがって、ある疾患が特定の犬種で好発していることを手掛かりに、新規の遺伝性疾患が発見されることがある。また、イヌの遺伝性疾患は、その多くでヒトの類似疾患が認められるため、自然発生性の動物モデルとして医学と獣医学をつなぐ重要な位置を占めることがある (16, 57, 63)。しかし、遺伝性腫瘍においては、イヌでは、*BHD (FLCN)* 遺伝子変異に起因するジャーマン・シェパード・ドッグの腎嚢胞腺癌および結節性皮膚

線維症を除いて、原因遺伝子が明らかにされている遺伝性腫瘍の報告はない(35)。

一方、様々な腫瘍の好発犬種が存在し(16,57)、特定の犬種で好発する腫瘍は遺伝性腫瘍の可能性が高く、ジャック・ラッセル・テリアで増加している消化管腫瘍性ポリープも遺伝性疾患の可能性が指摘されている(54)。

ヒトでは大腸腫瘍の発生を特徴とするいくつかの遺伝性疾患が知られている(24)。FAPは、がん抑制遺伝子である*APC*遺伝子の生殖細胞系列変異を原因とする常染色体顕性(優性)遺伝症候群である(14,15,46)。FAPの患者では結腸や直腸に数百から数千の腺腫性ポリープが発生する(14,15,46)。FAPの患者ではポリープが10から20代と若齢で発生し、年齢とともにポリープの発生数は増加していく。未治療のまま放置すると、50歳までに90%以上の患者で腺腫性ポリープは腺癌へと進行する(14,15)。FAPは腺腫性ポリープの数に基づいて、密生型、非密生型および軽症型に分類される(14,15,46)。FAPにおいて800種類以上の*APC*遺伝子の生殖細胞系列変異が同定されており(5,14,15,46)、*APC*遺伝子変異の位置と臨床的な重症度は関連しているとの報告が多数ある(14,15,46)。5,000個以上の大腸ポリープが発生する密生型FAPでは、*APC*遺伝子のcodon 1250から1464の間に生殖細胞系列変異が認められ、codon 1309がホットスポットであることが明らかとなっている(14,46)。数百から数千個のポリープが発生する非密生型では、codon 158~312, 413~1249, 1465~1594の間に変異が認められる(14,15,46)。軽症型の患者では10個から100個未満(平均30個)のポリープが発生し、発症年齢も比較的遅く、*APC*遺伝子変異は5'および3'末端領域(codon 157より5'側およびcodon 1595より3'側の領域)とexon 9に認められる(15,29,46)。

興味深い事象としてFAP患者では、大腸以外にも腫瘍性及び非腫瘍性の病変が発生することが知られている。胃や十二指腸といった上部消化管にも病変は発生し、

胃においては、胃底腺ポリープが最も多く認められ、5 から 20 %の FAP 患者では幽門腺に腺腫が発生する (10, 15, 46)。FAP 患者では胃癌のリスクは一般の患者と比較して高く、特に日本や韓国などピロリ菌の関与する胃癌の発生が多い国では、その発生リスクが高いと報告されている (22, 45, 50, 72)。

FAP 患者の APC 生殖細胞系列変異の大半はナンセンス変異またはフレームシフト変異であり、短縮化した非機能性の APC たんぱく質が産生されるが (15, 28)、野生型アレル由来のたんぱく質が機能しているため、明らかな異常は生じない。しかし、FAP 患者では、がん抑制遺伝子の 2 ヒットモデルに基づき (31)、APC 遺伝子の残存する野生型アレルに後天的に異常が加わると、機能性 APC たんぱく質が完全に失われることにより腫瘍発生に至ることが明らかになっている (15, 21, 39, 59, 66)。

本章では、ジャック・ラッセル・テリアで認められた消化管ポリポージスが FAP に類似した遺伝性疾患であるという仮説を立て、本疾患の臨床的および病理学的特徴を解析するとともに、APC 遺伝子の生殖細胞系列変異の検索を行った。さらに、腫瘍発生メカニズムを明らかにするため、ジャック・ラッセル・テリアの消化管上皮性腫瘍において APC 遺伝子に後天的な異常が認められるか分子生物学的に解析した。

II. 材料および方法

1. 症例情報

胃，大腸あるいはその両方に腫瘍性ポリープの発生が認められた 21 頭のジャック・ラッセル・テリアについて解析した（剖検例なし）。各症例の性別，病変切除年齢，初発年齢，臨床症状，肉眼的または内視鏡検査により確認された病変の数と発生部位について Table 1-1 に記載した。また，組織の採取方法についてはそれぞれ Table 1-2 および 1-3 に記載した。そのうち，11 頭は 2016 年から 2019 年の間に岐阜大学動物病院（岐阜県岐阜市柳戸 1-1）または一般の動物病院（愛知県および岐阜県）に来院した症例で，血液および組織材料が採取された。残りの 10 頭は 2008 年から 2019 年に岐阜大学獣医病理学研究室で消化管上皮性腫瘍と病理組織診断された症例で，病理診断に用いたホルマリン固定パラフィン包埋組織（Formalin Fixed Paraffin Embedded sample，以下 FFPE）サンプルを収集した。動物のカルテ情報および検査結果の研究利用について飼い主から書面または口頭での同意を得た。また，罹患犬の血縁関係を評価するために，飼い主の同意を得て，血統書を収集した。

2. 病理組織学的解析

21 頭のジャック・ラッセル・テリアに発生した 46 個の消化管ポリープについて病理組織学的に解析した。病変の発生部位，切除方法，組織診断名についてそれぞれ Table 1-2，Table 1-3 に記載した。胃のポリープが 26 個（Table 1-2），大腸のポリープが 20 個（Table 1-3）含まれていた。検体は外科切除（ $n=29$ ）または内視鏡的切除（ $n=17$ ）によって採取された。すべてのサンプルは採取後に 10%中性緩衝ホルマリンで固定後，定法に従ってパラフィンで包埋し，ヘマトキシリン・エオジン

染色（HE 染色）標本を作製し、病理組織学的解析を行った。胃および大腸の腫瘍の分類は、動物の WHO 分類（19）およびヒトの WHO 分類（18, 32）に準じて行った。さらに、腫瘍の深達度について、TNM 分類を用いて評価した（1, 6）。また、腫瘍細胞における β -カテニンの発現と分布を検索するため、 β -カテニンに対する免疫染色を行った。一次抗体には抗マウス β -カテニンマウスモノクローナル抗体（Clone : 14/ β -catenin, BD Transduction Laboratories, アメリカ）を用いた。切片は脱パラフィン後、濃度勾配をつけたエタノールで親水化を行った。その後、抗原賦活化処理のため、イムノアクティブ（pH6.0）（松浪硝子工業株式会社, 日本）に浸漬し、オートクレーブで加熱して（121°C, 1 分）、十分に処理液の温度が低下したのち、内因性ペルオキシダーゼの不活化のため、室温にて 0.3%過酸化水素水/メタノール溶液に 20 分間浸漬した。その後、非特異的反応をブロックするために、湿潤箱内で切片に Protein Block Serum-Free（Dako, アメリカ）を載せ、10 分間室温で反応させ、1000 倍希釈した一次抗体を 4°C で 12 時間反応させた。次に、二次抗体として EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Mouse（Dako）を切片に載せ、30 分間室温で反応させた。発色は Liquid Dab+ Substrate Chromogen System（Dako）を用いて行い、マイヤーのヘマトキシリンを用いて対比染色を行った。 β -カテニンの発現については、その細胞内分布を細胞膜、細胞質および核と細胞質に分類した（38）。高倍率（ $\times 400$ 倍）で 500 個以上の腫瘍細胞を評価し、病変ごとの核陽性腫瘍細胞の割合（%）を算出した。一つの病変に含まれる腫瘍細胞が 500 個以下の場合にはすべての腫瘍細胞を評価した。

3. APC 遺伝子の生殖細胞系列変異の検索

3-1. 血液からの DNA 抽出

消化管腫瘍性ポリープの発生が認められジャック・ラッセル・テリア 11 頭（症例 No. 1-11）に加え，比較のため，他疾患のジャック・ラッセル・テリア 6 頭（肥満細胞腫 2 頭，門脈体循環シャント 1 頭，リンパ腫 1 頭，胆嚢炎 1 頭，肝臓腫瘍 1 頭）（Table 1-4），ボクサー 3 頭（健康な雄 1 頭および雌 2 頭），ビーグル 1 頭から血液を採取した。採取した血液は EDTA・2Na で抗凝固処理し，Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, アメリカ) または DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, ドイツ) を用いてゲノム DNA を抽出した。本実験は岐阜大学動物臨床試験倫理審査専門委員会の承認（E18016）を得て実施した。

3-2. FFPE サンプルからの DNA 抽出

消化管ポリープの発生が認められたジャック・ラッセル・テリアで血液の入手が困難であった 10 頭（症例 No. 12-21）については，FFPE サンプルから腫瘍周辺の正常組織を採取し，QIAamp DNA FFPE Tissue Kit（QIAGEN）を用いてゲノム DNA を抽出した。

3-3. PCR-ダイレクトシーケンス

血液が入手可能であった 11 頭について，*APC* 遺伝子のコーディング領域全域を検索した。公開されているイヌの *APC* 遺伝子 (GenBank accession No.: NC_006585.3) の情報を基にプライマーを設計した。イヌの *APC* 遺伝子は 16 個の exon からなり，exon 9 および 16 以外の exon については exon ごとに 1 組のプライマーを設計し，exon 9 に対しては 2 組，exon 16 に対しては 15 組のプライマーを設計した (Table 1-1)。PCR は Takara EX Taq Hot Start Version（タカラバイオ株式会社，滋賀）を用いて行った。DNA ポリメラーゼ (EX Taq Hot Start Version)，10X Ex Taq buffer（最

終 MgCl₂ 濃度：2.0 mmol/L), dNTP Mixture (最終濃度：各 0.25 mmol/L), 3'-および 5'-primer (最終濃度：各 0.15 μmol/L) を含む PCR 反応液に, 血液から抽出した DNA 1.0 μL を加えて 20 μL に調節し, Takara PCR Thermal Cycler Dice (TP600) (タカラバイオ株式会社) を用いて, 94°C・5 分を 1 サイクル, 94°C・30 秒, 60°C または 58°C・30 秒, 72°C・30 秒の 3 ステップを 35 サイクル, 72°C・5 分を 1 サイクルの反応で行った。反応後の PCR 反応液に, 6× Loading Buffer Triple Dye (ニッポン・ジーン, 日本) をそれぞれ 4 μL 添加し, 3 %アガロースゲル用いて, 100V・30 分間の電気泳動を行った。

FFPE サンプルからゲノム DNA を抽出した 10 頭の解析ではイヌの *APC* 遺伝子の codon 154 および 155 を含む 156 bp の領域が増幅されるようにプライマーを設計し (Table 1-5), codon 154 および 155 に変異がみられるか検討した。PCR は血液から抽出した DNA と同じ方法で実施した。ただし, 20μL の反応系では十分な PCR 産物が得られなかった症例 No. 15 および No. 21 については, PCR 反応液の総量が 50 μL になるように調整し, PCR を行った。

電気泳動後, 目的の長さの PCR 産物のみを 3 %アガロースゲルから選択的に切り出し, QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。

シーケンス反応には Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, アメリカ) を用いた。Big Dye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix 1 μL, 5× Sequencing Buffer 3.5 μL, 5'-または 3'-primer (1 μmol/L) 5 μL, 精製した DNA サンプル 5 μL (DNA 量 4-20 ng) に滅菌水 6.5 μL を加え, 反応液を調整した。T100 Thermal Cycler (BIO-RAD, アメリカ) を用いて, 96°C・1 分を 1 サイクル, 96°C・10 sec, 50°C・5 sec, 60°C・4 分の 3 ステップを 25 サイクル繰り返した後, 4 °C で維持した。反応液には 125mmol/L・EDTA を 5 μL を添加し, さらに 99.5 %エタノ

ール加え、精製した。精製後は Hi-Di ホルムアミド (Thermo Fisher Scientific) を 10 μ L ずつ添加し、T100 Thermal Cycler で 95°C, 2 分間加熱したのち、4°C で維持した。シーケンシング解析は岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野にて ABI Prism 3100/3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ドイツ) で実施した。全てのシーケンス解析において、塩基配列は Forward と Reverse の両方向から決定した。

4. 腫瘍組織における APC 遺伝子の体細胞変異および LOH の検索

ヒトの FAP 患者では、大腸腺腫や腺癌 (15, 21, 39, 59), 胃十二指腸腫瘍 (15, 66) といった FAP 関連腫瘍において、APC 遺伝子の体細胞変異や野生型アレルの消失 (ヘテロ接合性の消失: Loss of heterozygosity, 以下 LOH) が検出されており、消化管上皮細胞は 2 ヒットモデルに従って癌化することが示されている (20, 31, 33)。そこで、ジャック・ラッセル・テリアの消化管上皮性腫瘍において APC 遺伝子の体細胞変異や LOH の有無を検索した。

4-1. 新鮮組織からの DNA 抽出

5 頭のジャック・ラッセル・テリアの 6 個の腫瘍組織について、未固定の新鮮な組織が採取可能であった。6 個の腫瘍のうち 4 個が胃の病変で、2 個が直腸の病変であった。6 頭のうち 3 頭では病変周囲の肉眼的に正常な粘膜も採材した。それぞれの組織は 1 mm 角に刻まれ、DNA 抽出まで -80°C で保管された。ゲノム DNA は DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。

4-2. FFPE サンプルからの DNA 抽出

10頭のジャックラッセルセルテリアに発生した21個の腫瘍のFFPEサンプルを用いた。13個は胃の病変で、8個は大腸の病変であった。腫瘍組織あるいは腫瘍周囲の非腫瘍組織をそれぞれ選択的に切り出し、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN) を用いてゲノムDNAを抽出した。

4-3. PCR-ダイレクトシーケンス

6個の新鮮組織から抽出したDNAを用いて、*APC* 遺伝子のコーディング領域全域を検索した。PCR-ダイレクトシーケンスは生殖細胞変異の解析と同様の方法（前述3-3項）で行った。

4-4. PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法

ジャック・ラッセル・テリアの腫瘍組織における*APC* 遺伝子のLOHを検出するために、腫瘍の新鮮組織およびFFPEサンプルから抽出したDNAを用いてPCR-RFLP法を実施した。検索には3個の新鮮組織および20個のFFPEサンプルを用いた。同じ個体の腫瘍周囲の新鮮組織においては肉眼的に、FFPEサンプルにおいては組織学的に正常な組織を対照サンプルとして用いた。

PCR-RFLP法では、ジャック・ラッセル・テリアの罹患犬で認められた*APC* 遺伝子変異により、codon154及び155の塩基配列がAA（A、アデニン）からTT（T、チミン）に変化し、変異型アレル特異的に制限酵素 *MseI* の標的配列（TTAA）が形成されることを利用して、変異型アレル由来のPCR産物と野生型アレル由来の産物の相対量を計測した。PCRには、codon 154および155を含む156bpの領域を増幅するプライマー（Table 1-5）を用いた。PCRはTakara EX Taq Hot Start Version（タカラバイオ株式会社）を用いて行い、反応後のPCR反応液4μLを1.5%アガロー

スゲルで電気泳動し、目的のサイズの PCR 産物が増幅されていることを確認した。その後、残りの PCR 反応液 15 μ L に 0.1%ウシ血清アルブミンおよび 10X Buffer をそれぞれ 2 μ L 加え、10U の *MseI* (*RspRSII*) (タカラバイオ株式会社) を混ぜて 60°C で一晩反応させた。制限酵素処理を行った反応液は 15%ポリアクリルアミドゲル (スーパーセップ™DNA, 富士フィルム和光純薬株式会社, 日本) を用いて、20mA の定電流 (最大電圧 200V) で 90 分間電気泳動した。電気泳動はイージーセパレーター (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いて行い、分子量マーカーには 20 bp DNA ladder (タカラバイオ株式会社) を用いた。電気泳動後、ゲルを TBE バッファーで希釈したエチジウムブロマイド溶液 (ニッポン・ジーン) で染色し、紫外線を照射してゲル撮影装置 (OptimaShot OS-300, 和光純薬株式会社) で撮影した。撮影した画像上の各 DNA 断片の輝度を ImageJ (National Institute of Health, アメリカ) を用いて測定し、変異型アレル由来の断片 (51 bp) に対する野生型アレル由来の断片 (109 bp) の比率を算出し、同値の正常組織に対する腫瘍組織の相対量を評価した。

さらに、制限酵素処理後の PCR 産物を Agilent 2100 バイオアナライザー (Agilent Technologies, アメリカ) と Agilent DNA 1000 キット (Agilent Technologies) を用いてマイクロキャピラリー電気泳動で解析し、分離された各ピークの DNA 濃度を測定し、変異型アレル由来断片に対する野生型アレル由来断片の濃度の比率を算出した。

4-5. TaqMan リアルタイム PCR 法

ジャック・ラッセル・テリアの消化管腫瘍における *APC* 遺伝子の LOH をより定量的に評価するため、TaqMan リアルタイム PCR 法を用いて *APC* 遺伝子の野生型

および変異型アレルの DNA 量を測定した。TaqMan リアルタイム PCR 法では 3 個の新鮮組織および 18 個の FFPE サンプルを用いた。腫瘍周囲の肉眼的または組織学的に正常な組織を対照サンプルとして用いた。TaqMan PCR 法では、イヌの *APC* 遺伝子の codon 154 および 155 を含む 78 bp の DNA 断片を増幅するようにプライマーを設計した (Table 1-6)。また、変異型および野生型の塩基配列に相補的な配列を有する 2 種類のプローブ (TaqMan MGB probe, Thermo Fisher Scientific) を作製した。プローブの 5'末端に野生型のプローブには 2-chloro-7'phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein (VIC), 変異型のプローブには 6-carboxyfluorescein (FAM) というそれぞれ異なる蛍光色素を用い、蛍光色素で、3'末端はクエンチャー (Non Fluorescent Quencher) により修飾した (Table 1-6)。DNA ポリメラーゼ (AmpliTaq Gold DNA Polymerase Ultra Pure), dNTP mixture, リファレンス色素 (6-carboxy-X-rhodamine, ROX) が混合済みのプレミックス試薬である TaqMan Universal Master Mix (TaqMan MGB SNP Detection Kits, Thermo Fisher Scientific), Forward および Reverse プライマー (最終濃度: 各 0.9 $\mu\text{mol/L}$) および野生型および変異型プローブ (最終濃度: 各 0.2 $\mu\text{mol/L}$), 鋳型 DNA (10 ng) を含む全量 25 μL の PCR 反応液を調整した。PCR は, StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific) を用い, 95°C・10 分を 1 サイクル, 95°C・15 sec, 60°C・1 分の 2 ステップを 40 サイクル, 60°C・30 sec を 1 サイクルの反応で行った。2 ステップの増幅過程では, VIC および FAM の蛍光強度をサイクル毎に測定した。再現性を確認するため, すべてのサンプルについて 2 回ずつ実験を行った。リアルタイム PCR の結果は StepOne and StepOnePlus Software v2.3 (Thermo Fisher Scientific) により解析し, Threshold cycle (Ct) 値を決定した。サンプルごとに変異型アレルに対する野生型アレルの比率を算出し, さらに, 正常組織の値を 1 とした場合の腫瘍組織

の相対値 [Relative Quantification (RQ) 値] を算出した。RQ 値は $2^{-\Delta\Delta CT}$ (ΔCT : 変異型アレルの Ct 値-野生型アレルの Ct 値, ΔCT_N : 正常組織の ΔCT , ΔCT_T : 腫瘍組織の ΔCT , $\Delta\Delta CT = \Delta CT_T - \Delta CT_N$) で示した。

5. 統計解析

胃腺腫と胃腺癌における β -カテニンの核陽性細胞の割合を比較するため、Mann-Whitney の U 検定を実施した。p 値 ≤ 0.05 の時に統計学的に有意とした。

III. 結 果

1. 消化管腫瘍性ポリープを認めたジャック・ラッセル・テリアの臨床的特徴

1-1. 年齢と性別

消化管ポリープの発生年齢，性別については Table 1-1 に記載した。消化管ポリープの初発年齢は平均 7.7 歳であった（中央値：7.7 歳，範囲：2.3～12.6 歳）。中には消化管ポリープを診断される数か月あるいは数年前より消化器症状が認められた症例も含まれていた。21 頭中 6 頭（28.5%）は 5 歳以下で消化管ポリープと診断されており，最も若い個体は 2.3 歳であった（症例 No. 19）。また，雄（n=10）と雌（n=11）がほぼ同数含まれており（Table 1-1），ポリープの発生に性差は認められなかった。

1-2. 臨床症状

症例 No. 16 と 21 を除いた 19 頭について，臨床情報を得ることができた（Table 1-1）。胃にポリープが発生した症例では嘔吐が最も頻繁にみられ，14 頭中 10 頭で認められた（Table 1-1）。上部消化管の出血を示唆する吐血や黒色便は 4 頭で認められた（Table 1-1）。大腸ポリープが発生したジャック・ラッセル・テリアでは血便が最も多くみられ，11 頭中 9 頭と認められた。その他に，直腸ポリープが発生した症例では，直腸ポリープの脱出，肛門脱，しぶりなどが見られた。いずれの症例においても，診断時に転移は認められなかった。

1-3. 消化管ポリープの分布と数

消化管病変の分布と発生数は，手術時の肉眼的観察または内視鏡検査の結果に基

づいて決定した (Table 1-1)。胃ポリープは 14 頭で、大腸ポリープは 13 頭で観察され、そのうち 6 頭では胃と大腸の両方にポリープが発生していた。同時に胃と大腸の両方を内視鏡で検査した場合、半数以上の症例でその両方にポリープが検出された (8 頭中 5 頭, 62.5%)。胃のポリープは幽門部に好発し (n=29), 噴門部および胃体部 (それぞれ n=3, n=6) に発生したポリープは少数であった。大腸のポリープは直腸に集中していた (n=21, 91.3%)。半数以上の症例 (57.1%) で複数のポリープが認められ、初発および再発時の腫瘍数を累計すると平均 2.95 ± 2.68 (平均 \pm 標準偏差) 個のポリープが発生していた (Table 1-1)。最も多い個体では累計で 13 個ものポリープが発生していた。胃にポリープが発生した症例では 14 頭中 10 頭 (71.4%) で、大腸にポリープが発生した症例では 13 頭中の 3 頭 (23.1%) で複数のポリープが発生しており、胃ではポリープが多発する傾向にあった。

1-4. 再発と予後

5 頭で外科的切除後にポリープの再発が認められた (Table 1-1)。症例 No. 1 では、消化管上皮性腫瘍の再発が繰り返し認められた (Table 1-1 および Figure 1-1)。再発は外科的切除から 1 年から 6 年経過してから認められた (Table 1-1)。さらに、病理組織学的検査において初発時の腫瘍は取り切れていたこと、また、再発したポリープはほとんどの個体で原発病変とは異なる位置に発生していたことから、残存腫瘍からの再増殖による局所再発の可能性は低く、新たな病変の発生による再発と考えられた。

予後に関する情報は、主に臨床獣医師への聞き取りと飼い主へのアンケート調査によって収集した。12 頭では 1 年以上、そのうちの 10 頭では 2 年以上の予後情報が得られた。外科切除後または内視鏡検査後、2 年以内に死亡した個体は 1 頭も認

められず、1年 (n=12) および2年 (n=10) 生存率は100%であった。さらに、8頭中7頭 (87.5%) が3年以上生存しており、初めて診断を受けてから最長で9年生存している個体 (症例 No. 1) も認められた。本章で解析した症例のうち4頭で死亡が確認された。死亡個体は消化管上皮性腫瘍と診断されてから2から4年後に死亡しており、平均生存期間は3.5年であった。症例 No. 4では、内視鏡検査により胃体部にポリープが認められたが、外科的切除は行われず、診断から2年1ヵ月後に消化器症状により10.1歳で死亡した。症例 No. 8は、5.2歳で胃と十二指腸の病変を切除されたが、8.8歳で再発し、内視鏡検査により胃と大腸に病変が見つかり、その2ヵ月後に死亡した。症例 No. 16は、12.8歳の時に直腸ポリープの外科切除を受け、約4年後に死亡した (死因不明)。症例 No. 21は、9.8歳で直腸ポリープの外科切除手術を受け、13.8歳の時、肝臓腫瘍のため死亡した。No.21の肝臓腫瘍は細胞学的検査が実施され、胆管癌などの悪性上皮性腫瘍と診断されたが、病理組織学的検査は実施されず確定診断には至らなかった。また、これら4例とも死後の解剖は行われなかった。

2. 病理学的特徴

2-1. 内視鏡および肉眼的所見

胃および大腸の病変は類似の内視鏡像あるいは肉眼像を示した。ほとんどの病変は、管腔内に突出する無茎性のポリープ状で、その表面は滑沢あるいはわずかに分葉状で、赤色を呈する部位もしばしば認められた (Figure 1-2)。嘔吐がみられた症例では、幽門部に複数のポリープが内腔に突出するように増殖し、内腔が著しく狭小化していた (Figure 1-2A)。

2-2. 病理組織学的特徴

胃

合計 26 個の胃ポリープを病理組織学的に解析した。胃ポリープは過形成性ポリープ、腺腫、腺癌と診断された（それぞれ $n=3, 16, 7$, Table 1-2）。過形成性ポリープは、均一な丈の高い円柱状の上皮で構成され、核の極性が保たれていた（Figure 1-3A および B）。腺腫や腺癌では、腫瘍細胞が管腔状や乳頭状に増殖していた（Figure 1-3 C~F）。腺腫および腺癌は、動物の WHO 分類（19）に基づき、管状、乳頭状、管状乳頭状に細分類された（Table 1-2）。腺腫は管状腺腫が 2 例、乳頭状腺腫が 2 例、管状乳頭状腺腫が 12 例であった。腺癌は、管状腺癌が 2 例、乳頭状腺癌が 1 例、管状乳頭状腺癌が 4 例であった（Table 1-2）。

腺癌はいずれも低悪性で、腺腫と比較してわずかに細胞異型性が増していた（Figure 1-3E~F）。腺癌では、腫瘍細胞は明瞭な核仁を有し、核の大小不同が認められ、N/C 比が増大するなどより明確な細胞異型性を示し、核分裂像も観察された（Figure 1-3F）。さらに、腺癌では腫瘍細胞は核の極性を失い、しばしば多層化していた（Figure 1-3F）。また、ほとんどの腺癌で腺腫の成分が含まれていた（Figure 1-4A および B）。腫瘍は主に胃粘膜の表層で増殖し、その下層にある正常または拡張した非腫瘍性の腺管を覆っていた（Figure 1-4A）。外科切除された腫瘍のうち全層評価が可能であった 10 例について腫瘍の深達度を評価した。腺癌の一例で、リンパ管浸潤を伴う粘膜固有層への腫瘍細胞の浸潤が認められたが（Figure 1-4C, D）、粘膜筋板を超えた浸潤はいずれの腺癌にも認められなかった。ヒトの胃腫瘍の WHO 分類（32）を用いた組織診断および腫瘍の深達度を Table 1-2 にまとめた。ヒトの WHO 分類に照らし合わせると、腺癌は乳頭状（ $n=3$ ）または管腔状腺癌（ $n=4$ ）と診断された。ヒトの FAP 患者では、大腸外随伴病変として胃底腺ポリープ

が好発することが知られているが (10, 15, 46), 検索したジャック・ラッセル・テリアの症例では観察されなかった。

大腸

合計 20 個の大腸ポリープを病理組織学的に解析した。腺腫と診断された 1 例を除き、他の病変はすべて腺癌であった (Table 1-3)。腺癌は、動物の WHO 分類 (18) に基づき、すべて乳頭状腺癌に分類された (Table 1-3)。腺腫では、円形から楕円形の核を持つ円柱状の腫瘍細胞が、極性を保ちつつ、管腔状あるいは小型の乳頭状に増殖していた (Figure 1-5A および B)。腺癌も同様の増殖パターンを示し、腺癌では、腫瘍細胞は円柱状で、核の大小不同が中等度から高度にみられ、しばしば多層化していた (Figure 1-5C および D)。胃癌と同様に、多くの大腸病変では主に粘膜表層で腫瘍細胞の増殖が認められた。外科切除組織 (n=15) において腫瘍の深達度を評価したところ、腺癌の 1 例で粘膜固有層への浸潤が観察されたが、いずれの腫瘍においても粘膜筋板を超えた浸潤は見られなかった (Table 1-3)。大腸病変のヒトの大腸腫瘍 WHO 分類 (18) を用いた組織診断を Table 1-3 にまとめた。ヒトの WHO 分類では粘膜以深に浸潤した腫瘍のみが診断されるため (18), 動物の WHO 分類で腺癌と診断された腫瘍の多く (n=13) は高度の異型性を伴う腺腫と診断された (Table 1-3)。また、興味深いことに、1 頭の直腸組織では、粘膜の狭い領域に複数の腫瘍が局在していた (Figure 1-6A)。

大腸の Single crypt adenoma (Aberrant crypt focus)

FAP 患者では、肉眼的には正常な大腸粘膜において Single crypt adenoma と呼ばれる微小病変が認められる (15)。Single crypt adenoma は Aberrant crypt focus (異

常陰窩巢)とも呼ばれ, 単一の異型陰窩からなる病変が大腸粘膜内に複数形成される (15, 64)。Single crypt adenoma は FAP 患者で最も早期に発見される病変であり (15), ここから腺腫が発生するとされている (15)。大腸腫瘍が認められた2頭のジャック・ラッセル・テリア (症例 No. 17 および 20) において, 単一の異型陰窩から成る Single crypt adenoma に類似した病変が観察された (Figure 1-6B および C)。いずれのジャック・ラッセル・テリアにおいても, 腫瘍周囲の大腸粘膜内に2~3個の Single crypt adenoma が散在していた (Figure 1-6B および C)。

免疫組織学的染色 (β -カテニン)

ジャック・ラッセル・テリアの消化管ポリープにおける β -カテニンの発現を免疫組織化学的に検索した (Figure 1-7)。胃, 大腸のいずれにおいても, 病変部周囲の正常な消化管粘膜上皮では, β -カテニンは細胞膜に局在して発現していた (Figure 1-7)。胃の過形成性ポリープでは, 正常粘膜と同様に, β -カテニンは細胞膜に局在していた (data not shown)。一方, 胃と大腸の腺腫および腺癌では, β -カテニンの細胞質および核への蓄積が観察された (Figure 1-7)。胃の腫瘍では, β -カテニン核陽性細胞の割合の平均値は, 腺腫で 43.4%, 腺癌で 58.7%であり, 両者の間に有意差は認められなかった (Table 1-7)。大腸の腫瘍では, β -カテニン核陽性細胞の割合は腺腫で 59.1%であった。腺癌では平均値が 67.1%であり, 19例中16例で半数以上の腫瘍細胞に β カテニンの核陽性像が認められた (Table 1-7)。さらに, Single crypt adenoma においても, β -カテニンの細胞質および核陽性像が観察された (Figure 1-6D)。

3. APC 遺伝子の生殖細胞系列変異

はじめに、消化管ポリープの発生を認めたジャック・ラッセル・テリア 11 頭の血液から抽出したゲノム DNA を用いて、APC 遺伝子のコーディング領域全域の塩基配列を解析した。解析した 11 頭全頭で exon 4 に同一の生殖細胞系列変異 (c.[462_463delinsTT], GenBank ID: LC598892.1~LC598902.1) がヘテロ接合性に認められた (Figure 1-8A 中央図, 赤矢印)。一方で、対照として検索した他疾患のジャック・ラッセル・テリア 6 頭では同変異は検出されなかった (Figure 1-8A 左図)。同定された生殖細胞系列変異は連続する 2 塩基に認められ、2 つのコドンにまたがって存在し、前者は codon 154 においてアミノ酸が変化するミスセンス変異 (p.Q154N)、後者は codon 155 が終止コドンに陥るナンセンス変異 (p.K155X) であった (Figure 1-8A 中央)。

続いて、血液サンプルが入手できなかった消化管上皮性腫瘍の症例 10 頭について、FFPE サンプルから DNA を抽出して、APC 遺伝子に同一の生殖細胞変異が認められるか解析した。その結果、10 頭全頭で codon 154 と 155 に上記と同じ遺伝子変異が検出された (Figure 1-8A 右図, GenBank ID: LCLC600200.1-LC600209.1)。

ヒトの FAP では、生殖細胞系列変異の位置と疾患の重症度が関連している (Figure 1-8B) (14, 15, 46)。消化管ポリープに罹患したジャック・ラッセル・テリアでは生殖細胞系列変異は APC 遺伝子の 5'末端領域で同定され、この領域は軽症型 FAP 患者で変異が認められる領域であった (Figure 1-8B) (15, 46)。

4. 血統書を用いた血縁調査

飼い主より、消化管ポリープを発症したジャック・ラッセル・テリアの 21 頭のうち 6 頭 (症例 No. 1, 3, 6, 8, 10 および 21) の血統書を入手した。血統書には、

対象個体の3世代にわたる祖先が記載されていた。No. 1の母犬とNo. 6の祖母犬が同腹の姉妹であり、症例No. 1と6は共通の繁殖ペア (Figure 1-9A 赤丸) の子孫であることが明らかとなった。また、No. 10の母犬とNo. 8の祖母犬が異母姉妹であり、症例No. 8と10は共通の雄 (Figure 1-9B 赤丸) の子孫であった。以上のように、症例No. 1と6、症例No. 8と10の間に共通の祖先が認められた (Figure 1-9A および B)。

5. 腫瘍組織における *APC* 遺伝子の体細胞変異および LOH の検索

5-1. 体細胞変異

腫瘍組織の新鮮材料 (n=6) を用いて *APC* 遺伝子のコーディング領域全域の塩基配列を解析した。No. 5の胃腺腫 (No. 05S01) で codon 548 (c.1643dup) にフレームシフト変異が認められた。フレームシフトの結果、codon 559 に終止コドンが生じることが予測された (p.Leu548PhefsX12) (Figure 1-10B)。この変異は、腫瘍周囲の正常な粘膜から得られた DNA からは検出されなかった (Figure 1-10A)。したがって、腺腫で検出されたフレームシフト変異は、体細胞変異であると判断された。

5-2. *APC* 遺伝子座における LOH

PCR-RFLP 法による LOH の検出

アクリルアミドゲルを用いた電気泳動では、23個の腫瘍 (新鮮組織 n=3, FFPE n=20) および正常組織を解析したところ、野生型アレル由来の 109 bp の断片、変異型アレル由来の 58 および 51 bp の断片が観察された (Figure 1-11A および B)。各断片のバンドの輝度を測定し、変異型アレル由来の断片 (51 bp) に対する野生型アレル由来 (109 bp) の断片を比較し相対量を算出したところ、数個の消化管上

皮性腫瘍 (No. 06S01, 12S03, 17S02) でその相対量が周囲の正常組織と比べて減少していた (Figure 1-11C,)。さらに、同様に、マイクロキャピラリー電気泳動 (Figure 1-12A および B) で分離された各 DNA 断片の濃度を測定し、変異型アレル由来の断片に対する野生型アレル由来の断片の相対量を比較したところ、アクリルアミドゲルより明確に腫瘍における野生型アレルの相対的な減少が捉えられた (Figure 1-12C)。いずれの解析においても、消化管上皮性腫瘍で野生型の DNA 断片の減少が認められた。

TaqMan リアルタイム PCR 法による LOH の検出

消化管上皮性腫瘍における LOH をより定量的に評価するために、TaqMan リアルタイム PCR 法を用いて (Figure 1-13A および B)、変異型アレルに対する野生型アレルの相対量を算出した (Figure 1-13C)。1 例の腫瘍 (No. 12S03) では正常組織と比較して野生型アレルが 3 分の 1 以下に、3 例の腫瘍 (No. 01S01, 06S01, 17I02) では 6 分の 1 以下に減少しており (Figure 1-13C 赤矢印)、腫瘍組織における LOH が示唆された。また、TaqMan リアルタイム PCR 法で野生型アレルの減少が示された胃腺癌の 1 例 (No. 06S01) では、PCR-ダイレクトシーケンス法により *APC* 遺伝子の codon 154 と 155 における野生型アレル由来の配列の消失が腫瘍組織に特異的に認められ、LOH が生じていることが示唆された (Figure 1-13D および E)。

6. *APC* 遺伝子におけるイヌの一塩基多型 (Single nucleotide polymorphisms, 以下 SNPs) の発見

PCR-ダイレクトシーケンス法により決定されたジャック・ラッセル・テリアの *APC* 遺伝子の塩基配列を、公開されているイヌの配列 (GenBank accession No.

