

柴犬における緑内障感受性遺伝子 *SRBD1* の 遺伝子型調査

印牧信行^{1)†} 太田充治²⁾ 辻田裕規³⁾ 小林由佳子⁴⁾ 安部勝裕⁵⁾
瀧本善之⁶⁾ 今安正樹⁷⁾

- 1) 麻布大学附属動物病院 (〒252-5201 相模原市中央区淵野辺 1-17-71)
- 2) 愛知県 開業 (動物眼科センター: 〒480-1147 長久手市市が洞 3-1001)
- 3) 大阪府 開業 (どうぶつ眼科専門クリニック: 〒562-0035 箕面市船場東 2-3-55)
- 4) 神奈川県 開業 (ありす動物眼科クリニック: 〒227-0034 横浜市青葉区桂台 1-11-20)
- 5) 東京都 開業 (安部動物病院: 〒110-0013 台東区入谷 2-2-8)
- 6) 岡山県 開業 (ナディア動物クリニック: 〒713-8102 倉敷市玉島 1367-15)
- 7) 株メニコン総合研究所 (〒487-0032 春日井市高森台 5-1-10)

(2017年11月17日受付・2018年6月1日受理)

要 約

全国6カ所の眼科紹介動物病院より緑内障群及び非緑内障群の柴犬DNAサンプルを回収し、イヌ緑内障感受性遺伝子 (*SRBD1* 遺伝子) の3つの一塩基多型 (rs8655283, rs22018514, rs22018513) における緑内障発症との関連を調査した。その結果、rs8655283 のリスクホモではノンリスクホモに対するオッズ比が3.45 ($P<0.05$)、rs22018514 ではオッズ比4.32 ($P<0.01$)、rs22018513 ではオッズ比10.33 ($P<0.01$) となった。またrs22018513 のヘテロではノンリスクホモに対するオッズ比が6.14 ($P<0.05$) となった。*SRBD1* 遺伝子の一塩基多型解析は将来的な緑内障発症リスクの評価に有用と考えられる。——キーワード: 遺伝子検査・調査, 緑内障, 柴犬。

-----日獣会誌 71, 645~648 (2018)

緑内障は眼圧が上昇して網膜神経節細胞の機能が損なわれることによって視覚障害を及ぼす眼疾患である [1, 2]。緑内障好発犬種としては柴犬, シベリアンハスキー, ビーグル, シーズー, パピヨンなどが知られているが, 中でも柴犬は症例数第1位で, 全犬種の約3分の1に相当する [3]。また, 麻布大学眼科に来院した柴犬の43%が緑内障に罹患していたとの報告もある [4]。

Kanemaki ら [5] は柴犬及びシーズーの緑内障感受性遺伝子として *SRBD1* 遺伝子を同定し, 柴犬では rs8655283, rs22018514, rs22018513 の3カ所の一塩基多型 (SNPs) のリスクアレル頻度が, シーズーでは rs9172407 のリスクアレル頻度が緑内障群と非緑内障群で有意差があることを報告した。また, *SRBD1* 遺伝子はヒト正常眼圧緑内障感受性遺伝子としても報告されている [6]。

今回, われわれは国内6カ所の眼科紹介動物病院に来院した柴犬よりゲノムDNAサンプルを採取し, *SRBD1* 遺伝子の3カ所のSNPをリアルタイムPCR法で解析した。

材料及び方法

国内6カ所の眼科紹介動物病院でサンプル採取を行った。施設ごとの提供サンプル数を表1に示す。平均年齢は緑内障群が 8.5 ± 2.9 歳, 非緑内障群が 8.2 ± 4.0 歳で両者に有意差はなかった (対応のない *t* 検定)。

性別では一部不明な個体を除き雄が35.4%, 雌が64.6%であった。なお, 神奈川県相模原市の117サンプルのうち98サンプルは前報 [5] と重複するが, 前報 [5] ではDNAシーケンサで5カ所のSNPを解析したのに対し, 今回は有意性の認められた3カ所のSNPのみを

† 連絡責任者: 印牧信行 (麻布大学附属動物病院)

〒252-5201 相模原市中央区淵野辺 1-17-71

☎ 042-754-7111 FAX 042-769-2418

E-mail: kanemaki@azabu-u.ac.jp

表1 柴犬 DNA の提供施設とサンプル数

所在地と 常勤専門医*	サンプル数			緑内障 サンプル 割合(%)
	緑内障	非緑内障	合計	
神奈川県・相模原市 AiCVO & JCVO	66	51	117	56.4
愛知県・長久手市 JCVO	10	5	15	66.7
東京都・台東区 JCVO	8	4	12	66.7
岡山県・倉敷市 JCVO	3	3	6	50.0
神奈川県・横浜市 JCVO	10	15	25	40.0
大阪府・箕面市 ACVO	15	9	24	62.5
合計	112	87	199	56.3

