

# 博士論文

## 論文題目

変性性脊髄症犬と SOD1 遺伝子改変マウスの  
筋萎縮性側索硬化症モデル動物としての有用性  
に関する比較病理学的研究

氏名 小川 瑞恵

緒論.....	2
第1章 ペンブローク・ウェルシュ・コーギーの変性性脊髄症の病理組織学的特徴.....	11
序.....	12
材料と方法.....	14
結果.....	16
考察.....	19
要約.....	22
図表.....	23
第2章 ペンブローク・ウェルシュ・コーギーの変性性脊髄症の脊髄に見られたニューロン脱落と GLT-1 の発現低下 .....	29
序.....	30
材料と方法.....	32
結果.....	35
考察.....	38
要約.....	41
図表.....	42
第3章 ペンブローク・ウェルシュ・コーギーの変性性脊髄症の脊髄におけるオートファジー関連因子の発現検索.....	53
序.....	54
材料と方法.....	56
結果.....	60
考察.....	62
要約.....	65
図表.....	66
第4章 SOD1 <sup>G93A</sup> トランスジェニックマウスの脊髄病変に対する rotenone 投与の影響 .....	73
序.....	74
材料と方法.....	76
結果.....	82
考察.....	85
要約.....	88
図表.....	89
総括.....	101
謝辞.....	109
引用文献.....	110

## 緒論

ヒトの筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は上位および低位の運動ニューロンの選択的変性・脱落を特徴とし、全身の筋萎縮をきたす進行性・難治性の神経変性疾患群である。

ALS は家族歴がない孤発性 ALS (sporadic ALS, sALS) と家族歴がある家族性 ALS (familial ALS, fALS) に大別される。fALS は全体の 5-10% を占め、現在までに 23 の原因遺伝子が同定されている (表 0-1) [Washington University Neuromuscular home page: <http://neuromuscular.wustl.edu>]。このうち活性酸素のスーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) 不均化酵素である superoxide dismutase 1 (SOD1) の変異が最初に発見され [Rosen *et al.*, 1993]、fALS 患者の約 20% に SOD1 遺伝子変異 (160 種、多くがミスセンス変異) が認められている [Rosen *et al.*, 1993, ALSod: <http://alsod.iop.kcl.ac.uk>]。また、sALS 患者でもその約 2% で SOD1 変異が確認される。SOD1 については常染色体優性遺伝の形式をとる 160 以上の ALS 関連変異が報告されており、SOD1 変異を伴う fALS は ALS1 と呼ばれる。

ALS1 を含む ALS では、初期にミトコンドリア障害 [Manfredi and Xu, 2005., Kong and Xu., 1998] および軸索輸送障害 [Williamson and Cleveland, 1999] が起こり、発症後は 1) 酸化ストレス、2) 興奮毒性および 3) タンパク質分解系の異常による変性タンパク質の蓄積が存在し、これらが互いに関連して病態が進行するものと考えられている [Swarup and Julien, 2011] (図 0-1)。特に発症後のアストロサイトやミクログリアの機能異常が病態の進行に重要であり [Yamanaka *et al.*, 2008]、少なくとも ALS1 における運動ニューロン死は非細胞自律性であること、すなわちニューロン単独の異常により起こっているものではないと推察されている。

ALS を特徴づける病変は、錐体路の変性に加えて、運動ニューロンおよびその周辺のグリア細胞における Bunina 小体や skein-like 封入体 (Skein-like inclusion; SLI) などの細胞質内の封入体形成である [Kato, 2008]。Bunina 小体を除くほとん

どの封入体はユビキチン陽性である (図 0-2)。近年では、核局在タンパク質である TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) をコードする *TARDBP* 遺伝子に変異を有する fALS および sALS (ALS10) が存在し、ALS10 を含むいくつかの fALS や sALS で観察されるユビキチン陽性の細胞質内封入体の構成成分が TDP-43 であることが報告された[Arai *et al.*, 2006, Neumann *et al.*, 2006]。このような TDP-43 の核からの逸脱と細胞質内封入体の形成は TDP-43 病理と呼ばれる。SOD1 遺伝子変異をもつ ALS1 では、TDP-43 病理はみられず、SOD1 陽性の封入体が特徴的に認められる。

ALS1 の発見を背景に、ALS 研究においては 1990 年代後半から、変異 SOD1 を強制発現させたトランスジェニックマウスが運動ニューロン変性過程の動物モデルとして汎用されてきた[Swarup and Julien, 2011, Jucker, 2010]。上述した病因仮説の多くはこのトランスジェニックマウスを用いた研究により検証されたものである。しかし一方、SOD1 トランスジェニックマウスに対して延命効果があった薬剤が ALS 患者に対しても効果があった例はこれまでになく、このマウスの ALS 治療薬開発のためのモデル動物としての有用性は疑問視されている[Jucker, 2010]。この問題の原因としてマウスとヒトの間の種差や、このモデルが自然発症の疾患ではないことが考えられている。この点についてはその後が開発された SOD1 トランスジェニックラット[Nagai *et al.*, 2001]でも克服されていない。そこで、体の大きさやライフスパン、生活環境という点で、げっ歯類よりもヒトに近い動物種で ALS の病態を再現する自然発生の疾患を解析することは、遺伝子改変動物から得られる知見とは異なる有用な情報を提供するものと考えられる。

イヌの変性性脊髄症 (Degenerative Myelopathy ; DM) は運動失調を臨床的特徴とし、病理検索により脊髄に変性を認める疾患の総称である[Averill, 1973]。本

疾患にはジャーマン・シェパード、シベリアンハスキー、ミニチュアプードルの脊髄症 [Summers BA *et al.*, *Veterinary Neuropathology*] やバーニーズマウンテン [Wininger *et al.*, 2011]、ボクサー [Miller *et al.*, 2009] などで近年報告された脊髄変性疾患が含まれる。これらの疾患は一般に進行性、多くは致死的で、病態末期に排尿障害や排便障害を起こすため、米国ではしばしば安楽死が選択される [Coates *et al.*, 2007, March *et al.*, 2009]。本疾患の国内での発生はペンブローク・ウェルシュ・コーギー (Pembroke Welsh Corgi ; PWC) に集中しており、「コーギーの変性性脊髄症」として広く認識されている。PWC における DM は 8 歳以上の高齢で発症する。まず後肢のふらつきが認められ、他の疾患を伴わない場合でも全経過 2~3.5 年で呼吸障害に至り死亡する (図 0-3)。確定診断には死後の病理学的検索が必須である。

DM の病因としては、免疫介在性 [Barclay *et al.*, 1994, Waxman *et al.*, 1980]、代謝性 [Johnston *et al.*, 2000]、遺伝性 [Coates *et al.*, 2007] など複数のメカニズムの関与が示唆されてきた。DM 症例には ALS と比較して、感覚系の異常を伴わない運動機能障害という臨床的類似点と、脊髄白質の顕著な変性・硬化という病理組織学的類似点がある。これに加えて 2009 年に Awano らにより PWC を含む DM 症例に SOD1 のミスセンス変異がみられることが報告 [Awano *et al.*, 2009] されて以降、DM が SOD1 の遺伝子変異を伴うヒト fALS (ALS1) に相当する疾患である可能性が示唆されている。ヒトの fALS における SOD1 変異が常染色体優性遺伝であるのに対してイヌ DM の SOD1 遺伝子変異は常染色体劣性遺伝の形式をとり、またホモ接合体変異を持つ個体でも必ず発症するわけではない。DM 症状を呈していない国内の PWC を無作為に検索した研究では、48% が SOD1 の c.118G>A ホモ接合体変異、43% がヘテロ接合体変異を有する一方で変異をもたない個体は全体の 9% にすぎず、A allele の発現率は 69.7% にのぼる [Chang *et al.*,

2013]。この研究が示す遺伝的背景の均一性と疾患の犬種特異性を考慮すると、国内のPWCはDMに罹患するリスクが他犬種より高いという素因をもっていることが推察される。PWCでみられるDMは自然発症のfALSモデル疾患となる可能性があり、モデル動物としての価値を高めるためには、報告されているALSおよび既存のモデルマウスの病態との比較検討が必須である。こうした研究はヒトのALSについての新たな知見をもたらすだけでなく、伴侶動物としてのイヌの医療にも貢献する。一方で、PWCは伴侶動物であることから、病理学的検索は多くが疾患の末期である死亡例のみで可能であり、発症前と発症初期の病理学的検索の対象として不適である。PWCのDMの剖検例とSOD1トランスジェニックマウスの発症後の病理学的変化を比較し、その共通点、相違点を検討した上で、発症後・末期の検索についてはPWCのDMを、発症前または発症直後の検索はマウスをALSモデルとして併用することが現実的である。

本研究の第1章～第3章ではイヌの変性性脊髄症の病理発生について、過去のALSおよびそのモデルマウスで報告されている病態関連因子に着目して検索した。特に第1章ではイヌDMの基本的な病変を検討するとともに、酸化ストレスの原因となりうる因子の発現を調べた。第2章ではイヌDMにおける腹角ニューロンの脱落パターンを検討するとともに、興奮毒性関連因子の発現を検討した。第3章ではオートファジー関連因子の発現パターンについて検討した。

一方、第4章ではALSモデルとして最も汎用されているSOD1<sup>G93A</sup>マウスを用いた研究を行った。このトランスジェニックマウスの主要な脊髄病変はミトコンドリアの異常に由来する空胞変性である[Dal Canto and Gurney, 1995, Wong *et al.*, 1995]。そこでミトコンドリア障害を介した酸化ストレスを増強するため、ミトコンドリア呼吸鎖の複合体Iを阻害するrotenoneを発症前に投与し、発症前・発症期・末期の病態や形態的变化を検討した。

表0-1 : fALSの遺伝子座と原因遺伝子

	遺伝子座	遺伝子	遺伝子産物	機能	遺伝形式	孤発例	発症時期	進行	凝集体形成
ALS1	21q22	<i>SOD1</i>	SOD1	抗酸化、ERストレス反応	AD	あり	成人	多様	SOD1 (LBHI/AstHI)
ALS2	2q33	<i>alsin</i>	alsin	タンパク輸送、分解	AR		幼年 若年	緩徐	不明
ALS3	18q21	<i>unknown</i>	-		AD		成人		
ALS4	9q34	<i>SETX</i>	senataxin	DNAダメージ応答	AD	あり	若年	緩徐	不明
ALS5	15q21	<i>SPG11</i>	spatacsin		AR		若年	緩徐	
ALS6	16p11	<i>FUS/TLS</i>	FUS/TLS	RNA代謝、転写調節	AD/AR	あり	成人	急性	FUS(好塩基性封入体), TDP-43
ALS7	20p13	<i>unknown</i>	-		AD		成人		
ALS8	20q13	<i>VAPB</i>	VAPB	ER、ゴルジの小胞輸送	AD		成人	緩徐	VAPB
ALS9	14q11	<i>ANG</i>	angiogenin	血管新生、神経保護	AD	あり	成人		不明
ALS10	1p36	<i>TARDBP</i>	TDP-43	RNA代謝、転写調節	AD	あり	成人	緩徐	TDP-43
ALS11	6q21	<i>FIG4</i>	PI5-phosphatase	小胞輸送制御	AD	あり	成人		不明
ALS12	10p13	<i>OPTN</i>	optineurin	NFκB制御	AR/AD	あり	成人		OPTN,TDP-43
ALS13	12q24	<i>ATXN2</i>	ataxin 2	遺伝子制御	AD	あり	成人		TDP-43
ALS14	9p13	<i>VCP</i>	VCP (p97)	タンパク分解	AD		成人	不定	TDP-43
ALS15	Xp11	<i>UBQLN2</i>	ubiquilin 2	タンパク分解	XD		成人	緩徐	ubiquilin2, TDP-43
ALS16	9p13	<i>SIGMAR1</i>	SIGMAR1	ERシャペロン	AR		若年	緩徐	不明
ALS17	3p11	<i>CHMP2B</i>	CHMP2B	タンパク輸送、分解	AD	あり	成人		TDP-43
ALS18	17p13	<i>PFN1</i>	profilin 1	細胞骨格	AD	あり	成人		TDP-43
ALS19	2q34	<i>ERBB4</i>	ErbB4	神経栄養因子受容体	AD	あり	成人	緩徐	不明
ALSFTD	9p21	<i>C9orf72</i>	C9orf72	不明	AD	あり	成人		
	2p13	<i>DCTN1</i>	dynactin 1	軸索輸送	AD	あり	成人		
	12q24	<i>DAO</i>	DAO	不明	AD		成人	急性	DAO
	22q12	<i>NEFH</i>	NF-H	細胞骨格	AD	あり	不定		

Washington University Neuromuscular home page : <http://neuromuscular.wustl.edu/>をもとに作成。

AD:常染色体優性遺伝、AR:常染色体劣性遺伝、XD:伴性優性遺伝



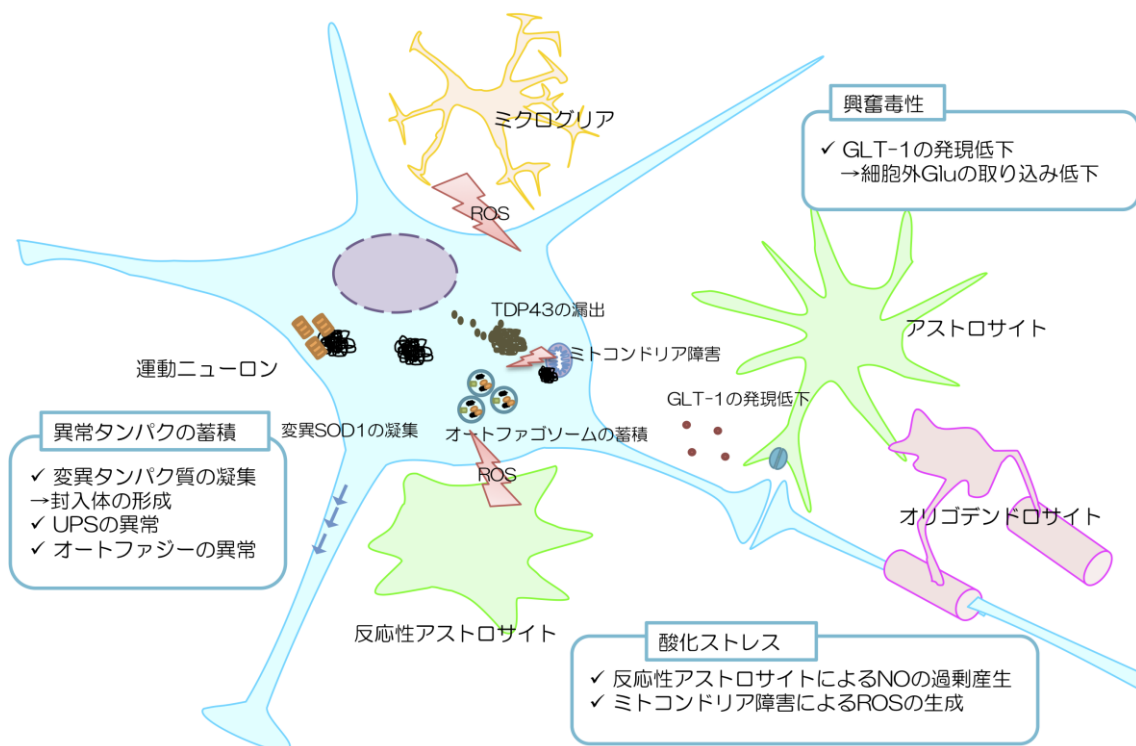


図 0-1 : ALS の病態関連因子。運動ニューロンに対する異常タンパク質の蓄積、酸化ストレス、興奮毒性はアストロサイトやマイクログリアの機能異常も原因となって起こる。