NC_006585.3, ボクサー犬) と比較したところ, 5 塩基の相違がみつかった (Figure 1-14)。消化管ポリープを発症したジャック・ラッセル・テリア (n=11) および他疾患に罹患したジャック・ラッセル・テリア (n=6) のいずれの個体でも認められたため, 疾患に関連した変異ではないと考えられた (Figure 1-14)。この塩基配列がジャック・ラッセル・テリアに特異的かを調べるため, ビーグル 1 頭およびボクサー 3 頭の exon 13 の塩基配列を確認したところ, これら 4 頭の配列もジャック・ラッセル・テリアと同一であった (Figure 1-14)。これらの結果から, 公開されているボクサーの配列に SNPs が複数含まれていると考えられた。実際, 5 つの違いのうち 3 つは NCBI の SNPs データベースにすでに登録されていた (rs850906243, rs852139532, rs851619666)。これらの SNPs は, イヌの APC 遺伝子のエクソン 13 (GenBank accession No. XM_014111995.1) の 3'領域に集中していた。今回決定した配列を元に exon 13 の 3'領域のコーディング領域を決定すると, ヒトの exon 13 (GenBank accession No. NC_000005.10) と対応するように, 現在予測されている位置から 9 塩基下流に exon 13 と intron 13 の境界があると考えられた (Figure 1-14)。

IV. 考 察

イヌでは、疾患の好発犬種を特定し、原因遺伝子の検索をすることすることにより遺伝性疾患の発見につながることもある。2010年代中頃から、ジャック・ラッセル・テリアにおいて消化管ポリープの症例が増加していることが小動物臨床や病理診断に携わる獣医師によって指摘され、遺伝性疾患ではないかと疑われてきた。実際、岐阜大学獣医病理学研究室の病理診断記録を回顧的に調査し、2012年から2018年の間に胃・大腸の腺腫または腺癌と診断されたイヌの犬種別の割合を調べたところ、ジャック・ラッセル・テリアが最も多く、18.0%（178頭中32頭）を占めていた（Figure 1-15）。はジャパンケネルクラブによると、最近の10年間（2011年～2020年）で登録されたイヌ（約300万頭）のうち、ジャック・ラッセル・テリアの占める割合はわずか1.3%である（23）。一方で、胃・大腸の腺腫または腺癌と診断された犬種のうち、2番目に多いミニチュア・ダックスフンドの飼育頭数はジャック・ラッセル・テリアの約6倍であった（23）。これらのことから、飼育頭数と消化管上皮性腫瘍の発生数に大きな隔たりがあり、ジャック・ラッセル・テリアにおいて消化管上皮性腫瘍が好発していることは明らかであった。また、本章により、ジャック・ラッセル・テリアの罹患犬では消化管ポリープが多発性に認められ、さらに、若齢での発症症例が含まれていたことから、本疾患が新規の遺伝性疾患であることが疑われた。病理学的にはジャック・ラッセル・テリアの消化管ポリープは腺腫または腺癌であることから、本疾患は、若年性ポリポーシス、Peutz-Jeghers 症候群、Cowden 症候群などの過誤腫の発生がみられる疾患でなく（25）、FAPの類似疾患である可能性が高いと考えられた。本研究では、FAPの原因遺伝子であるAPC遺伝子を解析したところ、消化管ポリープを認めた21頭すべてのジャック・ラッセル・

テリアに同一の生殖細胞系列変異 (c.[462_463delinsTT]) がヘテロ接合性に認められ、本疾患が FAP に類似した常染色体顕性 (優性) 遺伝性疾患であることが証明された。FAP 患者では 800 種類以上の APC 遺伝子変異が同定されており (5, 14, 15, 46), そのほとんどがナンセンス変異またはフレームシフト変異で、これらの変異により短絡化した非機能性の APC たんぱく質が翻訳される (15, 28)。ジャック・ラッセル・テリアの罹患犬で発見した生殖細胞系列変異はナンセンス変異 (p.K155X) であり、ヒトの報告と一致していた。

FAP は大腸ポリープ発生数によって密生型, 非密生型, 軽症型に分類され, その疾病表現型と APC 遺伝子の生殖細胞系列変異の位置が相関している (14, 15, 46)。ジャック・ラッセル・テリアの生殖細胞系列変異は, ヒトの FAP では軽症型の患者で変異が認められる APC 遺伝子の 5'末端領域に位置していた (Figure 1-8B) (7, 15, 29, 37, 46, 60)。FAP 患者では通常, 数百から数千の大腸ポリープが認められるが, 軽症型では 10 から 100 個未満 (平均 30 個) のポリープが発生する (15, 29)。本研究のジャック・ラッセル・テリアにおいて, 消化管ポリープの発生数は 1 個から数個 (平均 2.3 個) で, 最大でも 13 個であった。腫瘍の発生数の少なさは, ヒトと比較して, イヌでは消化管上皮性腫瘍の発生数が低いことを反映している可能性がある (19, 36, 44, 51)。APC 遺伝子の生殖細胞系列変異の位置および疾患の重症度を考慮すると, ジャック・ラッセル・テリアの消化管ポリポーシスはヒトの軽症型 FAP の類似疾患であると考えられる。

次に, 罹患したジャック・ラッセル・テリアの血統書を解析したところ, 罹患犬の間に血縁関係があることが示され, 本疾患が遺伝性疾患であることが示された (Figure 1-9)。一方で, 本研究で対象としたジャック・ラッセル・テリアは全て家庭犬であったため, 血縁のある個体の追跡は難しく, その両親や同腹犬などの近親

個体の遺伝子検査はできなかった。また、本疾患が成犬になってから発症する疾患（adult-onset disease）であることが、血縁個体の追跡をより困難にした。APC 遺伝子変異の家系内伝播の直接的な証明には、さらなる研究が必要である。

本研究におけるジャック・ラッセル・テリアに見られた Single crypt adenoma は、FAP の患者では、初期病変として発生し、腺腫へ進展する（15）ことが知られている。ヒトでは複数の Single crypt adenoma の発生が FAP に特徴的な所見とみなされており（15）、Single crypt adenoma の検出はイヌにおける遺伝性消化管ポリポーシスの病理組織学的診断にも有用と考えられる。また、APC 遺伝子の生殖細胞系列変異を有するジャック・ラッセル・テリアでは腫瘍が再発するリスクが高いが、粘膜内に存在する Single crypt adenoma が新たな腫瘍の発生母地と考えられる。さらに、ジャック・ラッセル・テリアの消化管上皮性腫瘍には APC 遺伝子に体細胞性変異や LOH が認められ、FAP 患者の大腸腺腫と同様に、残存する APC 野生型アレルの不活性化が腫瘍発生に関与していることが示された（15, 21, 39, 59, 64, 66）。また、FAP 患者の大腸腫瘍で示されているように（15, 64）、ジャック・ラッセル・テリアの消化管上皮性腫瘍において機能的な APC たんぱく質が喪失していることは、 β -カテニンが核や細胞質内に蓄積していることから示唆された。以上より、ジャック・ラッセル・テリアの消化管ポリープは、FAP 患者の大腸腺腫と形態的および分子生物学的に類似した過程を経て発生に至ることが示された。

ヒトの FAP とジャック・ラッセル・テリアの消化管ポリポーシスでは、腫瘍発生の好発部位が異なっていた。ヒトの FAP では大腸病変が主となるが、APC 遺伝子変異を有するジャック・ラッセル・テリアの病変は胃で最も多く認められた。胃腺腫は FAP 患者の 5 から 20%程度で発生する大腸外随伴病変である（10, 15, 46）。一方で、ジャック・ラッセル・テリアでは全体の 3 分の 2 で胃腺腫または胃腺癌が

認められ、さらに、胃では病変が多発する傾向にあった。腫瘍発生部位の違いは FAP のモデルマウスでも報告されている。*Apc*^{Min/+}マウスは、*Apc* 遺伝子の生殖細胞系列変異を有する FAP のモデルマウスであるが、大腸よりも小腸に腫瘍が多く発生する (42, 43)。同様に、他の FAP モデルマウスでも小腸腺腫の発生が多いことが報告されている (47)。これらのことから、*APC* 遺伝子に生殖細胞系列変異が生じることによって、動物種を問わず消化管での発癌リスクが亢進するものの、腫瘍の好発部位は動物種により異なることが示唆されたが、その機序は不明である。さらに、ヒトの FAP と異なり、ジャック・ラッセル・テリアでは大腸病変のほとんどが腺腫ではなく腺癌と診断された。動物の WHO では、浸潤性が乏しい場合でも、細胞や構造の異型性に基づいて腺癌と診断されるが (19)、ヒトの WHO 分類では、腫瘍が粘膜筋板を越えて浸潤した場合、大腸腺癌と診断されている (18)。ジャック・ラッセル・テリアの消化管上皮性腫瘍をヒトの WHO 分類に照らし合わせて診断すると、大腸病変のほとんどが、高度異型性を伴う腺腫 (adenoma with high-grade dysplasia) と診断された (Table 1-3)。この相違点は、ヒトと動物の間で、消化管上皮性腫瘍の組織学的な診断基準が異なることに起因すると考えられる。

ジャック・ラッセル・テリアに遺伝性に発生した消化管上皮性腫瘍は、他犬種にみられる散発性腫瘍とは異なる病理組織学的特徴を示した。組織学的な増殖パターンに基づいて腫瘍を分類したところ、ジャック・ラッセル・テリアでは、イヌの胃癌で多く認められる印環細胞癌 (19, 44) は認められなかった。また、散発性胃癌と異なり、ジャック・ラッセル・テリアの胃腺癌では粘膜筋板を超えた浸潤が観察されず、浸潤性が乏しい腫瘍であることが示された。しかしながら、ジャック・ラッセル・テリアの胃腺癌でも、1例で粘膜固有層への浸潤が認められたことから、ごくまれに、浸潤性腫瘍へ進展する可能性もあると考えられる。今後、死亡症例の

剖検も含めて、さらなる解析が必要である。また、一般に、イヌの消化管上皮性腫瘍の症例は、診断時にすでにリンパ節転移や遠隔転移を伴っていることが多いが(2, 49, 62), ジャック・ラッセル・テリアの症例では転移は認められなかった。これらの所見と一致して、他犬種の消化管上皮性腫瘍の症例と比べて(2, 19, 44, 49, 62), ジャック・ラッセル・テリアの症例は明らかに良好な生存率を示した。

これまでに、胃あるいは腸管腫瘍の好発犬種が複数報告されているが(2, 16, 44, 51, 52, 56, 61), その中にジャック・ラッセル・テリアは含まれていない。今回解析したジャック・ラッセル・テリアの症例の多くは2000年代に出生していた。よって、本疾患の原因となるAPC遺伝子の生殖細胞系列変異はこの時期に日本のジャック・ラッセル・テリアに広がった可能性がある。純血種では、繁殖に多用された雄犬が遺伝子変異を持っていた場合に急速に遺伝性疾患が広がること(Popular sire effect)が知られており(16), 同様の機序で広まった可能性が考えられる。また、6頭の血統書の解析では、2組4頭の症例で血縁関係が認められたものの、両家系には血縁はなく、さらに、残る2頭は他の症例と一切血縁関係がなかった。したがって、本疾患の原因となるAPC遺伝子の生殖細胞系列変異は、特定の家系に限らず、日本国内のジャック・ラッセル・テリアの間に広く拡散している可能性がある。よって、今後、ジャック・ラッセル・テリアにおいてどの程度APC遺伝子変異が広がっているのか、その保有率を明らかにする必要がある。

本研究により、ジャック・ラッセル・テリアの消化管ポリポースでは、①多発性ポリープの発生、②若齢での発生、③再発といった、散発性消化管腫瘍とは異なる特徴が認められることが明らかとなった。一方、消化管ポリポースに罹患したジャック・ラッセル・テリアの中には、ポリープが孤在性に発生する症例も認められ、さらに、10歳を超えて初めて腫瘍が発生する症例も認められた。したがって、

典型的な特徴(①～③)が認められない場合でも、本疾患を否定することはできず、臨床情報のみで遺伝性疾患か否かを診断することは不可能である。本疾患の症例は、散発性消化管腫瘍の症例と比較して予後が良く、長期間の生存を望めるが、一方で再発のリスクが高く、両者の鑑別を可能にする遺伝子検査が必須であると考えられる。

V. 小 括

本章では, ジャック・ラッセル・テリアの消化管ポリポーシスの病態がヒトの FAP に類似していることに着目し, 本疾患が APC 遺伝子の特定の生殖細胞系列変異 (c.[462_463delinsTT]) を原因とする新規の遺伝性疾患であることを明らかにした。原因となる生殖細胞系列変異を特定したことで, 今後, 動物臨床の現場ではこの変異に着目した遺伝子検査による確定診断が可能となり, 加えて, 繁殖段階で実施できれば遺伝子変異が受け継がれることを防ぎ, 疾患の拡散を防ぐことができると考えられる。

また, 本章では, 遺伝性消化管ポリポーシスの病態を解析し, 本疾患の症例では, ①多発性のポリープ, ②若齢発生, ③再発という散発性消化管腫瘍と異なる特徴がみられ, 本疾患を診断する上で重要な手掛かりになることを明らかにした。一方で, 臨床的には散発性腫瘍と鑑別が困難な症例がいることも明らかになった。今後, 遺伝性消化管ポリポーシスの確定診断を可能にする遺伝子検査法の開発が急務である。

第 1 章

图 表

Table 1-1. Summary of clinical information from Jack Russell Terriers with gastrointestinal polyps

Case No.	Age at diagnosis		Sex	Clinical symptoms	Number and location of gastrointestinal polyps*									
	Initial occurrence	Recurrence			Stomach			Colorectum			Total			
					Cardia	Corpus	Antrum	Unrecorded	Total	Colon		Rectum		
1	4y0m		F	(-)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	1	1
		5y4m		(-)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	1	1
		7y8m		Vomiting, Bloody stool	0	0	1	0	1	ND	ND	1	1	1
		8y6m	F (Spayed)	No symptoms	0	0	1	0	1	ND	ND	ND	ND	ND
		9y2m		No symptoms	0	0	7	0	7	ND	ND	ND	ND	ND
		11y4m		Bloody stool	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
2	7y10m		M	Bloody stool	1	0	1	0	2	1	1	0	0	1
		8y8m		Bloody stool	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
3	6y2m		F	Vomiting, Anorexia	0	2	3	0	5	0	0	0	0	0
4	8y0m		M	Melena, Soft stool, Anorexia	0	1	0	0	1	ND	ND	ND	ND	ND
5	12y1m		F (Spayed)	Vomiting, Hematemesis, Melena, Emaciation	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0
6	6y6m		F (Spayed)	Vomiting	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
		(8y6m) [†]		Vomiting, Hematemesis, Melena	0	2	1 ^{††}	0	3	0	0	0	0	0
7	10y3m		F (Spayed)	Bloody stool, Soft stool	0	0	0	3	3	0	0	1	1	1
8	5y2m		F	Vomiting, Anorexia	0	0	0	1	1	ND	ND	ND	ND	ND
		8y9m		Bloody stool, Tenesmus	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1
9	3y		F	Vomiting	0	0	1	0	1	ND	ND	ND	ND	ND
10	13y		F	Tenesmus	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	1	1
11	5y		M (Neutered)	Vomiting, Bloody stool, Tenesmus, Anorexia	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1
12	7y8m		F (Spayed)	Vomiting, Melena	0	0	1	0	1	0	0	ND	ND	ND
		13y10m		Vomiting	1	0	1	0	2	ND	ND	ND	ND	ND
13	5y3m		M	Bloody stool	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	1	1	1
		7y3m		Bloody stool, Vomiting	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	2	2	2

Table 1-1. Summary of clinical information from Jack Russell Terriers with gastrointestinal polyps (continued)

14	6y	M (Neutered)	Diarrhea, Prolapse of polyp	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	1	1
15	10y5m	M (Neutered)	Vomiting, Emaciation	0	1	1	0	2	ND	ND	ND	ND
16	8y10m	F	(-)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	1	1
17	7y3m	M (Neutered)	(-)	0	0	1	0	1	ND	1	1	1
	8y4m		(-)	0	0	1	0	1	ND	1	1	1
	8y11m		Bloody stool	0	0	1	0	1	ND	1	3	3
18	12y4m	M (Neutered)	Bloody stool	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	1	1
19	2y3m	M	Vomiting	0	0	4	0	4	ND	ND	ND	ND
20	11y8m	F (Spayed)	Bloody stool, Anorexia, Rectal prolapse	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	1	1
21	9y9m	M (Neutered)	(-)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	1	1

* Number and location of gastrointestinal polyps based on endoscopic findings and macroscopic observation at the time of surgery.

† Second endoscopic examination was performed due to exacerbation of digestive symptoms. Newly developed lesions were detected in addition to enlargement of primary lesion (antral lesion marked with †*).

(-): No information was available.

ND: Endoscopic examination was not performed.

Table 1-2. Histopathological diagnosis of gastric polyps

Case No.	Lesion No.	Location	Method of excision	Histological diagnosis		Depth of Invasion (T status) ^{3,4}
				Classification of animal tumors ¹	Classification of human tumors ²	
7	07S02	Antrum	E	Hyperplastic polyp		(-)
	07S03	Antrum	E	Hyperplastic polyp		(-)
17	17S01	Antrum	E	Hyperplastic polyp		(-)
1	01S02	Antrum	E (Polytectomy*)	Tubulopapillary adenoma	Adenoma	(-)
	01S03	Antrum	E	Tubulopapillary adenoma	Adenoma	(-)
2	02S01	Antrum	E	Tubular adenoma	Adenoma	(-)
	02S02	Cardia	E	Tubular adenoma	Adenoma	(-)
5	05S01	Antrum	E (Polytectomy*)	Tubulopapillary adenoma	Adenoma	(-)
	05S02	Antrum	E (Polytectomy*)	Tubulopapillary adenoma	Adenoma	(-)
6	06S02	Corpus	S (Billroth I)	Tubulopapillary adenoma	Adenoma	pTis
7	07S01	Antrum	E	Tubulopapillary adenoma	Adenoma	(-)
8	08S01	Cardia	E	Tubulopapillary adenoma	Adenoma	(-)
12	12S01	Antrum	S	Tubulopapillary adenoma	Adenoma	pTis
	12S02	Antrum	S	Tubulopapillary adenoma	Adenoma	pTis
15	15S01	Corpus	E	Papillary adenoma	Adenoma	(-)
19	19S01	Antrum	S	Tubulopapillary adenoma	Adenoma	pTis
	19S02	Antrum	S	Papillary adenoma	Adenoma	pTis
	19S03	Antrum	S	Tubulopapillary adenoma	Adenoma	(-)
	19S04	Antrum	S	Tubulopapillary adenoma	Adenoma	(-)
1	01S01	Antrum	S	Papillary adenocarcinoma	Papillary adenocarcinoma	pTis
3	03S01	Antrum	S (Billroth I)	Tubulopapillary adenocarcinoma	Papillary adenocarcinoma	pTis
4	04S01	Antrum	E	Tubulopapillary adenocarcinoma	Papillary adenocarcinoma	(-)
6	06S01	Antrum	S (Billroth I)	Tubular adenocarcinoma	Tubular adenocarcinoma	pT1a
9	09S01	Antrum	S	Tubulopapillary adenocarcinoma	Tubular adenocarcinoma	pTis
11	11S01	Antrum	E (Polytectomy*)	Tubulopapillary adenocarcinoma	Tubular adenocarcinoma	(-)
12	12S03	Cardia	S	Tubular adenocarcinoma	Tubular adenocarcinoma	pT1a

¹ Histological Classification of Tumours of the Alimentary System of Domestic Animals (WHO International Classification of Tumors of Domestic Animal Series) (2003)

² WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th edition (2010)

³ TMN classification

⁴ Endoscopic biopsy specimens were excluded from the assessment of tumor invasion due to the absence of submucosa and deeper tissues.

(-): Not evaluated because of the absence of submucosa and deeper tissues

E: Endoscopic biopsy

S: Surgical resection

* Partial polypectomy with a diathermic snare.

Table 1-3. Histopathological diagnosis of colorectal polyps

Case No.	Lesion No.	Location	Method of excision	Histological diagnosis		Depth of Invasion (T status) ^{3,4}
				Classification of animal tumors ¹	Classification of human tumors ²	
17	17104	Rectum	S (pull-through)	Adenoma	Tubular adenoma	pTis
1	01101	Rectum	S	Papillary adenocarcinoma	-	(-)
	01102	Rectum	S	Papillary adenocarcinoma	Tubulovillous adenoma (with high grade dysplasia)	pTis
2	02101	Colon	E	Papillary adenocarcinoma	-	(-)
7	07101	Rectum	S	Papillary adenocarcinoma	Tubular adenoma (with high grade dysplasia)	pTis
8	08101	Colon	E	Papillary adenocarcinoma	-	(-)
10	10101	Rectum	S	Papillary adenocarcinoma	Tubular adenoma (with high grade dysplasia)	pTis
11	11101	Rectum	E	Papillary adenocarcinoma	-	(-)
13	13101	Rectum	S	Papillary adenocarcinoma	Tubular adenoma (with high grade dysplasia)	pTis
	13102	Rectum	S (pull-through)	Papillary adenocarcinoma	Tubular adenoma (with high grade dysplasia)	pTis
	13103	Rectum	S (pull-through)	Papillary adenocarcinoma	Tubular adenoma (with high grade dysplasia)	pTis
14	14101	Rectum	S	Papillary adenocarcinoma	Tubular adenoma (with high grade dysplasia)	pTis
16	16101	Rectum	S	Papillary adenocarcinoma	Tubular adenoma (with high grade dysplasia)	pTis
17	17101	Rectum	S (pull-through)	Papillary adenocarcinoma	Tubular adenoma (with high grade dysplasia)	pTis
	17102	Rectum	S (pull-through)	Papillary adenocarcinoma	Tubular adenoma (with high grade dysplasia)	pTis
	17103	Rectum	S (pull-through)	Papillary adenocarcinoma	Tubular adenoma (with high grade dysplasia)	pTis
	17105	Rectum	S (pull-through)	Papillary adenocarcinoma	Tubular adenoma (with high grade dysplasia)	pTis
18	18101	Rectum	S	Papillary adenocarcinoma	-	(-)
20	20101	Rectum	S	Papillary adenocarcinoma	Tubular adenoma (with high grade dysplasia)	pTis
21	21101	Rectum	S (pull-through)	Papillary adenocarcinoma	Tubular adenoma (with high grade dysplasia)	pTis

¹ Histological Classification of Tumours of the Alimentary System of Domestic Animals (WHO International Classification of Tumors of Domestic Animal Series) (2003)

² WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th edition (2010)

³ TMN classification

⁴ Endoscopic biopsy specimens were excluded from the assessment of tumor invasion due to the absence of submucosa and deeper tissues.

(-) Not evaluated because of the absence of submucosa and deeper tissues

E: Endoscopic biopsy

S: Surgical resection

Table 1–4. List of control Jack Russell terriers with other diseases

Disease	Age	Sex
Mast cell tumor	10y 9m	Male (castrated)
Mast cell tumor		
Portosystemic shunt	0y 4m	Female
Lymphoma	4y	Female
Chronic cholecystitis	8y	Male (castrated)
Liver tumor	11y 10m	Male (castrated)

Table 1-5. Primers used for germline mutation analysis

Target		Primer sequence	Product size (bp)
<i>Primers for the entire coding region of the APC gene</i>			
exon1	sense	5'- TCCCTTTCTTTGTAAACAAGCAG	361
	antisense	5'- TTGCAAGAAAGAGTTTACATATTGC	
exon2	sense	5'- CAGCATACCGAAATGCCAAG	262
	antisense	5'- GACCTGAGCTGAAGGCAGATG	
exon3	sense	5'- AGCAATATTTTAGATCCCTTAAAGC	366
	antisense	5'- CCTGCCATTTCATGCTTCATA	
exon4	sense	5'- AGTCCCACCTTCAAAAATCC	385
	antisense	5'- AACTAAAAATGCAATTATCTTGAATG	
exon5	sense	5'- GTGCAATAACGTGCATATTTGA	375
	antisense	5'- TGTGAAGTTCTGCCAAAAGTGA	
exon6	sense	5'- CCCTAAGCTGTAAATGATAGCC	296
	antisense	5'- GAACATCTATATTTCAATGATACCACA	
exon7	sense	5'- GCATTACCATTTTTGTATG	238
	antisense	5'- TCACTCTGAGGACTATCTCACACC	
exon8	sense	5'- TGTGCACCCTTAACGTGAAAT	242
	antisense	5'- TGAGTGAAGAATGTTTTAGCAAAG	
exon9	sense	5'- CCCATTCATCACTTCATTGG	336
	antisense	5'- TGTCATCAGGCTGTGAGTGAA	
	sense	5'- TCCTCTCCTCATCCAGCTTT	387
	antisense	5'- AGCTATGTCAGCAATGCAGGT	
exon10	sense	5'- AAGCATTATGGTTTATGTCCATTC	207
	antisense	5'- TGGCCTCATATCCAGTTCAAC	
exon11	sense	5'- AACCATATATCCTCATCCTTTGAGA	285
	antisense	5'- ACCAGAGATCCATAAGAAATGG	
exon12	sense	5'- ACAGCTTCAGTTGCCTTGT	163
	antisense	5'- CCAGGAAAAACATCTGAAATTCT	
exon13	sense	5'- GCAACCGTATGTTATTTTATGTTCA	249
	antisense	5'- CAAAGGGTGGGAAAGGGTAG	
exon14	sense	5'- GTCCACACTTACGACTCCCTAA	220
	antisense	5'- TGGTCTTCTTTGCATTTCTCA	
exon15	sense	5'- CGGCAGGGGAGATACTAACA	389
	antisense	5'- AGGTCTTCCTGAGGGTATGAA	
exon16	sense	5'- AAGCAGATTTTACCTTAATTTTGGGA	558
	antisense	5'- GGTGAAAGGACAGTCATATTTCCAG	
	sense	5'- TGTTTTTGACACCAATCGACA	578
	antisense	5'- TTTCGTCATCTTCAGAATAGGATTC	
	sense	5'- GACGTGTCCTGTGCCTTATG	450
	antisense	5'- CCATGATTAGAACCTACTCGATTTCG	
	sense	5'- AAGAGGAGCCAGTGGTTCAG	496
	antisense	5'- ATTGGGGTGTCTCTACACAG	

Table 1–5. Primers used for germline mutation analysis (continued)

	sense	5'- CAACCAGGAAACGATACAGACG	-3'	
	antisense	5'- ACTGTTCGAGCGAACTGACTGAC	-3'	424
	sense	5'- CAGACCCCTAAAAGTCCACCAG	-3'	
	antisense	5'- TAAATGGCTCATCAAGGCTCAG	-3'	448
	sense	5'- AGAGTCCAGGTCTTCCAGACG	-3'	
	antisense	5'- TGCTTTTGTGCCTGTAACCTGT	-3'	455
	sense	5'- TGGCAAGGAAGCCAAGTCAAC	-3'	
	antisense	5'- TCTGTGGTATAGGTTTTACTGGTGAAG	-3'	531
	sense	5'- GCGTCTGTGTCTTCATCTGGAAC	-3'	
	antisense	5'- GGGTTTAGACTGACCTCGATTTAC	-3'	519
	sense	5'- CCAATCTCTAATCAACAATCCGC	-3'	
	antisense	5'- GTTCTGAATCTGGTCTCTGTATATC	-3'	574
	sense	5'- AGACGACCTGTTGCAGGAGT	-3'	
	antisense	5'- CCTCACTGGGACTTTTGGAG	-3'	686
	sense	5'- GATCTCTCGAGGCAGGACAATG	-3'	
	antisense	5'- GGATCCATTGCTATTACTCATCTG	-3'	562
	sense	5'- ATCCAAGAATGGCAGTAGTATCC	-3'	
	antisense	5'- CTTCTCCAAGTGCTTACTCGAG	-3'	546
	sense	5'- AATAGGTCAGGAACCTGGAAACG	-3'	
	antisense	5'- TTTGCATCTTTAGCGTTTGG	-3'	470
	sense	5'- GAGATCCCCAACAGGAAACA	-3'	
	antisense	5'- TCTGAAACAGGATTTCTACACAGC	-3'	558
<i>Primers used to amplify the region containing germline APC mutation sites</i>				
Germline mutation sites (Codons 154 and 155)	sense	5'- TCTTTTGGCATTGTGTAAACTTG	-3'	
	antisense	5'- CTTACATTTTCAGTTAAAGGGAGACT	-3'	156

Table 1-6. Primers and probes used in TaqMan real-time PCR for LOH analysis

	Sequence	Product size (bp)
Forward Primer	5'-TTTAGTGAGATTCTGAAGTTGAGCATAATA-3'	78
Reverse Primer	5'-TCATTACTTCTTGCTGATCTTGACAA-3'	
Probe for Wild allele	5'-(VIC)- CAATCTTTTCCTTTTC-(MGB)-3'	
Probe for Mutant allele	5'-(FAM)-CAATCTTAATCCTTTTC-(MGB)-3'	

VIC, 2-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein; FAM, 6-carboxyfluorescein; MGB, minor groove binder.

Table 1-7. Percentage of cells with nuclear β -catenin accumulation in gastrointestinal lesions

Localization of β -catenin		Membranous only	Nuclear and Cytoplasmic				Mean \pm s.d. (%)	Range (%)
			0-25%	25-50%	50-75%	75-100%		
Stomach								
Hyperplastic polyp	(n=3)	3	0	0	0	0	-	-
Adenoma	(n=16)	0	4	4	8	0	43.4 \pm 19.6	6.1-71.5
Adenocarcinoma	(n=7)	0	0	3	3	1	58.7 \pm 17.1	35.5-77.1
Colorectum								
Adenoma	(n=1)	0	0	0	1	0	59.1	-
Adenocarcinoma	(n=19)	0	1	2	8	8	67.1 \pm 19.1	19.8-97.2

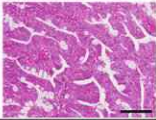
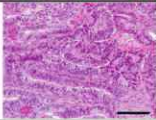



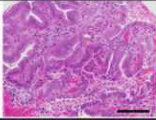

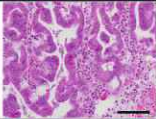

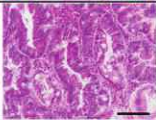

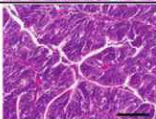
Hospital	Age	Locus	Endoscopic/ gross image ^{1,2}	Method of excision	Endoscopic/gross finding	Histopathological image	Histological diagnosis
Animal hospital A	4y	Rectum		Surgical resection		(unavailable)	adenoma
	5y	Rectum		Surgical resection		(unavailable)	adenocarcinoma
	6y	Rectum		Surgical resection			Not examined
Animal hospital B (Large hospital)	7y8m	Antrum		Endoscopic biopsy	Number of polyps : 1		
		Rectum		Partial resection	Number of Polyps : 1		adenocarcinoma
	7y9m	Antrum		Surgical resection	Polyps occupied antrum lumen		adenocarcinoma
Gifu Univ. Teaching Animal Hospital	7y11m	Antrum		(-)	Number of polyps : 1		
	9y0m	Antrum		(-)	Number of polyps : 1		
	9y2m	Antrum		Endoscopic biopsy	Number of polyps : 8		adenoma
	9y8m	Antrum		Endoscopic resection (Polypectomy)	Number of polyps : 8		adenocarcinoma
	11y4m	Rectum		Endoscopic biopsy	Number of polyps : 1		adenocarcinoma
	Animal hospital B	13y3m	Rectum		Surgical resection (Pull-through)	Number of polyps : 2	

Figure 1-1. Disease course of Case No. 1. Arrows and asterisks indicate same gastric and rectal polyps, respectively. Arrow heads indicated antrum polyps. Bars = 100 μ m.

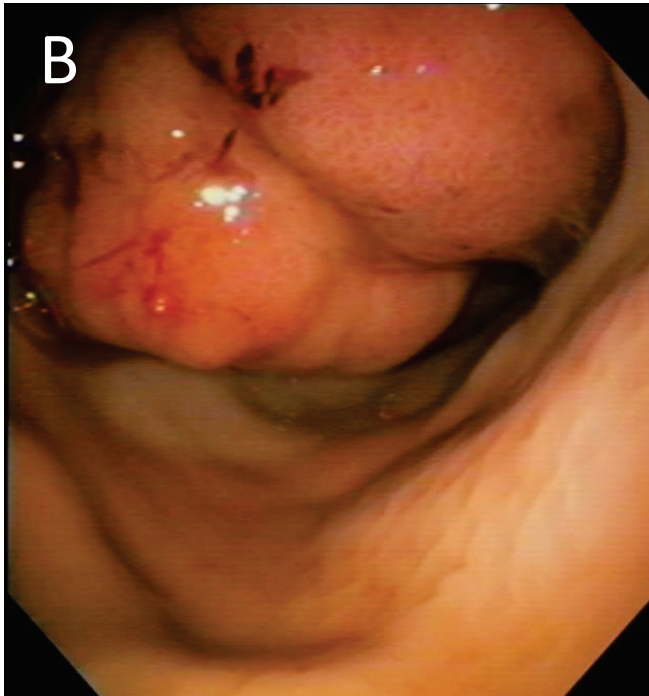
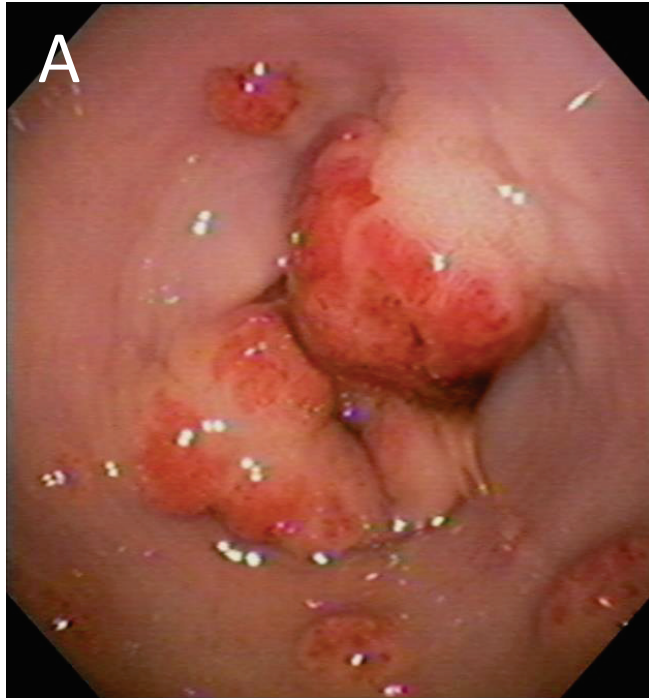


Figure 1-2. Endoscopic appearance of gastrointestinal polyps in Jack Russell Terriers. (A) Multiple polyps in the pyloric antrum. The protruded lesions cause severe narrowing of the pylorus. (B) Polyps in the rectum.

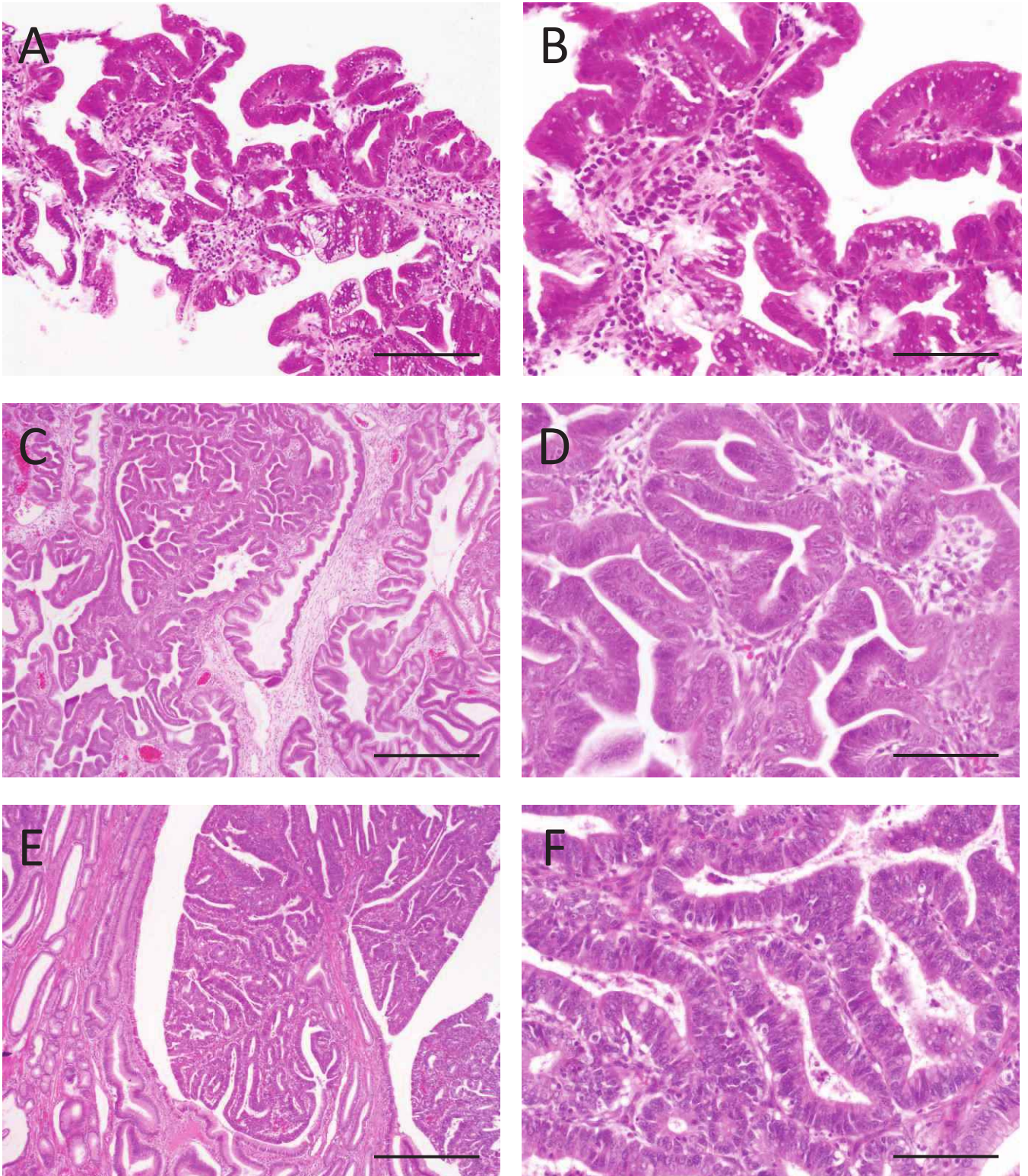


Figure 1-3. Histopathology of the gastric lesions in Jack Russell Terriers. (A-F) Representative photomicrographs of hyperplastic polyp (A, B), adenoma (C, D) and adenocarcinoma (E, F) in the stomach. (B), (D) and (F): Higher magnification of (A), (C) and (E), respectively. The lesions were diagnosed as hyperplastic polyp, tubulopapillary adenoma and tubulopapillary adenocarcinoma, respectively. Bars = 100 μ m (A), 200 μ m (C and E) and 50 μ m (B, D and F).