* AiCVO : アジア獣医眼科専門医
JCVO : 日本獣医眼科専門医 (比較眼科学会)
ACVO : アメリカ獣医眼科専門医
神奈川県相模原市のサンプルには前報 [5] で報告した麻布大学バイオバンクのサンプル (緑内障 56 サンプル, 非緑内障 42 サンプル) を含む。

表2 解析した *SRBD1* 遺伝子の SNP

SNP ID	染色体 番号	遺伝子位置 CanFam3.1	アレル	SNP タイプ	リスク アレル
rs8655283	10	47863774	C/T	イントロン	T
rs22018514	10	47924093	C/G	非同義 エクソン	G
rs22018513	10	47924097	A/G	同義 エクソン	G

すべてリアルタイム PCR 法で再解析した。

眼圧は前報 [5] と同様に眼圧計 (TONO-PEN XL, Reichert, U.S.A.) で測定し, 眼圧値 25 mmHg 以上で緑内障の臨床症候を示したものを緑内障と診断した。なお, 各動物病院での全サンプルに対する緑内障サンプルの割合は平均で 56.3% であり施設毎の有意差はなかった (χ^2 検定)。

スワブ (Catch-All Sample Collection Swab, Epicentre, U.S.A.) を用いて口腔粘膜より採取された 199 サンプル (緑内障 112 サンプル, 非緑内障 87 サンプル) より DNA 精製試薬 (Simple Prep Reagent for DNA, タカラバイオ(株), 滋賀) を用いてゲノム DNA を調製した。DNA の濃度と純度を超微量分光光度計 (Nano Drop 2000, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) で測定し, 約 10~50 ng/ μ l, A_{260}/A_{280} 比 1.80 以上であることを確認した。

今回解析したイヌ *SRBD1* 遺伝子の 3 カ所の SNP を

表3 SNP 検出用プライマー及びプローブ

SNP ID (rs 番号)	プライマー とプローブ	蛍光 標識*	塩基配列
8655283	Forward-Primer	なし	TTAGGATGAAACCATG GAAC
	Reverse-Primer	なし	TTGGCGATTATTGAAC TAAC
	Probe-1	ROX	ctacaga(G)gtc (antisense)
	Probe-2	FAM	ctacaga(A)gtc (antisense)
22018514	Forward-Primer	なし	GCATTTGCTGGAAACCT
	Reverse-Primer	なし	TAAAGTGGATACCGTGA AGAC
	Probe-1	ROX	gctgaaa(G)tt (antisense)
	Probe-2	FAM	tcatcaa(G)ttt (sense)
22018513	Forward-Primer	なし	GGGACTGACCAAATGT GAAG
	Reverse-Primer	なし	ACTCTGTGGCTATTGCT GATG
	Probe-1	ROX	aaaaagct(G)aa (antisense)
	Probe-2	FAM	caaaaagct(A)aa (antisense)

プローブの大文字は SNP サイト, () 内は RNA であることを示す。

* ROX : rhodamine-X, FAM : fluorescein amidite

表2に示す, rs8655283 はイントロンに, rs22018514 と rs22018513 はエクソンに位置し, 前者は非同義的, 後者は同義的である。遺伝子型の解析にはリアルタイム PCR 法 (サイクリングプローブ法) を用いた。ゲノム DNA サンプル (<100ng) を各 SNP についてあらかじめ設計した FAM または ROX で蛍光標識したプローブセット (Cycleave PCR 2 プローブセット, タカラバイオ(株), 滋賀) 及び PCR 反応試薬 (Cycleave PCR Reaction Mix, タカラバイオ(株), 滋賀) と混和し, リアルタイム PCR 装置 (TP800, タカラバイオ(株), 滋賀) で測定した。プライマー及びプローブの塩基配列を表3に示す。測定終了後, 付属の解析ソフト (Thermal Cycler Dice Real Time System Ver 3.00, タカラバイオ(株), 滋賀) で SNP を解析した。NCBI に登録してあるイヌ *SRBD1* 遺伝子の 3 カ所の SNP (rs8655283, rs22018514, rs22018513) について, ROX の蛍光強度が強い場合をリスク型, FAM の蛍光強度が強い場合をノンリスク型, 両方の蛍光強度が強い場合をヘテロ型と判定した。各 SNP についてリスクホモ型, ヘテロ型, ノンリスクホモ型の個体数を緑内障群と非緑内障群に分けて集計した。リスクホモ型のノンリスクホモ型に対するオッズ比及びヘテロ型のノンリスクホモ型に対するオッズ比をオッズ比検定 (Fisher 確率変数) で解析した。さらに *P* 値について Bonferroni 補正を行った。統計解析には js-STAR ver 8.0 (フリーソフト, <http://www.kisnet.or.jp/nappa/software/star/>)