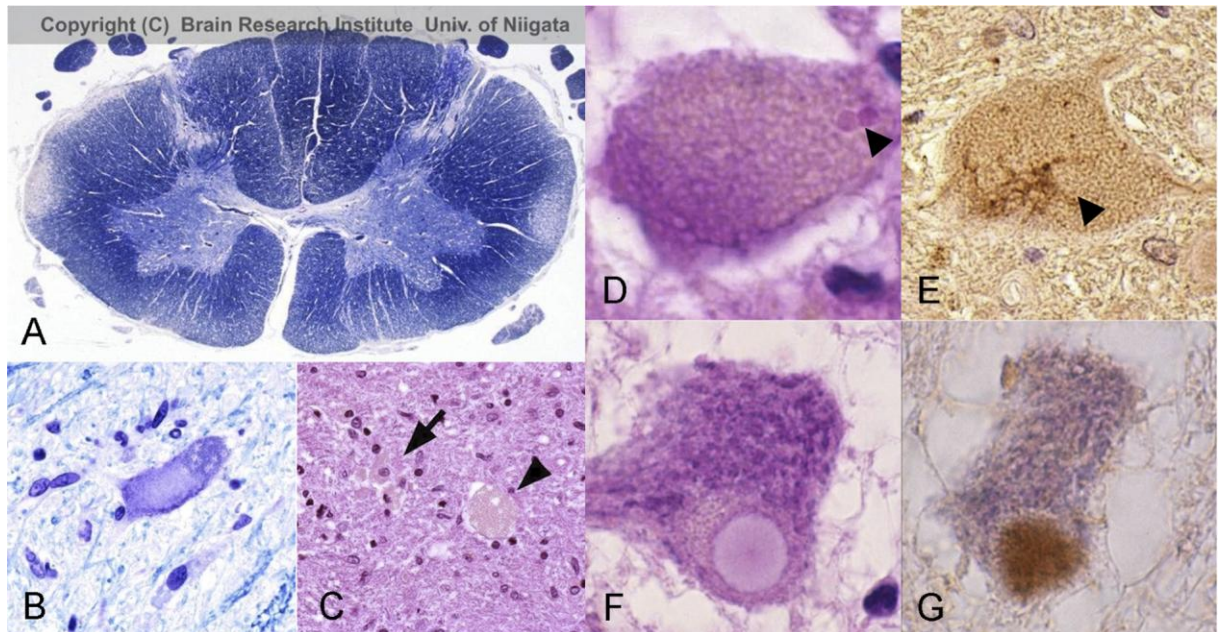


図 0-2 : ALS の病理学的特徴。新潟大学脳研究所「e-Learning 神経病理」より引用し作成。 <http://pd21.cihbs.niigata-u.ac.jp/menu.php>

A : 脊髄白質、錐体路の髄鞘脱落。クリューバー・バレラ染色。B : 運動ニューロンの色質融解像。クリューバー・バレラ染色。C : リポフスチンを充満したニューロン (矢頭) とリポフスチンを貪食したマクロファージ (矢印)。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色。D : 運動ニューロンの細胞体に認められた Bunina 小体 (矢頭)。HE 染色。細胞質にはリポフスチンが多量に蓄積している。E : 運動ニューロンに認められた Skein-like inclusion。Ubiquitin 免疫染色。F, G : *SOD1* 遺伝子変異を持つ家族性 ALS (ALS1) 患者の運動ニューロンで特徴的に認められる Lewy body-like hyaline inclusion (LBHI)。硝子様無構造な封入体は SOD1 免疫染色 (G) に陽性。



図 0-3 : PWC の DM にみられる典型的な臨床症状。A, B : 発症直後。後肢がふらつき、交差する。C, D : 発症 10 ヶ月後。後肢麻痺。前肢に異常はなく、車いすの使用が可能。E, F : 発症 22 ヶ月後。四肢麻痺、起立不能。

## 第1章

ペンブローク・ウェルシュ・コーギーの変性性脊髄症の病  
理組織学的特徴

序

ALS を特徴づける病変は錐体路の変性およびニューロン細胞体内、アストロサイト細胞質内の封入体である。ALS でみられる運動ニューロンおよびグリア細胞の細胞質内における凝集物や封入物の形成は、細胞内の主要な分解系であるユビキチン・プロテアソーム系の異常を反映するものと考えられており [Kato, 2008]、ALS に認められる封入体は Bunina 小体を除いてユビキチン陽性であることが知られている。また近年、不均一核内リボ核酸タンパク質の一種・TDP-43 が細胞質内のユビキチン陽性封入体の構成成分であることが報告され [Arai *et al.*, 2006, Neuman *et al.*, 2006]、核から逸脱した TDP-43 の染色性や TDP-43 陽性の凝集体・封入体の存在が ALS の重要な病理学的診断基準のひとつとなっている。

SOD1 遺伝子変異を持つ fALS (ALS1) の患者では、典型的 (古典的) ALS の症状および病理像が認められる。ただし ALS1 では Bunina 小体や TDP-43 陽性封入体は認められず、レビー小体様硝子様封入体 (Lewy body-like hyaline inclusion ; LBHI) と呼ばれる細胞質内封入体や、LBHI と同質の構造物と考えられているアストロサイト硝子様封入体 (Astrocytic hyaline inclusion ; Ast-HI) が認められる。これらはいずれも SOD1 陽性であり、変異 SOD1 の異常な凝集によるものと考えられている。

SOD1 変異を伴うイヌの DM においては、SOD1 陽性の凝集物が運動ニューロンの細胞体内に観察されたとの報告がある [Awano *et al.*, 2009]。一方で、DM の脊髓病変は側索・背索を中心とした顕著な髄鞘・軸索の変性・脱落という白質病変が主体であり、その診断に必ずしも灰白質病変を必要としない。実際、脊髓腹角ニューロンを含むニューロン細胞体の形態的变化についてはボクサーの DM [Miller *et al.*, 2009] において色質融解の記載があるのみで、その他の犬種の DM では十分に考察されていない。

ALSなど多くの神経変性疾患では、ROSによる酸化ストレスがニューロン変性を促す因子となると考えられている。スーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) は一酸化窒素 (NO) との反応により強力な酸化力をもつROSであるペルオキシナイトライト ( $ONOO^-$ ) を生成する。SOD1はスーパーオキシドアニオンを不均化することによりROSの生成を防ぐ役割を果たすが、ALS1における変異SOD1およびイヌDMの変異SOD1[Crisp *et al.*, 2013]のいずれにおいても、SOD1の活性は正常または高値に保たれていることが報告されており、SOD1の活性低下が酸化ストレスを誘発している可能性は低い。一方、NOはNO合成酵素 (nitric oxide synthetase, NOS) により産生される。NOSのサブタイプのうち炎症性サイトカインの刺激により誘導される誘導性NOS (inducible NOS, iNOS) は病態時に過剰量のNOを産生することで酸化ストレスを増大させると考えられ、神経変性疾患においても増悪因子として知られている。神経変性疾患におけるiNOSの誘導は、T細胞などの免疫細胞の浸潤に伴うものではなく、アストロサイト、ミクログリアの活性化によるものと考えられている。

本章では、イヌのDM症例の脊髄病変、とくに脊髄腹角ニューロンの形態学的変化を検索するとともに、酸化ストレス関連因子としてのSOD1、およびiNOSの発現パターンを検索し、ヒトALS1との病理学的類似性を検討した。また、DMにおける免疫細胞の挙動を検討するため、炎症細胞および免疫グロブリンの発現についても検索した。

## 材料と方法

### 症例・材料

臨床的および病理組織学的に変性性脊髄症と診断されたPWCの2例(症例1、2)と、椎間板ヘルニアによる圧迫性脊髄白質変性症と診断されたビーグル1例(対照例1)に加え、年齢が近い対照として多発性神経症と診断された脊髄に病変のないビーグル1例(対照例2)と神経系に病変のないPWCの1例(対照例3)、さらに神経系に病変のない中年齢のPWCの1例(対照例4)を用いた。症例の概要は表1-1に示した。症例2は岩手大学獣医病理学研究室より供与された。その他の材料は2009年度から2010年度に東京大学獣医病理学研究室において病理診断を行ったイヌの脊髄を用いた。

### *SOD1 c118. G>A (E40K) 変異の遺伝子型検査*

各症例のゲノムDNAはパラフィン包埋後組織(肝臓、脾臓または脊髄)からDNA Isolator PS Kit(和光純薬)を用いてメーカーのプロトコルに従い抽出した。変異型プライマー(Forward: 5'-TGGGCCTGTTGTGGTATCAG-3'、reverse: 5'-CAAACCTGATGGACGTGGAATCC-3')と6-carboxyrhodamine (VIC) 結合野生型プローブ(5'-CTCGCCTTCAGTCAGC-3')および6-carboxyfluorescein (FAM) 結合変異型プローブ(5'-CTCGCCTTTAGTCAGC-3')を用い、報告されているリアルタイムPCR法を用いて各色素の蛍光強度の増幅曲線を描出することにより遺伝子型を決定した[Chang *et al.*, 2013]。この操作は鹿児島大学の和修先生に依頼した。

### 病理組織学・免疫組織化学

各症例の脊髄組織は10%リン酸緩衝ホルマリンで固定後、常法に従い4 μmの厚さでパラフィン切片を作製した。この切片を脱パラフィンした後、ヘマトキ

シリン・エオジン (HE) 染色、ルクソール・ファスト・ブルー (LFB) -HE 染色、クリューバー・バレラ (KB) 染色をおこなった。

免疫組織化学に用いた一次抗体を表 1-2 に示した。脱パラフィンした切片について、表に示した条件でオートクレーブにより 120°C で 10 分間の抗原賦活化を行った。全ての切片を 3% 過酸化水素・メタノール溶液で室温 5 分間処理して内因性ペルオキシダーゼを不活化し、ブロッキング溶液 (8% スキムミルク・TBST) で 37°C、40 分間処理して非特異反応を抑制した後、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体と 4°C で一晩反応させた。Envision polymer (Dako, Glostrup, Denmark) 法により二次抗体と 37°C で 40 分間反応させた。0.5 % DAB (Dojindo Laboratories、熊本) に 0.1% になるよう  $H_2O_2$  (和光純薬、大阪) を添加して発色に使用した。核染色にはヘマトキシリンを用いた。



## 結果

### *SOD1 c.118G>A 遺伝子型*

SOD1 c.118G>A 遺伝子変異を検索した結果、DM 症例 1 および 2 ではホモ接合体変異を認めた。対照例 1 および 2 では変異を認めず、対照例 3 ではホモ接合体変異、対照例 4 ではヘテロ接合体変異を認めた（表 1-1）。

### *病理組織学*

DM症例1、2ともに頸髄、胸髄、腰髄に軸索の変性（膨化、断片化）と脱落、および髄鞘の脱落が認められた（図1-1）。これらの病変は尾側胸髄で特に顕著で、全周性に認められた。頸髄、頭側胸髄、腰髄ではいずれも背側索で最も重度であった。また上記の軸索・髄鞘の病変の程度に比例して、中程度～重度のアストロサイトーシスが認められた。また腹角の大型運動ニューロンにおいて色質融解やリポフスチンの重度蓄積が散見された（図1-2）。リポフスチンの重度蓄積は対照例1および2でも認められたが、色質融解像は稀であった。いずれの症例でも、ニューロン細胞体内およびグリア細胞体内に明瞭な凝集物や封入体の形成は認められなかった。

### *免疫組織化学*

DM症例1および2では、腹角ニューロンの細胞体および灰白質の反応性アストロサイトの細胞質において微細顆粒状のSOD1陽性像がび漫性に観察され（図1-3）、頸髄、胸髄、および腰髄のすべての部位で病変の程度にかかわらず同様の陽性像が認められた。これに対しすべての対照例の脊髄では、ニューロンやアストロサイトの細胞体内および神経網のいずれにおいてもSOD1に対する明瞭

な陽性所見を認めなかった。この結果は用いた二種類の抗SOD1抗体で共通していた。

DM症例の脊髄では、主として灰白質および白質の神経網に、大小の塊状または顆粒状のユビキチン陽性像が多数認められた。顆粒状の陽性像はグリア細胞の細胞質内にも認められた（図1-4）。対照例1~3では微細なユビキチン陽性顆粒をグリア細胞の細胞質内に多数認めたものの、神経網の塊状陽性像は認められなかった。対照例4では明瞭なユビキチン陽性像は認められなかった。検索した全ての症例の脊髄で、TDP-43の発現は主に腹角ニューロンの核に局在しており、細胞質内や細胞外の陽性顆粒や陽性凝集体は認められなかった（図1-5）。

iNOS陽性細胞はDM症例の脊髄で概ね灰白質に限局して認められ、症例1では白質の一部に小型の陽性細胞を少数認めた。このような分布はDM症例の頸髄、胸髄、腰髄のいずれにおいても同様であった。対照例の脊髄灰白質に明らかなiNOS陽性像は認められなかった。

DM症例については、炎症細胞のマーカーや抗体・補体沈着についても検索した。その結果、CD3陽性T細胞は脊髄実質内の血管周囲でごく稀に認められたが、CD20陽性B細胞は認められなかった。Iba1陽性のミクログリアは症例1の灰白質・白質の全域で多数認められたが、症例2では少なかった。IgGおよび補体C3は、いずれの症例においても明らかな陽性像を認めなかった。

### 蛍光二重染色

症例1の組織標本を用いて蛍光二重染色によりSOD1、ユビキチン、iNOSの局在を検討した。SOD1はニューロフィラメント（NF）およびリン酸化ニューロフィラメント（pNF）のいずれとも共局在せず、灰白質において一部のGFAP陽性反応性アストロサイトの細胞質に局在が認められた。ユビキチンはNFおよ

び pNF のいずれとも共局在しなかった。iNOS の発現は灰白質の GFAP 陽性細胞に概ね限局しており、NF、pNF との共局在は認められなかった。

## 考察

症例1および2の脊髄で認められた髄鞘の脱落、軸索の変性・脱落およびアストロサイトーシスは過去のDMの報告において記載された所見と一致していた。またこれらの病変の分布も、PWCのDMに関する報告と一致していたため、両症例を病理組織学的にDMと診断した。

PWCのDM症例1および2の脊髄腹角ニューロンの細胞体では、重度のリポフスチン沈着や色質融解といったALSに一般的な病変[Kusaka *et al.*, 1988, Sasaki *et al.*, 1996]が高頻度にみられた。このうちリポフスチン沈着については症例と同等の年齢の対照例においても重度に認められたことから、DMの病態に起因するものだけでなく、加齢性的変化も含まれると考えられた。一方で、このような疾患非特異的な病変を除くと、いずれの症例でも腹角ニューロンは形態的变化に乏しく、ヒトALSの最も特徴的な病変であるニューロン細胞体内のBunina小体やSLIは認めなかった。またSOD1遺伝子変異をもつALS患者で特徴的なSOD1陽性のLBHIやAst-HIも認めなかった。また、sALSやfALSのうちALS6 (FUS遺伝子変異)、ALS10 (TDP遺伝子変異) などで認められるTDP-43の分布異常および凝集体形成も認められず、この点ではALS1と一致していた。

PWCのDMに関する過去の報告[Awano *et al.*, 2009]では脊髄腹角ニューロンにSOD1陽性凝集物が観察されたが、今回検索したDM症例の腹角ニューロンではSOD1のび慢性陽性像は認められたものの凝集体の形成はみられなかった。加えて、ニューロンの細胞体ではユビキチン陽性像もみられなかった。最近、SOD1 (c.118G>A) 変異を有するDM症例では臨床ステージが進むにつれ脊髄に界面活性剤不溶性のSOD1が蓄積されることや、この変異SOD1は野生型SOD1と同等のSOD1活性を有すること、また*in vitro*では変異SOD1が凝集性を有することが報告されている[Crisp *et al.*, 2013]。これらを考慮すると、今回DM症例のみに認めら

れたニューロン細胞体内の顆粒状・び漫性のSOD1陽性像は、凝集過程にある変異SOD1タンパク質である可能性が考えられた。また反応性アストロサイトにみられたSOD1の発現は、ROSを除去するため通常のSOD1の発現上昇を反映したものであると考えられる一方で、凝集物を形成する可能性もあると考えられた。

今回検索したDM症例の脊髄灰白質では、神経網にユビキチンの大型塊状陽性像を多数認めた。このことから、異常なタンパク質の蓄積は、ニューロンの細胞体よりむしろ神経突起で生じていると考えられた。しかし、ユビキチンは軸索に存在する中間径フィラメントであるNF、pNFのいずれとも共局在せず、またSOD1の免疫染色では神経網での陽性像を認めなかったことから、このユビキチン陽性物質がSOD1である可能性は低く、その本態の解明には至らなかった。神経網・グリア細胞の細胞質内にみられた顆粒状のユビキチン陽性像については、症例と年齢が近い対照例1~3でも認められたため、加齢性変化と考えられた。以上のことから、変異SOD1がPWCのDMの病態において凝集体を形成する可能性がある一方で、変異SOD1を含まないタンパク質の異常凝集がDMの病態に関与する可能性も考えられた。