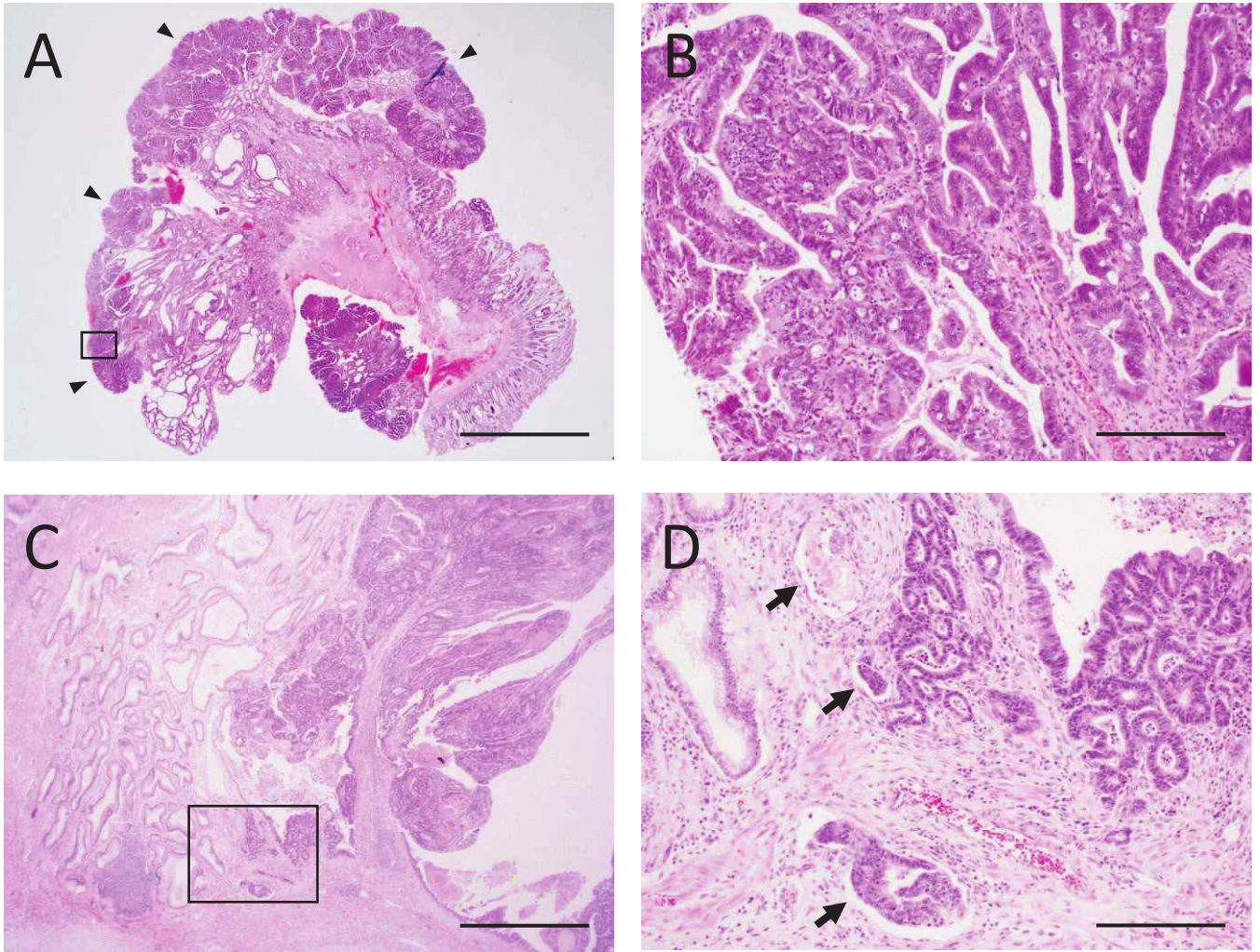


Figure 1-4. (A) Carcinoma in adenoma. Arrow heads indicate a carcinomatous component growing within an adenoma. Note also that the lesion developed mainly in the upper epithelial layer overlaying the normal or dilated gastric glands. (B) Higher magnification of the boxed area in (A). Boundary between adenoma (AD) and adenocarcinoma (ADC) components. (C) Adenocarcinoma with invasion into the lamina propria. (D) Higher magnification of the boxed area in (G). Lymphovascular invasions are also observed (arrows). Bars = 5 mm (A), 100 μ m (B), 1 mm (C) and 50 μ m (D).

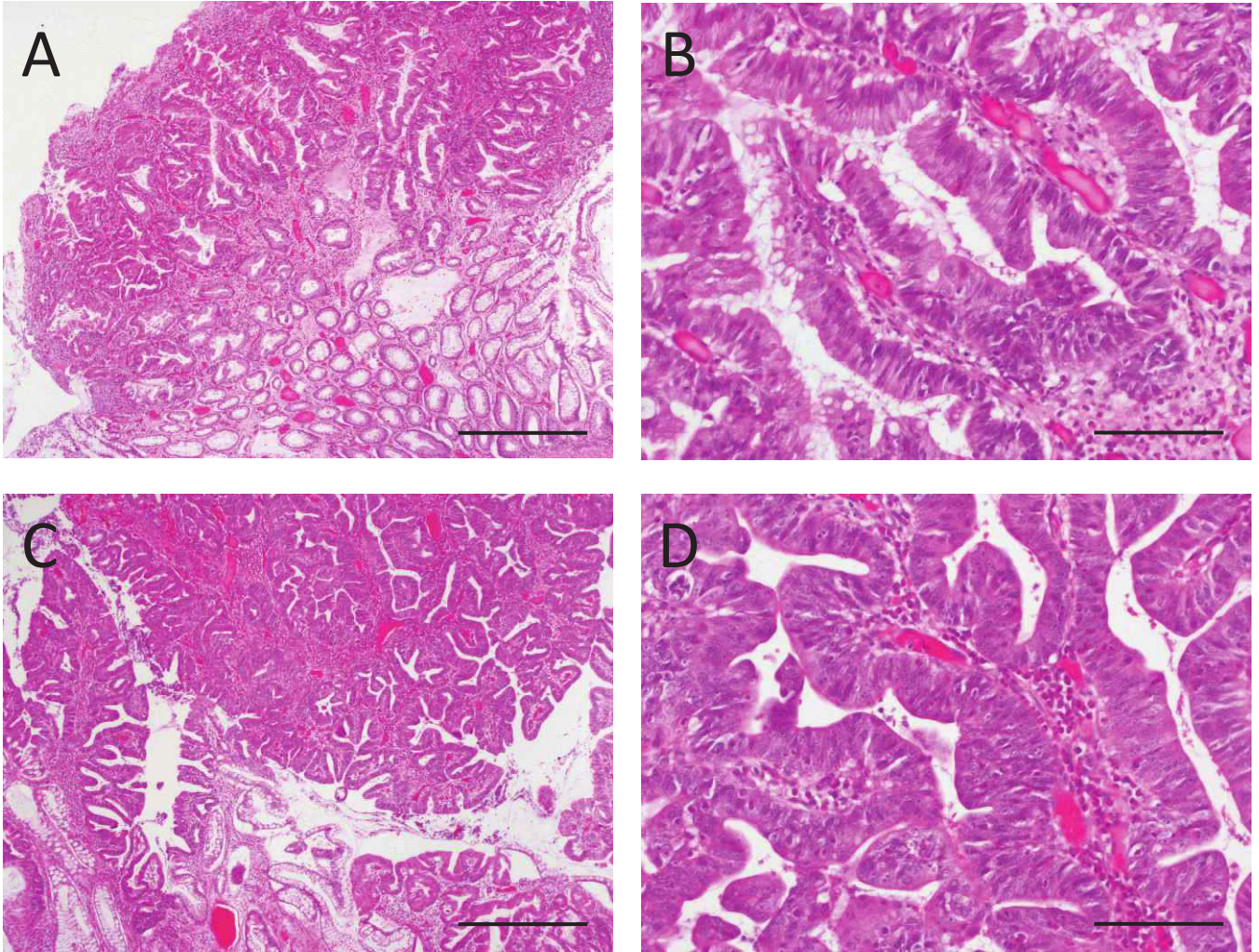


Figure 1-5. Histopathology of the colorectal lesions in Jack Russell Terriers. (A-D) Representative photomicrographs of adenoma (A, B) and adenocarcinoma (C, D) in the rectum. (B) and (D) Higher magnification of (A) and (C), respectively. Bars = 200 μ m (A and C), 50 μ m (B and D).

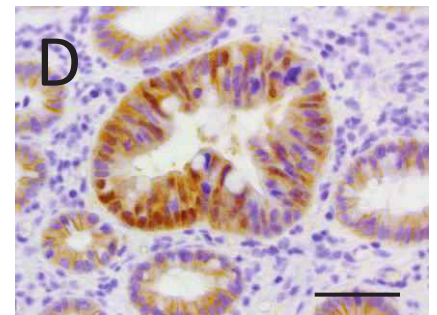
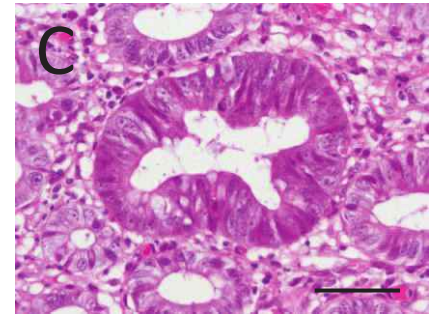
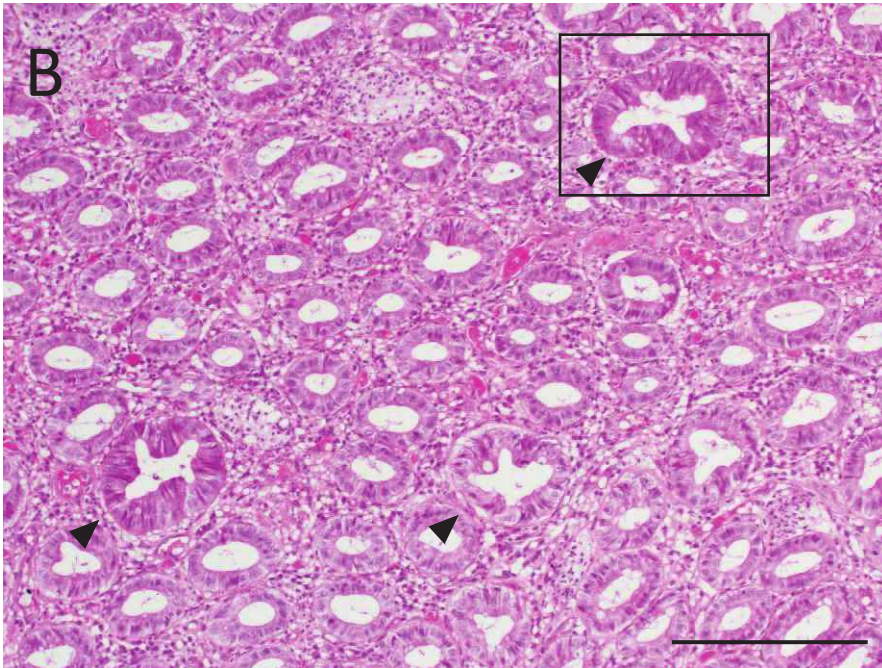
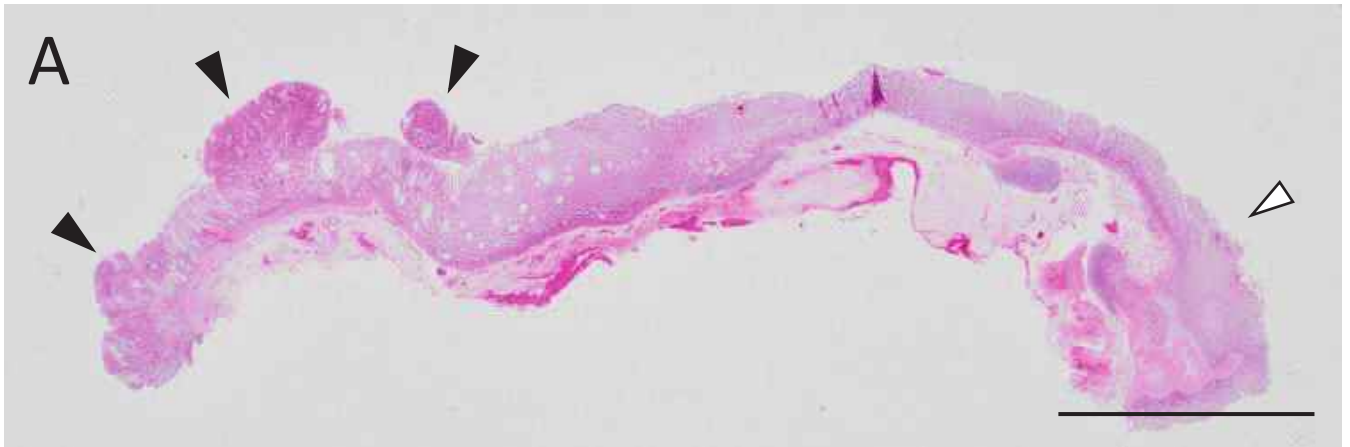


Figure 1-6. (A) Multiple tumors developed in the small area of rectal mucosa. In addition to the tumors (black arrowheads), there is also a single crypt adenoma (white arrowhead). (B-D) Single crypt adenomas in the rectal mucosa. H&E staining (B, C) and immunostaining for β -catenin on serial sections (D). (C) Higher magnification of the boxed area in (B). Multiple lesions are scattered in the rectal mucosa (arrowheads). Note the nuclear and cytoplasmic accumulation of β -catenin in the aberrant crypt (D). Bars = 5 mm (A), 100 μ m (B), and 20 μ m (C and D).

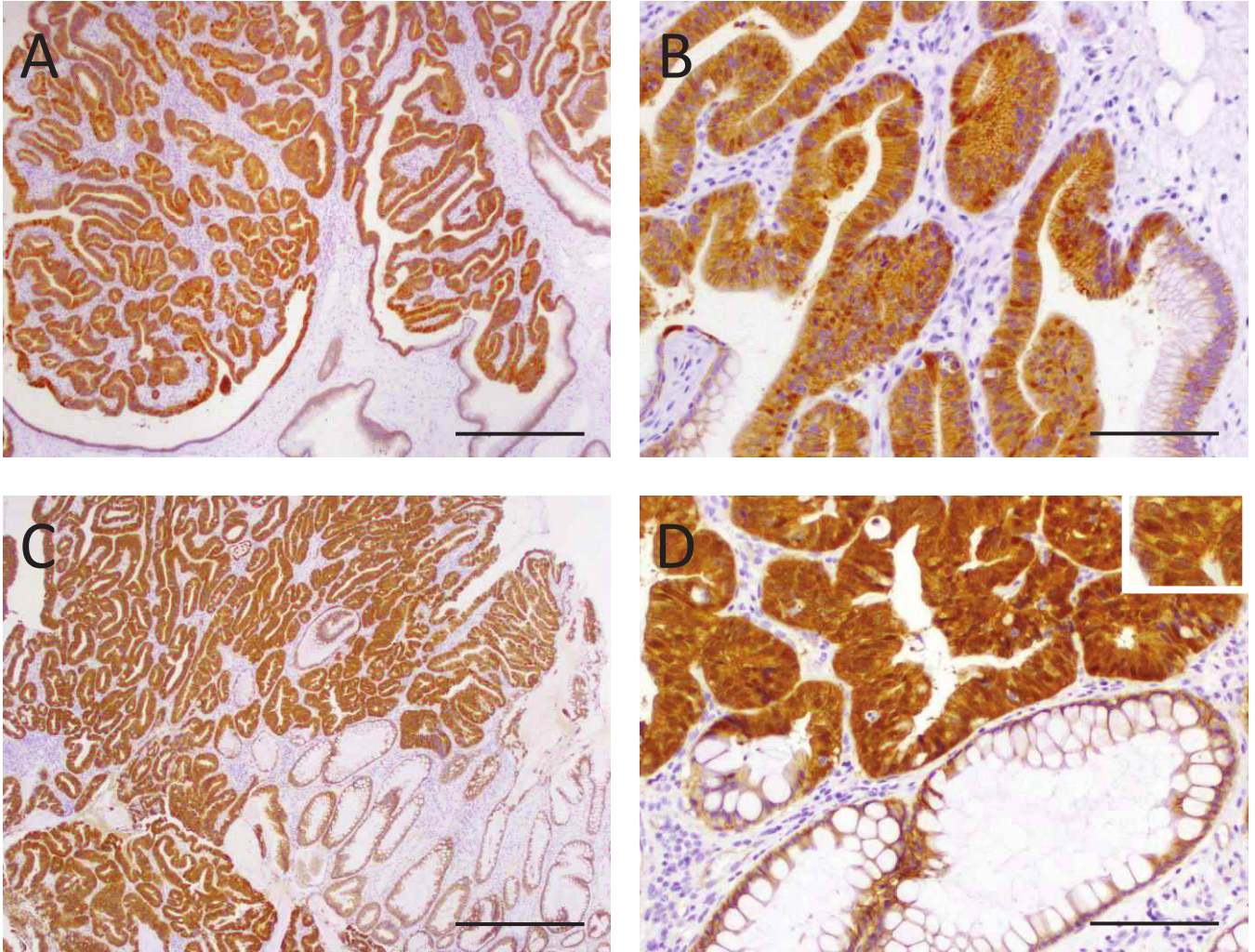


Figure 1-7. β -catenin expression in the gastrointestinal lesions of affected dogs. (A) Boundary between adenoma and surrounding normal tissues in the gastric antrum. (B) Higher magnification of the normal and neoplastic tissues in (A). (C) Boundary between the rectal adenocarcinoma and surrounding normal tissues. (D) Higher magnification of the normal and neoplastic tissues in (C). While the normal gastric and rectal epithelial cells show membranous β -catenin expression with no intracellular expression (B, D), cytoplasmic and nuclear accumulation of β -catenin is observed in tumor cells (B, D). Bars = 200 (A and C) and 50 μ m (B and D).

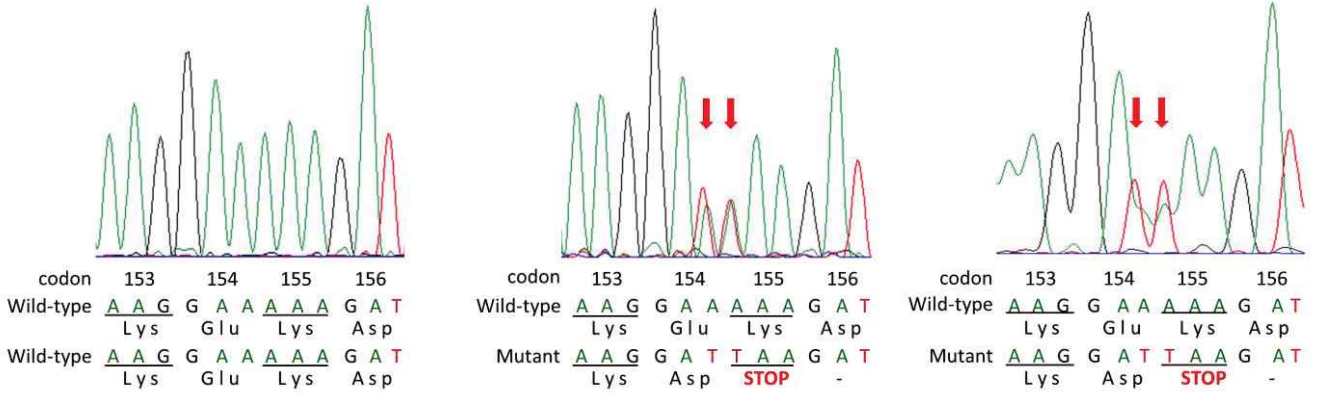
A Control JRTs

Blood (n= 6)

JRTs with gastrointestinal polyps

Blood (n= 11)

FFPE tissue (n= 10)



B

Phenotype of FAP in human

- Severe (1000s of polyps)
- Intermediate (over 100 polyps)
- Attenuated (few to 100 polyps)

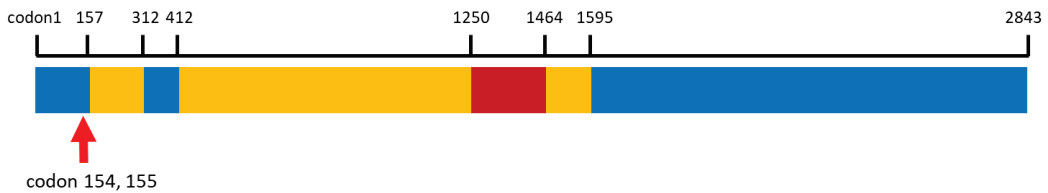


Figure 1-8. Germline *APC* variants identified in Jack Russell Terriers with gastrointestinal tumors. (A) Sequence of codons 153–156 in *APC* of the affected and control dogs. DNA samples were isolated from peripheral blood (left and middle panels) or paraffin-embedded tissue (right panel). Red arrows indicate germline variants. Heterozygous two-base substitutions at codons 154 and 155 were identified in dogs with gastrointestinal polyps (middle and right panels), but not in control dogs (left panels). (B) Location of the germline *APC* variant detected in Jack Russell Terriers and comparison with those in human FAP. The variants of the dogs (red arrow) are positioned in the 5' region of *APC* where the variants of patients with attenuated FAP are located (blue colored area). Colored areas represent regions of variants associated with each FAP phenotype in humans.

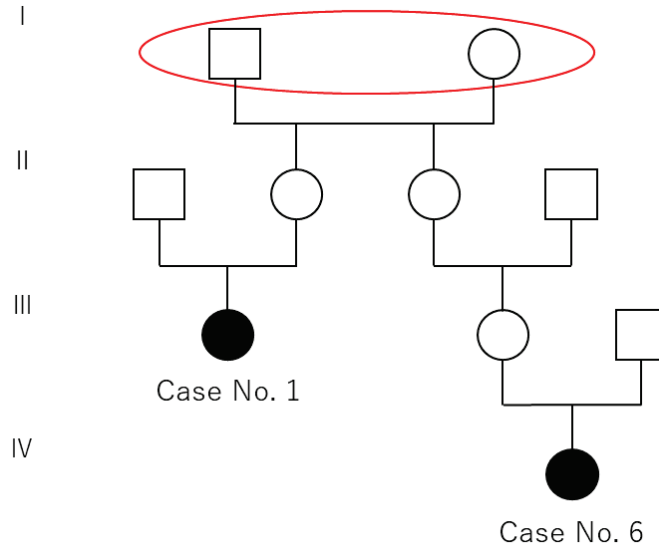
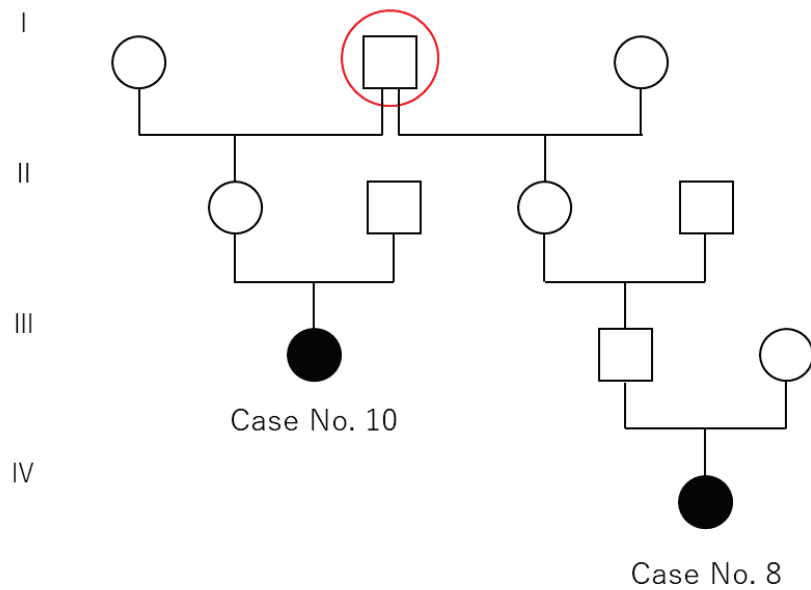
A**B**

Figure 1-9. Family tree conducted according to pedigree certificates of Case Nos. 1, 6, 8 and 10. There was a blood relationship between Case Nos 1 and 6 (A) and Nos 8 and 10 (B). (A) Mother dog of Case No. 1 and grandmother dog of Case No. 6 were littermates. Cases 1 and 6 were descended from a common breeding pair (red circle). (B) Grandmother of Case No. 8 was paternal half-sister of mother of Case No. 10. Cases 8 and 10 were descended from a common male dog (red circle). Square and circle show male and female, black pattern indicates carrier of the germline *APC* variants and affected with GI polyps, respectively.

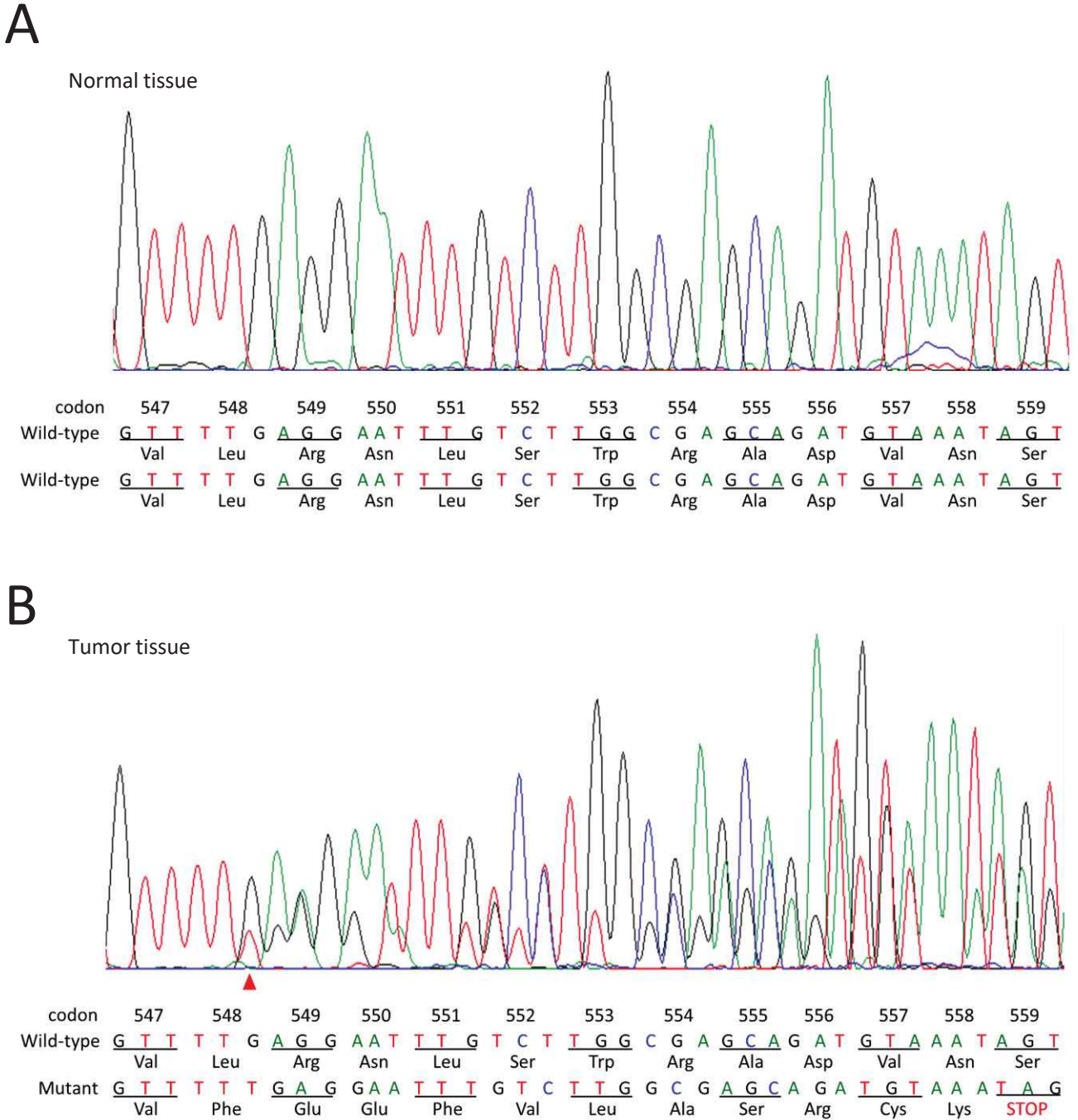


Figure 1-10. Somatic *APC* alterations in gastrointestinal tumors of Jack Russell Terriers. (A) The surrounding normal mucosa. (B) A frame shift mutation identified in *APC* of the gastric adenocarcinoma (B, Lesion No. 05S01). Arrowhead indicates a single base insertion in codon 548, forming a premature termination codon at codon 559.

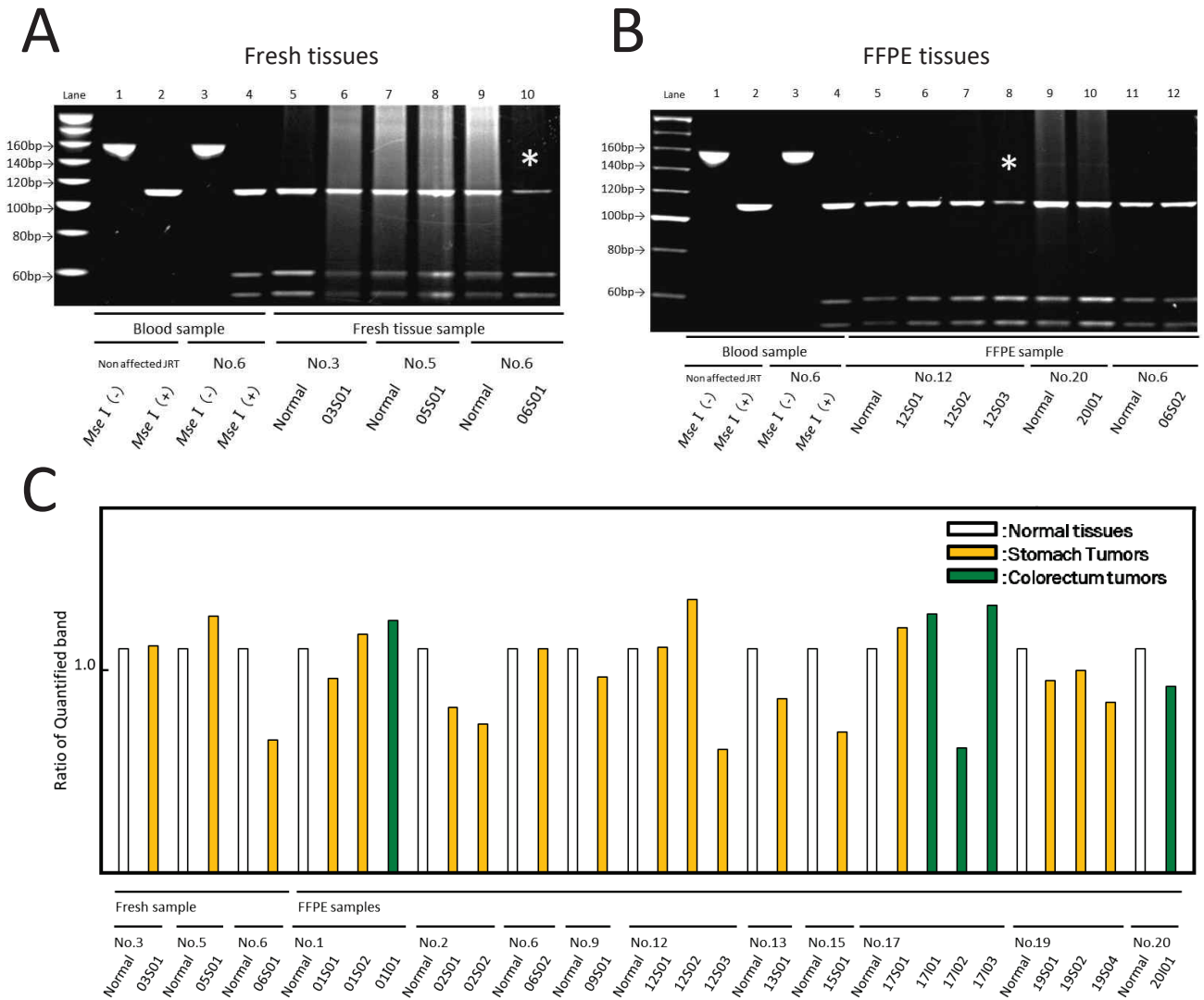


Figure 1-11. LOH at the *APC* locus detected by PCR-RFLP analysis (A and B) Representative images for acrylamide gel electrophoresis of *MseI*-digested PCR products amplified using DNA samples extracted from fresh (A) and FFPE (B) tumor samples. Lanes 1-4, controls: undigested and digested PCR products amplified from peripheral blood DNA with or without the germline *APC* variants. After digestion with *MseI*, only the wild-type allele-derived fragment (109 bp) is found in the dog without germline *APC* variant (lane 2), whereas mutant allele-derived fragments (51 and 58 bp) were detected in the dog carrying the variant (lane 4). Note that the wild-type allele-derived fragment is decreased in gastric and rectal adenocarcinomas (lane 10 in A and lane 8 in B, asterisks). (C) Relative band intensity of wild-type to mutant allele-derived fragments in gastrointestinal tumors. Data are presented as values relative to the corresponding normal tissue levels in each case. There are reductions in the allele ratio in some tumors (yellow and green bars) compared with the normal tissues (white bars).

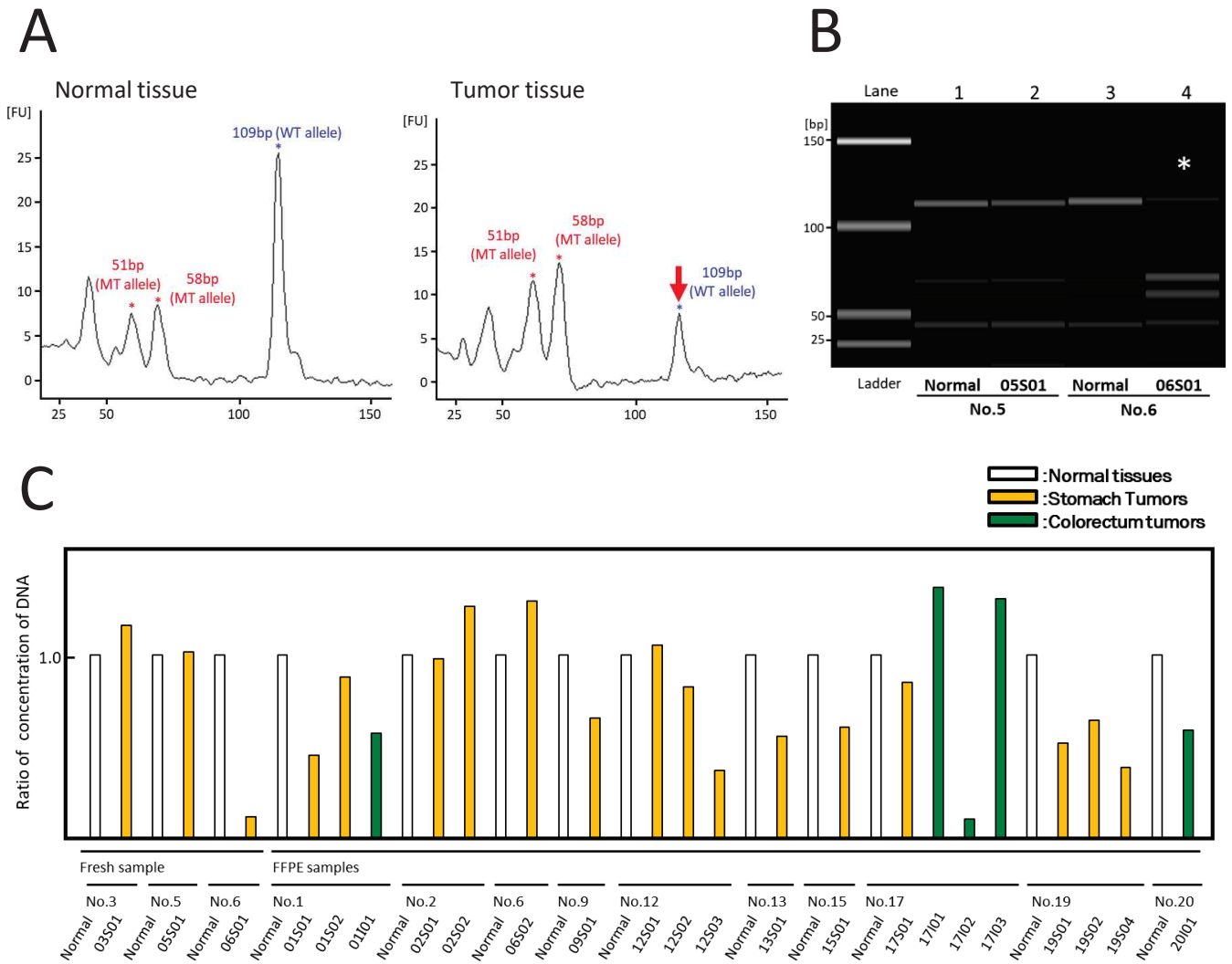


Figure 1-12. LOH at the *APC* locus determined by PCR-RFLP assay using the Agilent 2100 bioanalyzer. (A) Electropherograms of *MseI*-digested PCR products amplified from normal (left panel) and tumor (right panel) samples. Reduction of the wild-type allele-derived fragment (109 bp) is evident in the tumor sample (arrow). Lesion No. 06S01. (B) Virtual gel image of *MseI*-digested PCR products on the bioanalyzer. Representative results of tumors with or without reduction of the wild-type allele-derived fragment (lanes 2 and 4) and the corresponding normal tissues (lanes 1 and 3). Asterisk shows reduction in the wild-type allele-derived fragment. (C) Wild-type to mutant allelic ratio in gastrointestinal tumors (yellow and green bars) relative to the corresponding normal tissues (white bars). Relative reduction of the wild-type fragment is shown in some GI lesions.

