

氏名 (本 (国) 籍)	吉 寄 響 子 (長崎県)
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 酒 井 洋 樹
学位の種類	博士 (獣医学)
学位記番号	獣医博甲第590号
学位授与年月日	令和3年9月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	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シスに関する研究
審査委員	主査 岐阜大学 准教授 西 飯 直 仁 副査 帯広畜産大学 教授 古 林 与志安 副査 岩手大学 教授 落 合 謙 爾 副査 東京農工大学 准教授 吉 田 敏 則 副査 岐阜大学 教授 酒 井 洋 樹

#### 学位論文の内容の要旨

イヌでは消化管上皮性腫瘍の発生はまれであるが、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) で消化管上皮性腫瘍が増加している。本研究では、本疾患が *Adenomatous polyposis coli* (以下 APC) 遺伝子変異を原因とする、ヒトの家族性大腸腺腫症 (以下 FAP) に類似したイヌの新規遺伝性腫瘍であることを明らかにした。さらにこの遺伝性 GI (gastrointestinal) ポリポーシスの原因になる APC 遺伝子検出のための汎用性のある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し、その結果から本疾患の犬種特異性を検討した。

第1章では、胃および大腸のポリープを認めた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。ポリープの切除後再発は7頭でみられた。また、イヌの一般的な消化管悪性上皮性腫瘍は予後不良であるが、JRTの症例では比較的予後が良好であった。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、腺腫あるいは腺癌と診断され、腺癌では、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。イヌの一般的な消化管上皮性悪性腫瘍と異なり、JRTの腺癌は主に粘膜の上層で増殖し、浸潤性は乏しかった。イヌの消化管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の腺腫および腺癌においてβ-カテニンの細胞質および核の陽性像が観察された。

FAPは、ヒトのAPC遺伝子の生殖細胞系列の変異を原因とする常染色体顕性(優性)遺伝性疾患で、大腸に数百から数千の腺腫性ポリープが発生する。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、本疾患と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シング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* が失われると考えられた。*APC* タンパク質は  $\beta$  カテニンの分解に関与し、その機能喪失は  $\beta$  カテニンの核蓄積を促進し腫瘍発生につながる。これは、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 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種類の信頼性の高い遺伝子検査法を開発した。PCR-restriction fragment length polymorphism (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。いずれの検査法も偽陽性および偽陰性は検出されず、キャリア個体と非キャリア個体の識別が可能で、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。また、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章で開発した遺伝子検査法を用いて、日本国内の JRT および消化管上皮性腫瘍を有する JRT 以外の犬種について解析を行った。まず、日本国内の93動物病院から JRT の末梢血を集めて *APC* 遺伝子変異の保有状況を調査した。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頭と第1章の症例を含め、*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* 遺伝子変異は日本国内の 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。つづいて JRT 以外の犬種における生殖細胞系列の *APC* 変異体の広がりを知るために、消化管上皮性腫瘍を有する犬の生殖細胞系 *APC* 遺伝子を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。

以上のように、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、本疾患がヒトの軽症型 FAP に類似した遺伝性疾患であることが明らかとなった。また、本疾患で認められた腺癌は浸潤性が乏しく、通常のコリーの消化管腺癌と比較して長期の予後が期待できた。さらに、本疾患の遺伝子検査法を確立し、疫学情報を提供した。本研究によって得られた成果は、今後、本疾患の診断や拡散防止につながることを期待される。

## 審査結果の要旨

本研究では、日本国内のジャック・ラッセル・テリア (JRT) で増加している消化管

(gastrointestinal, GI) 上皮性腫瘍について, *Adenomatous polyposis coli* (*APC*) 遺伝子変異に起因するイヌの新規遺伝性腫瘍であることを明らかにした。さらに, この遺伝性 GI ポリポーシスの遺伝子検査法を開発し, 国内の JRT および GI 上皮性腫瘍を発症した JRT 以外の複数の犬種における遺伝子変異保有状況の調査から本疾患の犬種特異性を検討した。

第 1 章では, 胃および大腸にポリープを認めた 21 頭の JRT 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。ポリープの切除後再発は 7 頭でみられた。ポリープは上皮性過形成, 腺腫あるいは腺癌と診断された。腺癌は主に粘膜の上層で増殖し, 浸潤性は乏しかった。ヒトの家族性大腸腺腫症 (FAP) は *APC* 遺伝子の生殖細胞系列の変異を原因とする常染色体顕性 (優性) 遺伝性疾患で, 大腸に無数の腺腫性ポリープが発生し, 胃の腺腫, 腺癌の発症リスクが高いことも報告されている。そこで罹患 JRT の *APC* 遺伝子を検索したところ, 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, 本疾患が顕性遺伝性疾患であることが明らかになった。腫瘍組織の解析では, *APC* 遺伝子の体細胞変異や野生型 *APC* アレルの消失が検出され, FAP 患者と同様に機能的 *APC* が消失し腫瘍発生に至ると考えられた。

第 2 章では, 遺伝性 GI ポリポーシスの生殖細胞系列の *APC* 変異体の検出のため, PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) および TaqMan リアルタイム PCR をもとにした信頼性の高い遺伝子検査法を開発した。いずれも偽陽性および偽陰性は検出されず, *APC* 変異体キャリア個体と非キャリア個体の識別が可能な, 高い特異性と感度を有する遺伝子検査法を確立した。

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 JRT および JRT 以外の GI 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を調査した。JRT の変異保有率は 1.9 % で, 独立した 3 つの家系および家系に属さない個体が認められ, JRT 以外の犬種にはキャリア個体は認められなかった。以上より, 遺伝性 GI ポリポーシスは品種特異的疾患で, *APC* 変異体は特定の家系にとどまらず日本国内の JRT に広く拡散していると考えられた。

本研究では, GI 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が認められ, 本疾患がヒトの軽症型 FAP に類似した遺伝性疾患であることを明らかにし, さらに, 遺伝子検査法を確立し, 限定的ではあるものの, 日本国内の JRT にこの変異 *APC* 遺伝子が広く保有されていることが明らかとなった。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ことを期待される。

以上について, 審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Familial adenomatous polyposis in dogs: hereditary gastrointestinal polyposis in Jack Russell Terriers with germline *APC* mutations  
著 者 名 : Yoshizaki, K., Hirata, A., Nishii, N., Kawabe, M., Goto, M., Mori, T. and Sakai, H.  
学術雑誌名 : Carcinogenesis  
巻・号・頁・発行年 : 42 (1) : 70-79, 2021

- 2) 題 目 : PCR-based genotyping assays to detect germline *APC* variant

associated with hereditary gastrointestinal polyposis in Jack  
Russell terriers

著者名 : Yoshizaki, K., Hirata, A., Matsushita, H., Nishii, N., Kawabe, M.,  
Mori, T. and Sakai, H.

学術雑誌名 : BMC Veterinary Research

巻・号・頁・発行年 : 17 (1) : 32, 2021

既発表学術論文

1) 題 目 : Hepatic neuroendocrine carcinoma in a Japanese Macaque

著者名 : Hirata, A., Miyamoto, Y., Kaneko, A., Sakai, H., Yoshizaki, K.,  
Yanai, T., Miyabe-Nishiwaki, T. and Suzuki, J.

学術雑誌名 : Journal of Medical Primatology

巻・号・頁・発行年 : 48:137-140, 2018