ヒトにおいてはALS[Sasaki *et al.*, 2000]を含む多くの神経変性疾患で、iNOSによるNOの過剰産生を介した酸化ストレスが病態に関与すること知られている[Andersen *et al.*, 2004]。今回検索したDM症例の脊髄では灰白質の反応性アストロサイトに明瞭なiNOSの発現を認めた。このような特徴的なiNOSの発現パターンはALS患者[Phul *et al.*, 2000, Sasaki *et al.*, 2000]およびそのモデル動物であるSOD1トランスジェニックマウス[Almer *et al.*, 1999, Lee *et al.*, 2009]で報告されたものに類似しており、アストロサイトによる酸化ストレスの増強はALSとDMに共通する現象であると考えられた。一方、iNOSは炎症に伴い誘導されるが、今

回検索したDM症例ではCD3陽性のT細胞浸潤やIgG、C3の沈着を欠くことから、DMが炎症性疾患である可能性は非常に低いと推察された。

## 要約

ペンブローク・ウェルシュ・コーギー (PWC) におけるDMの病態を把握するため、脊髄灰白質の病理組織学的変化、酸化ストレス関連因子の発現および変性タンパク質の蓄積について検索した。SOD1遺伝子にc.118G>Aの変異を持ち、臨床的および病理組織学的にDMと診断されたPWCの2症例の脊髄病変部では、ニューロンの細胞体に封入体や封入体様凝集物を認めなかったが、SOD1の陽性像がび漫性に認められた。また病変部の神経網に塊状のユビキチン陽性像を認めた。これらの所見から、DMの病態にはタンパク質分解系の異常が関与するが、ニューロン細胞体よりむしろ突起における変化が主体であると考えられた。

一方、iNOSおよびSOD1の発現は主に灰白質の反応性アストロサイトに認められた。本所見はiNOSによる酸化ストレスの増強や、反応性のSOD1の発現増強を示唆するものであり、特にiNOSの発現はALSやSOD1トランスジェニックマウスでも報告されている分布と類似していることから、PWCのDMでもALS同様に酸化ストレスがその病態進行に関与していると推察された。

表1-1: 検索した症例の概要

	犬種	性別	年齢	脊髄の 病理学的診断	椎間板ヘルニア	SOD1.118 G>A 遺伝子変異
症例 1	PWC	オス	12y6m	変性性脊髄症	軽度(L1-2)	ホモ接合体変異
症例 2	PWC	去勢オス	14y6m	変性性脊髄症	軽度(L2-3,5-7)	ホモ接合体変異
対照例 1	ビーグル	オス	12y4m	慢性圧迫性脊髄変性	重度 (C3-4)	なし
対照例 2	ビーグル	オス	11y	著変なし	なし	なし
対照例 3	PWC	避妊メス	10y4m	著変なし	なし	ホモ接合体変異
対照例 4	PWC	避妊メス	6y11m	著変なし	なし	ヘテロ接合体変異

y; year, m; month



表1-2 □ □ 用いた一次抗体

抗体	種類	認識細胞・構造	抗原賦活化	希釈倍率	販売元、製品番号
GFAP	rabbit, p	アストロサイト	なし	1:100	Dako, Glostrup, Denmark, #Z0334
GFAP	mouse, m	アストロサイト	Citrate Buffer (pH 6.0)	pre-diluted	PROGEN Biotechnik, Heidelberg, Germany, #65011
Iba1	rabbit, p	ミクログリア	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:500	Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan, #019-19741
NF	mouse, m	軸索 (NF-L)	なし	pre-diluted	Dako, #N1591
pNF-H&M	mouse, m	-	なし	1:1000	Millipore, Billerica, MA, US, #MAB1592
ubiquitin	rabbit, p	-	なし	1:200 (IHC) 1:50 (IF)	Dako, #Z0458
SOD1	rabbit, p	-	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:200	Assay Designs, Ann Arbor, MI, US, #ADI-SOD-100
SOD1	rabbit, p	-	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:2000 (IHC) 1:200 (IF)	Abcam, Cambridge, UK, #ab13498
TDP-43	rabbit, p	-	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:500	Proteintech Group, Chicago, IL, US, #10782-2-AP
iNOS	rabbit, p	-	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:200 (IHC) 1:30 (IF)	LIFESPAN BioSciences, Seattle, WA, US, #LS-C88689
iNOS	rabbit, p	-	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:200 (IHC) 1:50 (IF)	Abcam, #ab15323
CD3	rabbit, p	T細胞	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:50	Dako, #A0452
CD20	rabbit, p	B細胞	なし	1:400	Thermo Scientific, Waltham, MA, US, #RB-9013-P
Dog IgG H&L	rabbit, p	-	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:300	American Qualex, San Clemente, CA, US, #A645BS / A645FS
Dog C3	rabbit, p	-	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:50	ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH, US

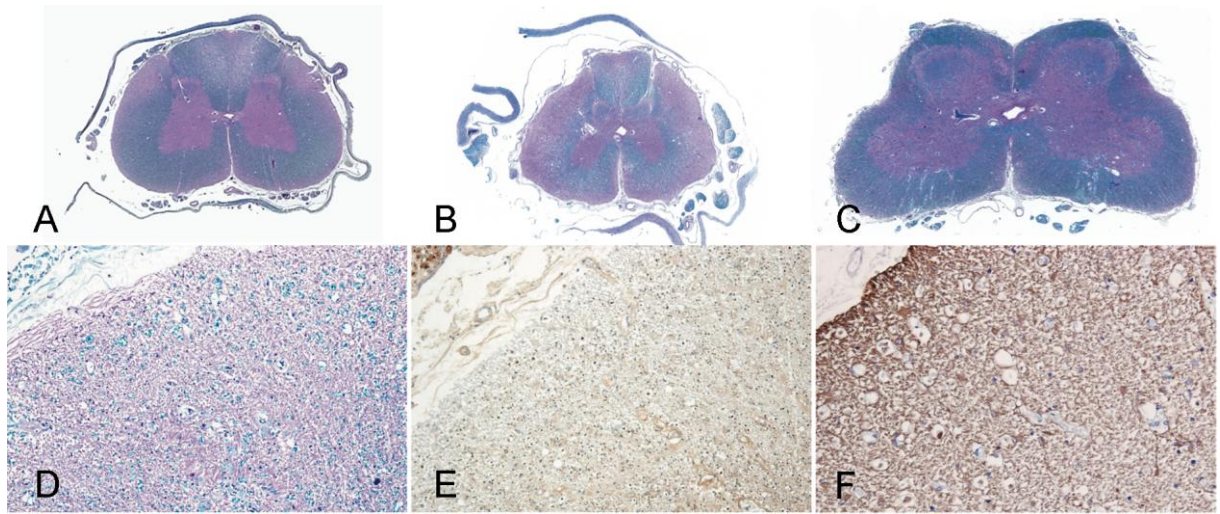


図 1-1 : 症例 1。A : 頸髄、B : 胸髄、C : 腰髄。LFB-HE 染色。D-F : 頸髄、背側索。D : LFB-HE 染色、E : ニューロフィラメント (NF) 免疫染色、F : GFAP 免疫染色。背索、背側索を中心に重度の髄鞘 (D)・軸索 (E) の変性・脱落を認める。これらの変化は胸髄 (B) で重度。病変部は重度のアストロサイトーシス (F) を伴っている。

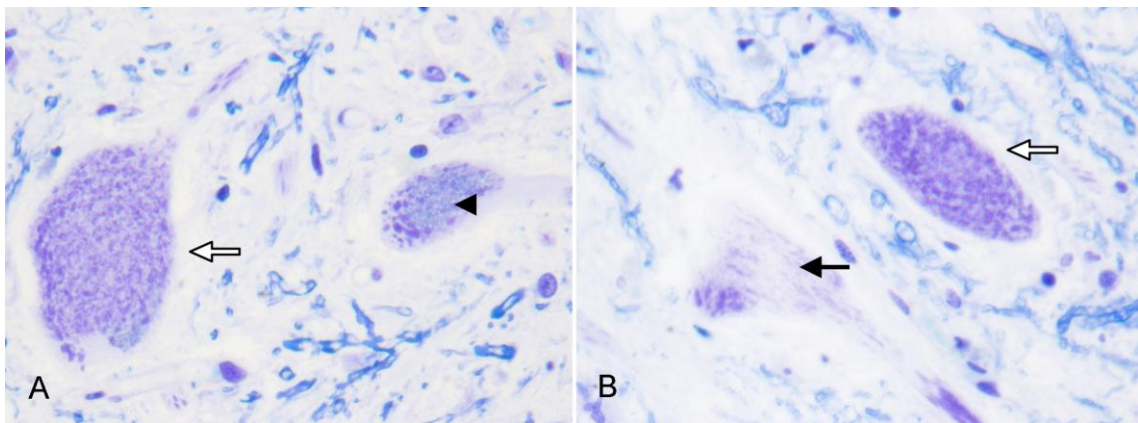


図 1-2 : DM 症例の脊髓腹角ニューロン (症例 1)。クリューバー・バレラ染色。細胞質内にリポフスチン沈着 (A : 黒矢頭)、色質融解 (B : 黒矢印) がみられる。近傍のニューロン (白矢印) は正常。

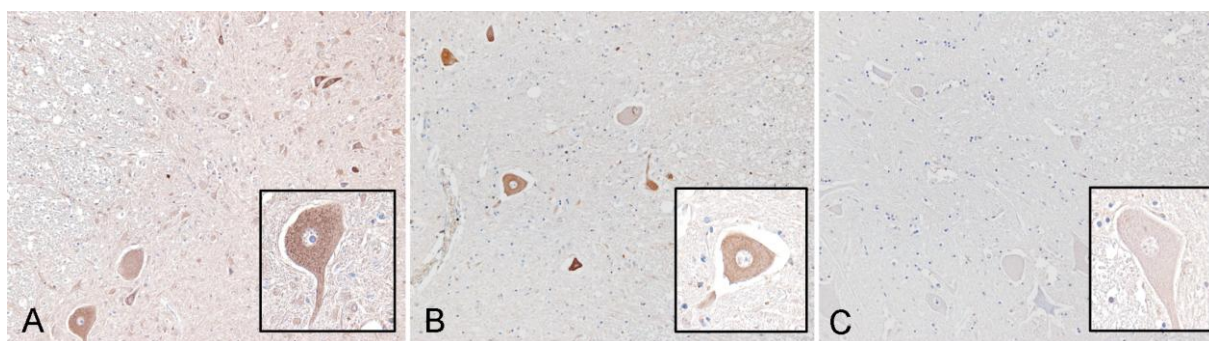


図 1-3：胸髄、腹角側索境界部。SOD1 免疫染色。A：症例 1、B：症例 2、C：対照例 1。DM 症例では腹角運動ニューロンにび慢性の SOD1 陽性像がみられる。また、ニューロン以外の陽性細胞も散見される。

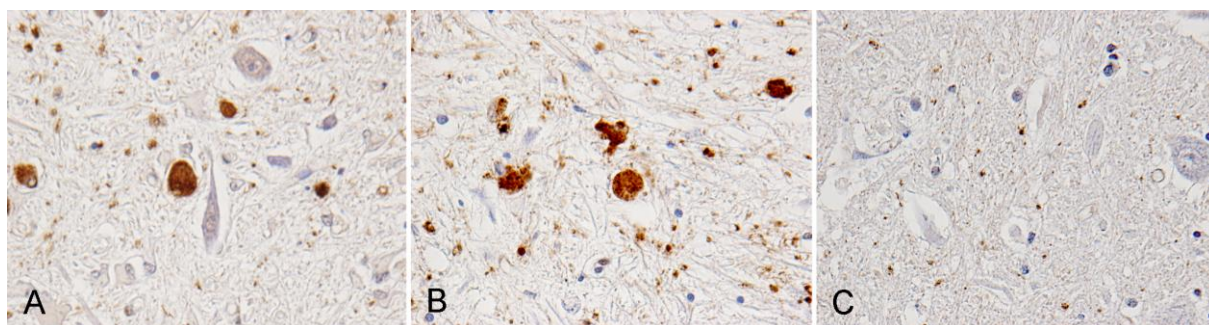


図 1-4：頸髄腹角。ユビキチン免疫染色。A：症例 1、B：症例 2、C：対照例 1。対照例 1 では、神経網に顆粒状のユビキチン陽性像が認められるのに対し、DM 症例では神経網に大型塊状の陽性像を認める。

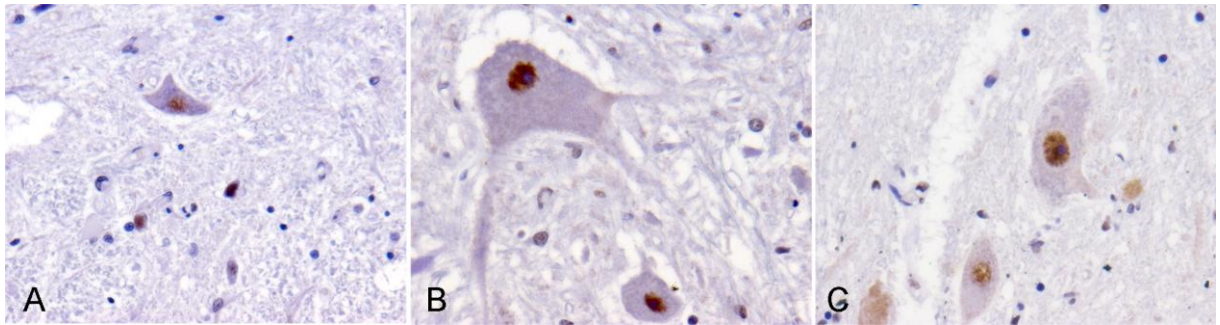


図 1-5：頸髄腹角。TDP-43 免疫染色。A：症例 1、B：症例 2、C：対照例 1。TDP-43 の発現はいずれにおいても腹角ニューロンの核内に局在し、細胞質内、神経突起には発現を認めない。

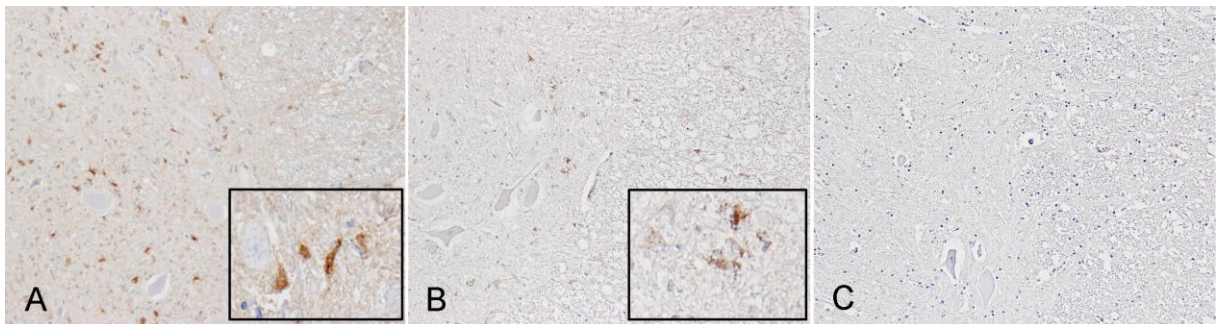


図 1-6：胸髄、腹角側索境界部。iNOS 免疫染色。A：症例 1、B：症例 2、C：対照例 1。DM 症例では主に灰白質の運動ニューロン周囲に iNOS 陽性の細胞を多見する。白質にも一部陽性細胞を認める。対照例では明瞭な陽性像を認めない。