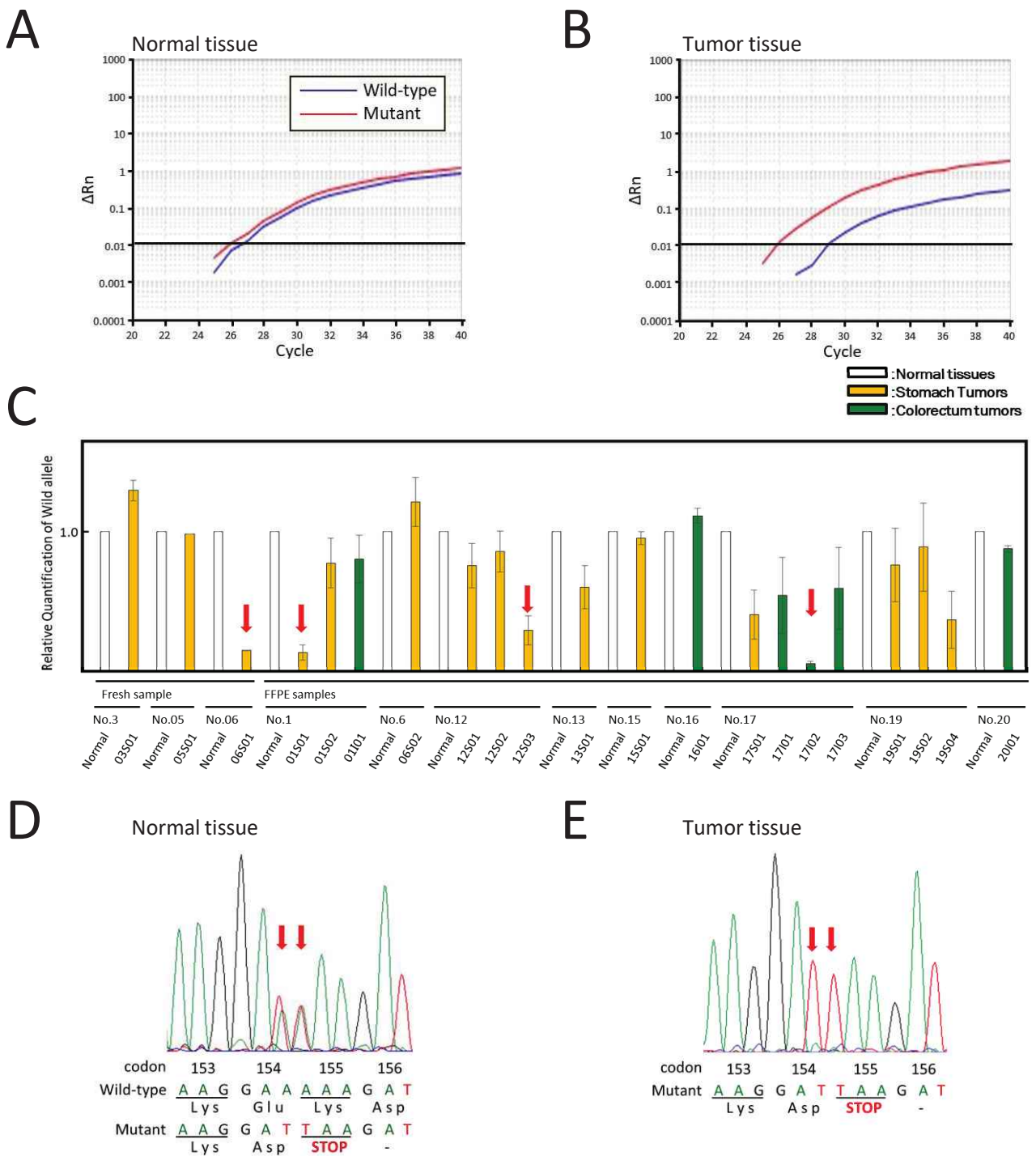


Figure 1-13. LOH at the *APC* locus determined by TaqMan real-time PCR assay. (A and B) Amplification plots of wild-type (blue curve) and mutant (red curve) *APC* copies in the gastric tumor. Lesion No. 06S01. Amplification of the wild-type allele copies requires approximately 4 cycles more than that of the mutant allele to reach the threshold level in the gastric tumor (B), whereas both amplifications reach the threshold level after nearly the same cycles in the surrounding normal tissues (A). (C) Wild-type to mutant allelic ratio in gastrointestinal tumors (yellow and green bars) relative to the corresponding normal tissues (white bars). Data are mean \pm SD of duplicate PCR reactions. There are marked reductions in the allele ratio in some tumors including gastric adenocarcinomas (Case No. 1, 6 and 12) and a rectal adenocarcinoma (Case No. 17). (D and E) DNA sequences of *APC* encompassing the germline variant sites as determined by PCR-direct sequencing. There are double peaks of A and T at the variant sites in the normal mucosa (D), whereas the chromatogram appears as single peaks of A in the gastric tumor (E, Lesion No. 06S01) indicating loss of the wild-type allele. Arrowheads indicate the sites of germline *APC* variants.

	Exon 13 (Dog, XM_014111995.1)	Exon 14 (Dog, XM_014111995.1)
Dog [NC_006585.3]	GTTATT ·····T-GATGAAAATGTGCTT-GAAA	GTTAAAAAG·····GACCTCAAAG··
Jack Russell Terrie (n=17)	GTTATT ·····T G ATG G A A -TGTGCTT T G G A A GTTAAAAAG	
Boxer dog (n=3)	GTTATT ·····T G ATG G A A -TGTGCTT T G G A A GTTAAAAAG	
Beagle (n=1)	GTTATT ·····T G ATG G A A -TGTGCTT T G G A A GTTAAAAAG	
Human [NC_000005.10]	GTTATT ·····T G ATG G A A -TGTGCTTTAGAA GTTAAAAAG	
	Exon 13 (Human, NM_001127510.2)	

Figure 1-14. SNPs detected in the 3' region of exon 13 of the predicted canine *APC* sequence. Nucleotide sequences of exon 13 were determined in boxers and a beagle (n = 3 and 1, respectively) as well as in Jack Russell Terriers (n = 17) and were compared with the published canine and human sequences of *APC* (GenBank accession No. XM_014111995.1 and NM_00112751.2). The published canine sequences were obtained from a boxer (Lindblad-Toh K. et al., *Nature* 438, 803-19). The alignment reveals five mismatches (red letters) between the sequences of dogs examined in the present study (second to fourth lines) and the published canine sequences (first line). On the contrary, the sequences of examined dogs match perfectly with those from humans (fifth line). Blue and green lines represent the published exon 13 of dogs and humans. Dashed line encloses exon 13 predicted based on the sequences of dogs examined in the present study. The first, fourth, and fifth SNPs have been already registered in the SNP database (rs850906243: c.1715delT, rs852139532: c.1730delT, rs851619666: c.1732A>G).

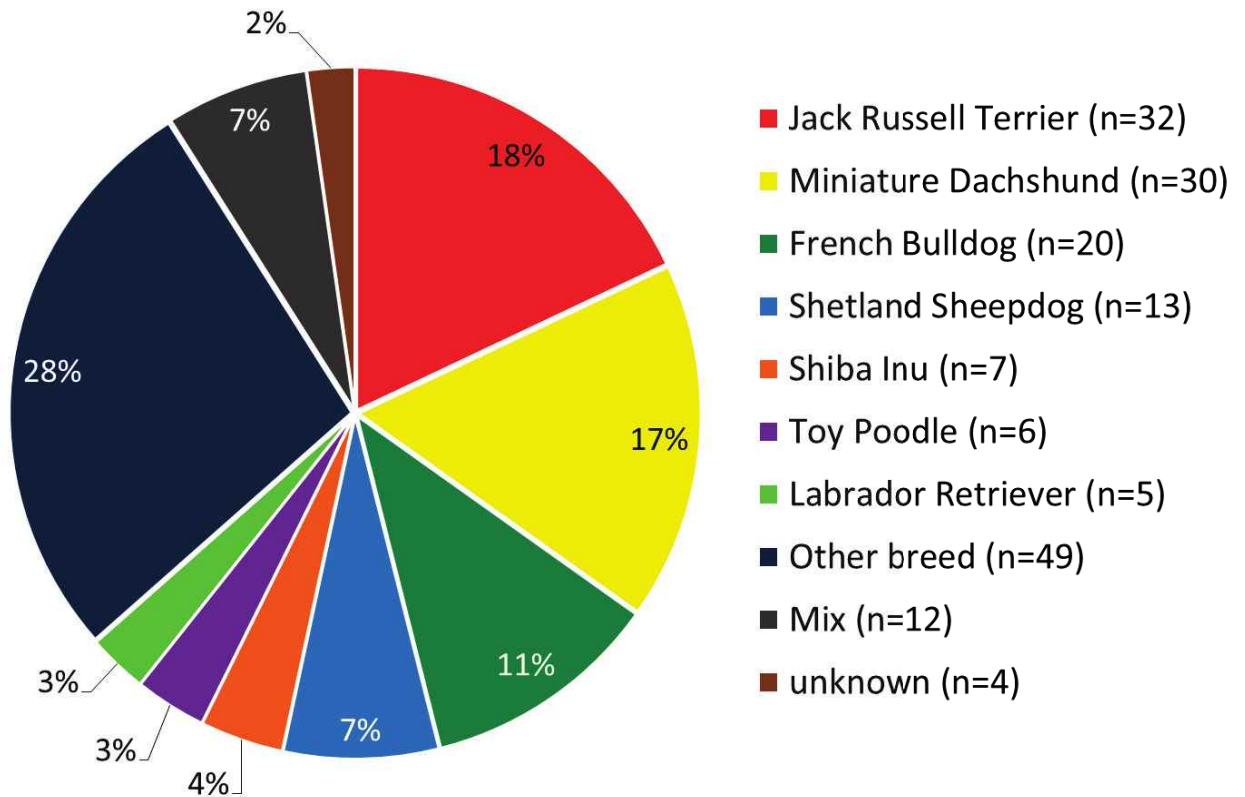


Figure 1-15. Breed distribution of dogs diagnosed with gastrointestinal adenoma and adenocarcinoma at the Laboratory of Veterinary Pathology, Gifu University from 2012 to 2018. In total, 178 dogs, including 57 dogs with gastric lesions and 121 dogs with colorectal lesions, were examined. Jack Russell Terriers (n = 32) rank at the top and account for 18% of all cases.

第2章

ジャック・ラッセル・テリアの遺伝性消化管ポリポーシスの 遺伝子診断法の確立

I. はじめに

近年の獣医臨床学や分子遺伝学の発展は、イヌやネコの遺伝性疾患の発見につながっている (16)。2003 年にはイヌの全ゲノム配列が解読され (34)、イヌの遺伝子解析が容易に行えるようになった。日本では 2000 年代後半からジャック・ラッセル・テリアで消化管ポリープの症例が増加しており、新規の遺伝性疾患であることが疑われていた (54)。第 1 章では、消化管ポリープを発症したジャック・ラッセル・テリアが同一の *APC* 遺伝子生殖細胞系列変異 (c.[462_463delinsTT]) をヘテロ接合性に保有していること、本疾患が常染色体顕性 (優性) 遺伝疾患であることを明らかにした。

遺伝性消化管ポリポシスに罹患したジャック・ラッセル・テリアでは、胃や大腸あるいはその両方にポリープが発生し、ポリープは病理組織学的に腺腫あるいは腺癌と診断される。本疾患のジャック・ラッセル・テリアでは、①ポリープが多発する、②若齢でポリープが発生する、③再発を繰り返すという 3 つの特徴的な病態を示すことがあり、本疾患を診断する上で重要な手掛かりとなる。一方で、遺伝性消化管ポリポシスの症例でも、孤在性にポリープが認められる症例や、高齢 (10 歳以上) になって初めて発症する症例も一部に認められ、ポリープの発生数や年齢を根拠に本疾患を否定することができない。また、遺伝性消化管ポリポシスでは、散発性の消化管上皮性腫瘍と同様 (44, 51, 62)、胃では幽門部、大腸では直腸で腫瘍性ポリープが好発するため、ポリープの発生部位から両者を鑑別することも不可能である。散発性の消化管上皮性腫瘍の症例と比べて、遺伝性消化管ポリポシスの症例は予後が良く、長期間の生存を望めるが、一方で再発のリスクは高い。したがって、適切な治療法の選択や治療後の検診計画を決定するためには、遺伝性消化

管ポリポーシスの遺伝子検査が不可欠である。

獣医療においても遺伝子検査が普及し、遺伝性疾患の診断に利用されている(15)。また、疾患の拡散を防ぐためにも遺伝子検査が不可欠である(13, 16, 17)。イヌの遺伝子検査は、従来、遺伝性疾患の疑いのある症例を対象に確定診断を目的に実施されてきたが、近年、健常な動物を対象に将来の発症リスクの評価を目的に行われるケースも増えている。遺伝性消化管ポリポーシスは成犬になってから発症するため、本疾患に関しても、発症の早期発見につながる将来的なリスク評価の意義は大きい。遺伝性消化管ポリポーシスの原因遺伝子変異は、2000年代に国内のジャック・ラッセル・テリアに広がったと予測され、これ以上の蔓延を防ぐためには、できるだけ早期に原因遺伝子変異を有するキャリア個体を繁殖から除外する必要がある。

第1章では、未知の遺伝子変異を検索するためにPCRダイレクトシーケンス法を用い、本疾患の原因遺伝子変異を同定した。この方法は、DNAの塩基配列を直接確認することが可能で、最も信頼性の高い遺伝子検査法となり得る、しかし、解析にあたりDNAシーケンサーが必要なため、実施可能な施設は限られる。既知の遺伝子変異に関しては、PCR-RFLP法やTaqManリアルタイムPCR法などのPCRをベースにしたより簡便かつ迅速に検出する方法が有用であり、遺伝性消化管ポリポーシスの原因遺伝子変異の検出にも適用可能であると考えられる。これらの方法は、点突然変異や一塩基多型(SNP)などの1塩基の違いを検出することが可能で、実際にイヌの様々な遺伝性疾患においても遺伝子型の決定に利用されている(8, 9, 30, 40, 41, 53)。

第1章では、腫瘍発生の分子メカニズムを解析ため、PCR-RFLP法およびTaqManリアルタイムPCR法を用いて、ジャック・ラッセル・テリアの消化管上皮性腫瘍

における LOH を検出に成功した。本章では、1 章で開発したこれらの方法を用いて、*APC* 遺伝子変異 (c.[462_463delinsTT]) を有するキャリア個体および非キャリア個体の遺伝子型を正確に判定可能であるか解析し、遺伝子検査法としての有用性を検証した。

II. 材料および方法

1. DNA サンプル

1-1. 血液サンプル

キャリア個体のサンプルとして、第1章で *APC* 遺伝子変異を検出した遺伝性消化管ポリポーシスのジャック・ラッセル・テリア 11 頭 (症例 No. 1~11) の血液を用いた。また、対照となる非キャリア個体のサンプルとして、第1章で用いた他疾患 (門脈体循環シャント, リンパ腫, 消化器症状, 胆嚢炎および肥満細胞腫) のジャック・ラッセル・テリア 5 頭から採取した血液を用いた。採血後, 血液は EDTA・2Na で抗凝固処理し, DNeasy Blood& Tissue Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出した。

1-2. 口腔スワブサンプル

より侵襲性の低い遺伝子検査法を確立するため, 口腔スワブサンプルを用いて検討した。口腔スワブサンプルは, ジャック・ラッセル・テリアの罹患犬 6 頭 (症例 No. 2, 3, 6, 7, 8, 11) と健常なビーグル 5 頭から, 4N6 FLOQ スワブ (COPAN Flock Technologies, イタリア) を用いて採取した。ゲノム DNA は, DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて下記の手順で抽出した。綿棒の先端を柄から切断し, 400 μ L の PBS に入れ, 20 μ L の Proteinase K, 400 μ L の Buffer AL を加えた後, 56°C で 10 min インキュベートした。それ以降の工程は製品マニュアルに従って行った。本実験は岐阜大学動物実験審査委員会 (2019-156) および岐阜大学動物臨床試験倫理審査専門委員会 (E18016) の承認を得て実施した。

1-3. FFPE サンプル

ジャック・ラッセル・テリアのキャリアとして罹患犬 10 頭（症例 No. 12～21）および非キャリアとして他疾患（慢性歯肉炎，線維毛包性過誤腫，脂肪腫，線維性歯肉過形成および乳管の嚢胞状拡張）のジャック・ラッセル・テリア 5 頭の FFPE サンプルを用いた。FFPE サンプルの非腫瘍部を選択的に採取し，QIAmp DNA FFPE Tissue Kit（QIAGEN）を用いてゲノム DNA を抽出した。

1-4. 人工合成 DNA

野生型または変異型アレルのホモ接合性の二重鎖 DNA を合成し，検体 DNA の対照として使用した。公開されているイヌの遺伝子配列（Genbank accession numbers: NC_006585.3, XM_014111995.1）をもとに，*APC* 遺伝子変異が存在する exon 4 の全域（109 bp）およびその上流および下流のイントロン領域各 100 bp を含む全長 309 bp の DNA を合成し（タカラバイオ株式会社）（Figure 2-1），T-Vector pMD20（タカラバイオ株式会社）を用いてクローニングした。

1-5. PCR-ダイレクトシーケンス

すべての DNA サンプルについて，*APC* 遺伝子変異（c.[462_463delinsTT]）の有無を PCR-ダイレクトシーケンス法にて確認した。血液および口腔スワブのサンプルについては，第 1 章で使用した *APC* 遺伝子の exon 4 の全領域を含む 385 bp を増幅するプライマーを用いた（Table 2-1）。FFPE サンプルについては，*APC* 遺伝子の codon 154 および 155 を含む 156 bp を増幅するプライマーを用いた（Table 2-1）。PCR には Takara EX Taq Hot Start Version（タカラバイオ株式会社）を用い，第 1 章と同様の条件で行った。

2. 遺伝子検査法

2-1. PCR-RFLP 法

第 1 章で同定した *APC* 遺伝子の変異型アレルでは，生殖細胞系列変異 (c.[462_463delinsTT]) により変異部位の塩基配列が AA (A, アデニン) から TT (T, チミン) に変化する。これによって，変異型アレルに特異的に *MseI* の認識配列 (TTAA) が増加する。PCR-RFLP 法では，PCR は，*APC* 遺伝子の codon 154 および 155 を含む 156 bp を増幅するプライマーを用い (Table 2-1)，第 1 章II-3-3 項で記述した方法により行った。制限酵素は *MseI* (*RspRSII*) (タカラバイオ株式会社) を使用し，酵素処理は第 1 章II-4-4 項で記述した方法で行なった。PCR 産物が制限酵素処理によって切断される位置および予想される DNA 断片のサイズを Figure 2-2A に図示した。はじめに，血液サンプルのうち，ジャック・ラッセル・テリアのキャリア個体 1 頭 (症例 No. 6) および非キャリア個体 1 頭，野生型および変異型の合成 DNA サンプルを用いて，最適な酵素処理時間の検討を行った。予備検査では，酵素反応時間を 1, 2, 4, 8, 12 および 24 時間とした。その結果，決定した酵素反応時間 (1 時間) を用いて血液，口腔スワブ，FFPE サンプルの解析を行った。

2-2. TaqMan リアルタイム PCR 法

変異型および野生型アレルの塩基配列に相補的な配列を有する 2 種類のプローブを用いた (Figure 2-2B)。PCR 反応は第 1 章II-4-5 項で記述した条件で行った。野生型および変異型合成 DNA，血液サンプル (ジャック・ラッセル・テリアのキャリア個体および非キャリア個体，n=11 および n=5) を用いて，VIC および FAM の蛍光強度はサイクル毎に測定するとともに，全 40 サイクル終了後のエンドポイントでも測定した。実験結果は，StepOne and StepOnePlus Software v2.3 (Thermo Fisher

Scientific) により解析した。

III. 結 果

1. DNA サンプルの *APC* 遺伝子変異の有無

ジャック・ラッセル・テリアのキャリア個体の血液サンプル (n=11), 口腔スワブサンプル (n=6) および FFPE サンプル (n=10), ジャック・ラッセル・テリアの非キャリア個体の血液サンプル (n=5), FFPE サンプル (n=5) および健常なビーグルの口腔スワブ (n=5), 野生型および変異型の合成 DNA について, *APC* 遺伝子変異部位の塩基配列を PCR-ダイレクトシーケンスで確認した。全てのキャリア個体では第 1 章で同定した *APC* 遺伝子のコドン 154 と 155 にまたがる 2 塩基連続した塩基置換 (c.[462_463delinsTT]) がヘテロ接合性に認められた。ジャック・ラッセル・テリアの全ての非キャリア個体および健常なビーグルでは, 野生型アレルがホモ接合性に認められ, 変異は検出されなかった。

2. PCR-RFLP 法

遺伝性消化管ポリポーシスの原因となる *APC* 遺伝子変異によって, 変異型アレルに特異的に制限酵素 *MseI* の認識配列が形成されることを利用して PCR-RFLP 法による遺伝子検査法を設計した (Figure 2-2A および 2-3)。

はじめに, 酵素反応の最適な反応時間を決定した。ジャック・ラッセル・テリアのキャリア個体および非キャリア個体由来の血液の DNA (各 n=1), 野生型および変異型の合成 DNA から増幅した PCR 産物を 1 時間から 24 時間の範囲で制限酵素反応を行った。その結果, 1 時間で十分な反応が得られた (Figure 2-4A および B)。さらに, 24 時間の反応でもスター活性 (71), による非特異的な切断は検出されなかった。

すべての DNA サンプルについて、PCR 反応後、アガロースゲルを用いた電気泳動で 156 bp の単一な PCR 産物が増幅されていることを確認し (data not shown)、制限酵素処理後にアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で泳動パターンを観察した。野生型および変異型の合成 DNA の PCR 産物はそれぞれ 16, 31, 109 bp の 3 つの断片と 16, 31, 51, 58 bp の 4 つの断片に切断された (Figure 2-3B)。はじめに、血液サンプルの解析を行ったところ、ジャック・ラッセル・テリアの非キャリア个体 5 頭の PCR 産物は野生型アレルに由来する 3 つの断片 (16, 31, 109 bp) に、キャリア个体 11 頭の PCR 産物は野生型アレル由来の 109 bp と変異型アレル由来の 51 bp と 58 bp の両断片を含む 5 つの断片 (16, 31, 51, 58 および 109 bp) に切断された (Figure 2-4A)。口腔スワブサンプル (ジャック・ラッセル・テリアのキャリア个体 6 頭とビーグル 5 頭) および FFPE サンプル (ジャック・ラッセル・テリアのキャリア个体 10 頭と非キャリア个体 5 頭で) を用いた解析においても、同様の切断パターンが観察され (Figure 2-4B および C)、いずれのサンプルからも APC 遺伝子変異の有無を正確に判定することができた。以上の結果より、PCR-RFLP 法では様々な材料から抽出した DNA が利用可能であることが示された。

制限酵素処理した PCR 産物はすべて、マイクロキャピラリー電気泳動でも分析した。合成 DNA を分析したところ、野生型では 31 bp と 109 bp に 2 つのピークが、変異型では 31 bp, 51 bp, 58 bp に 3 つのピークが観察された (Figure 2-5A)。Figure 2-5 B~D に血液、口腔スワブ、FFPE サンプルを用いたそれぞれの解析の代表的な結果を示す。非キャリア个体の場合、泳動パターンは野生型合成 DNA と同じであった (Figure 2-5 B~D 左図)。キャリア个体では、野生型と変異型の DNA を組み合わせたパターンが観察され、31, 51, 58, 109 bp に 4 つのピークが認められた (Figure 2-5 B~D 右図)。サンプルの種類を問わず、血液サンプル (キャリア个体

および非キャリア個体：n=5 および n=11), 口腔スワブサンプル (n=5 および n=6), FFPE サンプル (n=5 および n=10) のすべてのサンプルから同様の泳動パターンが得られた。

3. TaqMan リアルタイム PCR 法

TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法により遺伝子型を決定することが可能であるか，血液サンプルおよび合成 DNA を用いて検討した。FAM および VIC の蛍光強度をサイクル毎にモニタリングしたところ，野生型合成 DNA では VIC の蛍光強度が，変異型合成 DNA では FAM の蛍光強度が指数関数的に増加した (Figure 2-6A および 2-7A)。いずれの合成 DNA においても対立アレルの非特異的な増幅は検出されなかった。ジャック・ラッセル・テリアの非キャリア個体 5 頭の血液サンプルでは野生型合成 DNA と同様に VIC の蛍光強度のみが増加し，FAM の蛍光は 40 サイクルの増幅後でも認められなかった (Figure 2-6B, 2-6C 左, 2-7B および 2-7C 左図)。一方で，ジャック・ラッセル・テリアのキャリア個体 11 頭の血液サンプルを調べたところ，FAM と VIC の両方の蛍光強度が同時に増加し，30 サイクル前後でその値が閾値 (Threshold Line) を超えた (Figure 2-6B, 2-6C, 2-7B および 2-7C 右図)。

続いて，エンドポイントにおける FAM と VIC の蛍光強度に基づいて遺伝子型を決定する Allelic Discrimination Plot 解析を行なった (Figure 2-8)。解析した血液サンプルおよび合成 DNA は 3 つのクラスターに分類された。野生型合成 DNA と 5 頭の非キャリア個体からなる野生型クラスターはグラフの右下に，変異型合成 DNA からなる変異型クラスターは左上に，11 頭のキャリア個体からなるヘテロ接合型クラスターはその対角線上に位置し，それぞれの遺伝子型が正確に別のクラスター

に分類された (Figure 2-8)。

IV. 考 察

本章では、ジャック・ラッセル・テリアにおける遺伝性消化管ポリポーシスの原因として同定した *APC* 遺伝子の生殖細胞系列変異 (c.[462_463delinsTT]) の有無を判定できる遺伝子検査法を開発した。PCR-RFLP 法と TaqMan リアルタイム PCR 法のいずれの方法においても、偽陽性および偽陰性は検出されず、これらの検査法は高い特異性と感度を有する信頼性の高い遺伝子検査法であることが実証された。PCR-RFLP 法と TaqMan リアルタイム PCR 法は 1 塩基の違いを検出することが可能であるが、本疾患の原因となる変異は 2 塩基の連続した塩基置換であり、このことが検査法の特異性を高めることにつながっていると考えられる。

PCR-RFLP 法は、最も一般的な遺伝子型決定法の 1 つであるが、適切な制限酵素がない場合は本法を適用できない。本疾患については、原因遺伝子変異により *MseI* の認識配列 (TTAA) が形成されることを利用して、PCR-RFLP 法を設計可能であった。PCR-RFLP 法では、*MseI* を用いた制限酵素処理により得られた変異型アレル由来の 51 bp と 58 bp の断片の有無によってキャリア個体と非キャリア個体を正確に区別することができた。PCR-RFLP 法では、PCR 産物内に *MseI* の認識配列が遺伝子変異部位以外にも 2 つ含まれており (Figure 2-2A および 2-3)、検査個体の遺伝子型にかかわらず、制限酵素処理によって 156 bp のバンドが消失するため、不完全な酵素反応に起因する偽陰性の発生を防ぐことができる。さらに、今回開発した PCR-RFLP 法は、サーマルサイクラーと電気泳動装置を用いて半日で完了するため、一般的な検査施設で迅速な診断が可能である。また、検査材料として口腔スワブを用いることで、サンプリングの際の侵襲を避けることができる。さらに、FFPE サンプルを用いた検査が可能であるため、病理検査時に遺伝性ポリポーシス

が疑われた場合、血液や口腔スワブなど新たな生体材料を採取することなく、症例の遺伝子型を決定することができる。さらに、サンプルを用いることで回顧的研究も可能になる。

TaqMan リアルタイム PCR 法は複数の蛍光をリアルタイムに測定できる専用のサーマルサイクラーが必要となるが、多数の検体を一度に解析できるため大規模な疫学研究に適していると考えられる。また、一度の PCR 反応のみで遺伝子型を決定できるため、PCR 反応後に追加の操作を行う必要がなく、人為的ミスが生じるリスクを最小限に抑えることができる。

第 1 章で示した遺伝性消化管ポリポーシスの症例は、散発性消化管腫瘍の症例とは異なり、長期間の生存が期待できるが、一方で、腫瘍を再発するリスクが高い。また、腫瘍性ポリープが多発することも多く、胃と腸管の両方に発生する症例もみられる。したがって、臨床獣医師は両者を鑑別して診療にあたる必要がある。本章で開発した遺伝子検査によって、遺伝性消化管ポリポーシスの確定診断が可能になり、小動物臨床における診療に大きなメリットをもたらすと考えられる。すでに消化管上皮性腫瘍が検出されている症例ばかりでなく、慢性的に嘔吐や血便などの消化器症状が認められるジャック・ラッセル・テリアは遺伝子検査の対象とすべきである。イヌの内視鏡検査には全身麻酔が必要であるため、その実施については慎重に判断する必要があるが、遺伝子検査により遺伝性消化管ポリポーシスであると診断されれば、現在、消化器症状が認められない個体であっても、将来、消化管ポリープが発生する危険性が高いため、定期的な内視鏡検査の実施が強く推奨される。近年、多くの民間検査会社がイヌやネコの遺伝性疾患に対する遺伝子検査を提供しており (27, 68)、ペットの飼い主や獣医師は将来の発症リスクを確認しておくことができるようになってきた。遺伝性消化管ポリポーシスは成犬になった後に発症し、

発症年齢も若齢から高齢まで様々である。したがって、遺伝子検査により生涯にわたるリスクを把握することは、発症の早期発見という観点からも極めて重要である。

イヌの遺伝性疾患の蔓延を防ぐには、遺伝子検査は必須である (16,17)。成犬になった後に発症する疾患では、発症前のキャリア個体を意図せず繁殖に利用してしまいうリスクがある。ドッグショーのチャンピオン犬などは繁殖に多用されることがあり、このような個体が遺伝子変異を持っていた場合、犬種内で変異が急速に拡大することがあり、**Popular sire effect** と呼ばれる (16)。第 1 章で遺伝性消化管ポリポーシスと診断された症例の多くは 2000 年代に生まれていた。また、ジャック・ラッセル・テリアの遺伝性消化管ポリポーシスは 2000 年代の後半から増加しており、この時期に **Popular sire effect** などによって、日本国内で本疾患が拡大した可能性が考えられる。今後、繁殖に用いる個体の遺伝子検査を実施し、*APC* 遺伝子の生殖細胞系列変異が次世代に受け継がれないようにしていけば、将来の疾患発生数を大幅に減少させ、将来的には疾患を根絶できる可能性もある。

本章で確立した遺伝子検査法は大規模な疫学調査を可能とすると考えられる。国外で遺伝性消化管ポリポーシスの報告はなく、本疾患は日本国内のジャック・ラッセル・テリアにのみで蔓延している可能性がある。しかし、遺伝性消化管ポリポーシスと診断されたジャック・ラッセル・テリアの先祖にはオーストラリアから導入された個体が複数認められ、国外にも *APC* 遺伝子変異のキャリア犬が存在する可能性が残されている。また、日本国内のジャック・ラッセル・テリアにおいても、*APC* 遺伝子変異の保有率は不明であり、国内外のジャック・ラッセル・テリアに対する疫学調査を行なう必要がある。また、健康なジャック・ラッセル・テリアを対象に疫学調査を行うことで、*APC* 遺伝子変異を保有する未発症の個体が検出されれば、将来のリスク評価法としての遺伝子検査の有効性が示されるであろう。

V. 小 括

本章では、ジャック・ラッセル・テリアの遺伝性消化管ポリポーシスの信頼性の高い遺伝子検査法を確立した。遺伝子検査を実施することで、罹患個体の確定診断が可能になるだけでなく、将来の発症リスクの評価や繁殖段階での疾患の発生制御が可能になる。遺伝性消化管ポリポーシスに罹患したジャック・ラッセル・テリアでは多発性・再発性の消化管ポリープを発症するため、外科手術以外の治療法の確立が望まれている。本章で開発した遺伝子検査法は、小動物臨床の現場で効果的な治療法を確立していく上で有用な基盤となると考えられる。

また、遺伝性消化管ポリポーシスは同定されたばかりの疾患であり、その疫学的なデータが欠如している。今回確立した遺伝子検査法は、第3章の大規模疫学研究に有用であると考えられた。

第 2 章

图 表

Table 2-1. Primers and probes used for PCR-based assays for detection of the germline APC mutations.

	Sequence	Product size (bp)
<i>Primers used for PCR-direct sequencing</i>		
Primers	sense 5'- AGTCCCACCTTCAAAAATCC	385
	antisense 5'- AACTAAAAATGCAATTATCTTGAATG	
<i>Primers used for PCR-RFLP and PCR-directsequencing of FFPE samples</i>		
Primers	sense 5'- TCTTTTGGCATTGTAAACTTG	156
	antisense 5'- CTTACATTTTCAGTTAAAGGAGACT	

A Wild-type synthetic DNA

```
ACTTTAGGTTAAGTAGAGAACATTATAATTGCAGCTGATA  
AGAATTACTGTTATGTACTCTTTTGGCATTGTGTAAACTT  
GTCTTTTTTTTAAAAAAACAGATCATTACTTCTTGCTGATC  
TTGACAAAGAAGAAAAGGAAAAAGATTGGTATTATGCTCA  
ACTTCAGAATCTCACTAAAAGAATAGATAGTCTCCCTTTA  
ACTGAAAATGTAAGTAACTTAGCATTATGACCTATTTTAG  
ACTTTAATAACTTTGATCTCTTAAAAGTACCTACGTTACT  
CATTTAAAAAATTCAAGATAAAAAAAAAC
```

B Mutant synthetic DNA

```
ACTTTAGGTTAAGTAGAGAACATTATAATTGCAGCTGATA  
AGAATTACTGTTATGTACTCTTTTGGCATTGTGTAAACTT  
GTCTTTTTTTTAAAAAAACAGATCATTACTTCTTGCTGATC  
TTGACAAAGAAGAAAAGGATTAAGATTGGTATTATGCTCA  
ACTTCAGAATCTCACTAAAAGAATAGATAGTCTCCCTTTA  
ACTGAAAATGTAAGTAACTTAGCATTATGACCTATTTTAG  
ACTTTAATAACTTTGATCTCTTAAAAGTACCTACGTTACT  
CATTTAAAAAATTCAAGATAAAAAAAA
```

Figure 2-1. DNA sequences of synthetic DNA of wild-type (A) and mutant (B) APC alleles. The synthetic DNA fragments contained 309 bp that include entire exon 4 (109 bp) with the most proximal 100 bp of both upstream and downstream introns. Blue letters indicate coding region of exon 4. Red letters indicate APC variant.

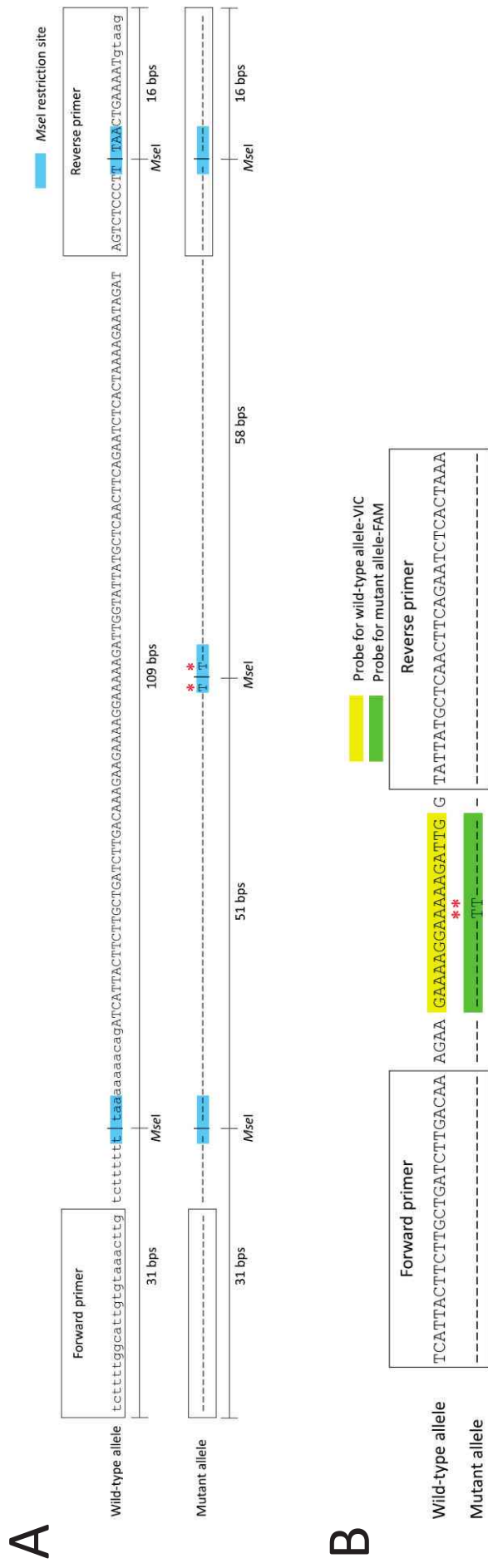


Figure 2-2. (A) PCR-RFLP assay. Note that, while the 156-bp fragment of the wild-type *APC* allele contains two restriction sites of *MseI*, there are 3 restriction sites in the fragment of the mutant *APC* allele. Restriction sites of *MseI* (T/TA) are highlighted in blue. Asterisks indicate the variant sites. Uppercase and lowercase letters indicate exon 4 and introns, respectively. (B) TaqMan duplex real-time PCR assay. Probes specific for wild-type and mutant alleles are highlighted in yellow and green, respectively. Asterisks indicate variant sites.