表4 SRBD1 遺伝子の SNP 解析結果

SNP ID (rs 番号)	遺伝子型	個体数		オッズ比	95% 信頼区間	P 値	Bonferroni 補正 P 値
		緑内障群 N=112	非緑内障群 N=87				
8655283	ノンリスク	51	44	—	—	—	—
	ヘテロ	45	39	1.00	0.55~1.79	1.0000	—
	リスクホモ	16	4	3.45	1.07~11.09	0.0444	0.1332
22018514	ノンリスク	50	48	—	—	—	—
	ヘテロ	44	35	1.21	0.67~2.19	0.5485	—
	リスクホモ	18	4	4.32	1.36~13.69	0.0090	0.0270
22018513	ノンリスク	2	11	—	—	—	—
	ヘテロ	48	43	6.14	1.29~29.27	0.0160	0.0480
	リスクホモ	62	33	10.33	2.16~49.41	0.0015	0.0045

各 SNP がハーディ・ワインバーク平衡にあることを χ^2 検定で確認した

info/copy.htm) を使用した。

成 績

表4は柴犬 SRBD1 遺伝子の SNP 解析結果を示したものである。rs8655283 のリスクホモではノンリスクホモに対するオッズ比が 3.45 ($P<0.05$)、ヘテロではノンリスクホモに対するオッズ比が 1.00 ($P>0.05$) となった。rs22018514 のリスクホモではオッズ比 4.32 ($P<0.01$)、ヘテロではオッズ比 1.21 ($P>0.05$) となった。rs22018513 のリスクホモではオッズ比 10.33 ($P<0.01$)、ヘテロではオッズ比 6.14 ($P<0.05$) となった。rs8655283 と rs22018514 の各 SNP はほとんど同じ結果となった。さらに P 値について Bonferroni 補正を行ったところ、rs8655283 では有意差なし ($P>0.05$) となったが、rs22018514 のリスクホモ、rs22018513 のヘテロとリスクホモでは有意差が認められた ($P<0.05$)。

考 察

前報 [5] では麻布大学バイオバンクのサンプルのみを対象とした遺伝子型解析を実施したが、今回は全国 6 カ所の動物病院からサンプルを収集し、前報 [5] で有意差の認められた SNP のみを対象として、ダイレクトシーケンス法より簡易的なリアルタイム PCR 法で解析した。その結果、前報と同様に 3 カ所の SNP で有意差を示し、すべての SNP でノンリスクホモに対してリスクホモでは高いオッズ比を示した。特に rs22018513 ではヘテロでもノンリスクホモに対するオッズ比が 6.14 と有意差を示し、最も緑内障感受性の高い SNP と考えられた。また rs8655283 と rs22018514 はノンリスクホモに対してヘテロ及びリスクホモのオッズ比でそれぞれ、ほとんど同じ値を示した。この結果は実際の遺伝子検査においてこの両方の SNP を解析する必要はなく、rs8655283

と rs22018513、または rs22018514 と rs22018513 の組み合わせで解析するのが精度の高い緑内障感受性 SNP 検査として適切であると考えられた。

今回、全国 6 カ所の動物病院間で差があるかにも興味があったが、各動物病院でのサンプル数にバラツキがあり、遺伝子解析結果に地域差があるかどうかは不明確であった。地域差の有無については今後症例数を増やして検証する必要があると考えられる。なお、今回回収した全サンプルに対する緑内障サンプルの割合は 56.3% であり、印牧ら [4] の報告による 43% と大きな差がなく、柴犬の緑内障罹患率の高さを確認できる結果となった。Kato ら [3] の報告によると、柴犬は先天的に隅角形成異常が認められるため、緑内障罹患率が高いとされている。柴犬以外の犬種での緑内障関連遺伝子としてはビーグル犬の開放隅角緑内障感受性遺伝子として ADAMTS10 遺伝子が知られている [7]。柴犬の原発緑内障は開放隅角緑内障とは異なる緑内障と考えられているため [1]、ビーグル犬の ADAMTS10 遺伝子と異なる SRBD1 遺伝子が関与していると考えられた。