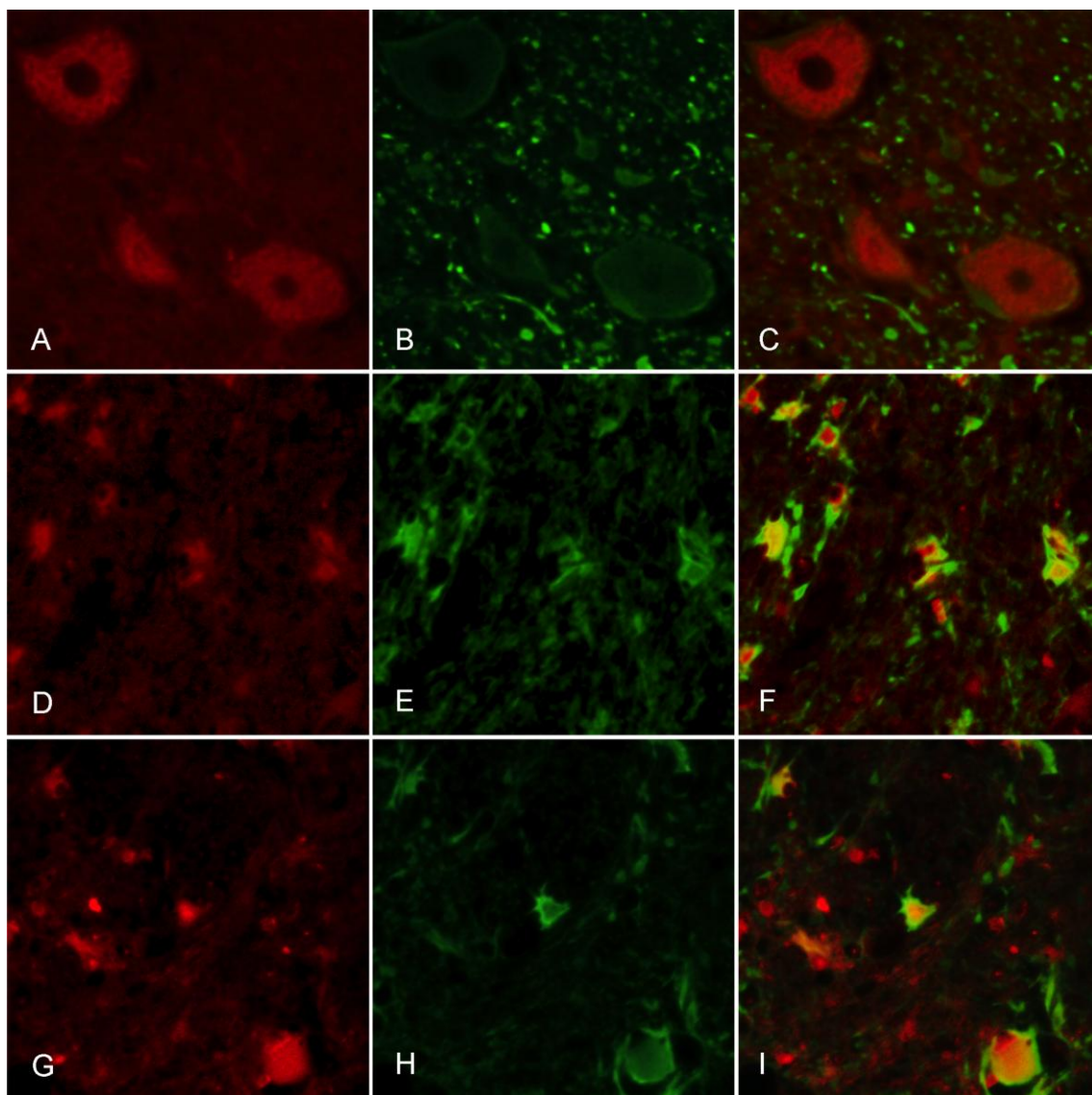


図 1-7 : 症例 1 の頸髄腹角。蛍光二重染色。A-C : SOD1(A ; 赤)、NF, (B ; 緑)、SOD1 / NF (C)。D-F : SOD1 (D ; 赤)、GFAP (E ; 緑)、SOD1 / GFAP (F)。G-I : iNOS (G ; 赤)、GFAP (H ; 緑)、iNOS / GFAP (I)。SOD1 と NF は共局在しない。灰白質 GFAP 陽性の反応性アストロサイトは SOD1 および iNOS に陽性。

## 第2章

ペンブローク・ウェルシュ・コーギーの変性性脊髄症の  
脊髄に見られたニューロン脱落と GLT-1 の発現低下

序

グルタミン酸は、中枢神経系における最も主要な興奮性伝達物質である。細胞外の余剰なグルタミン酸を細胞内に取り込む興奮性アミノ酸トランスポーター（Excitatory amino acid transporters, EAATs）のうち、アストロサイトの細胞膜上に発現するグルタミン酸トランスポーター1（glutamate transporter-1, GLT-1；EAAT2）およびグルタミン酸／アスパラギン酸トランスポーター（glutamate/aspartate transporter, GLAST；EAAT1）は、シナプス間隙のグルタミン酸取り込みの大部分を担っている。一方、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトが発現するグルタミン合成酵素（glutamine synthetase, GS）は、グルタミン酸とアンモニアからグルタミンを合成し、グルタミン酸濃度の維持に重要な役割を果たしている[D'Amelio 1990]。この一連のサイクルをグルタミン・グルタミン酸サイクルと呼び、これによりシナプス間隙の興奮性アミノ酸濃度の恒常性が維持されている。

グルタミン・グルタミン酸サイクルの破綻により生じる高濃度のグルタミン酸への暴露は、細胞内への過剰なカルシウムイオンの流入を介してニューロンに毒性を示す。これを興奮毒性と呼ぶ。運動ニューロンは特にグルタミン酸受容体を多く発現するため興奮毒性に脆弱であることが知られており[Carriedo *et al.*, 1996, Van Den Bosch *et al.*, 2000]、これが ALS 病態の主要な変化のひとつである運動ニューロン脱落の要因であると考えられている。GLT-1 の発現低下は ALS 症例および複数種の SOD1 トランスジェニックマウス（ALS モデルマウス）で報告されており[Bruijn *et al.*, 1997, Howland *et al.*, 2002, Pardo *et al.*, 2006, Rotherin *et al.*, 1992 and 1995]、ALS1 を含む ALS の病態進行に関与することが強く疑われている。さらに、このことは ALS における運動ニューロン脱落が非細胞自律的であることを支持している。

ALS 患者の脊髄における主要な変化は運動ニューロンの変性および脱落であ

る。脱落は大型の運動ニューロンから始まり、末期例では小型ニューロンの脱落もみられるようになる。すなわち、病期が進むにつれ腹角ニューロンの大きさの平均は小さくなると考えられる。第一章の結果から、イヌの DM の腹角ニューロンの病理学的変化は必ずしも ALS とは一致せず、むしろ形態的には正常に近いことが明らかとなった。また、これまでイヌの DM における腹角ニューロンの脱落は ALS のように顕著ではないとみなされてきたが[Crisp *et al.*, 2013]、実際には腹角ニューロンの脱落を定量的に評価した報告はない。これらを併せて考えると、イヌの DM の ALS モデル疾患としての有用性を検討するためには、病態の主要な要素であるニューロン脱落についての検討が必須である。加えて、ニューロン以外の細胞種における変化についても精査すべきである。

本章では、ALS でみられる腹角ニューロンの脱落やその原因となりうる興奮毒性がイヌの DM にも存在するか否かを調べるため、PWC の DM における脊髄腹角ニューロンの脱落パターンを評価するとともに、興奮毒性に関連する主要な因子である GLT-1、GLAST および GS の発現変化について検討した。



## 材料と方法

### 症例・材料

神経症状を呈さず、脊髄に著変を認めないビーグル 6 例（症例 1~6、1~14 歳、詳細な年齢が不明の症例を含むため平均年齢不明）、神経症状を呈さず、脊髄に著変を認めない PWC の 5 例（non-DM PWC、症例 7~11、6~11 歳齢、平均 8.9 歳）および病理学的に DM と診断された PWC の 5 例（DM、症例 12~16、9~14 歳、平均 12.3 歳）を用いた。症例の概要は表 2-1 に示した。頸髄（症例 C5、症例 13 は C7）、胸髄（T5）、腰髄（L3、症例 13 は L5）を検索に用いた。症例 5 では頸髄～胸髄、症例 11 では胸髄の一部、症例 15 では尾側胸髄～腰髄のみが使用可能であった。なお、検索した部位は表 2-1 にまとめて示した。症例 13 の脊髄組織は岩手大学獣医病理学研究室、症例 16 の脊髄組織は麻布大学獣医病理学研究室より供与された。これ以外の材料は 2009 年度から 2012 年度に東京大学獣医病理学研究室で病理診断を行った症例の脊髄を使用した。

### *SOD1 c118. G>A (E40K) 変異の遺伝子型検査*

各症例のゲノムDNAはパラフィン包埋後組織（肝臓、脾臓または脊髄）から DNA Isolator PS Kit（和光純薬）を用いてメーカーのプロトコルに従い抽出した。以下、第一章と同様に報告されているリアルタイムPCR法を用いて各色素の蛍光強度の増幅曲線を描出することにより遺伝子型を決定した[Chang *et al.*, 2013]。この操作は鹿児島大学の和修先生に依頼した。

### 病理組織学・免疫組織化学・蛍光二重染色

各症例の脊髄組織を 10%リン酸緩衝ホルマリンで固定し、常法に従い 4  $\mu$ m の厚さでパラフィン切片を作製した。この切片を脱パラフィンした後、ヘマト

キシリン・エオジン (HE) 染色、ルクソール・ファスト・ブルー (LFB) 染色および免疫組織化学に使用した。

免疫組織化学に用いた一次抗体を表 2-2 に示した。脱パラフィンした切片について、表に示した条件でオートクレーブにより 120°C で 10 分間の抗原賦活化を行った。全ての切片を 3% 過酸化水素・メタノール溶液で室温 5 分間処理して内因性ペルオキシダーゼを不活化し、ブロッキング溶液 (8% スキムミルク・TBST) で 37°C、40 分間処理して非特異反応を抑制した後、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体と 4°C で一晩反応させた。Envision polymer (Dako, Glostrup, Denmark) 法により二次抗体と 37°C で 40 分間反応させた。発色には 0.05% DAB (Dojindo Laboratories, 熊本) に 0.1% になるよう H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (和光純薬, 大阪) を添加して使用した。核染色にはヘマトキシリンを用いた。

腹角運動ニューロンは、中間外側核を含まない脊髄腹角に認められる βIII-tubulin 陽性かつニューロンの形態的特徴をもつ短径が 15 μm 以上の細胞として定義し、各症例の頸髄、胸髄、腰髄の切片でこれらの細胞について短径を測定し、細胞数を数えた。

蛍光二重染色は上記免疫組織化学と同様に抗原賦活化を行い、切片を一次抗体と反応させた後、TBST を用いて洗浄した後、もう一方の一次抗体と反応させた。用いた一次抗体を表 2-2 に示した。その後、TBST で希釈したフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識抗マウス IgG 抗体 (1:100 希釈、Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) と Alexa 594 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:100、Vector Laboratories, Burlingame, CA, US) の混合液と室温で 1 時間反応させた。その後、封入剤 (Vector Laboratories) で封入後、蛍光顕微鏡 DMI3000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて観察した。

### 半定量的データ解析

脊髄標本のルーペ像は Nikon COOLSCAN IV ED (Nikon Imaging, 東京) を用いてスキャンし、顕微鏡像 (組織像) は Nikon DXM1200F デジタルカメラおよび ACT-1 ソフトウェア (Nikon Instruments, 東京) を用いて撮影した。画像解析は National Institutes of Health (NIH) Image J ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD, US) を用いて行った。すなわち、カラーチャンネルを RGB 8-bit イメージに分離し、閾値 (threshold) を下限値 0、上限値 200 に設定し、この間の領域を陽性面積とした。シナプトフィジンおよび GLT-1 の免疫染色陽性領域は灰白質全体の面積中の比率として算出した。GLAST については、脊髄腹角、背角、側索のそれぞれにおいて無作為に抽出した正方形 (1000×1000 pixels) の 6 領域 (片側 3 領域) における陽性面積率を算出し、平均値を算出した。GS については、脊髄腹角から無作為に抽出した正方形 (1000×1000 pixels) の 6 領域 (片側 3 領域) における陽性細胞を数え、平均値を算出した。

得られた結果は、平均値±標準誤差で示し、多重比較法の一元配置分散分析 (one-way ANOVA) における Scheffe's *F* test を用いて検定し、 $p < 0.05$  のとき統計学的に有意であると判断した。

## 結果

### SOD1 遺伝子検査

検索した症例のうち、全てのDM症例（症例12~16）とnon-DM PWCの5例中3例（症例7、8、10）がSOD1遺伝子に118G>Aのホモ接合体変異を有していた。他のnon-DM PWC（症例9、11）はヘテロ接合体変異を有していた。検索した全てのビーグル（症例1~6）にこの変異は認められなかった。

### 病理組織学

ビーグル（症例1~6）およびnon-DM PWC（症例7~11）の脊髄には病理組織学的な著変を認めなかった（図2-1）。症例12および13の病理組織学的特徴はすでに第一章で示した。同様の白質における軸索の変性脱落、髄鞘の脱落は症例14~16でも広範に認められた（図2-1）。病変の程度は症例により異なり、症例14と15で最も重度であった。症例16では軽度で、頸髄には著変を認めなかった。GFAP陽性アストロサイトの増生は軸索・髄鞘の脱落の程度に応じて認められた。Iba-1陽性ミクログリアの増生は白質および灰白質の全体で認められ、特に症例12と15で顕著であった。髄鞘脱落と軸索の変性は症例14と15の脊髄腹根で重度であったが、他のDM症例では軽度であった。

ニューロンの細胞体における多量のリポフスチン沈着は全てのDM症例で高頻度に認められ、non-DM PWCの症例8、9、10およびビーグルの症例3において軽度であった。大型運動ニューロンの色質融解はDM症例の頸髄、胸髄、腰髄において認められ、特に症例12と14では高頻度であった。細胞質内封入体やアポトーシス小体はいずれの症例にもみられなかった。ユビキチン陽性像は変性ニューロンおよび神経網に認められたが、生存ニューロンの細胞体内には認められなかった。

### 腹角ニューロンの大きさ、細胞数

腹角における  $\beta$ III-tubulin 陽性ニューロン数は DM 症例で、non-DM PWC およびビーグルのそれぞれと比較して胸髄および腰髄で有意に少なかった (図 2-2、表 2-3)。DM 症例の腹角では大型のニューロンと小型のニューロンのいずれもが生存しており (図 2-2)、3 群間でニューロンの大きさの平均に有意な差は認められなかった (図 2-3)。

### 活性型 caspase 3 の発現

活性型 caspase 3 の免疫染色では、いずれの群においても脊髄腹角でニューロンの細胞体内に細糸状または顆粒状の陽性像がみられた (図 2-3)。これを陽性細胞とし、その数を数えたところ、DM で少ない傾向がみられたものの 3 群間で有意な差は認めなかった。またこの陽性細胞数を上記ニューロン数で除した値にも 3 群間で有意な差を認めなかった。

### シナプトフィジンの発現

脊髄灰白質に占めるシナプトフィジンの陽性面積率は、non-DM PWC およびビーグルと比較して DM 症例で有意に低く、特に腹角では染色性の顕著な低下が認められた (図 2-4)。シナプトフィジンの発現は症例 1、2、7 および 12 では検出できなかった。

### GLT-1、GLAST、GS の発現

GLT-1 の発現は、ビーグル、non-DM PWC で脊髄灰白質の全体で認められ、背角および腹角のニューロン周囲で最も強かった。DM 症例では、他の 2 群と比較して頸髄、胸髄、腰髄のいずれにおいても GLT-1 染色性の低下が認められ、

特に胸髄、腰髄で低下が顕著であった(図 2-5)。蛍光二重染色(図 2-6)の結果、GLT-1 陽性域はニューロン周囲に GFAP 陽性の突起に接して認められた。この陽性像は  $\beta$ III-tubulin 陽性の大型ニューロンの周囲にシナプトフィジン陽性部位を取り巻くように存在していたが、DM 症例では全体に発現が低下していた。一方で、DM 症例の灰白質にみられた GFAP 陽性大型細胞(反応性アストロサイト)の表面は GLT-1 陰性であった。

GLAST に対する免疫組織化学の結果、DM 症例と他の 2 群の間でその発現に有意な差は認められなかった(図 2-7)。蛍光二重染色の結果、GLAST の発現は、白質および灰白質において GFAP と共局在していたが、白質のグリオーシスを構成する GFAP 陽性線維および灰白質の GFAP 陽性反応性アストロサイトは GLAST 陰性であった。

GS 陽性細胞は灰白質で多数認められ、灰白質との境界に近い白質で少数認められた(図 2-8)。蛍光二重染色の結果、GS 陽性細胞はほとんどが GFAP 陰性、Olig2 陽性のオリゴデンドロサイトで、少数は GFAP 陽性のアストロサイトであった。DM 症例では単位面積当たりの GS 陽性細胞数が Non-DM PWC およびビーグルと比較して、僅かに少ない傾向があったが、統計学的には有意差を認めなかった。

## 考察

今回検索した PWC は高率に SOD1 遺伝子の変異を有し、このうち DM 症例は全てホモ接合体変異を有していた。国内の PWC に SOD1 遺伝子変異が高率に存在していることは既に報告されている[Chang *et al.*, 2013]が、今回の結果はこれを支持するものであった。