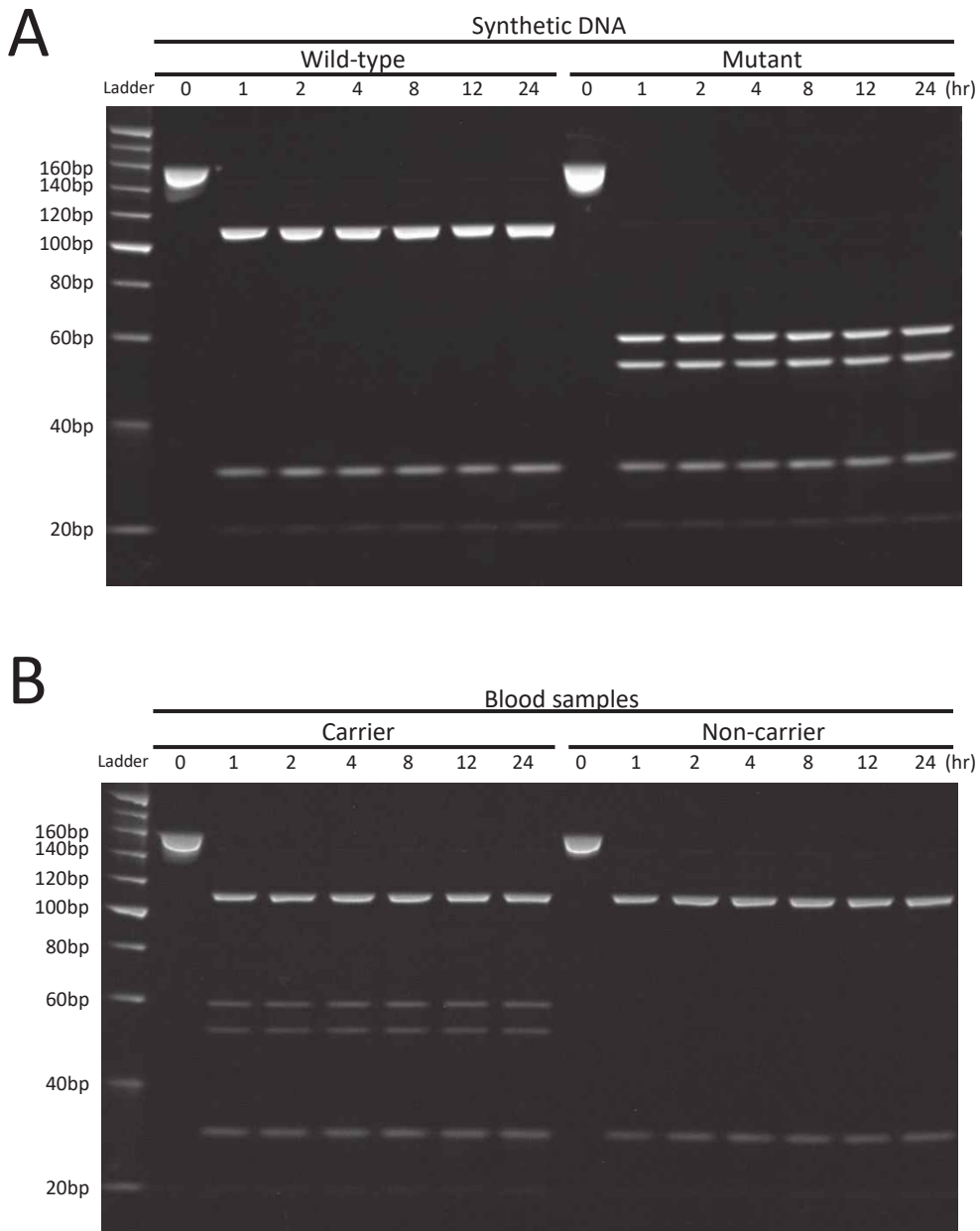


Figure 2-3. PCR-RFLP assay conducted to determine the optimal digestion time. Acrylamide gel electrophoresis of *MseI*-digested PCR products amplified from synthetic wild-type and mutant DNA (A), and blood-derived DNA samples of a carrier and a non-carrier of germline APC variant (B). PCR products amplified from each sample were digested with *MseI* for 0, 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h.

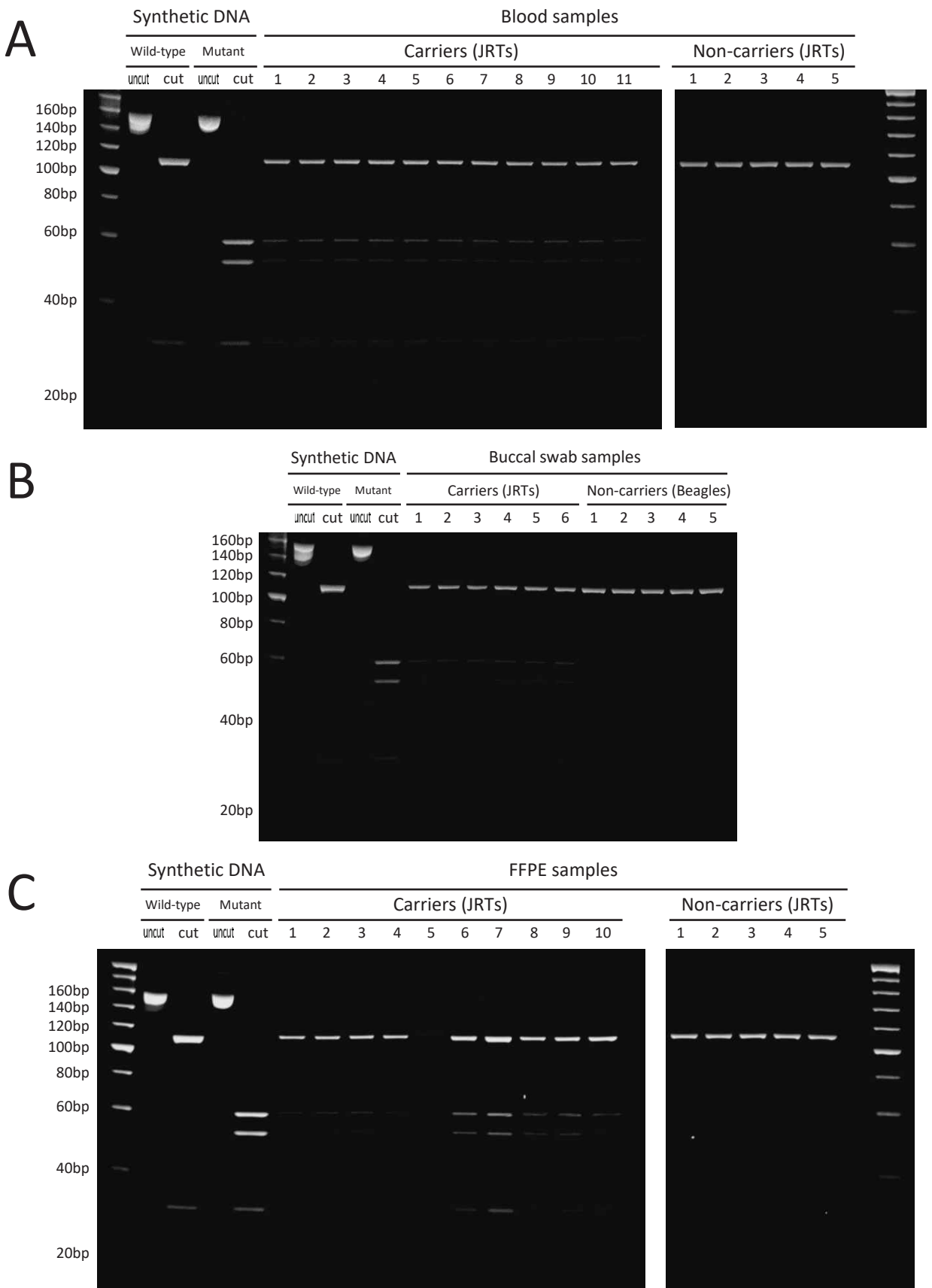


Figure 2-4. PCR-RFLP assay. (A) Polycrylamide gel electrophoresis of *MseI*-digested PCR products amplified from blood samples of carrier and non-carrier JRTs (n=11 and 5, respectively); (B) buccal swab samples of carrier JRTs and laboratory beagles (n=6 and 5, respectively); (C) FFPE tissue samples of carrier and non-carrier JRTs (n=10 and 5, respectively).

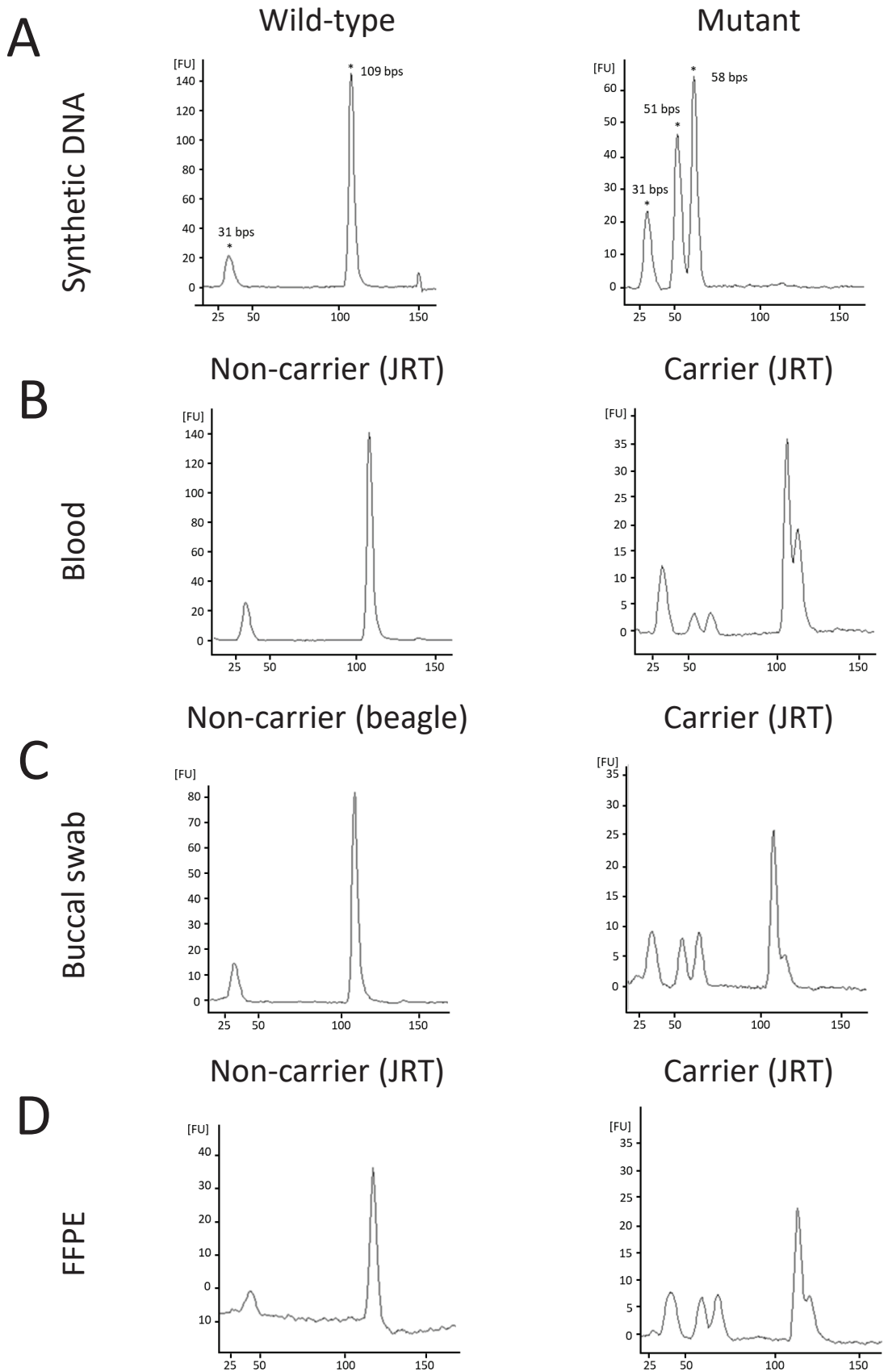


Figure 2-5. PCR-RFLP assay. Representative microfluidic capillary gel electropherograms of *MseI*-digested PCR products amplified from synthetic wild-type and mutant DNA (A), blood (B), buccal swab (C), and FFPE samples (D) of carrier and non-carrier dogs.

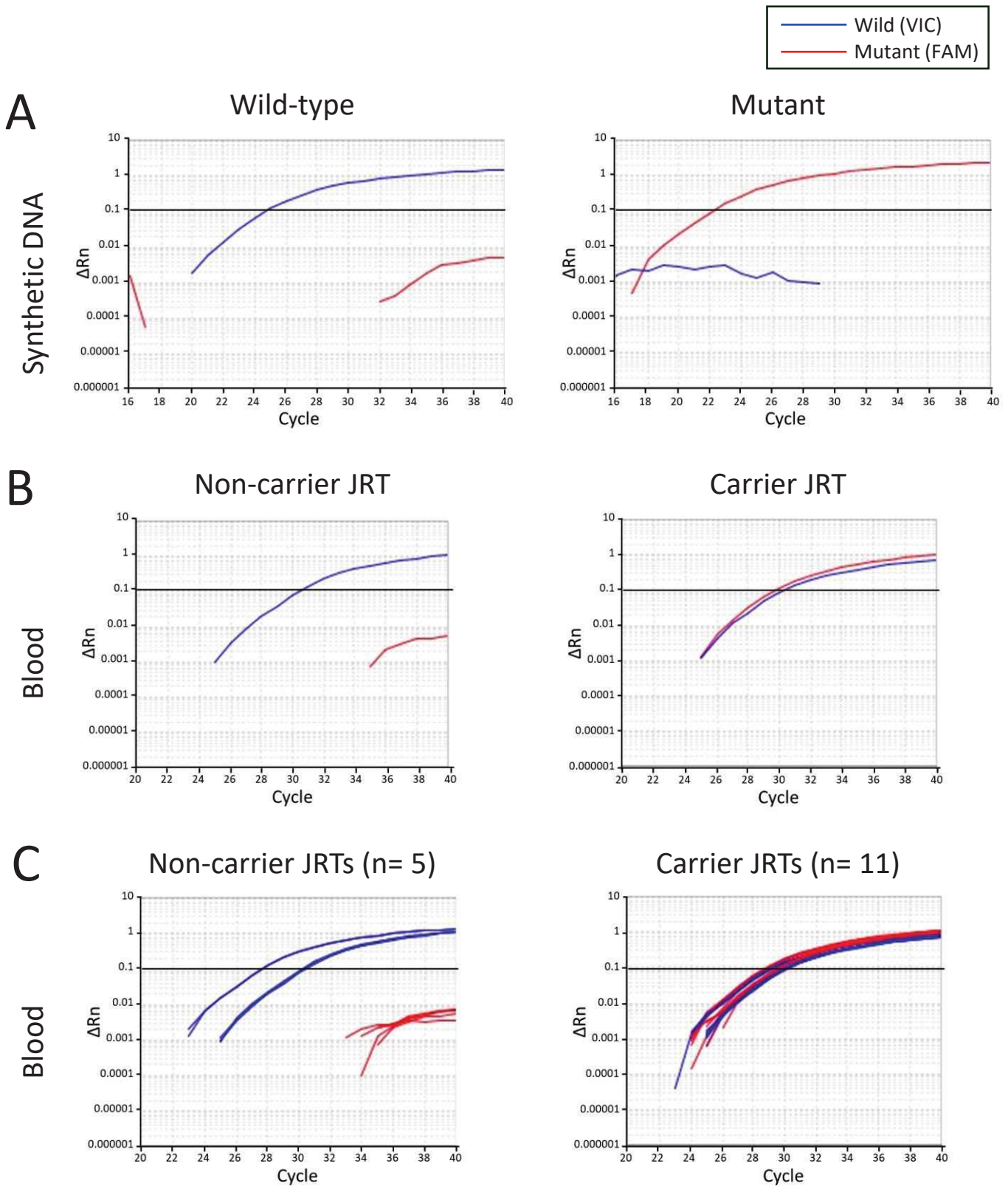


Figure 2-6. TaqMan duplex real-time PCR assay. Amplification plots of wild-type (blue curve) and mutant (red curve) *APC* gene copies on synthetic wild-type and mutant DNAs (A) and blood-derived DNAs of carrier or non-carrier JRTs (B and C). Amplification was plotted as fluorescence intensity (ΔRn value) against cycle numbers and shown on log scales. (B) shows representative results of individual cases of carrier or non-carrier dogs and the (C) summarize the results of all examined cases (n=11 and 5 for carrier and non-carrier JRTs, respectively).

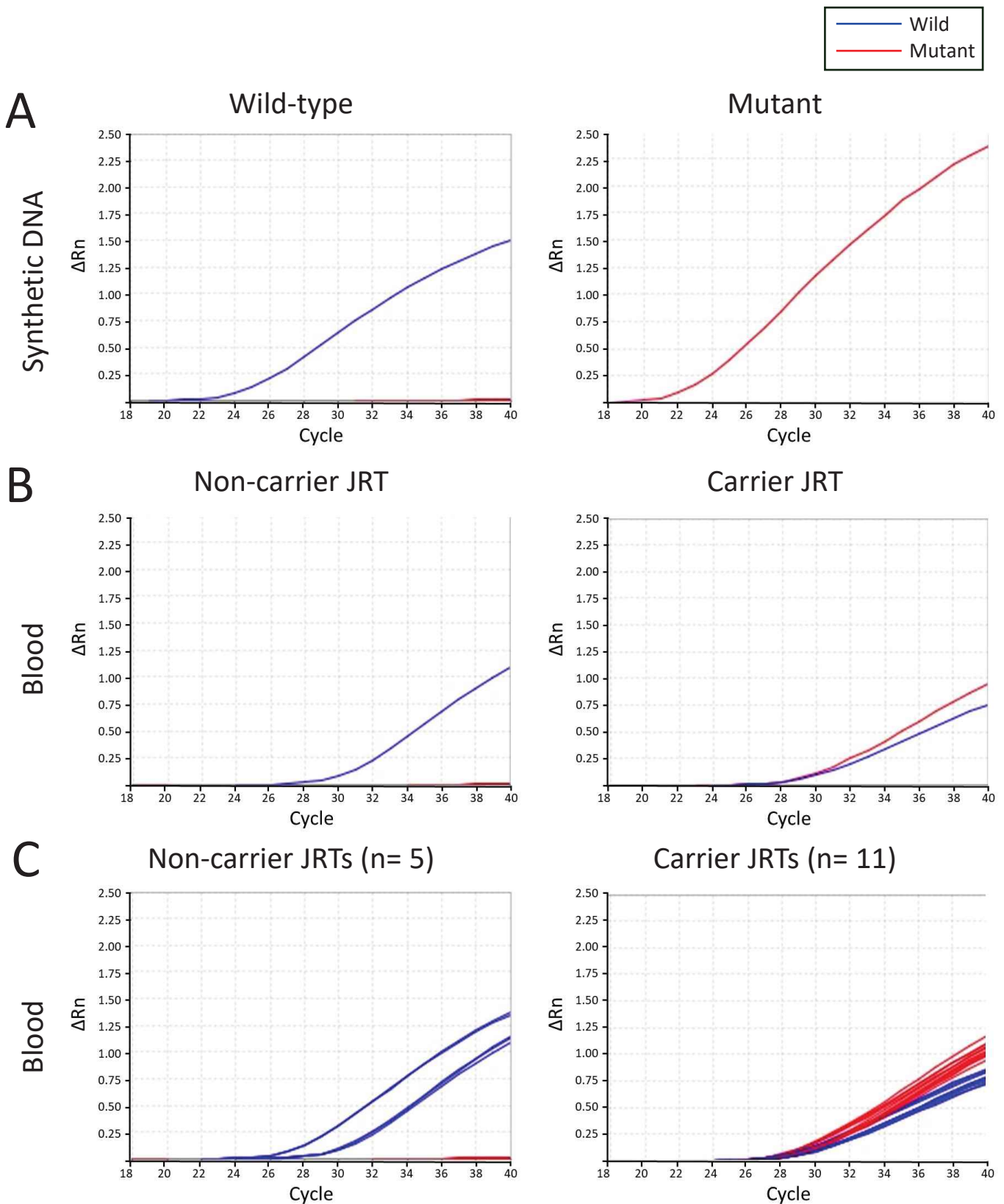


Figure 2-7. TaqMan duplex real-time PCR assay. Amplification plots of wild-type (blue curve) and mutant (red curve) *APC* gene copies on synthetic wild-type and mutant DNAs (A) and blood-derived DNAs of carrier or non-carrier JRTs (B and C). Amplification was plotted as fluorescence intensity (ΔRn value) against cycle numbers and shown on liner scales. (B) shows representative results of individual cases of carrier or non-carrier dogs and the (C) summarize the results of all examined cases (n=11 and 5 for carrier and non-carrier JRTs, respectively).

Allelic Discrimination Plot

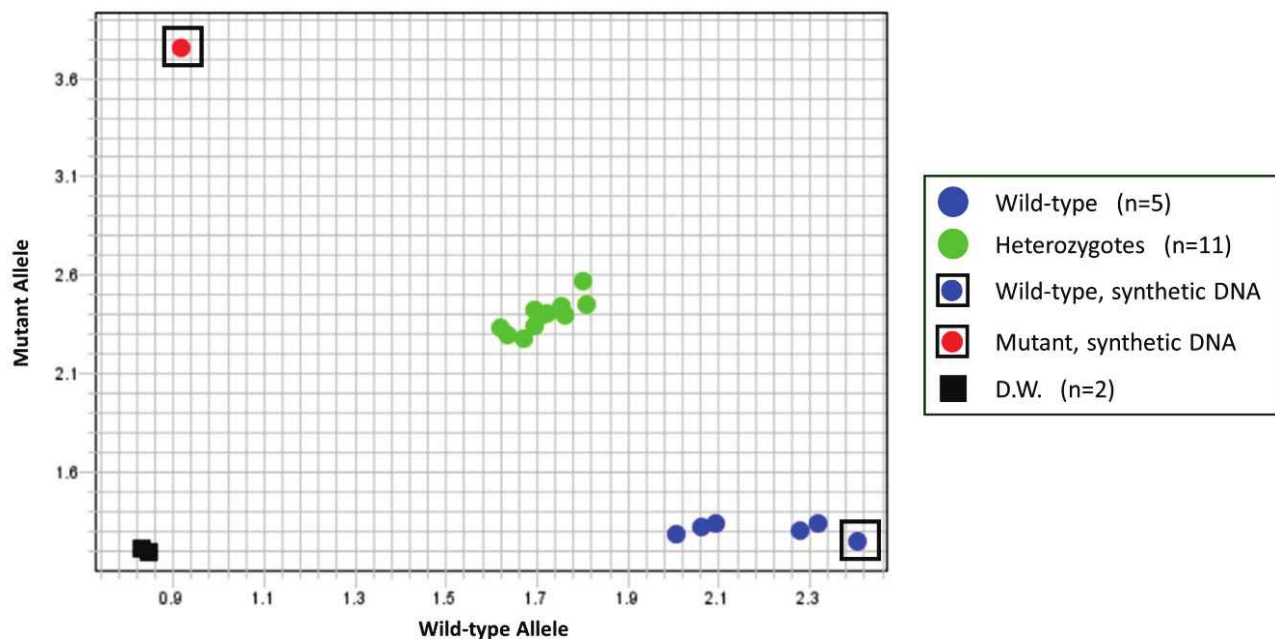


Figure 2-8. TaqMan duplex real-time PCR assay. Allelic discrimination plot based on the signal intensity ratio of FAM and VIC at the end points of PCR amplification. Synthetic wild-type and mutant DNAs are located at bottom right and top left corners, respectively, and distilled water used as negative control is at bottom left corner. Non-carrier JRTs are clustered together with the synthetic wild-type DNA at bottom right corner. Carrier JRTs are located near the diagonal line forming a distinct cluster.

第3章

遺伝性消化管ポリポーシスに関する分子疫学的解析：
ジャック・ラッセル・テリアにおける *APC* 遺伝子変異の保有率
および犬種特異性の検討

I. はじめに

第1章で明らかにしたジャック・ラッセル・テリアの遺伝性消化管ポリポーシスは、*APC* 遺伝子の特定の生殖細胞変異 (c.[462_463delinsTT]) を原因とする常染色体顕性 (優性) 遺伝疾患であり、ヒトの軽症型 FAP に相当する疾患と考えられている。遺伝性消化管ポリポーシスに罹患したジャック・ラッセル・テリアでは、胃や大腸に多発性の腺腫や腺癌が発生し、再発のリスクも高い。一方で、散発性消化管腫瘍の症例より予後が良く、長期の生存期間を望むことができる。したがって、臨床獣医師は遺伝性消化管ポリポーシスと散発性消化管腫瘍を鑑別して診療にあたる必要がある。そこで、第2章では、両者の鑑別を可能にする遺伝子検査法を開発した。また、今回開発した遺伝子検査法は、従来よりも簡便に *APC* 遺伝子変異を検出できるため、多数の検体の解析が求められる疫学調査などにも有用であると考えられる。ジャック・ラッセル・テリアの遺伝性消化管ポリポーシスに関する海外からの報告はなく、本疾患は日本国内のみで蔓延している可能性がある。しかしながら、国内のジャック・ラッセル・テリアにおいて、本疾患の原因となる *APC* 遺伝子変異がどの程度広がっているか明らかにされておらず、その疫学調査が望まれる。これまでの研究では、動物病院に来院したジャック・ラッセル・テリアの消化管腫瘍の症例を対象に解析を行い、*APC* 遺伝子変異の保有犬の存在を明らかにしてきた。一方、遺伝性消化管ポリポーシスは成犬になってから発症する疾患で、10歳以上になって初めて発症する症例もみられる。したがって、正確な *APC* 遺伝子変異の保有率を明らかにするためには、健常犬の中に含まれる未発症の個体を含めた解析が必要である。また、遺伝性消化管ポリポーシスの症例は2000年代後半から増加しており、2000年代に日本国内のジャック・ラッセル・テリアで *APC* 遺伝

子変異が拡散した可能性がある。大規模な疫学調査を実施すれば、*APC* 遺伝子変異保有率の推移を明らかにすることができると考えられる。

純血種は犬種を確立し、維持していく過程で、常に人為的に遺伝的な選択を受けている。その結果、純血種のイヌは、犬種確立当初の遺伝的特徴が強く反映された遺伝的に独立した集団となっており (17, 48, 70)、イヌの場合、遺伝性疾患は特定の犬種に特異的に発生することが多い。しかし、変性性脊髄症 (Degenerative Myelopathy, 以下 DM) のように、同じ遺伝性疾患が複数の異なる犬種で発生することがある。DM の原因となる *SOD1* 遺伝子変異はジャーマン・シェパード・ドッグで初めて発見されたが (3)、その後、同一の遺伝子変異が DM を発症したウェルシュ・コーギーやボクサーでも認められることが明らかになった (4)。したがって、遺伝性消化管ポリポシスがジャック・ラッセル・テリア以外の犬種にも認められる可能性は否定できない。

本章では、第 2 章で開発した遺伝子検査法を用いて、国内のジャック・ラッセル・テリアにおける *APC* 遺伝子変異保有状況を解析した。また、本疾患がジャック・ラッセル・テリア以外の犬種でも発生している可能性がないか検討するため、消化管上皮性腫瘍に罹患した他犬種の症例における *APC* 遺伝子変異の有無を検索した。

II. 材料および方法

1. DNA サンプル

1-1. ジャック・ラッセル・テリア

2020年3月から6月にかけて日本国内の93か所の一般開業動物病院に来院した792頭のジャック・ラッセル・テリア (Table 3-1) から末梢血を採取した。採血はその検査結果および臨床情報の研究利用について、全ての飼い主から書面での同意を得た上で行い、フィラリア検査の際に本研究のために500 μ L 余分に採取した。対象個体は、実施期間中に病院に来院したジャック・ラッセル・テリアとし、消化管関連疾患を含む過去の病歴を含めて犬種以外の条件は設けなかった。採取した血液は EDTA \cdot 2Na で抗凝固処理し、DNA 抽出までの間 -20°C で保存した。ゲノム DNA は DNeasy Blood& Tissue Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。抽出した DNA の濃度および A260/A280 比は、NanoDropTM Lite 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

1-2. 消化管上皮性腫瘍を罹患した他犬種

ジャック・ラッセル・テリア以外の犬種に同じ遺伝子変異を原因とする遺伝性消化管ポリポースが認められるか検討するため、消化管上皮性腫瘍 (腺腫および腺癌) と診断された症例において APC 遺伝子の生殖細胞変異 (c.[462_463delinsTT]) を検索した。

FFPE サンプル

岐阜大学獣医病理学研究室で2014年から2018年の間に胃あるいは腸管の腺腫・腺癌と診断されたジャック・ラッセル・テリア以外の犬種を対象症例とした。19犬

種 32 頭が含まれていた (Table 3-2 および 3-4)。ゲノム DNA は、FFPE 切片の非腫瘍部から QIAmp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。

遺伝子バンクサンプル

様々な非感染性疾患の罹患犬のゲノム DNA が収集・保管されている麻布大学のイヌの遺伝子バンクから (55)、消化管上皮性腫瘍の罹患犬の DNA サンプルの提供を受けた。DNA サンプルは血液から抽出され、 -30°C で保管されていたものを液体の状態を提供された。ジャック・ラッセル・テリア 4 頭を含む 19 犬種 39 頭が含まれていた (Table 3-3 および 3-4)。

1-3. 対照 DNA サンプル

遺伝子解析の対照サンプルとして、第 2 章で作製した野生型または変異型アレルのホモ接合性の合成二本鎖 DNA を用いた。また、キャリア個体および非キャリア個体の対照サンプルとして、第 1 章で検索した症例 No. 5 および他疾患(肝臓腫瘍)のジャック・ラッセル・テリアの DNA を用いた。

2. 遺伝子検査

2-1. PCR-RFLP 法

すべてのサンプルについて第 2 章で確立した PCR-RFLP 法を用いて遺伝子検査を行った。PCR 産物は *MseI* による制限酵素処理後、アクリルアミドゲルを用いた電気泳動で解析した。PCR 反応液は総量が $20\ \mu\text{L}$ になるように調整した。FFPE サンプルのうち FFPE006, 011, 012, 013, 019, 021 および 028 については、PCR 反応液の総量が $50\ \mu\text{L}$ になるように調整し、PCR を行った。

2-2. TaqMan PCR 法

遺伝子バンクサンプルについて TaqMan リアルタイム PCR 法を用いて解析した。第 2 章で記述した条件で PCR を行い、VIC および FAM の蛍光強度はサイクル毎に測定するとともに、40 サイクル終了後のエンドポイントでも測定した。実験結果は、StepOne and StepOnePlus Software v2.3 (Thermo Fisher Scientific) により解析した。

2-3. PCR-ダイレクトシーケンス法

PCR-RFLP 法で *APC* 遺伝子変異キャリア個体と判定されたジャック・ラッセル・テリアおよび遺伝子バンクの全サンプルについては、第 1 および 2 章で使用した exon 4 の全領域を増幅するプライマー (Table 2-1) を用いて PCR-ダイレクトシーケンス法を実施し、塩基配列を確認した。FFPE サンプルについては exon 4 の codon 154 および 155 を含む 156 bp を増幅するプライマー (Table 2-1) を用いた。PCR には Takara EX Taq Hot Start Version (タカラバイオ株式会社) を用いて、第 1 および 2 章と同様の条件で行った。

3. ジャック・ラッセル・テリアのキャリア個体の臨床症状および病歴に関する調査

遺伝子検査の結果、*APC* 遺伝子変異のキャリア個体であると判定されたジャック・ラッセル・テリアについて、現在および過去の病歴・健康状態を調査するため、臨床獣医師および飼い主から聞き取りを行った。病歴については、病理診断依頼書の記載情報をもとに調べるとともに、担当獣医師への電話での問い合わせにより調査した。また、飼い主へ研究目的を説明の上、アンケートにより、①嘔吐、②メレ

ナ、③下痢および④その他の症状の有無を調査した。

4. ジャック・ラッセル・テリアのキャリア個体に関する血統書を用いた家系調査

遺伝子検査の結果、*APC* 遺伝子変異のキャリア個体であると判定されたジャック・ラッセル・テリア 15 頭について、キャリア個体間の血縁関係を評価するために、血統書を収集した。血統書は飼い主の同意のもと提供された。さらに、これまでに岐阜大学獣医病理学研究室で遺伝性消化管ポリポーシスとした診断した症例 5 頭を加えて血縁関係を調べた。5 頭のうち 4 頭は、第 1 章で血統書を収集したジャック・ラッセル・テリア（症例 No. 1, 3, 6 および 21）である。1 頭はその後に新たに診断された症例で症例 No. 22 とした。上記 6 頭の誕生年、性別、ポリープの発生部位などを Table 3-5 に示した。

5. 病理組織学的解析

FFPE サンプルで用いた他犬種の消化管上皮性腫瘍の組織学的診断は動物の WHO 分類に準じて行った (19)。さらに、腫瘍の深達度について、ヒト消化管腫瘍で用いられる TNM 分類を用いて評価した (1, 6)。

6. 統計解析

ジャック・ラッセル・テリアにおける *APC* 遺伝子変異保有率はカイ二乗検定を用いて解析した。P 値が 0.05 以下の時に統計学的に有意とした。

III. 結 果

1. ジャック・ラッセル・テリアの解析

1-1. APC 遺伝子変異の保有率

国内 93 か所の動物病院から 792 頭のジャック・ラッセル・テリアの血液を採取した。抽出したゲノム DNA の濃度は 2.2 から 489.0 ng/ μ L で、平均値は 34.5 ng/ μ L で、吸光度比 (A260/280) の平均値は 1.74 であった。PCR-RFLP 法を用いて遺伝子検査を行ったところ、15 頭で APC 遺伝子の生殖細胞系列変異が検出された (Figure 3-1A)。キャリア個体と判定された 15 頭については、PCR-ダイレクトシーケンシングによって塩基配列を決定し、検出目的とした APC 遺伝子変異 (c.[462_463delinsTT]) が認められることを確認した (Figure 3-1B)。今回検索したジャック・ラッセル・テリアにおける変異保有率は 1.9% (n=15) であり、性別、被毛の種類による統計的に有意な差は認められなかった (Table 3-6)。また、検査個体の生まれた年について、5 年ごとに区切って解析したところ、キャリア個体 15 頭のうち、5 頭は 2006 年から 2010 年、6 頭が 2011 年から 2015 年、4 頭が 2016 年から 2020 年に生まれており、各年代の変異保有率は 2%前後で推移しており、統計学的に有意な差は認められなかった (Table 3-6)。今回見つかったキャリア個体のうち、最高齢の個体は 2007 年生まれ、最若齢の個体は 2017 年生まれであった。

1-2. APC 遺伝子変異キャリア個体の病歴および臨床症状

獣医師および飼い主のアンケート調査を通して、15 頭の APC 遺伝子変異のキャリア個体のうち 10 頭について現病歴、既往歴および臨床情報が収集できた。ジャック・ラッセル・テリアのキャリア個体のうち 5 頭 (JRT152, JRT203, JRT216,

JRT317 および JRT342) で消化管腫瘍の発生がみられた (Table 3-7)。JRT152 は、8.3 歳で嘔吐が認められ、直後に吐物に血液が混ざるようになった。嘔吐が認められた数日後に内視鏡検査が行われ (Figure 3-2)、胃噴門部および幽門部にポリープが発見され、病理組織学的にいずれも胃腺癌と診断された (Figure 3-3A および B)。JRT203 は、過去に血便、メレナ、下痢などの消化器症状が認められ、現在は嘔吐がみられるとの回答が飼い主から得られた。さらに、今回の遺伝子検査の結果を受けて、6.2 歳で内視鏡検査を実施したところ、幽門部に複数のポリープが発見され、病理組織学的に胃腺癌と診断された。JRT216 は、4.8 歳の時に直腸腺癌と診断された。術後、血便は改善されたものの、軽度な血便は継続していた。6.1 歳の時には内視鏡検査で直腸腺癌の再発がみられた (Figure 3-3C および D)。JRT317 は、3.7 歳の時にメレナが認められ、2 ヶ月後に手術にて直腸病変が切除され、腺癌と診断された。JRT342 は、長年、嘔吐を繰り返していた。5 月に 11.1 か月で再び嘔吐が認められ、2 週間後に内視鏡検査で幽門部ポリープが発見され、胃腺癌と診断された。この個体は、腫瘍の周囲組織への浸潤増殖および遠隔転移が認められ、手術の 2 か月後に 11.5 歳で死亡した。

さらに、4 頭 (JRT056, JRT196, JRT321 および JRT447) では、消化管ポリープについての報告はなかったものの、消化器症状がみられた。JRT056 は、遺伝子検査から数ヶ月後に 10.7 歳で死亡した。死因は不明であったが、死亡直前に重篤な嘔吐と食欲不振が見られた。JRT196 は、2.2 歳の時点で血液の混じった嘔吐の既往があり、遺伝子検査を行った 2.8 歳の時点で軟便と血便が認められた。JRT321 は 11 歳前後で下痢と血便が認められた。JRT447 は 3 歳前後で軟便が認められた。アンケートに回答のあった症例のうち 1 頭 (JRT221) は、3.5 歳時点で既往歴も消化器症状も認められなかった。