今回実施したイヌ SRBD1 遺伝子の SNP 解析は将来的な緑内障発症リスクの評価に有用と考えられる。

引 用 文 献

- [1] Quigley HA : Neuronal death in glaucoma, Prog Retin Eye Res, 18, 39-57 (1999)
- [2] Grozdanic SD, Kecova H, Harper MM, Nilaweera W, Kuehn MH, Kardon RH : Functional and structural changes in a canine model of hereditary primary angle-closure glaucoma, Invest Ophthalmol Vis Sci, 51, 255-263 (2010)
- [3] Kato K, Sasaki N, Matsunaga S, Nichimura R, Ogawa H : Incidence of canine glaucoma with goniodysplasia in Japan: a retrospective study, J Vet Med Sci, 853-858 (2006)

- [4] 印牧信行, 市川陽一朗, 川原井晋平, 落合秀治: 麻布大学眼科に来院した緑内障症例の随伴症の分類, 日獣会誌, 68, 55-58 (2015)
- [5] Kanemaki N, Tchedre KT, Imayasu M, Kawarai S, Sakaguchi M, Yoshino A, Itoh N, Meguro A, Mizuki N: Dogs and humans share a common susceptibility gene *SRBD1* for glaucoma risk, plos One, 8, e74372 (2013)
- [6] Meguro A, Inoko H, Ota M, Mizuki N, Bahram S: Genome-wide association study of normal tension glaucoma: common variants in *SRBD1* and *ELOVL5* contribute to disease susceptibility, Ophthalmology, 117, 1331-1338 (2010)
- [7] Kuchtey J, Olson LM, Rinkoski T, Mackay EO, Iversen TM, Gelatt KN, Haines JL, Kuchtey RW: Mapping of the disease locus and identification of *ADAMTS10* as a candidate gene in a canine model of primary open angle glaucoma, plos Genet, 7, e1001306 (2011)

Survey of Genotypes on Glaucoma Susceptibility Gene *SRBD1* in Shiba Inu

Nobuyuki KANEMAKI^{1)†}, Masaharu OHTA²⁾, Hiroki TSUJITA³⁾, Yukako KOBAYASHI⁴⁾, Masahiro ABE⁵⁾, Yoshiyuki TAKIMOTO⁶⁾ and Masaki IMAYASU⁷⁾

- 1) *Veterinary Teaching Hospital of Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagami-hara, 252-5201, Japan*
- 2) *Animal Eye Center, 3-1001 Ichigahora, Nagakute, 480-1147, Japan*
- 3) *Veterinary Ophthalmology Specialized Clinic, 2-3-55 Senbahigashi, Minoh, 562-0035, Japan*
- 4) *Arisu Animal Medical Eye Clinic, 1-11-20 Katsuradai, Aoba-ku, Yokohama, 227-0034, Japan*
- 5) *Abe Animal Hospital, 2-2-8 Iriya, Taito-ku, 110-0013, Japan*
- 6) *Nadia Animal Clinic Ophthalmology Referral Services, 1367-15 Tamashima, Kurashiki, 713-8102, Japan*
- 7) *Central Research Laboratories, Menicon Co., Ltd., 5-1-10 Takamoridai, Kasugai, 487-0032, Japan*

SUMMARY

We investigated the association between the incidence of glaucoma in Shiba Inu and three single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of glaucoma candidate gene *SRBD1* as a survey at six referral hospitals for ophthalmic diseases in small animals. Our analysis showed that the risk of glaucoma in Shiba Inu carrying the homologous risk allele rs8655283 was 3.45 times higher ($P<0.05$) compared to those carrying the homologous non-risk allele. Carrying the homologous risk allele rs22018514 was 4.32 times higher ($P<0.01$) than the homologous non-risk allele. Carrying the homogeneous or heterogeneous allele of rs22018513 was 10.33 times ($P<0.01$) or 6.14 times ($P<0.05$) higher than the non-risk homologous allele, respectively. We anticipate that the SNP genotyping data from the results of this study can be used in genetic testing to precisely determine whether a dog has glaucoma and to predict whether it will develop glaucoma.

— Key words : Genetic diagnosis, glaucoma, Shiba Inu.

† Correspondence to : Nobuyuki KANEMAKI (Veterinary Teaching Hospital of Azabu University)

1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagami-hara, 252-5201, Japan

TEL 042-754-7111 FAX 042-769-2418 E-mail : kanemaki@azabu-u.ac.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 71, 645 ~ 648 (2018)