今回検索した DM 症例（症例 12~16）の病理組織学的所見は、これまでのイヌ DM の報告[Coates *et al.*, 2007, March *et al.*, 2009., Miller *et al.*, 2009]に一致し、またその病変分布は PWC の DM の報告[Coates *et al.*, 2007, March *et al.*, 2009, Shelton *et al.*, 2012]に一致していた。

今回検索した DM 症例ではシナプトフィジンの有意な発現減少が認められたことから、DM では神経変性の過程でシナプスも減少すると考えられた。ヒト ALS においても同様にシナプトフィジンの発現低下を示した報告が複数あり [Ikemoto *et al.*, 1994, Ince *et al.*, 1995, Sasaki and Maruyama, 1994<sup>1,2</sup>, Zang *et al.*, 2005]、シナプスの減少は DM と ALS とに共通する所見と思われた。本章で検索したいずれの症例においても、第一章の検索例と同様、残存ニューロンにおける封入体形成やユビキチン陽性物質の凝集は認められなかった。しかし DM 症例では他の 2 群と比較して、腹角ニューロン数が顕著に減少しており、特に臨床症状が重度であった症例 13 と 15 で顕著であった。一方で残存ニューロンの大きさは DM 症例の脊髄腹角においても短径が 30  $\mu\text{m}$  以上のニューロン、一部では 50  $\mu\text{m}$  以上のニューロンが残存していることが分かった。また、DM 症例、non-DM PWC、ビーグルの 3 群間にはニューロン短径の平均値に差を認めなかった。このことから、腹角ニューロンの脱落は大型運動ニューロンに限らず、全てのニューロンで非選択的に起こっているものと考えられた。一方で、ALS1 を含め、ヒト ALS では脊髄腹角ニューロンは小径であることが報告されており [Kiernan *et al.*,

1991]、大型ニューロンの選択的萎縮あるいは脱落が起こっていると推測されている。したがって、ALSとイヌのDMとでは腹角ニューロンの脱落形式が異なっていると推測される。また、これらのニューロンにアポトーシス小体は認められず、活性型caspase 3陽性細胞率にも3群間で差がなかった。ALSにおけるニューロンの脱落にアポトーシスが関与しているかについては未だ議論があるが [Sobue *et al.*, 1990, Martin *et al.*, 2011, Winslow and Rubinszten, 2008, Won *et al.*, 2002]、今回の結果から、イヌのDMではニューロンの脱落にアポトーシスが関与する可能性は低いと考えられた。

今回の検索で観察されたビーグルとnon-DM PWCの脊髄におけるGLT-1の発現分布は正常のヒト、ラット、マウスで報告されている分布に類似していた[Frayer *et al.*, 1998., Milton *et al.*, 1997., Rauen *et al.*, 1994]。またGLT-1の発現低下がALS患者およびALSモデルマウスで病態発症後にみられることも知られている[Bruijn *et al.*, 1997, Howland *et al.*, 2002, Rothstein *et al.*, 1995]。GLT-1の発現が低下した結果、グリア細胞表面で細胞間隙グルタミン酸の除去が十分に行われず、これが運動ニューロンの興奮毒性をもたらすと考えられている[Rothstein *et al.*, 1996]。今回のDM症例にもGLT-1の発現低下が認められたことから、ALS患者およびSOD1トランスジェニックマウスと同様、DM罹患犬でもGLT-1の発現低下が運動ニューロンの興奮毒性の原因となる可能性が示唆された。またSOD1変異を有するnon-DM PWCと変異がないビーグルの間でGLT-1の発現レベルに差が認められなかったことから、GLT-1の発現低下は発症後に生じる二次的な現象であり、さらに病態の増悪因子にもなりうると考えられた。また、GLASTの発現レベルに3群間の全ての部位で差を認めなかったことから、イヌのDMでは2つのトランスポーターのうち、GLASTではなくGLT-1のみが興奮毒性の原因となると推察された。



iNOSの誘導によるNOの過剰産生がGLT-1を介したグルタミン酸の取り込み活性と興奮毒性に関連するとの報告が複数ある[Ida *et al.*, 2008, Rao *et al.*, 2004]。

第一章で示したように、DM症例では灰白質の反応性アストロサイトでiNOS発現が認められており、このことからDM症例の脊髄でもアストロサイトによるNO産生とグルタミン酸取り込みに何らかの関連があると推察された。

今回の検索ではイヌにおいてGSはアストロサイトとオリゴデンドロサイトに局在していた。この発現分布はこれまでネコ、ラットで報告された分布に一致していた[D'Amelio *et al.*, 1990, Tansey *et al.*, 1991]。DM症例で他の2群と比較してGS陽性細胞数のわずかな減少がみられたが、有意差は認めなかった。GSの中樞神経系の発現変化に関しては、他の神経変性疾患の患者では報告があるものの[Smith *et al.*, 1991]、ALS患者においては血球中の発現変化に関する報告しかない[Bos *et al.*, 2006]。またある種の SOD1トランスジェニックマウスでは、脊髄におけるGSの発現と活性に変化が認められないことも報告されている[Fray *et al.*, 2001]。ALSとDMの両疾患におけるGS発現の役割は未だ明らかではないが、今回の結果からGSの発現変化が病態に与える意義は少ないと考えられた。

以上のことから、DM症例の脊髄では、ALSと同様、GLASTではなくGLT-1の発現低下によるグルタミン・グルタミン酸サイクルの障害に起因する興奮毒性が脊髄腹角ニューロンの顕著な脱落に関与していると考えられた。一方で、DMではALSとは異なり、腹角ニューロンは非選択的に脱落することから、細胞死に至る細胞内のメカニズムについてはDMとALSとで異なっていると推察された。

## 要約

イヌDMはfALSの自然発症動物モデルとして期待されているにも関わらず、これまでその腹角ニューロンの脱落を詳細に検討した報告はない。ALSでは、グルタミン・グルタミン酸サイクルの異常による細胞間の過剰なグルタミン酸による興奮毒性が運動ニューロン脱落に寄与すると考えられている。そこで、SOD1遺伝子変異を伴うPWCのDM症例5例、DMに罹患していないPWC 5例、対照例としてビーグル6例について、腹角ニューロンの脱落様式およびグルタミン・グルタミン酸サイクルで主要な役割を担うグリア細胞性興奮性アミノ酸トランスポーター（GLT-1、GLAST）の発現レベルを検索した。DM症例の腹角ニューロンは対照の2群と比較して平均サイズに差を認めないものの、その数は有意に少なかった。また顕著なシナプス脱落もみられた。各群でニューロンのアポトーシスを示す形態的特徴はみられず、活性型caspase 3の陽性率にも差はなかった。さらに、DM症例ではGLT-1の発現の著しい発現低下がみられたが、GLASTの発現には各群で差を認めなかった。これらの結果から、アストロサイト膜上のGLT-1発現低下がDMとALSとで同様にみられるものの、神経細胞の脱落メカニズムはDMとALSとで相違があると推察された。

表2-1：症例の概要

	犬種	性別	年齢	罹病期間	DMの臨床症状	検索した部位			剖検主診断	SOD1(118G>A, p.E40K) 遺伝子変異
						C	T	L		
1	ビーグル	メス	記載なし	-	-	+	+	+	なし	なし
2	ビーグル	メス	記載なし	-	-	+	+	+	なし	なし
3	ビーグル	メス	14y	-	-	+	+	+	記載なし	なし
4	ビーグル	メス	6y	-	-	+	+	+	なし	なし
5	ビーグル	メス	6y	-	-	+	+	-	なし	なし
6	ビーグル	メス	8y	-	-	+	+	+	糸球体腎炎	なし
7	PWC	避妊メス	6y11m	-	-	+	+	+	炎症性筋症	ホモ接合体変異
8	PWC	避妊メス	10y4m	-	-	+	+	+	炎症性筋症	ホモ接合体変異
9	PWC	避妊メス	11y2m	-	-	+	+	+	組織球性肉腫 (脳)	ヘテロ接合体変異
10	PWC	オス	6-7y	-	-	+	+	+	なし	ホモ接合体変異
11	PWC	去勢オス	11y3m	-	-	-	+	-	T細胞性リンパ腫 (多発性)	ヘテロ接合体変異
12	PWC	オス	12y6m	3y	HLW, FLW, DU	+	+	+	変性性脊髄症	ホモ接合体変異
13	PWC	去勢オス	14y6m	2y5m	TP, DU, RD	+	+	+	変性性脊髄症	ホモ接合体変異
14	PWC	避妊メス	12y2m	2y7m	TP, DU, RD	+	+	+	変性性脊髄症	ホモ接合体変異
15	PWC	避妊メス	9y6m	2y9m	TP, DU, RD	-	-	+	変性性脊髄症	ホモ接合体変異
16	PWC	オス	13y	4m	HLW	+	+	+	変性性脊髄症、B細胞性リンパ腫 (脾臓)	ホモ接合体変異

y; year, m; month, HLW; hindlimb weakness (後肢不全), FLW; forelimb weakness (前肢不全), TP; tetraplegia (四肢麻痺), DU; dysurea (排尿障害), RD; respiratory dysfunction (呼吸困難), C; cervical 5 - 7, T; thoracic 5, L; lumbar 3 - 5, ND; no data

表2-2：用いた一次抗体

抗体名	抗原	種類	認識細胞・構造	抗原賦活化	希釈倍率	販売元、製品番号
GFAP	GFAP isolated from cow spinal cord	Rabbit, p	アストロサイト	なし	1:1000	Dako, Glostrup, Denmark, #Z0334
GFAP	intermediate filament cytoskeleton from cultured human glioma cells	Mouse, m (GF 12.24)	アストロサイト	Citrate Buffer (pH 6.0)	pre-diluted	PROGEN Biotechnik, Heidelberg, Germany, #65011
Iba1	C-terminous of Iba1	Rabbit, p	ミクログリア	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:500	Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan, #019-19741
NF	neurofilament purified from human brain peptide	Mouse, m (2F11)	軸索 (NF-L)	なし	pre-diluted	Dako, #N1591
bIII-tubulin	corresponding to the C-terminus of $\beta$ III-tubulin	Mouse, m (5G8)	ニューロン	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:2000	Promega corporation, Madison, WI, USA, #G712A
synaptophysin	crude fractions of coated vesicles from bovine brain	Mouse, m (SY38)	シナプス小胞	Target retrieval solution, pH 9.0	1:30	Dako, #M0776
Olig2	Recombinant mouse Olig-2	Rabbit, p	オリゴデンドロサイト	Target retrieval solution, pH 9.0	1:200	Millipore, Billerica, MA, #AB9610
ubiquitin	ubiquitin isolated from cow erythrocytes	Rabbit, p	-	なし	1:200	Dako, #Z0458
ACTIVE® caspase-3	Peptide derived from the p17 fragment of caspase-3	Rabbit, p	-	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:200	Promega
EAAT1 (GLAST)	synthetic MAP of C-terminal region of canine GLAST	Rabbit, p	-	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:300 (IHC), 1:75 (IF)	(Sato et al., 2000)
EAAT2 (GLT-1)	C-terminal aa residue of rat GLT	Rabbit, p	-	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:1000 (IHC), 1:300 (IF)	Wako Pure Chemical Industries, #015-16421
GS	Sheep Glutamine Synthetase aa.1-373	Mouse, m (6/GS)	-	Target retrieval solution, pH 9.0	1:300	BD Biosciences, San Jose, CA, USA, #610518

GFAP: glial fibrillary acidic protein, Iba1: ionized calcium-binding adapter molecule 1, NF: neurofilament, Olig2: oligodendrocyte transcription factor 2, EAAT: excitatory amino acid transporter, GLAST: glutamate/aspartate transporter, GLT-1: glutamate transporter 1, GS: glutamine synthetase, m: monoclonal, p: polyclonal

表2-3 : ビーグル、non-DM PWCおよびDM症例の腹角における $\beta$ III-tubulin陽性ニューロンの平均サイズのおよび細胞数。

		Beagle	Non-DM PWC	DM
Cervical	size ( $\mu$ m)	25.0 $\pm$ 1.5	25.1 $\pm$ 0.2	25.4 $\pm$ 2.3
	number	76.5 $\pm$ 14.6	85.5 $\pm$ 13.2	52.0 $\pm$ 11.1
Thoracic	size ( $\mu$ m)	21.9 $\pm$ 0.7	22.7 $\pm$ 1.1	23.7 $\pm$ 1.4
	number	25.5 $\pm$ 4.7	31.2 $\pm$ 5.5	12.5 $\pm$ 3.4 *†
Lumbar	size ( $\mu$ m)	27.0 $\pm$ 0.8	25.0 $\pm$ 0.7	25.6 $\pm$ 1.7
	number	83.2 $\pm$ 18.8	99.5 $\pm$ 10.8	32.1 $\pm$ 8.3*†

Mean  $\pm$  SE,  $p < 0.05$ , DM vs \*non-DM PWC or †beagle

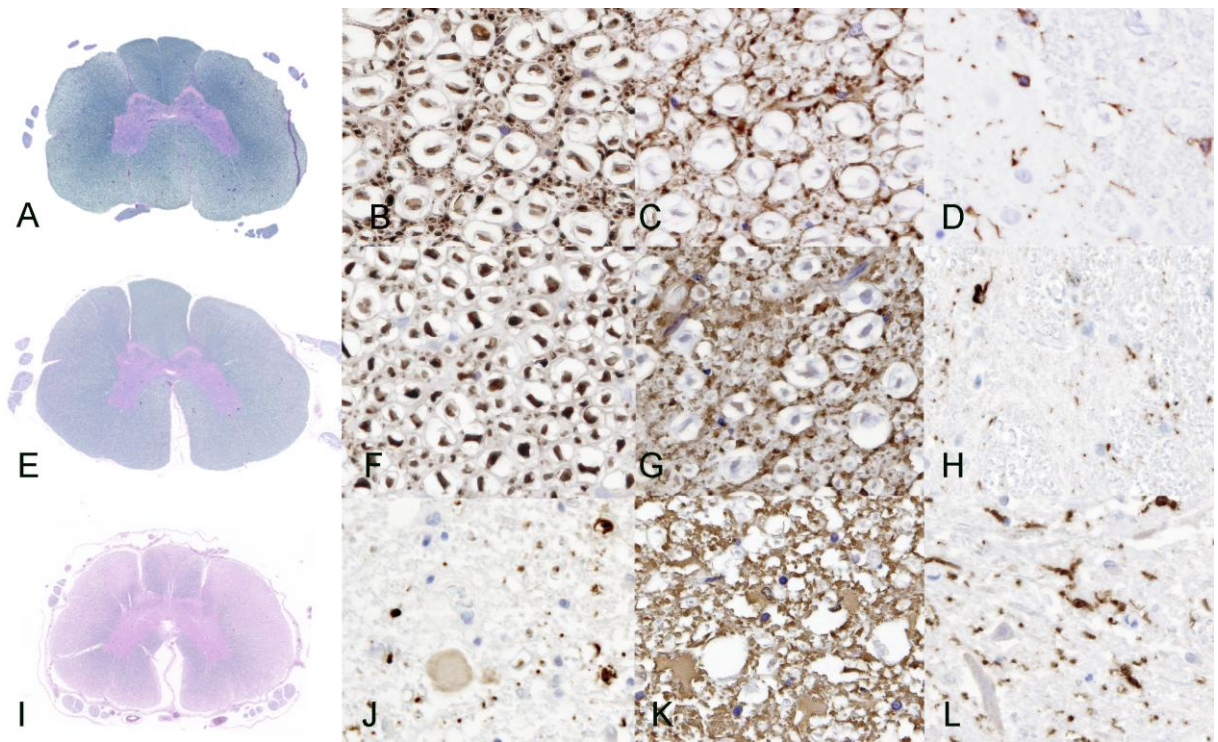


図 2-1：症例の脊髄病変。

A-D：対照ビーグル、症例 4、胸髄（T5）、E-H：non-DM PWC、症例 10、胸髄（T5）、I-L：DM 症例、症例 14、胸髄（T5）。A, E, I：LFB-HE 染色、B, F, J：ニューロフィラメント免疫染色、C, G, K：GFAP 免疫染色、D, H, L：Iba-1 免疫染色。DM 症例では白質で全周性の顕著な髄鞘脱落（I）、白質における軸索の顕著な変性・脱落（J）、GFAP 陽性のアストロサイト（K）と Iba1 陽性のミクログリア（L）の増生を認める。他の 2 群では著変を認めない。