1-3. ジャック・ラッセル・テリアのキャリア個体の家系調査

ジャック・ラッセル・テリアのキャリア個体 15 頭うち 8 頭 (JRT152, 196, 203, 216, 221, 317, 342 および 447) の血統書が入手できた。これら 8 頭に、これまでに本研究室で遺伝性消化管腫瘍症と診断された 5 頭を加え、合計 13 頭の血統書を解析した。その結果、JRT203, JRT317, 症例 No. 22 の 3 頭, JRT197, JRT216, 症例 No. 3, 症例 No. 21 の 4 頭, JRT221, JRT342, 症例 No. 1, 症例 No. 6 の 4 頭の間にそれぞれ血縁関係が認められた (Figure 3-4)。

1 番目の家系では最も近い血縁関係が認められ、JRT203, JRT317 および症例 No. 22 の父犬は共通であった (Figure 3-4A)。さらに、それぞれの母犬にも血縁関係があり、JRT203 と JRT317 の母犬は同腹仔ではないものの、同じ繁殖ペアから生まれた異腹姉妹犬であった (Figure 3-4A)。さらに、症例 No. 22 の母犬は JRT203 と JRT317 の母犬と異母姉妹でもあった (Figure 3-4A)。

2 番目の家系では、JRT216 は過去に診断された症例 2 頭と関連があった (Figure 3-4B)。JRT216 は症例 No. 3 と異父姉弟であった (Figure 3-4B)。また、JRT216 の父犬と症例 No. 21 は異母兄弟であった (Figure 3-4B)。JRT196, 216, 症例 No. 3 は共通の雌の子孫であった。(Figure 3-4B, 赤字アスタリスク)

最後の家系では、4 頭は共通のペア (Figure 3-4C 赤丸) の子孫であった。第 1 章の解析において、症例 No. 1 と No. 6 に血縁関係を見出していたが、今回みつかったキャリア個体である JRT221 と JRT342 はこの家系に属していた。JRT221 の母犬と症例 No. 6 は同じ繁殖ペアの姉妹であった (Figure 3-4C)。また、JRT342 の祖母犬と症例 No. 1 は、同腹仔ではないものの同じ繁殖ペアの姉妹であった (Figure 3-4C)。

また、今回見つかったキャリア個体のうち、JRT152 および JRT447 はどの個体とも血縁関係が認められなかった。

2. 消化管上皮性腫瘍に罹患した他犬種の症例の解析

2-1. 症例情報

2-1-1. 病理診断用サンプルを用いた回顧的解析

2014 年から 2018 年の間に、岐阜大学獣医病理学研究室で消化管上皮性腫瘍（腺腫・腺癌）と診断された 32 症例を用いた。32 症例にはトイ・プードル（n=5, 15.6%）、ミニチュア・ダックスフンド（n=4, 12.5%）、チワワ（n=4, 12.5%）、フレンチ・ブルドッグ（n=3, 9.4%）、ラブラドル・レトリバー（n=2, 6.3%）、シー・ズー（n=2, 6.3%）、その他 8 犬種（各犬種 n=1, 各 3.1%）および雑種（n=4, 12.5%）が含まれており、国内での飼育頭数の多い人気犬種が多く含まれていた（Table 3-2 および 3-4）。腫瘍の発生部位は胃（n=1）、小腸（n=13）および大腸（n=18）で、大腸での発生が最も多かった。大腸の症例では直腸での発生が最も多く認められ（n=12）、結腸（n=2）と盲腸（n=2）にも腫瘍が発生していた。症例の病理組織学的診断および腫瘍の深達度について Table 3-2 にまとめた。胃の腫瘍（n=1）と小腸の腫瘍（n=12）はすべて腺癌であった。大腸の腫瘍は 13 例が腺腫、5 例が腺癌と診断された。小腸腺癌の 1 例および大腸腺癌の 1 例は印環細胞癌であった。腫瘍の深達度は胃腺癌の 1 例は T2、小腸腺癌では T1b が 1 例、T2 が 11 例、大腸腺癌は T1 が 2 例、T2 が 2 例で、腺癌と診断された全ての症例で粘膜筋板を超えた浸潤が認められた。

2-1-2. 遺伝子バンクサンプルを用いた解析

麻布大学のイヌ遺伝子バンクから 39 症例の消化管上皮性腫瘍の DNA サンプルを入手した。39 症例にはミニチュア・ダックスフンド (n=12, 30.8%), ジャック・ラッセル・テリア (n=4, 10.3%), トイ・プードル (n=4, 10.3%), シー・ズー (n=3, 7.7%), チワワ (n=2, 5.1%), その他の 14 犬種 (各 n=1, 雑種を含む, 各 2.6%) が含まれていた (Table 3-3 および 3-4)。消化管腫瘍の内訳は、胃腺癌 (n=10, 25.6%), 腸腺腫 (n=6, 15.4%), 腸腺癌 (n=23, 59.0%) であった。ジャック・ラッセル・テリアの腫瘍は、胃腺癌 (n=2) および腸管腺癌 (n=2) であった。

2-2. 消化管上皮性腫瘍の罹患犬における APC 遺伝子生殖細胞系列変異の検索

FFPE サンプルを PCR-RFLP 法で解析した結果、いずれのサンプルでも変異型アレルに由来する断片は検出されなかった (Figure 3-5A)。しかし、FFPE006, 011, 012, 013, 019, 021 および 028 は酵素処理後の断片の観察が困難であった (Figure 3-5A)。FFPE サンプルでは、ホルマリン固定による影響などで、質の高い DNA を得られにくいことが原因と考えられた。そこで、FFPE サンプルについてはすべてのサンプルについて PCR-ダイレクトシーケンスで塩基配列を確認し、その結果、いずれのサンプルにおいても APC 遺伝子変異は検出されなかった (Figure 3-5B)。

遺伝子バンクサンプルは PCR-RFLP 法と TaqMan リアルタイム PCR 法で解析した。PCR-RFLP 法では、APC 遺伝子変異が 3 頭のジャック・ラッセル・テリア (GB018, 33, 39) で検出され、残りの 36 頭では検出されなかった (Figure 3-6A)。TaqMan リアルタイム PCR 法による解析では、各サンプルの PCR のエンドポイントにおける FAM と VIC の蛍光強度に基づいてプロット図を作成し、APC 遺伝子の遺伝子型を

決定した (Figure 3-6B)。3 頭のジャック・ラッセル・テリアは正比例関数に近似してプロットされ、ヘテロ接合体と判定された。その他の 35 頭は対照とした野生型合成 DNA とともにグラフの右下にプロットされ、非キャリア個体と判定された (Figure 3-6B)。1 頭はクラスターに含まれなかったものの、増殖曲線を確認したところ、野生型アレル由来の蛍光強度の増幅しか認められず (data not shown)、非キャリア個体と判定された。PCR-RFLP 法と TaqMan リアルタイム PCR 法の解析結果は一致しており、さらに全てのサンプルの変異部位の塩基配列は PCR-ダイレクトシーケンスによって確認された (data not shown)。

注目すべきことに、*APC* 遺伝子変異が検出された 3 頭はすべてジャック・ラッセル・テリアであり、他犬種では遺伝子変異は認められなかった。

IV. 考 察

本章では、遺伝性消化管ポリポーシスの原因として同定した *APC* 遺伝子変異の日本国内で飼育されているジャック・ラッセル・テリアにおける保有率を明らかにすることを目的とした。*APC* 遺伝子変異を保有していたのは 792 頭のうち 15 頭で、その保有率は 1.9%であった。

国内のジャック・ラッセル・テリアにおいて、本疾患の原因となる *APC* 遺伝子の変異保有率は 1.9%と比較的低かったことから、遺伝子変異が特定の家系に限定して伝播している可能性が考えられた。しかし、今回実施したキャリア個体の血統調査では独立した 3 つの家系が見出され、さらに、いずれの家系にも属さない個体も認められた。したがって、国内のジャック・ラッセル・テリアにおいて、*APC* 遺伝子は、特定の家系にとどまらず広く拡散していることが予想された。また、今回の解析では、キャリア個体の中に親子や同腹仔といった近縁の個体を見出すことはできなかった。ヒトの場合と異なり、イヌの場合、別々の家庭で飼育されている近縁個体を見つけ出すことは容易ではなく、遺伝性疾患の特徴のひとつである家族内伝搬を実証するにはさらなる研究が必要である。

また、生まれた年を 5 年ごとに区切り解析したところ、各年代の *APC* 変異保有率はおおよそ 2%で推移しており、大きな変動は認められなかった。したがって、日本国内では、今後も遺伝性消化管ポリポーシスの症例が一定数発生すると考えられる。今後は、繁殖に用いる個体の遺伝子検査を実施し、繁殖段階で次世代に遺伝子変異が受け継がれないようにする取り組みが必要である。

APC 遺伝子の生殖細胞系列変異の認められた 15 頭のジャック・ラッセル・テリアのうち 10 頭の病歴および臨床症状に関する情報が得られた。5 頭で胃または大腸

に腺癌が発生しており、*APC* 遺伝子変異が消化管腫瘍との関連性があらためて明らかになった。そのうちの1頭 (JRT203) は、以前から嘔吐を呈していたが、遺伝子検査の結果を受けて、内視鏡検査を実施したところ胃腺癌が発見された。よって、ジャック・ラッセル・テリアについては、嘔吐や血便などの本疾患を疑う消化器症状が認められる場合、遺伝子検査を積極的に実施することで疾患の早期発見につなげることができると考えられる。さらに、4頭では、腫瘍発生の有無は不明であったものの、嘔吐や血便など第1章で示した遺伝性消化管ポリポーシスの発症症例に特徴的な消化器症状が認められた。1頭 (JRT221) については消化器症状も認められなかったが、アンケートを行った時点で3.5歳であり、本疾患の平均初発年齢(7.7歳)に達しておらず、将来的に腫瘍が発生する可能性が高いと考えられる。一方で、遺伝性消化管ポリポーシスでは11歳や12歳といった高齢になってから発症している症例も認められ、また、ヒトのFAPと比べてポリープの発生数が少ないため、イヌの場合は生涯発症しない個体がいる可能性も否定できない。本疾患の浸透率については、キャリア個体の追跡調査などさらなる研究が必要である。

ジャック・ラッセル・テリアの遺伝性消化管ポリポーシスに関する海外からの報告はなく、本疾患は日本国内のみで蔓延している可能性がある。同じ犬種であっても、各国で遺伝的に独立した集団が形成されており、遺伝性疾患のリスクも異なることが示されている。例えば、進行性網膜萎縮症の原因となる*PRCD* 遺伝子変異のトイ・プードルにおける変異保有状況を調べた研究では、チェコ共和国ではヘテロ接合体が32%、ホモ接合体が29% (12)であったのに対し、日本国内の調査ではヘテロ接合体が17%、ホモ接合体が0.5% (30)であったと報告されている。国内で発症した遺伝性消化管ポリポーシスの症例の血統書を調べると、その先祖にはオーストラリアやニュージーランドで生まれたジャック・ラッセル・テリアが少な

らず含まれている。よって、海外においても *APC* 遺伝子変異保有個体が存在する可能性が残されており、今後は海外での保有状況も検討していく必要がある。

DM で報告されているように、遺伝性疾患の原因となる特定の遺伝子変異が複数の犬種にまたがって認められることがある (3,4)。本章では、消化管上皮性腫瘍を発症した 25 種類の犬種および雑種犬について遺伝性消化管ポリポシスの原因となる *APC* 遺伝子変異の有無を検索した。その結果、FFPE サンプル、遺伝子バンクのサンプルのいずれにおいても、ジャック・ラッセル・テリア以外の犬種の症例からは *APC* 遺伝子変異は検出されなかった。*APC* 遺伝子変異が検出された 3 頭は、いずれも遺伝子バンクのサンプルに含まれていたジャック・ラッセル・テリアであった。よって、*APC* 遺伝子の生殖細胞系列変異 (c.[462_463delinsTT]) に起因する遺伝性消化管ポリポシスは、ジャック・ラッセル・テリアの犬種特異的疾患である可能性が高いことが示唆された。遺伝子バンクサンプルには 4 頭のジャック・ラッセル・テリアが含まれていたが、このうちの 1 頭には *APC* 遺伝子変異は認められず、散発性に発生した腸管腫瘍の症例と考えられた。よって、ジャック・ラッセル・テリアに消化管上皮性腫瘍が発生した場合であっても、遺伝性消化管ポリポシスと断定することなく、遺伝子検査により散発性消化管腫瘍と鑑別する必要がある。また、今回の研究では、遺伝性消化管ポリポシスの原因として同定された特定の *APC* 遺伝子変異 (c.[462_463delinsTT]) の有無のみを検索し、*APC* 遺伝子の他の領域については解析していない。イヌの DM は *SOD1* 遺伝子の生殖細胞系列変異によって引き起こされることが知られているが、好発犬種であるウェルシュ・コーギーやジャーマン・シェパード・ドッグ、ボクサーでは同一の変異 (c.118 G>A) が認められるが (4,9,27,73)、バーニーズ・マウンテン・ドッグでは *SOD1* 遺伝子の別の変異 (c.52 A>T) が認められることが報告されている (48)。また、ヒトの

FAP では、家系・患者ごとに変異の部位は異なり、800 種類以上の異なる *APC* 遺伝子変異が報告されている (5, 14, 15, 46)。したがって、今回の解析結果からは、検索対象とした *APC* 遺伝子変異 (c.[462_463delinsTT]) 以外の生殖細胞系列変異が存在している可能性は否定できない。

第 1 章で示したように、遺伝性消化管ポリポージスで発生する腫瘍は侵襲性が乏しく、粘膜筋板を越えた浸潤は認められない。一方で、*APC* 遺伝子変異 (c.[462_463delinsTT]) が検出されなかった他犬種の症例に発生した消化管上皮性腫瘍では、多くの腫瘍で粘膜筋板を越えた増殖が認められた (Table 3-2)。今回、深達度を含めた詳細な病理学的解析により、改めて、ジャック・ラッセル・テリアの遺伝性消化管ポリポージスと散発性の消化管上皮性腫瘍との病理学的な違いを明確にすることができた。

イヌにおいて消化管上皮性腫瘍の発生は稀であるため、該当症例の多数の DNA サンプルを収集ことは困難である。本章では、麻布大学の遺伝子バンクに保管されている DNA サンプルを用いることで、迅速に解析を進めることができた。麻布大学の遺伝子バンクは、遺伝性疾患の解析を目的に設立された日本初のイヌのバイオリソースバンクであり、遺伝性疾患を含む、様々な非感染性の疾患の罹患犬から採取した血液由来 DNA サンプルを保管している (55)。遺伝子バンクに保管されたサンプルは、これまでに、パピヨンの神経軸索ジストロフィーの原因遺伝子変異の決定 (67) や、柴犬およびシー・ズーにおける緑内障と *SRBD1* 遺伝子の遺伝子多型の関連性の解析 (26) などの研究に実際に役立てられている。今後も、獣医学研究において極めて有用な資源になると考えられる。

V. 小 括

本章では、遺伝性消化管ポリポーシスの原因として同定した *APC* 遺伝子変異 (c.[462_463delinsTT]) の日本国内のジャック・ラッセル・テリアにおける保有率を明らかにした。保有率は 1.9 % と比較的低かったが、遺伝子変異のキャリア個体は特定の家系には限定しておらず、国内のジャック・ラッセル・テリアにおいて変異は低い頻度ながら広く拡散していることが考えられた。また、*APC* 遺伝子変異が検出されたジャック・ラッセル・テリアのうち 5 頭で消化管腫瘍性ポリープが認められ、あらためて遺伝子変異と疾患との関連性を確認することができた。

さらに、消化管上皮性腫瘍に罹患した複数の犬種の症例について *APC* 遺伝子変異の有無を検索したところ、ジャック・ラッセル・テリア以外の犬種では *APC* 変異が検出されず、遺伝性消化管ポリポーシスは犬種特異的な疾患であると考えられた。

本疾患は、日本以外の国では報告されていないが、国内で発症した症例の血統書を調べると、その先祖にはオーストラリアやニュージーランドで生まれたジャック・ラッセル・テリアが少なからず含まれている。そのため、これらの国にも *APC* 遺伝子変異保有個体が存在する可能性が残されており、今後は海外での保有状況も検討していく必要がある。

第 3 章

图 表

Table 3–1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis

Case No.	Birth year	Sex	Coat type	<i>APC</i> variant status
JRT001	2018	Male	rough	Non-carrier
JRT002	2014	Male	rough	Non-carrier
JRT003	2015	Male	rough	Non-carrier
JRT004	2011	Male	rough	Non-carrier
JRT005	2017	Male	rough	Non-carrier
JRT006	2016	Male	rough	Non-carrier
JRT007	2006	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT008	2009	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT009	2015	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT010	2007	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT011	2013	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT012	2010	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT013	2008	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT014	2012	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT015	2006	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT016	2010	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT017	2014	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT018	2004	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT019	2017	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT020	2014	Male	unknown	Non-carrier
JRT021	2008	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT022	2015	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT023	2014	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT024	2019	Female	smooth	Non-carrier
JRT025	2014	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT026	2004	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT027	2013	Female	unknown	Non-carrier
JRT028	2018	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT029	2013	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT030	2017	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT031	2010	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT032	2005	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT033	2011	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT034	2011	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT035	2007	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT036	2017	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT037	2010	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT038	2009	Male	rough	Non-carrier
JRT039	2016	Female (spayed)	broken	Non-carrier

Table 3-1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT040	2006	Male	smooth	Non-carrier
JRT041	2013	Male	smooth	Non-carrier
JRT042	2009	Male	unknown	Non-carrier
JRT043	2016	Male	unknown	Non-carrier
JRT044	2009	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT045	2009	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT046	2019	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT047	2008	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT048	2006	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT049	2018	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT050	2011	Male	rough	Non-carrier
JRT051	2011	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT052	2011	Male	broken	Non-carrier
JRT053	2013	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT054	2010	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT055	2010	Male	smooth	Carrier
JRT056	2010	Male	broken	Non-carrier
JRT057	2012	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT058	2011	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT059	2014	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT060	2010	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT061	2001	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT062	2006	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT063	2013	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT064	2012	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT065	2006	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT066	2009	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT067	2015	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT068	2013	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT069	2011	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT070	2008	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT071	2013	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT072	2010	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT073	2003	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT074	2014	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT075	2018	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT076	2018	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT077	2012	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT078	2009	Male	smooth	Non-carrier
JRT079	2015	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT080	2004	Female	smooth	Non-carrier

Table 3–1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT081	2007	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT082	2003	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT083	2011	Male	rough	Non-carrier
JRT084	2019	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT085	2013	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT086	2006	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT087	2014	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT088	2013	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT089	2011	Male	broken	Non-carrier
JRT090	2015	Male	smooth	Non-carrier
JRT091	2010	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT092	2006	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT093	2006	Male	smooth	Non-carrier
JRT094	2007	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT095	2005	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT096	2014	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT097	2014	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT098	2006	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT099	2008	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT100	2005	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT101	2003	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT102	2007	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT103	2011	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT104	2014	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT105	2016	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT106	2016	Male	smooth	Non-carrier
JRT107	2006	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT108	2012	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT109	2004	Male	broken	Non-carrier
JRT110	2011	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT111	2008	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT112	2015	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT113	2016	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT114	2015	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT115	2011	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT116	2010	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT117	2013	Female	smooth	Non-carrier
JRT118	2013	Female	broken	Non-carrier
JRT119	2007	Female	smooth	Non-carrier
JRT120	2011	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT121	2013	Female (spayed)	smooth	Non-carrier

Table 3-1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT122	2017	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT123	2009	Female (spayed)	smooth	Carrier
JRT124	2005	Female	smooth	Non-carrier
JRT125	2009	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT126	2011	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT127	2013	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT128	2006	Male	smooth	Non-carrier
JRT129	2019	Male	smooth	Non-carrier
JRT130	2010	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT131	2008	Male	smooth	Non-carrier
JRT132	2018	Female	unknown	Non-carrier
JRT133	2004	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT134	2015	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT135	2017	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT136	2005	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT137	2019	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT138	2009	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT139	2006	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT140	2010	Female	smooth	Non-carrier
JRT141	2006	Male	broken	Non-carrier
JRT142	2019	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT143	2008	Male	smooth	Non-carrier
JRT144	2008	Male	broken	Non-carrier
JRT145	2014	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT146	2009	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT147	2018	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT148	2016	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT149	2013	Female	rough	Non-carrier
JRT150	2009	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT151	2011	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT152	2012	Female	smooth	Carrier
JRT153	2016	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT154	2019	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT155	2013	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT156	2015	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT157	2013	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT158	2014	Female	rough	Non-carrier
JRT159	2014	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT160	2008	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT161	2012	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT162	2004	Female (spayed)	smooth	Non-carrier

Table 3–1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT163	2005	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT164	2004	Male	smooth	Non-carrier
JRT165	2013	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT166	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT167	2008	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT168	2019	Female	smooth	Non-carrier
JRT169	2008	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT170	2013	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT171	2017	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT172	2010	Male	broken	Non-carrier
JRT173	2010	Male	smooth	Non-carrier
JRT174	2006	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT175	2009	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT176	2011	Male	smooth	Non-carrier
JRT177	2010	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT178	2012	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT179	2005	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT180	2009	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT181	2017	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT182	2014	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT183	2008	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT184	2005	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT185	2002	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT186	2011	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT187	2010	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT188	2005	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT189	2008	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT190	2012	Female	broken	Non-carrier
JRT191	2011	Female	rough	Non-carrier
JRT192	2010	Male	smooth	Non-carrier
JRT193	2011	Male	smooth	Non-carrier
JRT194	2014	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT195	2019	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT196	2017	Male	smooth	Carrier
JRT197	2011	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT198	2006	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT199	2011	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT200	2019	Female	smooth	Non-carrier
JRT201	2010	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT202	2012	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT203	2014	Female (spayed)	broken	Carrier

Table 3–1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT204	2007	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT205	2010	Male	broken	Non-carrier
JRT206	2004	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT207	2014	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT208	2006	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT209	2011	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT210	2006	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT211	2011	Female	smooth	Non-carrier
JRT212	2009	Male	smooth	Non-carrier
JRT213	2016	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT214	2006	Female	rough	Non-carrier
JRT215	2007	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT216	2013	Male (castrated)	smooth	Carrier
JRT217	2015	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT218	2005	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT219	2012	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT220	2017	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT221	2016	Female (spayed)	smooth	Carrier
JRT222	2005	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT223	2005	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT224	2013	Female	smooth	Non-carrier
JRT225	2015	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT226	2006	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT227	2013	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT228	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT229	2006	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT230	2012	Male	broken	Non-carrier
JRT231	2005	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT232	2015	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT233	2019	Male	smooth	Non-carrier
JRT234	2004	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT235	2016	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT236	2005	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT237	2015	Female	smooth	Non-carrier
JRT238	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT239	2019	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT240	2018	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT241	2008	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT242	2016	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT243	2010	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT244	2008	Female (spayed)	smooth	Non-carrier

Table 3-1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT286	2015	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT287	2013	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT288	2011	Male	smooth	Non-carrier
JRT289	2010	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT290	2018	Male	smooth	Non-carrier
JRT291	2010	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT292	2013	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT293	2015	Female	broken	Non-carrier
JRT294	2018	Male	rough	Non-carrier
JRT295	2008	Female	broken	Non-carrier
JRT296	2011	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT297	2013	Female	broken	Non-carrier
JRT298	2017	Female	rough	Non-carrier
JRT299	2018	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT300	2011	Female	broken	Non-carrier
JRT301	2012	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT302	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT303	2005	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT304	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT305	2014	Male	smooth	Non-carrier
JRT306	2016	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT307	2010	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT308	2012	Male	rough	Non-carrier
JRT309	2004	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT310	2013	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT311	2017	Female	smooth	Non-carrier
JRT312	2017	Male	smooth	Non-carrier
JRT313	2009	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT314	2007	Female	smooth	Non-carrier
JRT315	2010	Male	smooth	Non-carrier
JRT316	2017	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT317	2017	Female (spayed)	smooth	Carrier
JRT318	2007	Female	smooth	Non-carrier
JRT319	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT320	2011	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT321	2009	Female (spayed)	broken	Carrier
JRT322	2013	Male	smooth	Non-carrier
JRT323	2015	Male	broken	Non-carrier
JRT324	2018	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT325	2008	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT326	2006	Female	smooth	Non-carrier

Table 3-1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT327	2010	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT328	2018	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT329	2009	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT330	2016	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT331	2015	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT332	2013	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT333	2004	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT334	2008	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT335	2018	Male	broken	Non-carrier
JRT336	2015	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT337	2019	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT338	2009	Male	broken	Non-carrier
JRT339	2005	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT340	2009	Female	broken	Non-carrier
JRT341	2017	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT342	2009	Female (spayed)	rough	Carrier
JRT343	2010	Male	smooth	Non-carrier
JRT344	2015	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT345	2012	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT346	2014	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT347	2006	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT348	2006	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT349	2007	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT350	2009	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT351	2017	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT352	2005	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT353	2012	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT354	2004	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT355	2017	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT356	2013	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT357	2007	Male	smooth	Non-carrier
JRT358	2011	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT359	2010	Male	smooth	Non-carrier
JRT360	2013	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT361	2007	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT362	2007	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT363	2010	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT364	2007	Female	smooth	Non-carrier
JRT365	2012	Female	smooth	Non-carrier
JRT366	2010	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT367	2007	Female (spayed)	smooth	Non-carrier

Table 3-1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT368	2008	Male	smooth	Non-carrier
JRT369	2007	Male	rough	Non-carrier
JRT370	2010	Female	rough	Non-carrier
JRT371	2015	Female	rough	Non-carrier
JRT372	2008	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT373	2017	Male	rough	Non-carrier
JRT374	2019	Male	unknown	Non-carrier
JRT375	2009	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT376	2010	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT377	2017	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT378	2016	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT379	2014	Male	smooth	Non-carrier
JRT380	2007	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT381	2006	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT382	2008	Female	rough	Non-carrier
JRT383	2015	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT384	2018	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT385	2018	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT386	2012	Male	smooth	Non-carrier
JRT387	2010	Male	rough	Non-carrier
JRT388	2010	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT389	2009	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT390	2007	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT391	2016	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT392	2013	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT393	2009	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT394	2011	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT395	2012	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT396	2011	Male	broken	Non-carrier
JRT397	2013	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT398	2007	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT399	2012	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT400	2014	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT401	2014	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT402	2013	Male	smooth	Non-carrier
JRT403	2017	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT404	2009	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT405	2017	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT406	2006	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT407	2008	Male	smooth	Non-carrier
JRT408	2008	Female	smooth	Non-carrier

Table 3-1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT409	2019	Female	smooth	Non-carrier
JRT410	2017	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT411	2011	Male	rough	Non-carrier
JRT412	2012	Male	smooth	Non-carrier
JRT413	2014	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT414	2010	Female	smooth	Non-carrier
JRT415	2013	Female	smooth	Non-carrier
JRT416	2004	Female	smooth	Non-carrier
JRT417	2020	Female	smooth	Non-carrier
JRT418	2006	Male	smooth	Non-carrier
JRT419	2011	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT420	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT421	2014	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT422	2014	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT423	2019	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT424	2018	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT425	2015	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT426	2017	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT427	2019	Male	rough	Non-carrier
JRT428	2017	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT429	2015	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT430	2013	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT431	2006	Female	smooth	Non-carrier
JRT432	2018	Male	smooth	Non-carrier
JRT433	2008	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT434	2010	Female	smooth	Non-carrier
JRT435	2007	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT436	2008	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT437	2007	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT438	2016	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT439	2016	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT440	2007	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT441	2014	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT442	2018	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT443	2018	Male	smooth	Non-carrier
JRT444	2013	Female	broken	Non-carrier
JRT445	2017	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT446	2015	Male	smooth	Non-carrier
JRT447	2017	Male (castrated)	rough	Carrier
JRT448	2007	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT449	2008	Female (spayed)	broken	Non-carrier

Table 3-1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT450	2012	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT451	2011	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT452	2016	Female	smooth	Non-carrier
JRT453	2007	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT454	2007	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT455	2012	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT456	2019	Male	rough	Non-carrier
JRT457	2014	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT458	2008	Female	broken	Non-carrier
JRT459	2018	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT460	2009	Male	unknown	Non-carrier
JRT461	2009	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT462	2003	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT463	2006	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT464	2007	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT465	2013	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT466	2014	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT467	2013	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT468	2019	Male	unknown	Non-carrier
JRT469	2010	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT470	2017	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT471	2016	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT472	2015	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT473	2017	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT474	2019	Male	smooth	Non-carrier
JRT475	2017	Female (unspecified)	smooth	Non-carrier
JRT476	2004	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT477	2008	Female	smooth	Non-carrier
JRT478	2012	Male	rough	Non-carrier
JRT479	2009	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT480	2010	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT481	2015	Male	smooth	Non-carrier
JRT482	2006	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT483	2019	Male	broken	Non-carrier
JRT484	2018	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT485	2011	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT486	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT487	2017	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT488	2020	Female	smooth	Non-carrier
JRT489	2005	Male	smooth	Non-carrier
JRT490	2019	Female (spayed)	smooth	Non-carrier

Table 3–1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT491	2010	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT492	2007	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT493	2013	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT494	2014	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT495	2015	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT496	2005	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT497	2008	Female	smooth	Non-carrier
JRT498	2009	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT499	2008	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT500	2004	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT501	2016	Female	broken	Non-carrier
JRT502	2013	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT503	2006	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT504	2012	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT505	2018	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT506	2015	Male	broken	Non-carrier
JRT507	2016	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT508	2019	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT509	2014	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT510	2014	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT511	2012	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT512	2004	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT513	2017	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT514	2008	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT515	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT516	2012	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT517	2018	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT518	2005	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT519	2017	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT520	2011	Female	smooth	Non-carrier
JRT521	2012	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT522	2007	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT523	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT524	2016	Male	rough	Non-carrier
JRT525	2013	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT526	2008	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT527	2006	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT528	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT529	2008	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT530	2018	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT531	2014	Female (spayed)	smooth	Non-carrier

Table 3–1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT532	2013	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT533	2013	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT534	2019	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT535	2015	Male (castrated)	smooth	Carrier
JRT536	2014	Female	broken	Non-carrier
JRT537	2008	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT538	2007	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT539	2016	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT540	2007	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT541	2013	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT542	2018	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT543	2011	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT544	2014	Male	smooth	Non-carrier
JRT545	2019	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT546	2014	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT547	2019	Female	unknown	Non-carrier
JRT548	2018	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT549	2019	Male	rough	Non-carrier
JRT550	2017	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT551	2009	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT552	2018	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT553	2016	Male	smooth	Non-carrier
JRT554	2019	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT555	2019	Female	smooth	Non-carrier
JRT556	2005	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT557	2016	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT558	2008	Male	broken	Non-carrier
JRT559	2011	Male	broken	Non-carrier
JRT560	2017	Male	smooth	Non-carrier
JRT561	2011	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT562	2016	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT563	2010	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT564	2008	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT565	2018	Female	unknown	Non-carrier
JRT566	2020	Female	unknown	Non-carrier
JRT567	2020	Female	unknown	Non-carrier
JRT568	2020	Male	unknown	Non-carrier
JRT569	2020	Male	unknown	Non-carrier
JRT570	2014	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT571	2007	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT572	2018	Female	smooth	Non-carrier

Table 3-1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT573	2014	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT574	2013	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT575	2014	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT576	2009	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT577	2011	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT578	2010	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT579	2009	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT580	2010	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT581	2014	Female	broken	Non-carrier
JRT582	2007	Female (spayed)	unknown	Non-carrier
JRT583	2007	Female	smooth	Non-carrier
JRT584	2017	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT585	2004	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT586	2020	Male	broken	Non-carrier
JRT587	2009	Female	rough	Non-carrier
JRT588	2008	Female	smooth	Non-carrier
JRT589	2011	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT590	2011	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT591	2011	Female	smooth	Non-carrier
JRT592	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT593	2019	Male	unknown	Non-carrier
JRT594	2010	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT595	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT596	2019	Female	smooth	Non-carrier
JRT597	2018	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT598	2008	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT599	2007	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT600	2006	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT601	2014	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT602	2019	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT603	2005	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT604	2020	Male	smooth	Non-carrier
JRT605	2013	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT606	2014	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT607	2020	Female	smooth	Non-carrier
JRT608	2011	Female	rough	Non-carrier
JRT609	2006	Male	broken	Non-carrier
JRT610	2005	Female	smooth	Non-carrier
JRT611	2012	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT612	2007	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT613	2017	Male (castrated)	smooth	Non-carrier

Table 3-1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT614	2018	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT615	2019	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT616	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT617	2005	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT618	2009	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT619	2015	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT620	2010	Female	smooth	Non-carrier
JRT621	2006	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT622	2004	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT623	2008	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT624	2011	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT625	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT626	2015	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT627	2012	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT628	2009	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT629	2016	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT630	2013	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT631	2012	Male	smooth	Non-carrier
JRT632	2007	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT633	2004	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT634	2009	Female	rough	Non-carrier
JRT635	2019	Male	smooth	Non-carrier
JRT636	2009	Male	smooth	Non-carrier
JRT637	2011	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT638	2016	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT639	2014	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT640	2010	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT641	2015	Male	smooth	Non-carrier
JRT642	2015	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT643	2005	Male	rough	Non-carrier
JRT644	2009	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT645	2011	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT646	2010	Male	unknown	Non-carrier
JRT647	2007	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT648	2013	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT649	2012	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT650	2006	Female	smooth	Non-carrier
JRT651	2013	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT652	2012	Male	smooth	Non-carrier
JRT653	2008	Male	smooth	Non-carrier
JRT654	2010	Female	smooth	Non-carrier

Table 3-1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT655	2009	Male	smooth	Non-carrier
JRT656	2015	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT657	2011	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT658	2010	Male	smooth	Non-carrier
JRT659	2019	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT660	2006	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT661	2011	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT662	2017	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT663	2014	Male(unspecified)	smooth	Non-carrier
JRT664	2015	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT665	2019	Male(unspecified)	smooth	Non-carrier
JRT666	2008	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT667	2010	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT668	2011	Female	smooth	Non-carrier
JRT669	2009	Male	smooth	Non-carrier
JRT670	2017	Male	smooth	Non-carrier
JRT671	2011	Male (castrated)	smooth	Carrier
JRT672	2015	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT673	2017	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT674	2009	Male	smooth	Non-carrier
JRT675	2014	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT676	2017	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT677	2017	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT678	2019	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT679	2017	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT680	2012	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT681	2013	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT682	2007	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT683	2015	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT684	2016	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT685	2005	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT686	2006	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT687	2018	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT688	2011	Female	smooth	Non-carrier
JRT689	2007	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT690	2015	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT691	2013	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT692	2009	Male	smooth	Non-carrier
JRT693	2010	Male	smooth	Non-carrier
JRT694	2016	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT695	2019	Female (spayed)	smooth	Non-carrier

Table 3-1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT696	2011	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT697	2007	Female (spayed)	broken	Carrier
JRT698	2005	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT699	2012	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT700	2019	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT701	2016	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT702	2007	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT703	2007	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT704	2005	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT705	2007	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT706	2007	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT707	2008	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT708	2006	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT709	2014	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT710	2010	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT711	2018	Female	broken	Non-carrier
JRT712	2009	Male	broken	Non-carrier
JRT713	2008	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT714	2015	Female	broken	Non-carrier
JRT715	2004	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT716	2009	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT717	2012	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT718	2013	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT719	2014	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT720	2011	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT721	2009	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT722	2010	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT723	2014	Male	smooth	Non-carrier
JRT724	2006	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT725	2017	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT726	2010	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT727	2015	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT728	2009	Male	smooth	Non-carrier
JRT729	2014	Male	smooth	Non-carrier
JRT730	2014	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT731	2011	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT732	2017	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT733	2007	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT734	2007	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT735	2019	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT736	2008	Male (castrated)	unknown	Non-carrier

Table 3-1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT737	2013	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT738	2007	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT739	2008	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT740	2010	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT741	2012	Male	unknown	Non-carrier
JRT742	2009	Male	broken	Non-carrier
JRT743	2015	Male	unknown	Non-carrier
JRT744	2008	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT745	2014	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT746	2016	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT747	2007	Female	broken	Non-carrier
JRT748	2012	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT749	2017	Male	rough	Non-carrier
JRT750	2015	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT751	2011	Male	broken	Non-carrier
JRT752	2012	Female	smooth	Non-carrier
JRT753	2013	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT754	2007	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT755	2006	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT756	2010	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT757	2009	Male	rough	Non-carrier
JRT758	2014	Male	smooth	Non-carrier
JRT759	2006	Female	broken	Non-carrier
JRT760	2017	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT761	2010	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT762	2011	Male	smooth	Non-carrier
JRT763	2011	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT764	2011	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT765	2009	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT766	2007	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT767	2016	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT768	2018	Male (castrated)	unknown	Non-carrier
JRT769	2017	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT770	2009	Male	smooth	Non-carrier
JRT771	2011	Male	smooth	Non-carrier
JRT772	2011	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT773	2004	Male (castrated)	smooth	Non-carrier
JRT774	2006	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT775	2008	Male	smooth	Non-carrier
JRT776	2019	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT777	2009	Female	smooth	Non-carrier

Table 3–1. Signalment of Jack Russell terriers examine in prevalence survey of germline *APC* variant associated with hereditary gastrointestinal polyposis (continued)

JRT778	2010	Male	smooth	Non-carrier
JRT779	2007	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT780	2019	Male	smooth	Non-carrier
JRT781	2009	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT782	2009	Female (spayed)	smooth	Non-carrier
JRT783	2014	Male	rough	Non-carrier
JRT784	2018	Male	smooth	Non-carrier
JRT785	2008	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT786	2009	Male (castrated)	broken	Non-carrier
JRT787	2015	Female	rough	Non-carrier
JRT788	2013	Female (spayed)	rough	Non-carrier
JRT789	2007	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT790	Unknown	Female (spayed)	broken	Non-carrier
JRT791	Unknown	Male (castrated)	rough	Non-carrier
JRT792	2018	Female (spayed)	rough	Non-carrier

Table 3-2. Summary of signalment and pathological information of dogs with gastrointestinal epithelial tumor of multiple breeds in retrospective analysis

Case No.	Dog breed	Sex	Age at occurrence	Location of GI epithelial tumor	Histopathological diagnosis	Depth of Invasion (T status)*
FFPE001	Mix (Japanese mix)	Female (spayed)	9y 2m	Small intestine (unspecified)	Signet-ring cell carcinoma	T2
FFPE002	Miniature Dachshund	Female (spayed)	8y 6m	Rectum	Adenoma	(-)
FFPE003	Bull Terrier	Female	3y 3m	Rectum	Adenoma	(-)
FFPE004	Mix	Male (castrated)	10y 3m	Rectum	Adenoma	(-)
FFPE005	Toy Poodle	Female	8y 8m	Cecum	Adenoma	(-)
FFPE006	French Bulldog	Male	2y 9m	Rectum	Adenoma	(-)
FFPE007	Miniature Dachshund	Male	12y 3m	Ileum	Adenocarcinoma	T2
FFPE008	Miniature Dachshund	Male	14y 0m	Small intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	T1b
FFPE009	Welsh Corgi	Male (castrated)	9y 5m	Colon	Adenoma	(-)
FFPE010	Toy Poodle	Female (spayed)	13y 8m	Small intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	T2
FFPE011	Chihuahua	Female	11y	Cecum	Adenoma	(-)
FFPE012	Chihuahua	Male	10y	Large intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	T2
FFPE013	French Bulldog	Male (unspecified)	12y	Stomach	Adenocarcinoma	T2
FFPE014	Shih Tzu	Male (castrated)	12y	Jejunum	Adenocarcinoma	T2
FFPE015	French Bulldog	Male	9y	Rectum	Signet-ring cell carcinoma	T2
FFPE016	Maltese	Female (spayed)	7y	Colon	Adenocarcinoma	T1
FFPE017	Mix (Japanese mix)	Female	11y	Ileum	Adenocarcinoma	T2
FFPE018	Mix	Male	12y	Rectum	Adenoma	(-)
FFPE019	West Highland white terrier	Male	8y 7m	Rectum	Adenocarcinoma	T1
FFPE020	Chihuahua	Female (spayed)	11y 8m	Small intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	T2
FFPE021	Toy Poodle	Male (castrated)	6y 9m	Rectum	Adenoma	(-)
FFPE022	Labrador Retriever	Male (castrated)	10y 11m	Rectum	Adenoma	(-)
FFPE023	Shih Tzu	Male (unspecified)	13y 5m	Small intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	T3
FFPE024	Miniature Schnauzer	Female	Unknown	Small intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	T2
FFPE025	Border Collie	Female (spayed)	7y	Large intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	T1

Table 3-2. Summary of signalment and pathological information of dogs with gastrointestinal epithelial tumor of multiple breeds in retrospective analysis (continued)

FFPE026	Miniature Dachshund	Male	11y	Jejunum	Adenocarcinoma	T2
FFPE027	Chihuahua	Male (castrated)	7y 8m	Small intestine (not specified)	Adenocarcinoma	T2
FFPE028	Bichon Frise	Male	9y 2m	Rectum	Adenoma	(-)
FFPE029	Labrador Retriever	Male	13y 4m	Rectum	Adenoma	(-)
FFPE030	Toy Poodle	Unknown	14y 2m	Small intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	T2
FFPE031	Toy Poodle	Male	9y	Small intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	T2
FFPE032	Wire Fox Terrier	Male	6y 5m	Rectum	Adenoma	(-)

ND: Not determined

* T (tumor) status, the depth of invasion, are evaluated according to the criteria listed below.