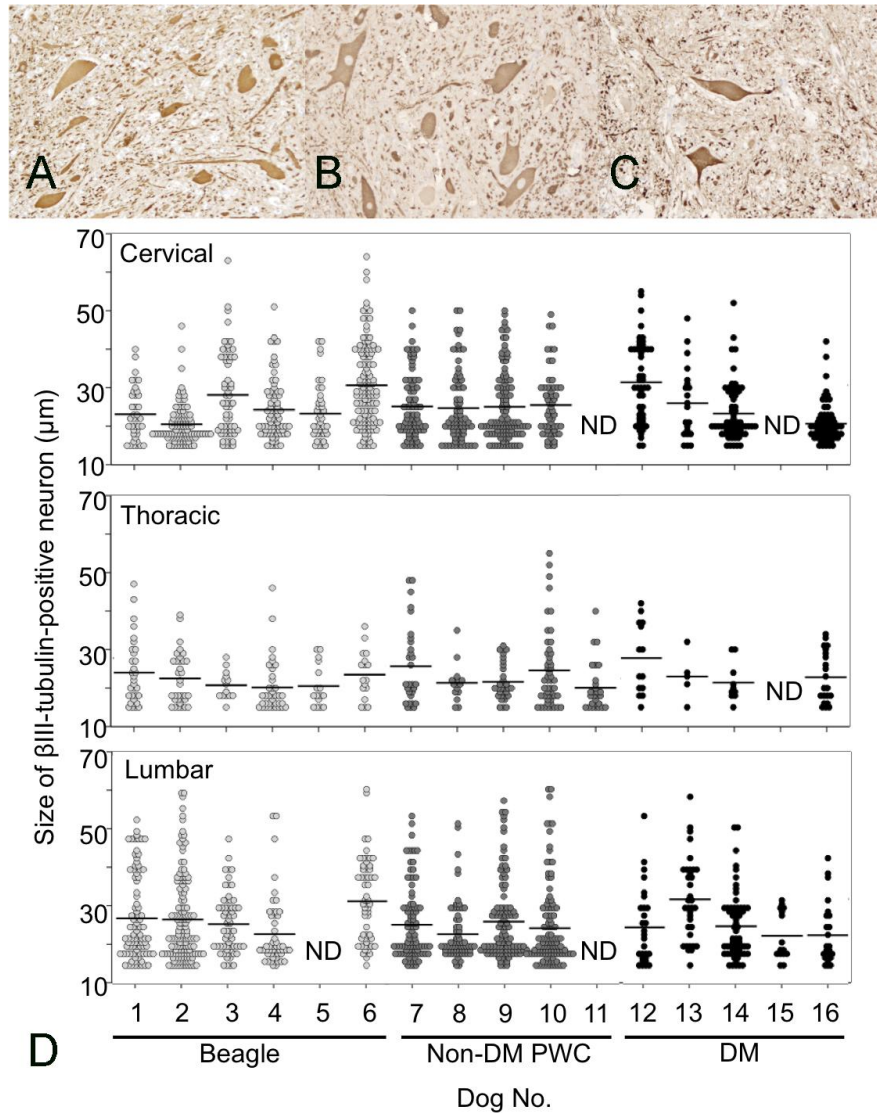


図2-2：脊髄腹角ニューロンの大きさと数の変化。

A-C： $\beta$ III-tubulin陽性腹角ニューロン。A：対照ビーグル、症例2、胸髄（T5）、B：non-DM PWC、症例9、胸髄（T5）、C：DM症例、症例14、胸髄（T5）。D：症例1-6（ビーグル、淡灰色のドット）、症例7-11（non-DM PWC、灰色のドット）、症例12-16（DM、黒色のドット）の頸髄、胸髄、腰髄の $\beta$ III-tubulin陽性ニューロンの神経細胞体の短径の散布図。水平の線は各例における平均を示す。DM症例でも短径 $30\mu\text{m}$ 以上の細胞が残存する。ND：検索せず。

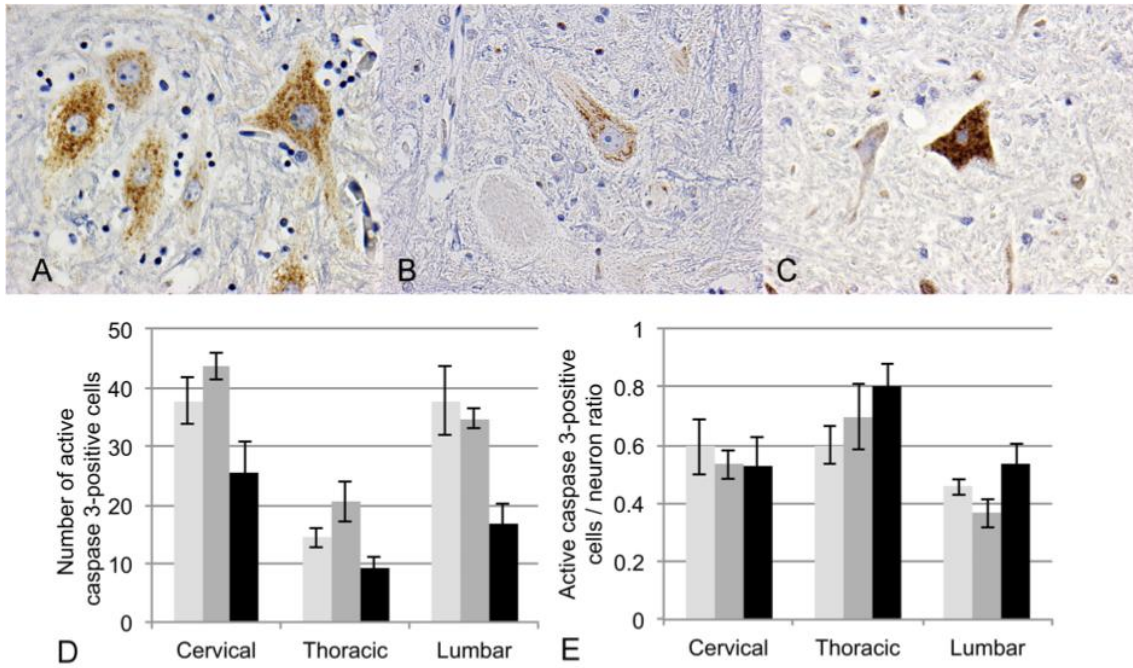


図2-3：活性型caspase 3 免疫染色。

A：対照ビーグル、症例2、胸髄（T5）腹角ニューロン。B：non-DM PWC、症例8、胸髄（T5）、腹角ニューロン。C：DM症例、症例2、胸髄（T5）、腹角ニューロン。D, E：活性型caspase 3陽性細胞数（D）および腹角ニューロン数に占める陽性細胞の割合（E）。症例1-6（ビーグル、淡灰色）、症例7-11（non-DM PWC、灰色）、症例12-16（DM、黒色）。陽性細胞数および陽性細胞率のいずれにも3群間で有意な差は認められない。



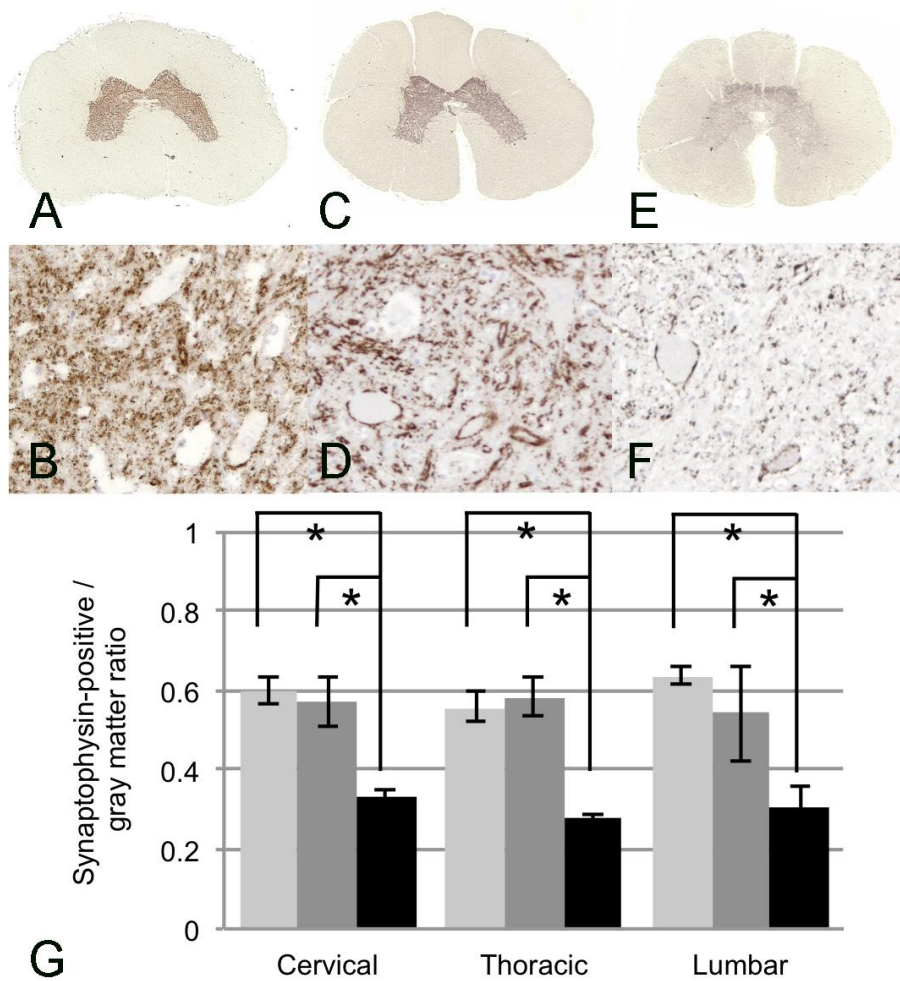


図2-4：シナプトフィジン免疫染色。

A：対照ビーグル、症例2、胸髄（T5）。B：Aの腹角の強拡大像。C：non-DM PWC、症例8、胸髄（T5）。D：Cの腹角の強拡大像。E：DM、症例14、胸髄（T5）。F：Eの腹角強拡大像。G：頸髄、胸髄、腰髄の灰白質に占めるシナプトフィジン陽性部位の面積比率。症例1-6（ビーグル、淡灰色）、症例7-11（non-DM PWC、灰色）、症例12-16（DM、黒色）。DM症例の脊髄では他の2群と比べてシナプトフィジン染色性の顕著な低下が認められる。 $*p < 0.05$

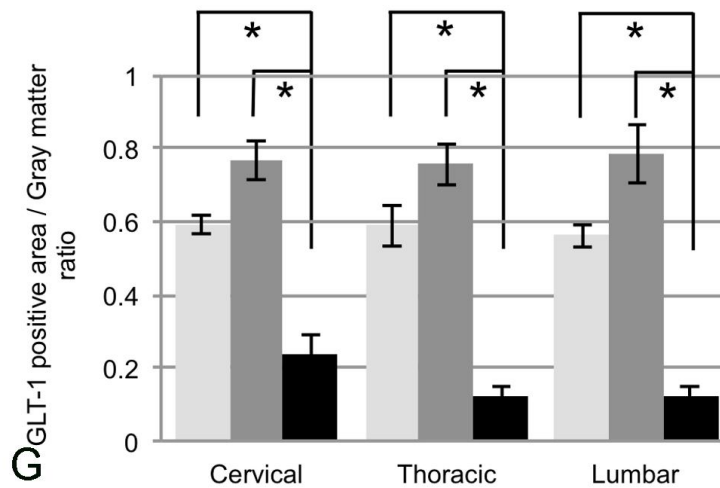
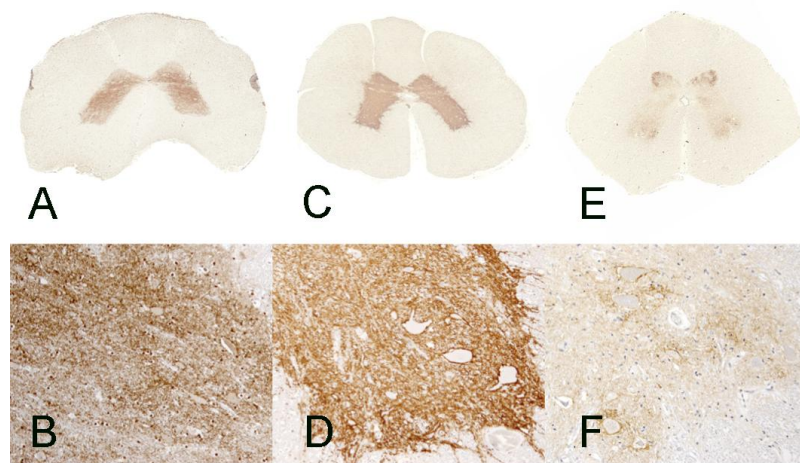


図2-5 : GLT-1免疫染色。

A : 対照ビーグル、症例5、胸髄 (T5)。B : Aの腹角の強拡大像。C : non-DM PWC、症例8、胸髄 (T5)。D : Cの腹角の強拡大像。E : DM、症例12、胸髄 (T5)。F : Eの腹角強拡大像。G : 頸髄、胸髄、腰髄の灰白質に占めるGLT-1陽性部位の面積比率。症例1-6 (ビーグル、淡灰色)、症例7-11 (non-DM PWC、灰色)、症例12-16 (DM、黒色)。DM症例の脊髄では他の2群と比べてGLT-1染色性の顕著な低下が認められる。\* $p < 0.05$

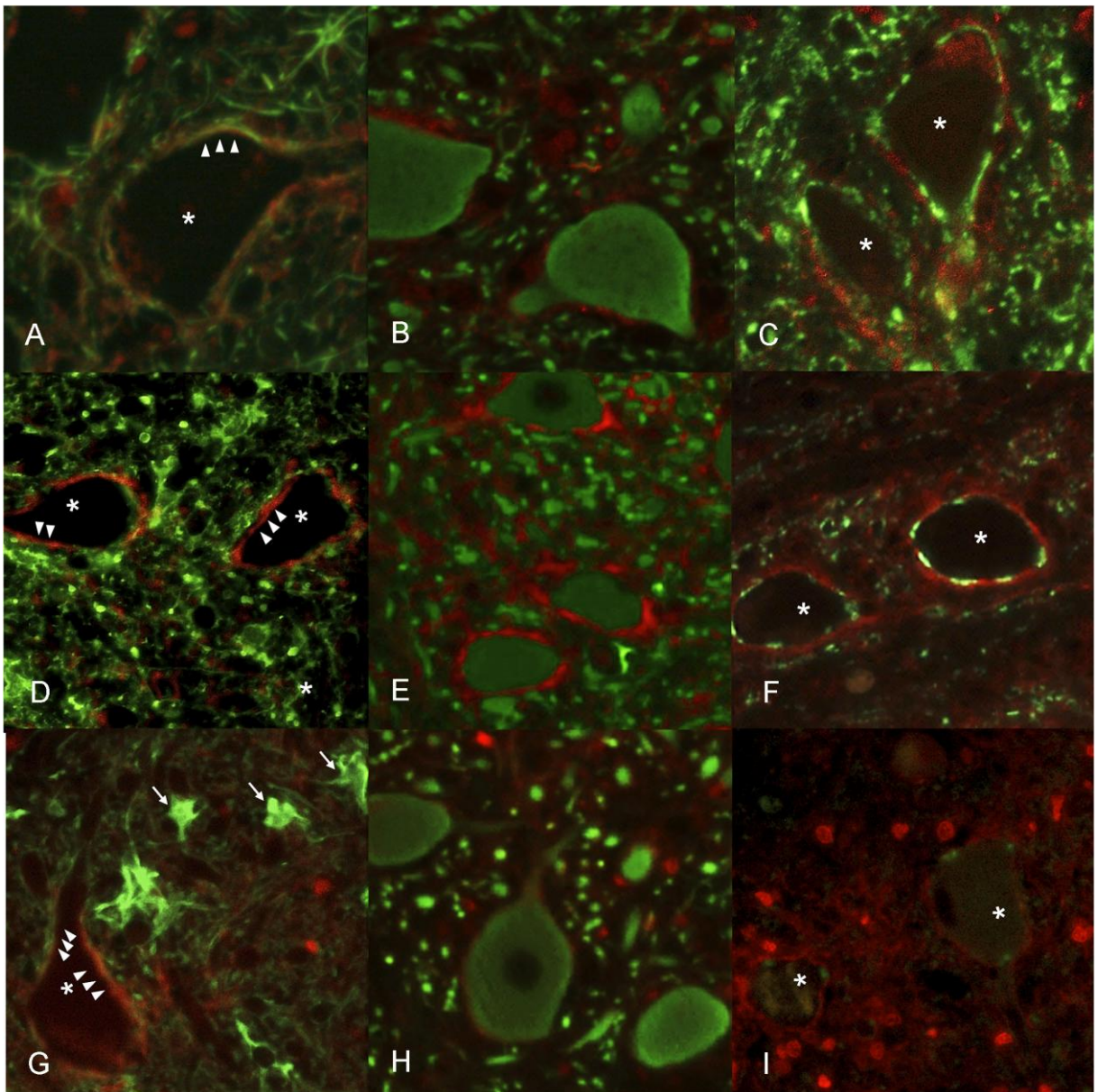


図2-6 : GLT-1とGFAP、 $\beta$ III-tubulin、シナプトフィジンとの蛍光二重染色。

A-C : 対照ビーグル、症例 6、頸髄腹角。D-F : non-DM PWC、症例 9、頸髄腹角。G-I : DM、症例 14、頸髄腹角。A, D, G : GLT-1 (赤) および GFAP (緑)、B, E, H : GLT-1 (赤) および  $\beta$ III-tubulin (緑)、C, F, I : GLT-1 (赤) およびシナプトフィジン (緑)。ビーグルと non-DM PWC では GLT-1 の発現はニューロンの細胞体 (\*で示す : B, E, H では緑色の胞体) と GFAP 陽性突起の間 (アストロサイト膜上、矢頭) にシナプトフィジン陽性構造 (シナプス、C, F の緑色の構造) を取り巻くように発現が見られる。一方、DM 症例では膨化アストロサイト (G : GFAP 陽性細胞、矢印) には GLT-1 の発現を認めない。

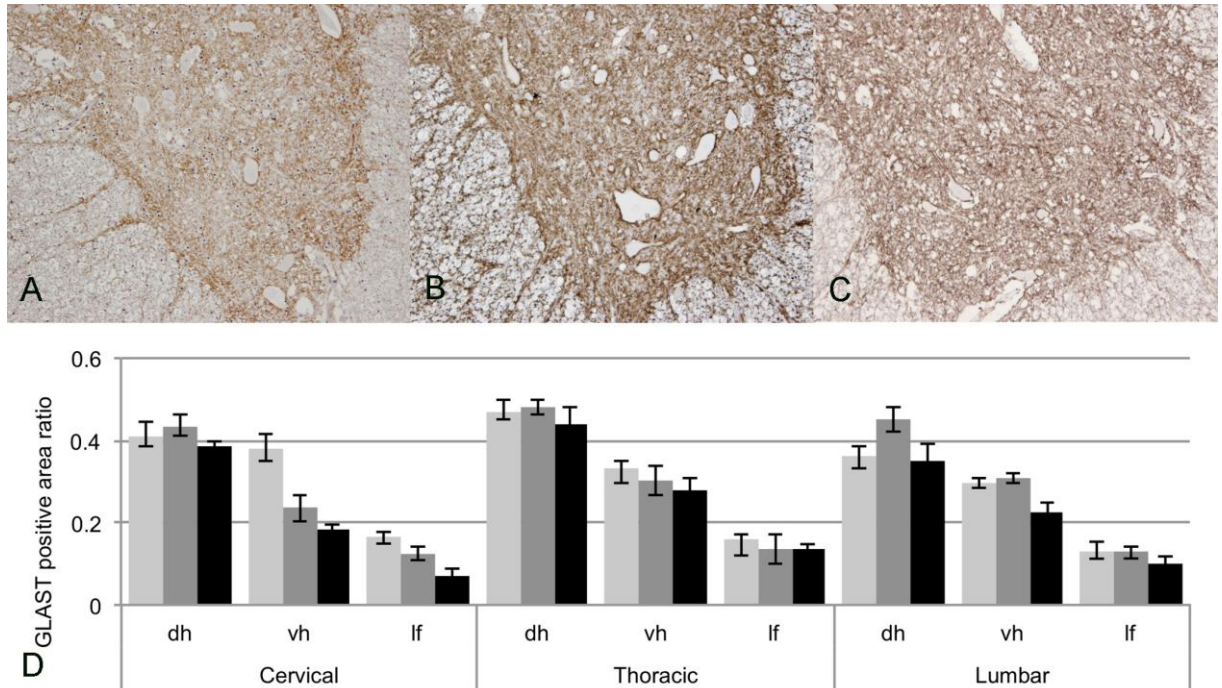


図2-7 : GLAST免疫染色。

A : 対照ビーグル、症例4、胸髄 (T5) 腹角。B : non-DM PWC、症例7、胸髄 (T5) 腹角。C : DM、症例13、胸髄 (T5) 腹角。D : 頸髄、胸髄、腰髄それぞれの腹角、背角および側索の一定面積に占めるGLAST陽性面積比率。症例1-6 (ビーグル、淡灰色)、症例7-11 (non-DM PWC、灰色)、症例12-16 (DM、黒色)。3群間でGLASTの陽性部位の面積率に有意な差は認められない。dh : dorsal horn, vh : ventral horn, lf : lateral funiculi。

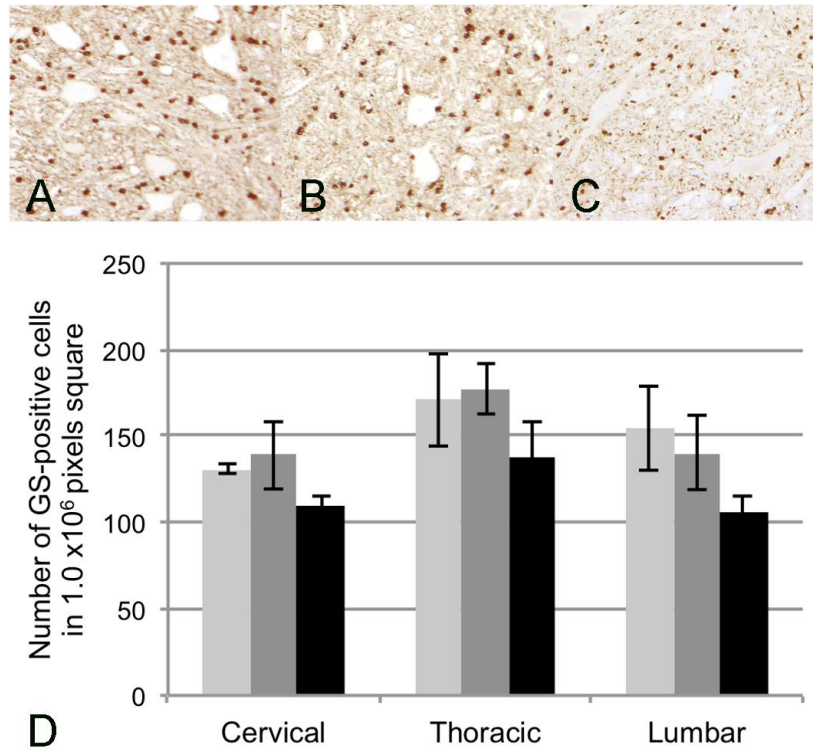


図2-8 : GS免疫染色。

A : 対照ビーグル、症例4、胸髄 (T5) 腹角。B : non-DM PWC、症例9、胸髄 (T5) 腹角。C : DM、症例13、胸髄 (T5) 腹角。D : 頸髄、胸髄、腰髄それぞれの腹角の一定面積に占めるGS陽性細胞数。症例1-6 (ビーグル、淡灰色)、症例7-11 (non-DM PWC、灰色)、症例12-16 (DM、黒色)。3群間でGS陽性細胞数に有意な差は認められない。

## 第3章

ペンブローク・ウェルシュ・コーギーの変性性脊髄症の脊髄におけるオートファジー関連因子の発現検索

序

オートファジー（マクロオートファジー）はユビキチン・プロテアソーム系（UPS）以外で最も主要な細胞質内のタンパク質分解系（自己分解経路）である。その主要な機能は細胞の栄養飢餓状態の際の自己代謝によるアミノ酸供給で、飢餓状態の他に小胞体ストレス、酸化ストレス、低酸素、興奮毒性および感染によっても活性化され、誘導的オートファジーと呼ばれる[Levine and Kroemer, 2008]。他方、栄養豊富な状態でも恒常的に低いレベルで維持されているオートファジーを定常的オートファジーと呼び、異常タンパク質の蓄積を防ぐことで細胞内の恒常性維持および細胞の生存に寄与している[Uchiyama *et al.*, 2008]。定常的オートファジーの活性は加齢とともに減弱すると考えられている[Levine and Kroemer, 2008]。

オートファジーによる分解は、Beclin 1 を含む Vps34 PI3 キナーゼ複合体を介して誘導され、Atg12-Atg5-Atg16L 結合体の形成を経て二重の隔離膜を形成し、その後、隔離膜がアダプタータンパク質（カーゴレセプター）である p62/A170/Sqstm 1 (p62) や neighbor of BRCA gene 1 (NBR1) の介在で分解の対象物である細胞小器官や変性タンパク質、リポフスチンなどの消耗色素を取り囲み、Microtubule-associated protein light chain (LC3) -I から LC3-II への変換を経てオートファゴソームが形成される。これがライソゾームと融合してオートライソゾームとなり、消化・分解される。LC3 はオートファゴソームまたはオートライソゾーム（両者をあわせてオートファジー小胞と呼ぶ）のマーカーとなる[Mizushima *et al.*, 2010]。

近年、神経変性疾患など様々な疾患に於けるオートファジー、特に定常的オートファジーの異常が徐々に明らかになっており、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病ばかりでなく、ALS の病態機序に関してもオートフ

ファジーの関与が指摘されている[Chen *et al.*, 2012, Nassif and Hetz, 2012, Nixon, 2013]。sALS 患者の脊髄を用いた研究では、腹角ニューロンにおける LC3 陽性像、skein-like inclusion や round body の p62 陽性像が認められること、および変性腹角ニューロンの超微形態的観察により多数のオートファゴソームが認められることが報告されている [Sasaki, 2011]。これらの研究から、ALS では凝集物や封入体がオートファジーの対象であるとともに、オートファジーの活性低下がこれらを形成する原因となっていることが推察される。一方、ALS のモデルである SOD1<sup>G93A</sup> トランスジェニックマウスでは、発症後の脊髄における LC3 [Morimoto *et al.*, 2007]や p62 [Gal *et al.*, 2009] の異常蓄積や、隔離膜形成を促進によるニューロン脱落の早期化[Zhang *et al.*, 2011] が報告されている。これらのことから、ALS 病態においては隔離膜形成の亢進や、ライソゾームによる分解能を越えた過剰なオートファジー小胞の形成・蓄積が増悪因子になると推察される [Chu, 2006]。

第一章および第二章の結果から、PWC の DM 症例の脊髄では封入体形成はなく、ニューロンの脱落パターンも ALS と異なることが示されたが、ユビキチン陽性物質の蓄積パターンから主に神経突起への異常タンパク質の蓄積が疑われ、タンパク質分解機構としての定常的オートファジーに異常をきたしている可能性が考えられた。

本章では、PWC の DM におけるオートファジー関連因子の局在を ALS のそれと比較するため、代表的なオートファジー関連因子の発現を、免疫組織化学およびウェスタンブロットティングにより検討した。



## 材料と方法

### 症例・材料

神経症状を呈さず、脊髄に著変を認めないビーグル6例(ビーグル、症例1~6、1~14歳、詳細な年齢が不明の症例を含むため平均年齢不明)、神経症状を呈さず、脊髄に著変を認めないPWC5例(non-DM PWC、症例7~11、6~11歳、平均8.9歳)および病理学的にDMと診断されたPWCの8例(DM、症例12~19、9~16歳、平均13.2歳)を用いた。症例の概要は表3-1に示した。頸髄(C5、症例13はC7)、胸髄(T5)、腰髄(L3、症例13はL5)を用いた。症例5では頸髄~胸髄、症例11では胸髄の一部、症例15では尾側胸髄~腰髄のみが使用可能であった。なお検索した部位は表3-1に示した。タンパク質の抽出には症例10では胸髄、それ以外の症例では頸髄を用いた。症例13の脊髄組織は岩手大学獣医病理学研究室、症例16の脊髄組織は麻布大学獣医病理学研究室より供与された。これ以外の材料は2009年度から2013年度に東京大学獣医病理学研究室で病理診断を行った症例の脊髄を使用した。

### *SOD1 c118. G>A (E40K) 変異の遺伝子型検査*

各症例のゲノムDNAはパラフィン包埋後組織(肝臓、脾臓または脊髄)からDNA Isolator PS Kit(和光純薬)を用いてメーカーのプロトコルに従い抽出した。以下、第1章と同様に報告されているリアルタイムPCR法を用いて各色素の蛍光強度の増幅曲線を描出することにより遺伝子型を決定した[Chang *et al.*, 2013]。この操作は鹿児島大学の和修先生に依頼した。

### 病理組織学・免疫組織化学・蛍光二重染色

各症例の脊髄組織は剖検時に10%リン酸緩衝ホルマリンで固定し、常法に

従い 4  $\mu\text{m}$  の厚さでパラフィン切片を作製し、各染色に使用した。

免疫組織化学は Envision polymer 法を用いて実施した。脱パラフィンした切片について、表に示した条件でオートクレーブにより 120°C、10 分間の抗原賦活化を行った。以降、切片の洗浄には 0.2%の Tween20 を添加したトリス緩衝液 (Tris-buffered solution, TBST) を用いた。全ての切片を 3%過酸化水素・メタノール溶液で室温 5 分間処理して内因性ペルオキシダーゼの不活化を行い、ブロッキング溶液 (8%スキムミルク・TBST) を用い 37°Cで 40 分間処理して非特異反応を抑制した後、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体と 4°Cで一晩反応させた。用いた一次抗体は表 3-2 に示した。二次抗体は horseradish peroxidase (HRP) 標識ポリマー試薬 (抗ウサギ-または抗マウス-IgG, Envision polymer, Dako, Glostrup, Denmark) を使用し、37°Cで 40 分間反応させた。発色には 0.5 %DAB (Dojindo Laboratories, 熊本)溶液に最終濃度 0.1%になるよう  $\text{H}_2\text{O}_2$ (和光純薬、大阪)を添加して使用した。核染色にはヘマトキシリンを用いた。

腹角運動ニューロンは第二章と同様に中間外側核を含まない脊髄腹角に認められた  $\beta\text{III-tubulin}$  陽性かつニューロンの形態的特徴をもつ短径が 15 $\mu\text{m}$  以上の構造として定義し、各症例の頸髄、胸髄、腰髄の切片で計数を行った。LC3 共陽性斑点を有する細胞数・神経突起数は光学顕微鏡下で計数した。

蛍光二重染色は上記免疫組織化学と同様に抗原賦活化を行い、切片を一次抗体と反応させ、TBST を用いて洗浄した後にもう一方の一次抗体と反応させた。使用した一次抗体は表 3-2 に示した。その後、TBST で希釈したフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 結合抗マウス IgG 抗体 (1:100 希釈、Invitrogen Life Technologies, Paisley,UK) と Alexa 594 結合抗ウサギ IgG 抗体 (1:100、Vector Laboratories, Burlingame, CA, US) の混合液と室温で 1 時間反応させた。封入剤 (Vector Laboratories) で封入後、蛍光顕微鏡 DMI3000B (Leica Microsystems,

Wetzlar, Germany) を用いて観察した。

#### 組織からのタンパク質の抽出

採取した脊髄材料は使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。実体顕微鏡下で白質・灰白質を分離した後、タンパク質抽出用緩衝溶液 [150 mM NaCl、1 mM EDTA、2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、10 mM NaF、1% NP-40 および 5% protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) を含む pH 7.8 の 10 mM Tris-HCl 緩衝液] を添加し、氷冷しながら攪拌子 (Bio Masher II, Nippi、東京) を用いて攪拌破砕した。これを  $4^{\circ}\text{C}$  で  $12000\times\text{g}$ 、20 分間遠心した後、上清を回収して組織抽出タンパク質とし、使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。タンパク質量はタンパク質定量システム (DC™ プロテインアッセイ、Bio-Rad, Hercules, CA, USA) および吸光光度計 (Bio-Rad) を用いて Lowry 変法により測定した。抽出タンパク質と 5% のメルカプトエタノールを加えた sodium dodecyl sulfate (SDS) 処理液 (Laemmli sample Buffer、Bio-rad) とを 1:1 の割合で混合し、 $100^{\circ}\text{C}$  で 10 分間煮沸した後、ウェスタンブロッティング法に用いた。