Stomach

T1s: Intraepithelial tumor without invasion of the lamina propria (carcinoma *in situ*), T1a: Tumor invades lamina propria or muscularis mucosae, T1b: Tumor invades submucosa, T2: Tumor invades muscularis propria, T3: Tumor perforates serosa (visceral peritoneum), T4a: Tumor perforates serosa (visceral peritoneum), T4b: Tumor invades adjacent structures.

Small intestine

T1s: Carcinoma *in situ*, T1a: Tumor invades lamina propria or muscularis mucosae, T1b: Tumor invades submucosa, T2: Tumor invades muscularis propria, T3: Tumor invades subserosa or nonperitonealized perimuscular tissue (mesentery or retroperitoneum) with extension 2 cm or less, T4: Tumor perforates visceral peritoneum or directly invades other organs or structure (includes other loops of small intestine, mesentery, or retroperitoneum more than 2 cm and abdominal wall by way of serosa)

Large intestine

T1s: Intraepithelial or invasion of lamina propria (carcinoma *in situ*), T1: Tumor invades submucosa, T2: Tumor invades muscularis propria, T3: Tumor invades subserosa or into nonperitonealized pericolic or perirectal tissue, T4a: Tumor perforates visceral peritoneum T4b: Tumor directly invades other organs or structure.

Table 3–3. Signalment and pathological information of dog with gastrointestinal epithelial tumors obtained from genomic bank at Azabu University

Case No.	Dog breed	Location of GI epithelial tumor	Histopathological diagnosis	<i>APC</i> variant status
GB001	Miniature Dachshund	Intestine (unspecified)	Adenoma	Non-carrier
GB002	Miniature Dachshund	Intestine (rectum)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB003	Miniature Dachshund	Stomach	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB004	Miniature Dachshund	Small intestine	Adenoma	Non-carrier
GB005	Belgian Shepherd Tarvuren	Stomach	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB006	Papillon	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB007	Shetland Sheepdog	Intestine (unspecified)	Adenoma	Non-carrier
GB008	Jack Russell Terrier	Intestine (rectum)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB009	Miniature Dachshund	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB010	Miniature Dachshund	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB011	Toy Poodle	Intestine (rectum)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB012	Chihuahua	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB013	Shiba Inu	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB014	Boston Terrier	Intestine (rectum)	Adenoma	Non-carrier
GB015	Mix	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB016	Shih Tzu	Stomach	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB017	American Cocker Spaniel	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB018	Jack Russell Terrier	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Carrier
GB019	Miniature Dachshund	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB020	Chinese Crested Dog	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB021	Miniature Dachshund	Stomach	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB022	Miniature Dachshund	Stomach	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB023	Chihuahua	Small intestine	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB024	Lakeland Terrier	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB025	Miniature Schnauzer	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB026	Miniature Dachshund	Intestine (rectum)	Adenoma	Non-carrier
GB027	Miniature Dachshund	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB028	Golden Retriever	Stomach	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB029	Toy Poodle	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB030	Toy Poodle	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB031	Miniature Dachshund	Intestine (unspecified)	Adenoma	Non-carrier
GB032	Shih Tzu	Stomach	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB033	Jack Russell Terrier	Stomach	Adenocarcinoma	Carrier
GB034	Brittany Spaniel	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB035	Shih Tzu	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB036	Toy Poodle	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB037	French Bulldog	Stomach	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB038	West Highland white terrier	Intestine (unspecified)	Adenocarcinoma	Non-carrier
GB039	Jack Russell Terrier	Stomach	Adenocarcinoma	Carrier

Table 3-4. Breeds and number of dog with gastrointestinal epithelial tumors

Dog breed	n
<i>FFPE samples (n=32)</i>	
Miniature Dachshund	12
Jack Russell Terrier	4
Toy Poodle	4
Shih Tzu	3
Chihuahua	2
American Cocker Spaniel	1
Belgian Shepherd Tarvuren	1
Boston Terrier	1
Brittany Spaniel	1
Chinese Crested Dog	1
French Bulldog	1
Golden Retriever	1
Lakeland Terrier	1
Miniature Schnauzer	1
Papillon	1
Shetland Sheepdog	1
Shiba Inu	1
West Highland white terrier	1
Mix breed	1
<i>Genomic bank samples (n=39)</i>	
Toy Poodle	5
Chihuahua	4
Miniature Dachshund	4
French Bulldog	3
Labrador Retriever	2
Shih Tzu	2
Bichon Frise	1
Border Collie	1
Bull Terrier	1
Maltese	1
Miniature Schnauzer	1
Welsh Corgi	1
West Highland white terrier	1
Wire Fox Terrier	1
Mix breed	4

Table 3–5. List of Jack Russell terriers with hereditary gastrointestinal polyposis used in pedigree analysis

Case No.	Birth year	Sex	Location of polyps	Reference
21	2005/09	Male (castrated)	Rectum	Ref. 70
1	2006/05	Female (spayed)	Stomach, rectum	Ref. 70
3	2010/04	Female	Stomach	Ref. 70
6	2010/07	Female (spayed)	Stomach	Ref. 70
22	2013/09	Female (spayed)	Duodenum, colon, rectum	Unpublished

Table 3–6. Prevalence of germiline *APC* variant according to birth year, sex and coat type of Jack Russell terriers

	Total number of examined case	Number of <i>APC</i> variant carrier (%)	P value
<i>Birth year</i>			
2001-2005	57	0 (0%)	0.72671914
2006-2010	272	5 (1.84%)	
2011-2015	286	6 (2.10%)	
2016-2020	175	4 (2.29%)	
Unknown	2		
<i>Sex</i>			
Male	399	7 (1.75%)	0.771578924
Female	393	8 (2.04%)	
<i>Coat type</i>			
Smooth	396	9 (2.27%)	0.704531295
Broken	212	3 (1.42%)	
Rough	129	3 (2.33%)	
Unkown	55		

Table 3-7. Profile and clinical information of Jack Russell terriers with germline APC variant found in prevalence survey

No.	Case No.	Birth month	Sex	Coat type	Age	Clinical course	Clinical symptoms
1	JRT055	2010/04	Male	Smooth	10y 7m		vomiting, anorexia
2	JRT123	2009/06	Female (spayed)	Smooth	10y 8m	Deceased *	-
3	JRT152	2012/01	Female	Smooth	8y 3m	No information †	vomiting, hematemesis
4	JRT196	2017/05	Male	Smooth	2y 10m	Stomach adenocarcinoma (endoscopic biopsy)	bloody stool, soft stool, vomiting, hematemesis
5	JRT203	2014/10	Female (spayed)	Broken	Earlier		bloody stool, melena, diarrhea
6	JRT216	2013/03	Male (castrated)	Smooth	6y 2m	Stomach adenocarcinoma (endoscopic biopsy)	vomiting
					4y 10m	Rectum adenocarcinoma (pull-through)	bloody stool
					6y 1m	Rectum adenocarcinoma (endoscopic biopsy)	bloody stool
7	JRT221	2016/12	Female (spayed)	Smooth	-		no symptoms
8	JRT264	2014/05	Male (castrated)	Rough	No information †		
9	JRT317	2017/01	Female (spayed)	Smooth	3y 8m		bloody stool
10	JRT321	2009/09	Female (spayed)	Broken	3y 10m	Rectum adenocarcinoma (surgery)	
11	JRT342	2009/03	Female (spayed)	Rough	10y 8m		diarrhea, melena
					Earlier		vomiting
					11y 1m	Gastric polyp (ultrasonography)	vomiting
					11y 4m	Stomach adenocarcinoma (Billroth II)	
					11y 6m	Deceased **	
12	JRT447	2017/03	Male (castrated)	Rough	3y 3m		soft stool
13	JRT535	2015/07	Male (castrated)	Smooth	No information †		
14	JRT671	2011/10	Male (castrated)	Smooth	No information †		-
15	JRT697	2007/03	Female (spayed)	Broken	No information †		

* : Serious vomiting and anorexia was observed just before death.

** : Stomach adenocarcinoma invaded adjacent structure and distant metastasis was observed.

† : Questionnaire survey was not available

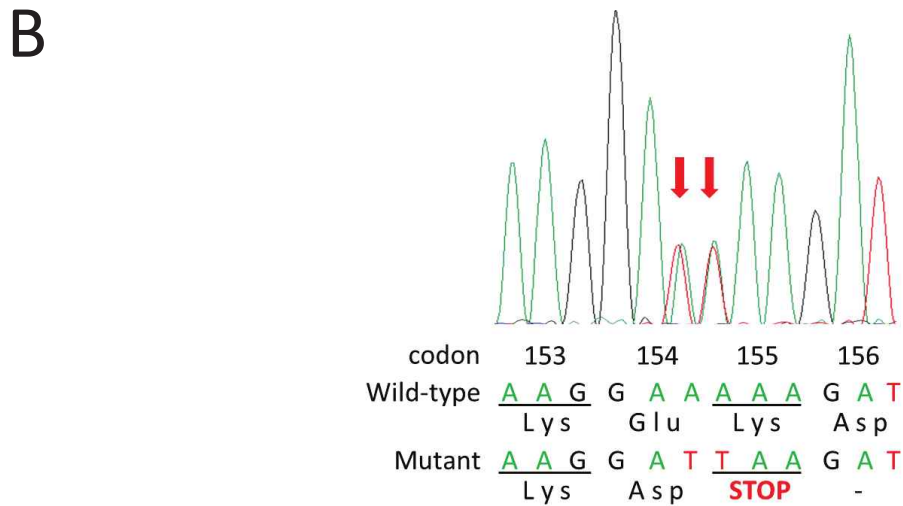
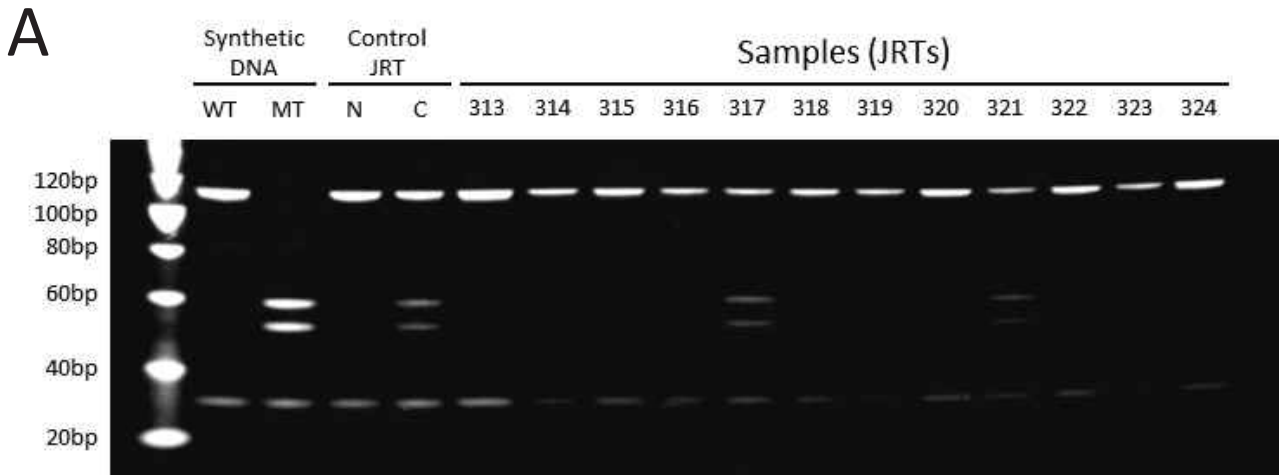


Figure 3-1. Genetic test for germline *APC* variant used in prevalence survey in Jack Russell terriers in Japan. (A) PCR-RFLP analysis. Representative result of polyacrylamide gel electrophoresis of *MseI*-digested PCR products amplified from blood samples of Jack Russell terriers (Case Nos. JRT313-324). Synthetic wild-type and mutant DNA, as well as DNA samples from carrier and non-carrier JRTs found in previous study, are used as controls. Case Nos. JRT 317 and 321 are determined to be *APC* variant carriers based on presence of bands of 51 and 57 bp derived from *APC* variant allele. N: Non-carrier JRT and C: Carrier JRT. (B) PCR-direct sequencing. Representative result of a carrier JRT (Case No. JRT321). DNA sequence of codons 153-156 in the canine *APC* gene determined by PCR-direct sequencing. The red arrows indicated 2-bp substitution at codons 154 and 155.

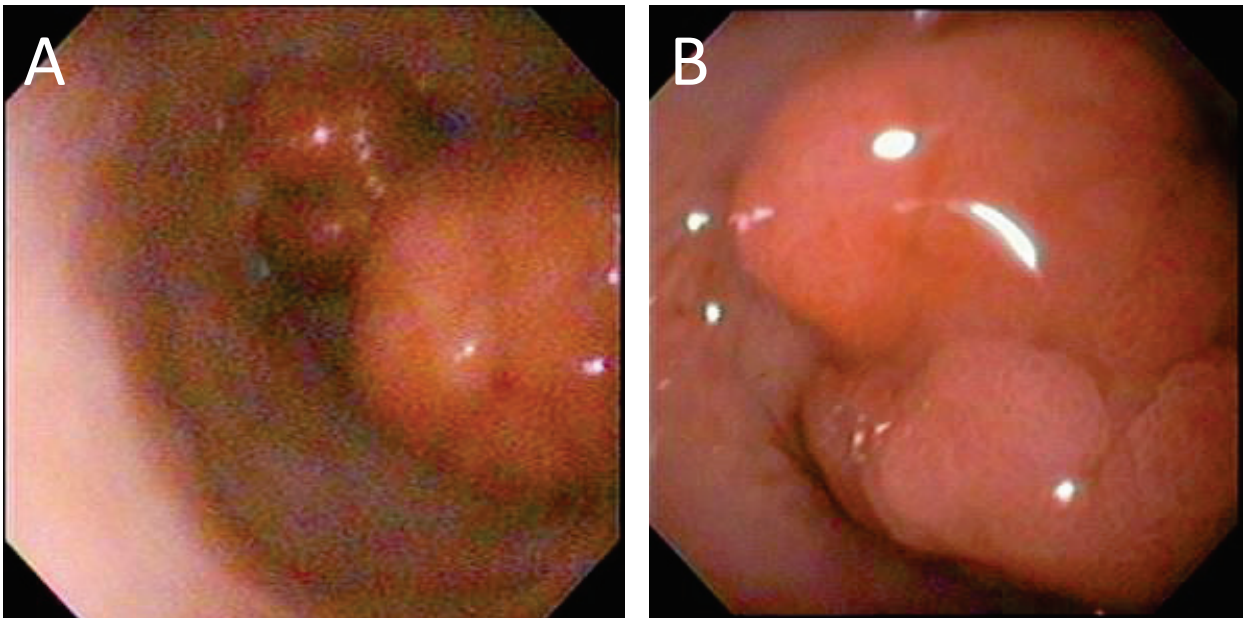


Figure 3-2. Endoscopic appearance of pyloric polyps developed in a Jack Russell terriers with germline *APC* variant. JRT152. The protruded lesions cause narrowing of the pylorus. (B) is larger image of the same polyp in (A) .

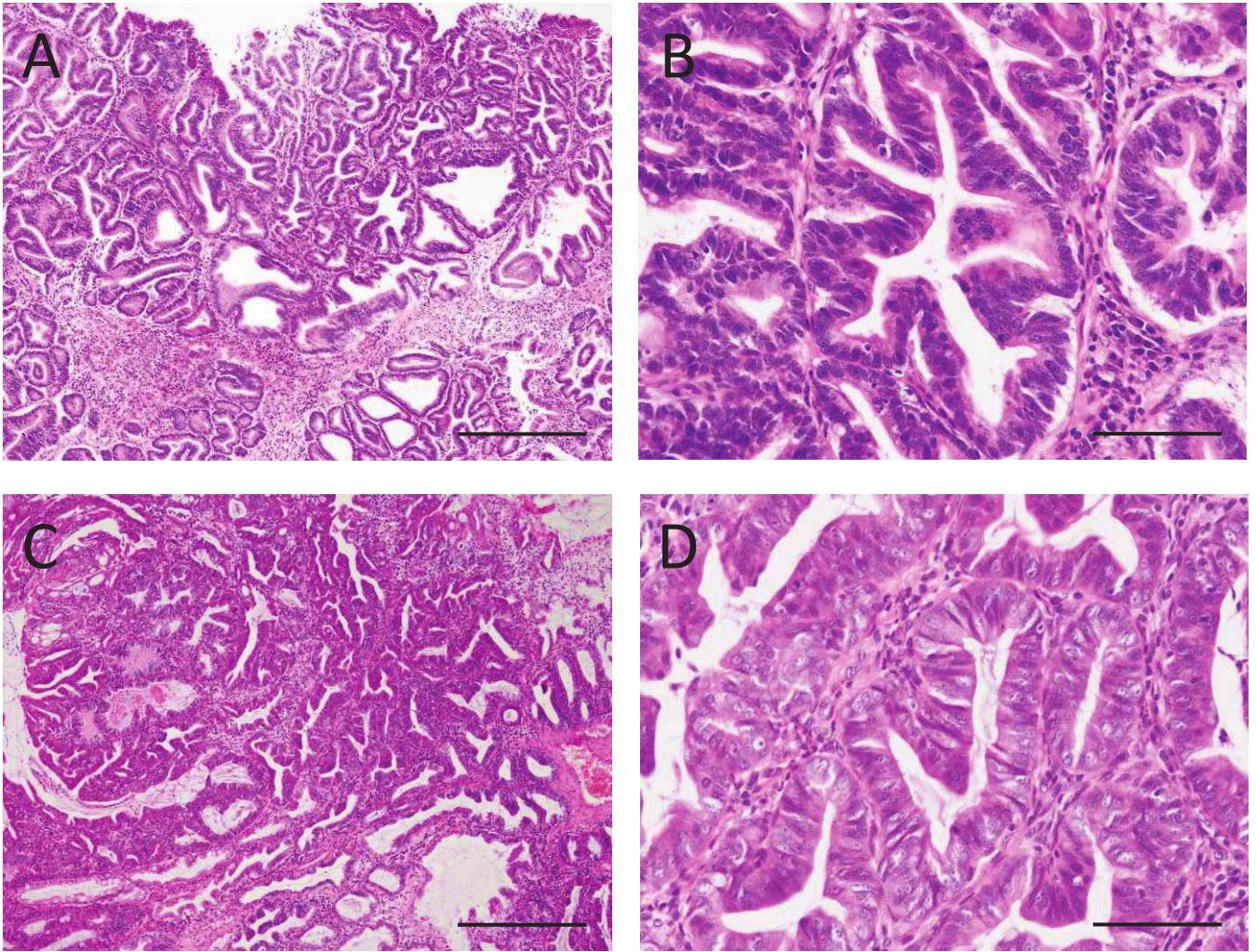


Figure 3-3. Histopathology of the gastric and rectum lesions in Jack Russell Terriers with germline *APC* variant. (A, B) Adenocarcinoma in the gastric antrum of JRT152. (C, D) Rectum adenocarcinoma of JRT 216. (B) and (D) are higher magnification of (A) and (C). Bars = 200 μm (A and C), 50 μm (B and D).

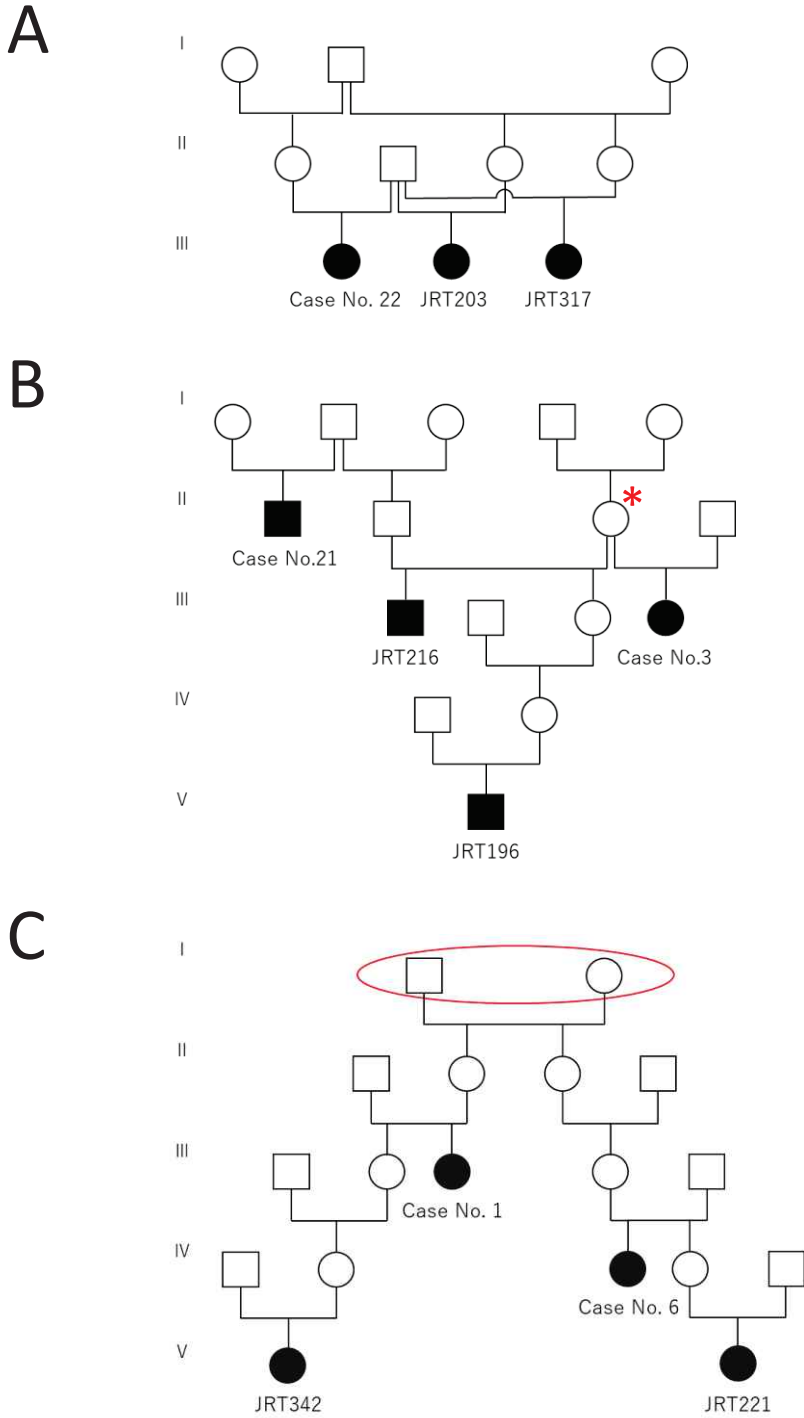


Figure 3-4. Family tree conducted according to pedigree certificates of Jack Russell terriers with germline *APC* variant. Blood relationship among carrier dogs detected in the current prevalence study, JRT 196, 203, 216, 221, 317 and 342, are examined together with previously diagnosed cases, Case Nos. 1, 3, 6, 21 and 22. Square and circle show male and female, respectively. The black pattern indicates carriers of germline *APC* variant. (A) Family tree of JRT203, 317 and Case No. 22. Father of the three carriers was common. (B) Family tree of JRT196, 216, Case Nos. 3 and 21. Asterisk indicates common ancestor of JRT196, 216 and Case No. 3. (C) Family tree of JRT221, 342, Case Nos. 1 and 6. These carrier dogs are descendants of a common breeding pair indicated by red circle.

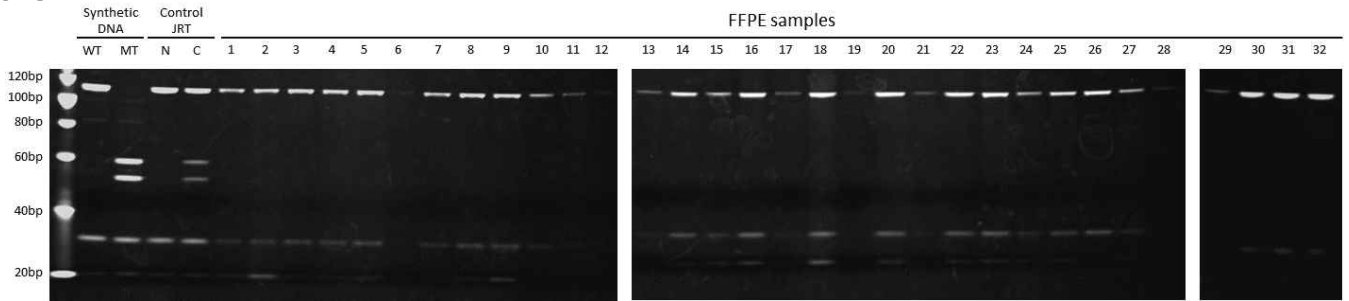
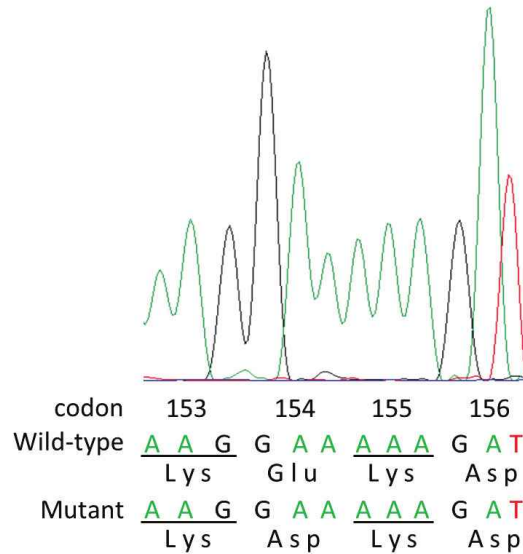
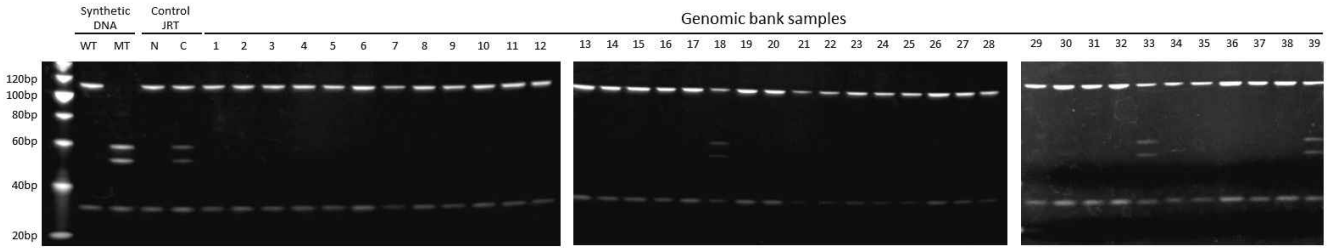
A**B**

Figure 3-5. Genetic test for germline *APC* variant using FFPE samples of dogs with gastrointestinal (GI) epithelial tumors. (A) PCR-RFLP analysis. The polyacrylamide gel electrophoresis of *MseI*-digested PCR products amplified from FFPE samples of dogs of multiple breeds which were affected with GI epithelial tumor. Synthetic wild-type and mutant DNA and DNA samples from carrier and non-carrier JRTs are used as controls. DNA fragments derived from *APC* variant allele, 51 and 57 bp-bands, are not detected in all FFPE samples. N: Non-carrier JRT and C: Carrier JRT. (B) PCR-direct sequencing. Representative result of a non-carrier dog with GI tumor (Case No. GIT032). DNA sequences of codons 153-156 in the canine *APC* gene determined by PCR-direct sequencing. The *APC* variant associated with hereditary GI polyposis, which is located at codons 154 and 155, is absent.

A



B

Allelic Discrimination Plot

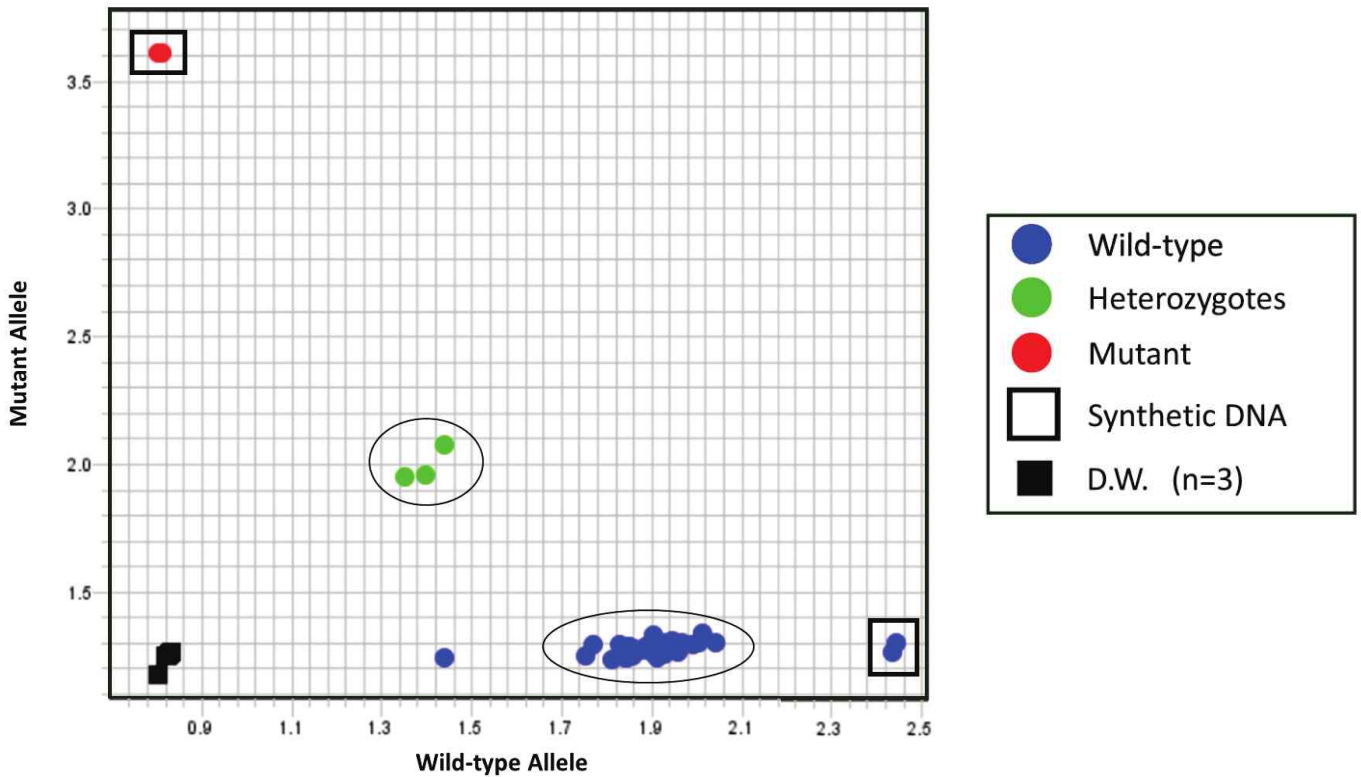


Figure 3-6. Genetic test for germline *APC* variant using DNA samples of dogs with gastrointestinal (GI) epithelial tumors obtained from genomic bank. (A) PCR-RFLP assay. The polyacrylamide gel electrophoresis of MseI-digested PCR products amplified from DNA samples of dog with GI epithelial tumor. Synthetic wild-type and mutant DNA and DNA samples from carrier and non-carrier JRTs are used as controls. Case Nos. GB018, GB033 and GB039 are determined to be *APC* variant carriers. N: Non-carrier JRT and C: Carrier JRT. (B) TaqMan real time PCR. Allelic discrimination plot based on the signal intensity ratio of FAM and VIC at the end points of PCR amplification. Synthetic wild-type and mutant DNAs are located at bottom right and top left corners, respectively, and distilled water used as negative control is at bottom left corner. Non-carrier dogs are clustered together with the synthetic wild-type DNA at bottom right corner. One non-carrier is not contained in this cluster. Carrier dogs are located near the diagonal line forming a distinct cluster.

総 括

本研究では、ジャック・ラッセル・テリアで近年増加している消化管ポリープは *APC* 遺伝子の特定の生殖細胞系列変異 (c.[462_463delinsTT]) を原因とするイヌの新規の遺伝性疾患であることをあきらかにした。また、罹患犬において遺伝子変異がヘテロ接合性に認められたことから、本疾患は顕性（優性）遺伝性疾患であることがわかった。遺伝性消化管ポリポーシスは、①胃および大腸における多発性のポリープの形成、②若齢での発生、③再発しやすいという、臨床学的に犬における一般的な散発性消化管上皮性腫瘍と異なる特徴を示すことが明らかとなり、これらの特徴的な病態は、ジャック・ラッセル・テリアの遺伝性消化管ポリポーシスを予測、診断する上で重要な手掛かりになることが示唆された。病理学的解析では、本疾患で発生する消化管上皮性腫瘍は浸潤性の乏しい腺腫および腺癌であった。さらに、本疾患に見られる消化管上皮性腫瘍には *APC* 遺伝子に体細胞性変異や LOH が認められ、残存する *APC* 遺伝子の野生型アレルの不活性化が腫瘍発生に関与していることが明らかとなった。

第 2 章では、第 1 章で同定した *APC* 遺伝子の生殖細胞系列変異 (c.[462_463delinsTT]) の有無を判定可能な PCR-RFLP 法および TaqMan リアルタイム PCR 法を開発し、*APC* 遺伝子変異のキャリアおよび非キャリア個体のサンプルを用いて、これら方法が偽陰性や偽陽性を伴わない信頼性の高い遺伝子検査法であることを示した。本研究で開発した遺伝子検査法は、小動物臨床において確定診断に用いられるだけでなく、本疾患の発症リスクの評価や、繁殖段階での遺伝子変異の拡散防止のためのキャリア個体の摘発にも有用と考えられた。

第 3 章では、第 2 章で確立した遺伝子検査法を用いて、日本国内のジャック・ラ

ッセル・テリアにおける *APC* 遺伝子変異の保有状況を調査した。*APC* 遺伝子変異の保有率は 1.9 %と低かったが、遺伝子変異のキャリア個体は特定の家系には限定しておらず、国内のジャック・ラッセル・テリアに低い頻度ながら広く広がっていると考えられた。また、消化管上皮性腫瘍が認められた複数の犬種の検索ではジャック・ラッセル・テリア以外の犬種では *APC* 遺伝子の変異は検出されず、*APC* 遺伝子の特定の生殖細胞系列変異 (c.[462_463delinsTT]) を原因とする遺伝性消化管ポリポーシスはジャック・ラッセル・テリアの犬種特異的な疾患であると考えられた。しかし、*APC* 遺伝子全域の解析は行っておらず、他の領域に異なる生殖細胞系列変異がある可能性は残されており、今後のさらなる研究が必要である

本研究では、ジャック・ラッセル・テリアで見られる消化管ポリポーシスが新規の遺伝性疾患であることを示し、その遺伝子検査法を開発するとともに、疾患の現在の拡散状況を明らかにした。今後、本研究の成果が疾患の診断や遺伝性消化管ポリポーシスの拡散防止につながることを期待する。

謝 辞

本稿を終えるにあたり，本研究に対し，ご指導，ご鞭撻いただき，ご高閲を賜った，岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科獣医病理学の酒井洋樹准教授ならびに平田暁大助教，獣医内科学の西飯直仁准教授，獣医学科分子病態学の森崇教授ならびに岐阜大学応用生物科学部附属動物病院外科診療科の川部美史獣医師に深く感謝します。

本稿作成に関して，懇篤なご指導，ご助言を賜りました，帯広畜産大学畜産学部獣医学ユニットの古林与志安教授，岩手大学農学部共同獣医学科の落合謙爾教授，東京農工大学農学部共同獣医学科の吉田敏則准教授に深く感謝いたします。

遺伝子解析を行うにあたりご協力いただきました，岐阜大学生命科学総合研究支援センター ゲノム研究分野の皆様には深く感謝します。

検体の提供にご協力いただきました，岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科獣医寄生虫病学研究室の鬼頭克也教授に深く感謝いたします。

検体や臨床情報の提供にご協力いただきました，岐阜大学動物病院の獣医師ならびに看護師の皆様には深く感謝いたします。

遺伝子検査法開発にご協力いただきました岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科獣医病理学研究室の松下浩之君に深く感謝いたします。

疫学調査に際し，検体の提供にご協力いただきました，奈良動物二次診療クリニックの米地若菜副院長をはじめすべての動物病院の獣医師ならびに看護師の皆様には深く感謝いたします。

検体収集に際し，麻布大学遺伝子バンクより検体の提供にご協力いただきました，麻布大学獣医学部獣医学科獣医微生物学分野の阪口雅弘教授に深く感謝いたしま

す。

そして、本研究を終えるにあたり、ご助言、ご協力をいただき、温かく支えてくださいました、岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科獣医病理学の柳井徳磨名誉教授、岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科分子病態学の村上麻美助教、病理学研究室の皆様、客員臨床准教授の米丸加余子先生、研究員の後藤みなみ先生、技術補佐の入山千香子氏、高橋ゆかり氏、神谷美佐氏ならびにすべての皆様に対して、心から感謝します。

参考文献

- 1) Amin, M. B., Byrd, D. R., Edge, S. B. and Greene, F. L. 2016. AJCC cancer staging manual, Springer International Publishing AG, Cham.
- 2) Amorim, I., Taulescu, M. A., Day, M. J., Catoi, C., Reis, C. A., Carneiro, F. and Gartner, F. 2016. Canine Gastric Pathology: A Review. *J Comp Pathol* **154**: 9-37.
- 3) Averill, D. R., Jr. 1973. Degenerative myelopathy in the aging German Shepherd dog: clinical and pathologic findings. *J Am Vet Med Assoc* **162**: 1045-1051.
- 4) Awano, T., Johnson, G. S., Wade, C. M., Katz, M. L., Johnson, G. C., Taylor, J. F., Perloski, M., Biagi, T., Baranowska, I., Long, S., March, P. A., Olby, N. J., Shelton, G. D., Khan, S., O'Brien, D. P., Lindblad-Toh, K. and Coates, J. R. 2009. Genome-wide association analysis reveals a *SOD1* mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2794-2799.
- 5) Beroud, C. and Soussi, T. 1996. *APC* gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* **24**: 121-124.
- 6) Brierley, J., Gospodarowicz, M. K. and Wittekind, C. 2017. TNM classification of malignant tumours, John Wiley & Sons, Chichester.
- 7) Burt, R. W., Leppert, M. F., Slattery, M. L., Samowitz, W. S., Spirio, L. N., Kerber, R. A., Kuwada, S. K., Neklason, D. W., Disario, J. A., Lyon, E., Hughes, J. P., Chey, W. Y. and White, R. L. 2004. Genetic testing and phenotype in a large kindred with attenuated familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* **127**: 444-451.
- 8) Chang, H. S., Arai, T., Yabuki, A., Hossain, M. A., Rahman, M. M., Mizukami, K. and Yamato, O. 2010. Rapid and reliable genotyping technique for *GMI* gangliosidosis in

Shiba dogs by real-time polymerase chain reaction with TaqMan minor groove binder probes. *J Vet Diagn Invest* **22**: 234-237.

- 9) Chang, H. S., Kamishina, H., Mizukami, K., Momoi, Y., Katayama, M., Rahman, M. M., Uddin, M. M., Yabuki, A., Kohyama, M. and Yamato, O. 2013. Genotyping assays for the canine degenerative myelopathy-associated c.118G>A (p.E40K) mutation of the *SOD1* gene using conventional and real-time PCR methods: a high prevalence in the Pembroke Welsh Corgi breed in Japan. *J Vet Med Sci* **75**: 795-798.
- 10) Domizio, P., Talbot, I. C., Spigelman, A. D., Williams, C. B. and Phillips, R. K. 1990. Upper gastrointestinal pathology in familial adenomatous polyposis: results from a prospective study of 102 patients. *J Clin Pathol* **43**: 738-743.
- 11) Donner, J., Kaukonen, M., Anderson, H., Moller, F., Kyostila, K., Sankari, S., Hytonen, M., Giger, U. and Lohi, H. 2016. Genetic Panel Screening of Nearly 100 Mutations Reveals New Insights into the Breed Distribution of Risk Variants for Canine Hereditary Disorders. *PLoS One* **11**: e0161005.
- 12) Dostal, J., Hrdlicova, A. and Horak, P. 2011. Progressive rod-cone degeneration (PRCD) in selected dog breeds and variability in its phenotypic expression. *Vet Med* **56**: 243-247.
- 13) Farrell, L. L., Schoenebeck, J. J., Wiener, P., Clements, D. N. and Summers, K. M. 2015. The challenges of pedigree dog health: approaches to combating inherited disease. *Canine Genet Epidemiol* **2**: 3.
- 14) Fearnhead, N. S., Britton, M. P. and Bodmer, W. F. 2001. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* **10**: 721-733.
- 15) Giardiello, F. M., Burt, R. W., Järvinen, H. J. and Offerhaus, G. J. 2010. Familial

- adenomatous polyposis. In:(Bosman, F. T., Carneiro, F., Hruban, R. H. and Theise, N. D. eds.), WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th Edition ed. pp. 147-151. World Health Organization, Lyon.
- 16) Giger, U., Sargan, D. R. and McNiel, E. A. 2006. Breed-specific Hereditary Diseases and Genetic Screening. In:(Ostrander, E. A., Giger, U. and Lindblad-Toh, K. eds.), The Dog and Its Genome, pp. 249-289. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 - 17) Gough, A., Thomas, A. and O'Neill, D. 2018. Introduction. In:(Alex Gough, A. T., Dan O'Neill ed.) Breed predispositions to disease in dogs and cats, 3 ed. pp. 1-16. John Wiley & Sons, Chichester.
 - 18) Hamilton, S. R., Bosman, F. T., Boffetta, P., Ilyas, M., Morreau, H., Nakamura, S.-I., Quirke, P., Riboli, E. and Sobin, L. H. 2010. Carcinoma of the colon and rectum. In:(Bosman, F. T., Carneiro, F., Hruban, R. H. and Theise, N. D. eds.), WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th Edition ed. pp. 134-146. World Health Organization, Lyon.
 - 19) Head, K. W., Cullen, J. M. and Dubielzig, R. R. 2003. Histological classification of tumors of the alimentary system of domestic animals, Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC.
 - 20) Ichii, S., Horii, A., Nakatsuru, S., Furuyama, J., Utsunomiya, J. and Nakamura, Y. 1992. Inactivation of both *APC* alleles in an early stage of colon adenomas in a patient with familial adenomatous polyposis (FAP). *Hum Mol Genet* **1**: 387-390.
 - 21) Ichii, S., Takeda, S., Horii, A., Nakatsuru, S., Miyoshi, Y., Emi, M., Fujiwara, Y., Koyama, K., Furuyama, J., Utsunomiya, J. and et al. 1993. Detailed analysis of genetic alterations in colorectal tumors from patients with and without familial adenomatous

- polyposis (FAP). *Oncogene* **8**: 2399-2405.
- 22) Iwama, T., Mishima, Y. and Utsunomiya, J. 1993. The impact of familial adenomatous polyposis on the tumorigenesis and mortality at the several organs. Its rational treatment. *Annals of surgery* **217**: 101-108.
- 23) JAPAN KENNEL CLUB. 一般社団法人 ジャパンケネルクラブ. <https://www.jkc.or.jp/>. [accessed on 2021/04/13]
- 24) Jaspersen, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W. and Burt, R. W. 2010. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* **138**: 2044-2058.
- 25) Jelsig, A. M., Qvist, N., Brusgaard, K., Nielsen, C. B., Hansen, T. P. and Ousager, L. B. 2014. Hamartomatous polyposis syndromes: a review. *Orphanet J Rare Dis* **9**: 101.
- 26) Kanemaki, N., Tchedre, K. T., Imayasu, M., Kawarai, S., Sakaguchi, M., Yoshino, A., Itoh, N., Meguro, A. and Mizuki, N. 2013. Dogs and humans share a common susceptibility gene *SRBD1* for glaucoma risk. *PLoS One* **8**: e74372.
- 27) 株式会社ケーニンラボ. 小動物臨床の遺伝子検査. <https://canine-lab.jp/>. [accessed on 2021/04/28]
- 28) Kerr, S. E., Thomas, C. B., Thibodeau, S. N., Ferber, M. J. and Halling, K. C. 2013. *APC* germline mutations in individuals being evaluated for familial adenomatous polyposis: a review of the Mayo Clinic experience with 1591 consecutive tests. *J Mol Diagn* **15**: 31-43.
- 29) Knudsen, A. L., Bisgaard, M. L. and Bulow, S. 2003. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer* **2**: 43-55.
- 30) Kohyama, M., Tada, N., Mitsui, H., Tomioka, H., Tsutsui, T., Yabuki, A., Rahman, M. M., Kushida, K., Mizukami, K. and Yamato, O. 2016. 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**: 481-484.
- 31) Lamlum, H., Ilyas, M., Rowan, A., Clark, S., Johnson, V., Bell, J., Frayling, I., Efstathiou, J., Pack, K., Payne, S., Roylance, R., Gorman, P., Sheer, D., Neale, K., Phillips, R., Talbot, I., Bodmer, W. and Tomlinson, I. 1999. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nature Medicine* **5**: 1071-1075.
- 32) Lauwers, G. Y., Carnerio, F., Graham, D. Y., Curado, M.-P., Franceschi, S., Montgomery, E., Tatematsu, M. and Hattori, T. 2010. Gastric carcinoma. In:(Bosman, F. T., Carneiro, F., Hruban, R. H. and Theise, N. D. eds.), WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th Edition ed. pp. 48-58. World Health Organization, Lyon.
- 33) Levy, D. B., Smith, K. J., Beazer-Barclay, Y., Hamilton, S. R., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. 1994. Inactivation of both *APC* alleles in human and mouse tumors. *Cancer Res* **54**: 5953-5958.
- 34) Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J. L., Kulbokas, E. J., 3rd, Zody, M. C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R. K., Ostrander, E. A., Ponting, C. P., Galibert, F., Smith, D. R., DeJong, P. J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, C. W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M. J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, K. P., Parker, H. G., Pollinger, J. P., Searle, S. M., Sutter, N. B., Thomas, R., Webber, C.,

Baldwin, J., Abebe, A., Abouelleil, A., Aftuck, L., Ait-Zahra, M., Aldredge, T., Allen, N., An, P., Anderson, S., Antoine, C., Arachchi, H., Aslam, A., Ayotte, L., Bachantsang, P., Barry, A., Bayul, T., Benamara, M., Berlin, A., Bessette, D., Blitshteyn, B., Bloom, T., Blye, J., Boguslavskiy, L., Bonnet, C., Boukhgalter, B., Brown, A., Cahill, P., Calixte, N., Camarata, J., Cheshatsang, Y., Chu, J., Citroen, M., Collymore, A., Cooke, P., Dawoe, T., Daza, R., Decktor, K., DeGray, S., Dhargay, N., Dooley, K., Dooley, K., Dorje, P., Dorjee, K., Dorris, L., Duffey, N., Dupes, A., Egbiremolen, O., Elong, R., Falk, J., Farina, A., Faro, S., Ferguson, D., Ferreira, P., Fisher, S., FitzGerald, M., Foley, K., Foley, C., Franke, A., Friedrich, D., Gage, D., Garber, M., Gearin, G., Giannoukos, G., Goode, T., Goyette, A., Graham, J., Grandbois, E., Gyaltsen, K., Hafez, N., Hagopian, D., Hagos, B., Hall, J., Healy, C., Hegarty, R., Honan, T., Horn, A., Houde, N., Hughes, L., Hunnicutt, L., Husby, M., Jester, B., Jones, C., Kamat, A., Kanga, B., Kells, C., Khazanovich, D., Kieu, A. C., Kisner, P., Kumar, M., Lance, K., Landers, T., Lara, M., Lee, W., Leger, J. P., Lennon, N., Leuper, L., LeVine, S., Liu, J., Liu, X., Lokyitsang, Y., Lokyitsang, T., Lui, A., Macdonald, J., Major, J., Marabella, R., Maru, K., Matthews, C., McDonough, S., Mehta, T., Meldrim, J., Melnikov, A., Meneus, L., Mihalev, A., Mihova, T., Miller, K., Mittelman, R., Mlenga, V., Mulrain, L., Munson, G., Navidi, A., Naylor, J., Nguyen, T., Nguyen, N., Nguyen, C., Nguyen, T., Nicol, R., Norbu, N., Norbu, C., Novod, N., Nyima, T., Olandt, P., O'Neill, B., O'Neill, K., Osman, S., Oyono, L., Patti, C., Perrin, D., Phunkhang, P., Pierre, F., Priest, M., Rachupka, A., Raghuraman, S., Rameau, R., Ray, V., Raymond, C., Rege, F., Rise, C., Rogers, J., Rogov, P., Sahalie, J., Settipalli, S., Sharpe, T., Shea, T., Sheehan, M., Sherpa, N., Shi, J., Shih, D., Sloan, J., Smith, C., Sparrow, T., Stalker, J., Stange-

- Thomann, N., Stavropoulos, S., Stone, C., Stone, S., Sykes, S., Tchuinga, P., Tenzing, P., Tesfaye, S., Thoulutsang, D., Thoulutsang, Y., Topham, K., Topping, I., Tsamla, T., Vassiliev, H., Venkataraman, V., Vo, A., Wangchuk, T., Wangdi, T., Weiland, M., Wilkinson, J., Wilson, A., Yadav, S., Yang, S., Yang, X., Young, G., Yu, Q., Zainoun, J., Zembek, L., Zimmer, A. and Lander, E. S. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* **438**: 803-819.
- 35) Lingaas, F., Comstock, K. E., Kirkness, E. F., Sorensen, A., Aarskaug, T., Hitte, C., Nickerson, M. L., Moe, L., Schmidt, L. S., Thomas, R., Breen, M., Galibert, F., Zbar, B. and Ostrander, E. A. 2003. A mutation in the canine *BHD* gene is associated with hereditary multifocal renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis in the German Shepherd dog. *Hum Mol Genet* **12**: 3043-3053.
- 36) Lingeman, C. H. and Garner, F. M. 1972. Comparative study of intestinal adenocarcinomas of animals and man. *J Natl Cancer Inst* **48**: 325-346.
- 37) Lynch, H. T., Smyrk, T., McGinn, T., Lanspa, S., Cavalieri, J., Lynch, J., Slominski-Castor, S., Cayouette, M. C., Priluck, I. and Luce, M. C. 1995. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. *Cancer* **76**: 2427-2433.
- 38) McEntee, M. F. and Brenneman, K. A. 1999. Dysregulation of beta-catenin is common in canine sporadic colorectal tumors. *Vet Pathol* **36**: 228-236.
- 39) Miyoshi, Y., Nagase, H., Ando, H., Horii, A., Ichii, S., Nakatsuru, S., Aoki, T., Miki, Y., Mori, T. and Nakamura, Y. 1992. Somatic mutations of the *APC* gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the *APC* gene. *Hum Mol Genet* **1**: 229-233.
- 40) Mizukami, K., Yabuki, A., Kawamichi, T., Chang, H. S., Rahman, M. M., Uddin, M.

- M., Kohyama, M. and Yamato, O. 2013. Real-time PCR genotyping assay for canine trapped neutrophil syndrome and high frequency of the mutant allele in Border collies. *Vet J* **195**: 260-261.
- 41) Mizukami, K., Chang, H. S., Yabuki, A., Kawamichi, T., Kawahara, N., Hayashi, D., Hossain, M. A., Rahman, M. M., Uddin, M. M. and Yamato, O. 2011. Novel rapid genotyping assays for neuronal ceroid lipofuscinosis in Border Collie dogs and high frequency of the mutant allele in Japan. *J Vet Diagn Invest* **23**: 1131-1139.
- 42) Moser, A. R., Pitot, H. C. and Dove, W. F. 1990. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* **247**: 322-324.
- 43) Moser, A. R., Luongo, C., Gould, K. A., McNeley, M. K., Shoemaker, A. R. and Dove, W. F. 1995. *ApcMin*: a mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis. *Eur J Cancer* **31A**: 1061-1064.
- 44) Munday John S., L. C. V., Kiupel Matti 2016. Tumors of the Alimentary Tract. In:(Meuten, D. J. ed.) *Tumors in Domestic Animals*, 5 ed. pp. 499-601. Willey & Sons.
- 45) Nakamura, S., Matsumoto, T., Kobori, Y. and Iida, M. 2002. Impact of *Helicobacter pylori* infection and mucosal atrophy on gastric lesions in patients with familial adenomatous polyposis. *Gut* **51**: 485-489.
- 46) Nieuwenhuis, M. H. and Vasen, H. F. 2007. Correlations between mutation site in *APC* and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol* **61**: 153-161.
- 47) Oshima, M., Oshima, H., Kitagawa, K., Kobayashi, M., Itakura, C. and Taketo, M. 1995. Loss of *Apc* heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated *Apc* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4482-

4486.

- 48) Ostrander, E. A. and Kruglyak, L. 2000. Unleashing the canine genome. *Genome Res* **10**: 1271-1274.
- 49) Paoloni, M. C., Penninck, D. G. and Moore, A. S. 2002. Ultrasonographic and clinicopathologic findings in 21 dogs with intestinal adenocarcinoma. *Vet Radiol Ultrasound* **43**: 562-567.
- 50) Park, J. G., Park, K. J., Ahn, Y. O., Song, I. S., Choi, K. W., Moon, H. Y., Choo, S. Y. and Kim, J. P. 1992. Risk of gastric cancer among Korean familial adenomatous polyposis patients. Report of three cases. *Dis Colon Rectum* **35**: 996-998.
- 51) Patnaik, A. K., Hurvitz, A. I. and Johnson, G. F. 1977. Canine gastrointestinal neoplasms. *Vet Pathol* **14**: 547-555.
- 52) Penninck, D. G., Moore, A. S. and Gliatto, J. 1998. Ultrasonography of canine gastric epithelial neoplasia. *Vet Radiol Ultrasound* **39**: 342-348.
- 53) Rahman, M. M., Yabuki, A., Kohyama, M., Mitani, S., Mizukami, K., Uddin, M. M., Chang, H. S., Kushida, K., Kishimoto, M., Yamabe, R. and Yamato, O. 2014. Real-time PCR genotyping assay for *GM2* gangliosidosis variant 0 in toy poodles and the mutant allele frequency in Japan. *J Vet Med Sci* **76**: 295-299.
- 54) Saito, T., Nibe, K., Chambers, J. K., Uneyama, M., Nakashima, K., Ohno, K., Tsujimoto, H., Uchida, K. and Nakayama, H. 2020. A histopathological study on spontaneous gastrointestinal epithelial tumors in dogs. *J Toxicol Pathol* **33**: 105-113.
- 55) 坂口雅弘, 川原井晋平. 2009. Canine bio-resource banking project in 2008. 麻布大学雑誌 19・20: 134-137.
- 56) Scanziani, E., Giusti, A. M., Gualtieri, M. and Fonda, D. 1991. Gastric carcinoma in

- the Belgian shepherd dog. *J Small Anim Pract* **32**: 465-469.
- 57) Shearin, A. L. and Ostrander, E. A. 2010. Leading the way: canine models of genomics and disease. *Dis Model Mech* **3**: 27-34.
- 58) Slutsky, J., Raj, K., Yuhnke, S., Bell, J., Fretwell, N., Hedhammar, A., Wade, C. and Giger, U. 2013. A web resource on DNA tests for canine and feline hereditary diseases. *Vet J* **197**: 182-187.
- 59) Solomon, E., Voss, R., Hall, V., Bodmer, W. F., Jass, J. R., Jeffreys, A. J., Lucibello, F. C., Patel, I. and Rider, S. H. 1987. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature* **328**: 616-619.
- 60) Spirio, L., Olschwang, S., Groden, J., Robertson, M., Samowitz, W., Joslyn, G., Gelbert, L., Thliveris, A., Carlson, M., Otterud, B. and et al. 1993. Alleles of the *APC* gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* **75**: 951-957.
- 61) Sullivan, M., Lee, R., Fisher, E. W., Nash, A. S. and McCandlish, I. A. 1987. A study of 31 cases of gastric carcinoma in dogs. *Vet Rec* **120**: 79-83.
- 62) Swann, H. M. and Holt, D. E. 2002. Canine gastric adenocarcinoma and leiomyosarcoma: a retrospective study of 21 cases (1986-1999) and literature review. *J Am Anim Hosp Assoc* **38**: 157-164.
- 63) Switonski, M. 2014. Dog as a model in studies on human hereditary diseases and their gene therapy. *Reprod Biol* **14**: 44-50.
- 64) Takayama, T., Ohi, M., Hayashi, T., Miyanishi, K., Nobuoka, A., Nakajima, T., Satoh, T., Takimoto, R., Kato, J., Sakamaki, S. and Niitsu, Y. 2001. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* **121**: 599-611.

- 65) The University of Sydney. OMIA - Online Mendelian Inheritance in Animals. <https://omia.org/home/> [accessed on 2021/04/13].
- 66) Toyooka, M., Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Iwama, T. and Miyaki, M. 1995. Somatic mutations of the *adenomatous polyposis coli* gene in gastroduodenal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* **55**: 3165-3170.
- 67) 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, J. K., Sugano, S., Uchida, K. and 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**: e0169002.
- 68) University of Pennsylvania. Penn Gen. <https://www.vet.upenn.edu/research/academic-departments/clinical-sciences-advanced-medicine/research-labs-centers/penngen/tests-worldwide> [accessed on 2021/04/13].
- 69) Vasen, H. F., Moslein, G., Alonso, A., Aretz, S., Bernstein, I., Bertario, L., Blanco, I., Bulow, S., Burn, J., Capella, G., Colas, C., Engel, C., Frayling, I., Friedl, W., Hes, F. J., Hodgson, S., Jarvinen, H., Mecklin, J. P., Moller, P., Myrhoi, T., Nagengast, F. M., Parc, Y., Phillips, R., Clark, S. K., de Leon, M. P., Renkonen-Sinisalo, L., Sampson, J. R., Stormorken, A., Tejpar, S., Thomas, H. J. and Wijnen, J. 2008. Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). *Gut* **57**: 704-713.
- 70) Vonholdt, B. M., Pollinger, J. P., Lohmueller, K. E., Han, E., Parker, H. G., Quignon, P., Degenhardt, J. D., Boyko, A. R., Earl, D. A., Auton, A., Reynolds, A., Bryc, K., Brisbin, A., Knowles, J. C., Mosher, D. S., Spady, T. C., Elkahloun, A., Geffen, E., Pilot, M., Jedrzejewski, W., Greco, C., Randi, E., Bannasch, D., Wilton, A., Shearman,

- J., Musiani, M., Cargill, M., Jones, P. G., Qian, Z., Huang, W., Ding, Z. L., Zhang, Y. P., Bustamante, C. D., Ostrander, E. A., Novembre, J. and Wayne, R. K. 2010. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* **464**: 898-902.
- 71) Wei, H., Therrien, C., Blanchard, A., Guan, S. and Zhu, Z. 2008. The Fidelity Index provides a systematic quantitation of star activity of DNA restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* **36**: e50.
- 72) Yamaguchi, T., Ishida, H., Ueno, H., Kobayashi, H., Hinoi, T., Inoue, Y., Ishida, F., Kanemitsu, Y., Konishi, T., Tomita, N., Matsubara, N., Watanabe, T. and Sugihara, K. 2016. Upper gastrointestinal tumours in Japanese familial adenomatous polyposis patients. *Jpn J Clin Oncol* **46**: 310-315.
- 73) Zeng, R., Coates, J. R., Johnson, G. C., Hansen, L., Awano, T., Kolicheski, A., Ivansson, E., Perloski, M., Lindblad-Toh, K., O'Brien, D. P., Guo, J., Katz, M. L. and Johnson, G. S. 2014. Breed distribution of SOD1 alleles previously associated with canine degenerative myelopathy. *J Vet Intern Med* **28**: 515-521.

要 旨

本研究では、およそ 10 年前から日本国内のジャック・ラッセル・テリア（以下 JRT）で増加している消化管上皮性腫瘍について、ヒトの FAP に類似したイヌの新規遺伝性腫瘍であることを証明した。さらにその確定診断のための遺伝子検査法の開発を行い、国内の JRT および消化管上皮性腫瘍を発症した複数の犬種における遺伝子変異保有状況の調査および本疾患の犬種特異性を検討した。

第 1 章では、消化管ポリープを認めた 21 頭の JRT の臨床的および病理学的特徴を解析した。ポリープの初発年齢は 2.3 から 12.6 歳であったが、5 歳以下という若齢での発症が 6 頭で認められた。ポリープは胃および大腸で発生し、胃では幽門部、大腸では直腸に多く認められた。21 頭中 13 頭では複数のポリープの発生が認められ、6 頭では胃と大腸の両方で発生していた。ポリープの術後再発は 7 頭でみられた。また、イヌの典型的な消化管悪性上皮性腫瘍は予後不良であるが、JRT では、1 年および 2 年生存率はともに 100% (n=12 および 10)、3 年生存率は 87.5% (n=8) であり比較的予後良好であった。胃および直腸のポリープは病理組織学的に上皮性過形成、腺腫、腺癌と診断され、腺癌は、管状腺癌、乳頭状腺癌および管状乳頭状腺癌に細分類された。イヌの消化管上皮性悪性腫瘍と異なり、JRT の腫瘍は主に粘膜の上層で増殖し、浸潤性は乏しかった。イヌの腺癌で多いとされる印環細胞癌は認められなかった。免疫染色では、JRT の腫瘍において β -カテニンの細胞質および核の陽性像が観察された。

家族性大腸腺腫症 (FAP) は、ヒトの APC 遺伝子の生殖細胞系列の変異によって引き起こされる常染色体優性疾患で、結腸および直腸に数百から数千の腺腫性ポリープが発生することを特徴とし、また、FAP 患者は胃の腺腫および腺癌を発症する

リスクが高いことも報告されている。そこで、FAP の病態との類似性に着目し、JRT の罹患犬 21 頭の *APC* 遺伝子変異を PCR-ダイレクトシーケンス法にて検索したところ、全頭で同一の遺伝子変異 (c.[462_463delinsTT]) がヘテロ接合性に認められ、本疾患が顕性 (優性) 遺伝性疾患であることが明らかになった。次に、腫瘍発生メカニズムの解析のために、JRT の腫瘍組織の解析を行ったところ、*APC* 遺伝子において体細胞変異 (n=1) や野生型 *APC* アレルの消失 (ヘテロ接合性の消失: LOH, n=4) が検出され、FAP 患者と同様に、機能的 *APC* が失われることで腫瘍発生に至ると考えられた。*APC* タンパク質の機能喪失は β カテニンの分解に関与し、その核への蓄積を促進するため、機能的 *APC* の消失は、免疫染色の結果からも支持された。

第 2 章では、JRT の遺伝性 GI (gastrointestinal) ポリポーシスの原因となる生殖細胞系列の *APC* 変異体の正確な検出のため、PCR 法をもとにした 2 つの信頼性の高い遺伝子検査法 [PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法および TaqMan リアルタイム PCR 法] を開発した。PCR-RFLP 法では、変異部位が制限酵素 *Mse*I により切断されることを利用して、PCR 産物の切断パターンの違いによって *APC* 遺伝子変異のキャリア個体と非キャリア個体を識別することが可能であった。TaqMan リアルタイム PCR 法では、野生型および変異型アレルに特異的に結合するプローブを用いることで両者を識別することが可能であった。いずれの方法も偽陽性および偽陰性は検出されず、これらの検査法は高い特異性と感度を有する遺伝子検査法であることが実証された。また、血液、口腔スワブおよびパラフィン包埋組織から抽出した様々な由来の DNA サンプルに適用可能な汎用性が高い検査法であると考えられた。これらの遺伝子検査法は、小動物の診療における犬の遺伝性 GI ポリポーシスの診断と予防に貢献できる可能性が示唆された。

第3章では、第2章で開発した PCR-RFLP 法を用いて、国内の JRT における APC 遺伝子変異の保有状況を調査した。日本国内の 93 動物病院から JRT の末梢血を集めて調査した。792 頭中 15 頭で APC 遺伝子の生殖細胞系列変異が認められ、その保有率は 1.9 %であった。性別、被毛の種類による有意な差は認められなかった。生まれた年を 5 年ごとに区切り解析したところ、各年代の APC 変異保有率はおおよそ 2%で推移しており、大きな違いは認められなかった。さらに、本調査で発見された 8 頭を含め、APC 遺伝子変異のキャリア個体 13 頭の血統書を用いた家系調査では、独立した 3 つの家系が見出され、さらにいずれの家系にも属さない個体も認められた。以上より、本疾患の原因となる APC 遺伝子変異は国内の JRT において、特定の家系にとどまらず広く拡散していると考えられた。また、JRT 以外の犬種における生殖細胞系列の APC 変異体の広がりを調べるために、複数の犬種において、ホルマリン固定パラフィン包埋サンプルと麻布大学のゲノムバンクから入手した DNA サンプルを使用して、消化管上皮性腫瘍を有する犬の生殖細胞系 APC 遺伝子を回顧的に検索した。その結果、ゲノムバンクサンプルの 3 頭の JRT に、生殖細胞系 APC 変異体キャリアが見出されたが、JRT 以外の犬には生殖細胞系 APC 変異体キャリアは認められなかった。これらの結果から生殖細胞系 APC 変異体 (c.[462_463delinsTT]) に関連する遺伝性 GI ポリポーシスは JRT における品種特異的疾患であると考えられた。

本研究では、消化管上皮性腫瘍の発生を認めた JRT には APC 遺伝子の同一の生殖細胞系列変異 (c.[462_463delinsTT]) が認められ、本疾患がヒトの FAP に類似した遺伝性疾患であることを明らかにした。さらに、遺伝子検査法を確立し、疫学情報を提供した。本研究の成果によって、本疾患の診断や拡散防止につながる事が期待される。

英文要旨

The present study demonstrated that gastrointestinal (GI) polyposis in Jack Russell Terriers (JRTs), which has increased in Japan since the late 2000s, is a novel hereditary disease associated with the germline variant of the *adenomatous polyposis coli* (*APC*) gene. Furthermore, reliable genetic tests for this disease, which can detect the germline *APC* variant, was established. This study also elaborated on the prevalence of the *APC* variant in JRTs in Japan and breed specificity of this hereditary disease.

In Chapter 1, the clinical and pathological features of 21 JRTs with GI polyps were discussed. Although, the age of onset of the polyps ranged 2.3–12.6 years, it was found that the GI polyps developed under 5 years of age in 6 animals such a case of juvenile onset was observed in some dogs with GI polyps. The GI polyps were found in either or both the stomach and colorectum, with a predilection for the gastric antrum and rectum. Of the 21 dogs examined, 13 suffered from multiple polyps including six dogs with both gastric and colorectal polyps. Recurrence of GI polyps was observed in seven out of the 21 dogs observed in the study. Although the prognosis of dogs with typical canine GI carcinomas was poor, follow-up for those of the JRT cases revealed 100% 1-year-and 2-year survival rates (n = 12 and 10, respectively) and 87.5% (7 of 8 cases) 3-year survival rate after the initial surgical or endoscopic treatment. Histopathologically, The GI polyps were diagnosed as epithelial hyperplasia, adenomas or adenocarcinomas. All of the adenocarcinomas were subclassified into tubular, papillary, and tubulopapillary adenocarcinoma, and they did not invade into the submucosa, unlike typical canine GI carcinomas. There was no signet-ring carcinoma detected, which is the common type of canine GI adenocarcinomas.

Immunohistochemical analysis revealed cytoplasmic and nuclear β -catenin positivity in tumor cells. Familial adenomatous polyposis (FAP) is an autosomal dominant disorder caused by germline mutations in the *APC* gene in humans. FAP is characterized by the development of hundreds to thousands of adenomatous polyps in the colon and rectum, and it has also been reported that FAP patients are at a higher risk of developing adenoma and adenocarcinoma of the stomach. Focusing on the similar pathogenesis to FAP, we investigated for *APC* gene mutations in 21 JRT-affected dogs by the PCR-direct sequencing, and found that the identical heterozygous germline *APC*, characterized by a 2-bp substitution (c.[462_463delinsTT]) in exon 4 was found in all of them, and it was clarified that this disease is a dominant hereditary disease. Furthermore, when examining whether there were somatically acquired *APC* alterations in the GI lesions of JRTs, somatic mutation (n=1) and loss of the wild-type *APC* allele (loss of heterozygosity: LOH, n=4) were detected in the GI tumors of JRTs, suggesting that biallelic *APC* inactivation is at work in tumor development. This result was also supported by the results of immunohistochemical analysis because the loss of APC protein function is involved in the degradation of β -catenin and promotes its accumulation in the nucleus.

In Chapter 2, the two highly reliable PCR- based genetic tests [PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and TaqMan real-time PCR assays] for hereditary GI polyposis in JRTs which provide an accurate assessment of the causative germline *APC* variant was developed. The PCR-PCR-RFLP assay was developed by creating a new restriction site for *Mse* I by utilizing the germline *APC* variant. In the PCR-RFLP assay, the mutation site was cleaved by the restriction enzyme *Mse* I, and it was possible to distinguish between carrier individuals and non-carriers of the *APC* gene variant by the

difference in the cleavage pattern of the PCR product. In the TaqMan real-time PCR assay, it was possible to distinguish between wild-type and mutant alleles by using probes that specifically bind to them. Neither assay detected false positives or false negatives, demonstrating that these tests are genetic tests with high specificity and sensitivity. In addition, since DNA extracted from blood, oral swabs, and paraffin-embedded tissues could be used, it was considered to be a highly versatile test that can be applied to various samples. These genetic assays could contribute to the diagnosis and potential prevention of hereditary GI polyposis transmission in dogs in small animal practice.

In Chapter 3, the PCR-RFLP assay developed in Chapter 2 was used to investigate the prevalence of *APC* gene mutations in domestic JRTs. Peripheral blood of 792 JRTs was collected from 93 veterinary hospitals in Japan and investigated. Germline mutations in the *APC* gene were found in 15 JRTs, with a prevalence of 1.9%. No significant difference was observed depending on the sex and the type of hair. The prevalence of *APC* variant in each age group remained at about 2% when the year of birth was divided and analyzed every 5 years, and no significant differentiation was observed among them. In addition, a pedigree study using the pedigree of 13 carriers of *APC* gene variant, including 8 individuals found in the present study, found 3 independent pedigrees. Some individuals didn't belong to any pedigree. From the above, it is considered that the *APC* gene variant that causes this disease is widely spread not only in specific families but also in domestic JRTs. In addition, when we retrospectively collected cases of GI epithelial tumors regardless of breed and analyzed the *APC* gene variant retention status, no mutation was detected in dog breeds other than JRT. Therefore, hereditary GI polyposis due to germline mutations in the *APC* gene (c. [462_463delinsTT]) is likely to be a breed-specific disease of JRT. In order to determine if

germline *APC* variant widespread in breeds other than JRT, the dogs bearing with GI epithelial tumors in multiple breeds was using formalin-fixed paraffin-embedded samples and DNA samples obtained from the Azabu University Genome Bank. As a result, germline *APC* variant carriers were found in the three JRTs included in the genome bank sample, but germline *APC* variant carriers were not found in dogs other than JRT. Based on these results, hereditary GI polyposis associated with germline *APC* variant (c.[462_463delinsTT]) could be considered to be a breed-specific disease of JRTs.

In the present study, the same germline mutation of the *APC* gene (c.[462_463delinsTT]) was found in JRT with the development of GI epithelial tumors, demonstrating that this disease is a similar hereditary disease of human FAP. In addition, a genetic testing assay was established and epidemiological information was provided. The results of this study will lead to the diagnosis of this disease and the prevention of its spread.