#### ウェスタンブロッティング

抽出タンパク質を 10%、15% または 5-20% ポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL, ATTO, 東京) を用いて室温でゲル 1 枚あたり 20mA 定電流、90 分電気泳動した後、あらかじめ 100% メタノールで親水化処理を行ったタンパク質ブロッティング用ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて、25 分間ブロッティング (25 mV 定電圧) した。膜を TBST で洗浄した後、3% スキムミルク/TBST で 60 分間ブロッキングを行った。3% スキムミルクを含む TBST で希釈した各 1 次抗体 (表 3-2) と  $4^{\circ}\text{C}$  で振盪しながら

一晚反応させ、TBST で洗浄した。同様に希釈した HRP 標識 2 次抗体 (1:5000) と室温で 1 時間反応させ、TBST で洗浄した後、化学発光検出試薬 (ECL Prime、GE healthcare) と反応させ、ルミノ・イメージアナライザー (Chemi-Doc, Bio-Rad) で陽性バンドを検出した。

#### データ解析・半定量的解析

脊髄組織標本は Nikon DM-U3 デジタルカメラおよび NIS-Elements ソフトウェア (Nikon Instruments, 東京) を用いて撮影した。脊髄腹角の LC3 陽性細胞数および神経突起数は光学顕微鏡下で計数し、得られた結果は、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。データは、多重比較法の一元配置分散分析 (one-way ANOVA) における Tukey-Kramer test を用いて検定し、 $p < 0.05$  のとき統計学的に有意であると判断した。

ウェスタンブロッティングで検出したバンドは画像解析ソフト (Image Lab, Bio-Rad) を用いて定量した。LC3 は LC3-I と LC3-II の比、その他の分子は  $\beta$ -actin との発現比を算出し、得られた値を症例 1 との比率で示した。統計学的解析には多重比較法の一元配置分散分析 (one-way ANOVA) における Tukey-Kramer test を用い、 $p < 0.05$  のとき統計学的に有意であると判断した。

## 結果

### LC3、NBR1、p62 発現の局在

LC3 抗体を用いた免疫組織化学の結果、LC3 の発現は観察した全ての症例で腹角のニューロン細胞体、神経細胞の樹状突起、灰白質の神経網において斑点状 (LC3 puncta) に認められた (図 3-1)。また、神経細胞内のリポフスチン蓄積に一致する部位およびその周囲も陽性を呈した。non-DM PWC 群の症例 10 では、腹角ニューロンで結晶状の陽性像が稀に認められた (図なし)。白質にも LC3 陽性細胞を散見した。LC3 陽性斑点を細胞質に有するニューロン数は、DM 症例、non-DM PWC およびビーグルの間で頸髄、胸髄では差を認めなかった (図 3-2)。腰髄ではビーグルと他の 2 群との間、および non-DM PWC と DM の間に有意差を認めた。この数を腹角の神経細胞数で除した数 (LC3 陽性斑点を細胞質にもつ腹角ニューロンの割合) も 3 群間で差を認めなかった。灰白質において LC3 陽性斑点を有する神経突起 (樹状突起) を数えたところ、DM 症例群で他の 2 群と比較して有意に多かった。また、蛍光二重染色の結果、LC3 と  $\beta$ III-tubulin 陽性の樹状突起での局在が認められたが、LC3 とライソゾームマーカーである Lysosome-associated membrane protein 2 (LAMP2) の共局在は認められなかった (図なし)。

次にアダプタータンパク質である p62 および NBR1 について免疫組織化学を行った。p62 免疫染色の結果、全ての症例において灰白質を中心に顆粒状の陽性像を認め、白質にも陽性細胞を多見した (図 3-3)。さらに DM 症例では灰白質の神経網にも塊状の陽性像を認め、また変性ニューロンの細胞体での強陽性像も稀に認めた (図 3-3)。神経網にみられた塊状の p62 の発現は  $\beta$ III-tubulin、GFAP、HLA-DR、CNPase および pNF のいずれとも共局在しなかった (図なし)。NBR1 はすべての群のいずれの例においても神経網に微細顆粒状の染色性を示し、ま

た白質に陽性細胞を散見した。すべての DM 症例においては、灰白質の特に腹角神経細胞周囲に強い陽性像を多数認めた (図 3-4)。同様の細胞は non-DM PWC の症例 10 でも少数認められた。蛍光二重染色の結果、この細胞は GFAP 陽性細胞 (アストロサイト) であり、一部では NBR1 と  $\beta$ III-tubulin との共局在が認められた (図 3-5)。

#### ウェスタンブロッティング

各症例 (ビーグル : 症例 1、2、4、5、6、non-DM PWC : 症例 9、10、11、DM : 症例 16、17、18、19) の脊髄を用いて、隔離膜形成に関わる Beclin 1、Atg-16L、p62 および LC3 の灰白質・白質それぞれにおける発現レベルをウェスタンブロッティングにより検索した (図 3-6)。この結果、Beclin 1 の発現レベルは、灰白質ではビーグル群と比較して non-DM PWC で有意に低値、DM 症例で低値の傾向がみられ、白質では non-DM PWC が他の 2 群と比較してやや高値であった。Atg16L の発現レベルは、検索した DM 症例で灰白質、白質ともにビーグルおよび non-DM PWC と比べ低値の傾向がみられた。灰白質では non-DM PWC と DM 症例の間に有意差が認められた。p62 の発現量は灰白質・白質ともに他の 2 群より DM 症例でやや高値であった。LC3-II / LC3-I 比には灰白質で各群の平均値に差を認めなかった。白質では DM 症例で他の 2 群と比較して有意に高値であった。

## 考察

イヌを含む哺乳類で、LC3 や p62、NBR1 などのオートファジー関連分子について中枢神経系での正常な発現分布を詳細に検討した報告はこれまでない。本章の検索で明らかになったニューロン細胞体内、特にリポフスチンに一致した LC3 陽性顆粒の存在、p62 および NBR1 の神経網における顆粒状の発現パターンはこれらの分子の正常な局在を反映していると考えられた。

免疫組織化学の結果から、脊髄腹角において LC3 強陽性顆粒を細胞体に有するニューロン数では、DM 症例と他の 2 群の間に差が認められたが、これは第 2 章で示した残存ニューロン数の違いを反映したものと考えられた。実際、ニューロンの総数で除した値では頸髄、胸髄、腰髄とも 3 群間で有意な差を認めなかった。一方で、シナプス小胞が減少しているにも関わらず、陽性顆粒を有する樹状突起の数は DM 症例で頸髄、胸髄、腰髄のいずれにおいても他の 2 群と比較して有意に多かった。第一章で示した DM 症例のニューロン細胞体内のユビキチン陽性像の欠如と合わせて考えると、ニューロンの細胞体よりも樹状突起において異常タンパク質が蓄積していることが推察された。また、樹状突起における LC3 強陽性顆粒の増加は、LAMP2 との共局在を認めなかったことから、オートファゴソームの蓄積を示しており、このことから、オートファジーストレスが突起内で局所的に起こっていると考えられた。

DM 症例で特徴的に認められた p62 の神経網での発現パターンは、第一章で示したユビキチンの発現パターンと一部で類似していた。p62 が介在するオートファジーの経路は、UPS で分解できずポリユビキチン化されたタンパク質を分解する補完的経路であると考えられており、UPS およびオートファジーによる分解が不十分な場合、ユビキチンと p62 が凝集・蓄積すると考えられている [Komatsu *et al.*, 2007]。したがって、今回 DM 症例でみられた p62 の発現の一部

はユビキチン化を介した選択的オートファジーの機能不全によるものである可能性が高い。一方で、SOD1<sup>G93A</sup> トランスジェニックマウスを用いた研究では、蓄積した変異 SOD1 と LC3 を介在する p62 はユビキチンを必要としないことが示されており [Gal *et al.*, 2009]、ユビキチンと関連しない p62 の蓄積も含まれていると考えられる。NBR1 は p62 と同じアダプタータンパク質として知られているが、種々の神経変性疾患およびそのモデルマウスを用いた研究から、p62 とは分布・機能が異なることが分かっている [Odagiri *et al.*, 2012, Rué *et al.*, 2013]。ALS 患者およびモデルマウスで NBR1 の局在を検索した報告はないが、今回の DM 症例では NBR1 の局在は p62 のそれと一致せず、主として反応性アストロサイトに局在していた。このことから、DM 症例の脊髄では、p62 と NBR1 の動態は異なっていて、反応性アストロサイトが NBR1 を介するオートファジーの機能変化になんらかの役割を果たすことが推察された。

ウェスタンブロットティングの結果から、DM 症例の脊髄では、灰白質においてオートファジーの過程のうち Beclin 1 および Atg16L が関与する隔離膜形成の段階が抑制されていると考えられた。灰白質における Beclin 1 の発現は non-DM PWC でビーグルと比較して低値であり、non-DM PWC を発症の前段階であると仮定すると、この発現低下が DM の発症前から正常な定常的オートファジーの機能を妨げている可能性がある。一方で、Atg16L の発現は、non-DM PWC と DM の間で有意差がみられたことから、発症後の変化と考えられた。p62 の発現レベルには灰白質、白質いずれにおいても 3 群間で差を認めなかったが、DM 症例では高値を示す症例があり、病態進行とともに p62 が凝集・蓄積するものと推察された。灰白質では LC3-II/LC3-I 比に 3 群間で平均値に差を認めなかったことから、灰白質における樹状突起への LC3 の蓄積はオートファゴソーム形成の亢進によるものではなく、オートファゴソームの分解の異常の結果であると



考えられた。この仮説は、上述のように LC3 陽性斑点がライソゾームマーカーである LAMP2 と共局在しなかったことと矛盾しない。分解出来なかった p62 や LC3 が神経突起や神経網に蓄積し、DM の病態において増悪因子となる可能性があるかと推察された。一方で白質では DM 症例で他の 2 群と比較して LC3-II/LC3-I 比が高値を示したが、LC3 の異常な蓄積はみられなかったことから、この LC3-I から LC3-II への変換は、DM 症例の主要病変である白質病変に対応した正常な定常的オートファジーの増強であると推察された。

以上のことから、イヌの DM 症例においては、隔離膜形成初期の過程が抑制されている一方で、オートファゴソームとライソゾームとの融合および消化・分解が正常に起こらず、特に灰白質の神経突起や神経網において LC3 や p62 が重度に蓄積し、これがニューロンの脱落の要因のひとつとなっている可能性が示唆された。

## 要約

細胞質内の主要なタンパク質分解系であるオートファジーの異常は、神経変性疾患を含む様々な疾患で徐々に明らかになっており、ALS でもその関与が指摘されている。そこで、SOD1 遺伝子変異を伴う PWC の DM 症例 8 例、DM に罹患していない PWC 5 例、対照例としてビーグル 6 例について、オートファジー小胞のマーカーとなる LC3 およびアダプタータンパク質である NBR1、p62 の脊髄における発現局在を検索するとともに、オートファジー経路の因子である Beclin 1、Atg16L、p62 および LC3 の発現レベルを検索した。LC3 強陽性顆粒をもつニューロン細胞体の割合については各群に差を認めなかったものの、LC3 強陽性顆粒をもつ樹状突起の数は DM 症例で有意に多かった。NBR1 は DM 症例脊髄の反応性アストロサイトに局在し、p62 は神経網に塊状に局在していた。またウェスタンブロッティングにより、DM 症例の脊髄ではオートファゴソームの隔離膜形成に関与する Beclin 1 および Atg16L の発現レベルの低下傾向が認められた。これらの結果から、DM 症例の脊髄では神経突起においてオートファゴソームの分解異常による LC3 や p62 の蓄積が起こる一方で、隔離膜形成の初期段階が抑制されていることが示唆された。また 2 種のアダプタータンパク質である p62 と NBR1 は、DM の病態においてそれぞれ異なる役割を果たしていると考えられた。

表3-1：症例の概要

	犬種	性別	年齢	罹病期間	DMの臨床症状	検索した部位				剖検主診断	SOD1(118G>A, p.E40K) 遺伝子変異
						C	T	L	WB		
1	ビーグル	メス	記載なし	-	-	+	+	+	+	なし	なし
2	ビーグル	メス	記載なし	-	-	+	+	+	+	なし	なし
3	ビーグル	メス	14y	-	-	+	+	+	-	記載なし	なし
4	ビーグル	メス	6y	-	-	+	+	+	+	なし	なし
5	ビーグル	メス	6y	-	-	+	+	-	+	なし	なし
6	ビーグル	メス	8y	-	-	+	+	+	+	糸球体腎炎	なし
7	PWC	避妊メス	6y11m	-	-	+	+	+	-	炎症性筋症	ホモ接合体変異
8	PWC	避妊メス	10y4m	-	-	+	+	+	-	炎症性筋症	ホモ接合体変異
9	PWC	避妊メス	11y2m	-	-	+	+	+	+	組織球性肉腫 (脳)	ヘテロ接合体変異
10	PWC	オス	6-7y	-	-	+	+	+	+	なし	ホモ接合体変異
11	PWC	去勢オス	11y3m	-	-	-	+	-	+	T細胞性リンパ腫 (多発性)	ヘテロ接合体変異
12	PWC	オス	12y6m	3y	HLW, FLW, DU	+	+	+	-	変性性脊髄症	ホモ接合体変異
13	PWC	去勢オス	14y6m	2y5m	TP, DU, RD	+	+	+	-	変性性脊髄症	ホモ接合体変異
14	PWC	避妊メス	12y2m	2y7m	TP, DU, RD	+	+	+	-	変性性脊髄症	ホモ接合体変異
15	PWC	避妊メス	9y6m	2y9m	TP, DU, RD	-	-	+	-	変性性脊髄症	ホモ接合体変異
16	PWC	オス	13y	4m	HLW	+	+	+	+	変性性脊髄症、B細胞性リンパ腫 (脾臓)	ホモ接合体変異
17	PWC	避妊メス	14y3m	3y7m	TP, DU, RD	+	+	+	+	変性性脊髄症、乳腺癌、重度慢性膀胱炎	ホモ接合体変異
18	PWC	去勢オス	13y4m	2y4m	HLW	+	+	+	+	変性性脊髄症、脾臓血腫の破裂	ホモ接合体変異
19	PWC	避妊メス	16y	1y11m	TP, DU, RD	+	+	+	+	変性性脊髄症、B細胞性リンパ腫 (脾臓)	ホモ接合体変異

y : year, m : month, HLW : hindlimb weakness (後肢不全), FLW : forelimb weakness (前肢不全), TP : tetraplegia (四肢麻痺), DU : dysurea (排尿障害), RD : respiratory dysfunction (呼吸困難), C : cervical 5 - 7, T : thoracic 5, L : lumbar 3 - 5, WB : western blotting, ND : no data

表3-2. 用いた一次抗体

抗体名	種類	認識細胞・構造	適用	抗原賦活化	希釈倍率	販売元、製品番号
GFAP	Mouse, m (GF 12.24)	アストロサイト	IF	Citrate Buffer (pH 6.0)	pre-diluted	PROGEN Biotechnik, Heidelberg, Germany, #65011
HLA-DR	Mouse, m	ミクログリア, マクロファージ	IF	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:500	Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan, #019-19741
bIII-tubulin	Mouse, m (5G8)	ニューロン	IHC, IF	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:2000	Promega corporation, Madison, WI, USA, #G712A
Olig2	Rabbit, p	オリゴデンドロ サイト	IF	Target retrieval solution, pH 9.0	1:200	Millipore, Billerica, MA, #AB9610
pNF-H&M	mouse, m	-	IHC	-	1:1000	Millipore, Billerica, MA, US, #MAB1592
LC3	Rabbit, p	-	IHC	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:1000	MBL, Nagoya, Aichi, Japan #PM036
LC3	Mouse, m (8E10)	-	WB	-	1:2000	MBL, #M186-3
NBR1	Rabbit, p	-	IHC, IF	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:300	Proteintech Group, #160004-1- AP
p62	Rabbit, p	-	IHC, IF, WB	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:300, 1:1000(WB)	MBL, #PM045
Atg16L	Rabbit, p	-	WB	-	1:1000	MBL, #PM040
beclin1	Rabbit, p	-	WB	-	1:1000	MBL, #PD017
beta-actin	Rabbit, p	-	WB	-	1:2000	Cell signaling, #4967
LAMP2	Goat, p	ライソゾーム	IF	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:100	Santa Cruz, #sc-8100

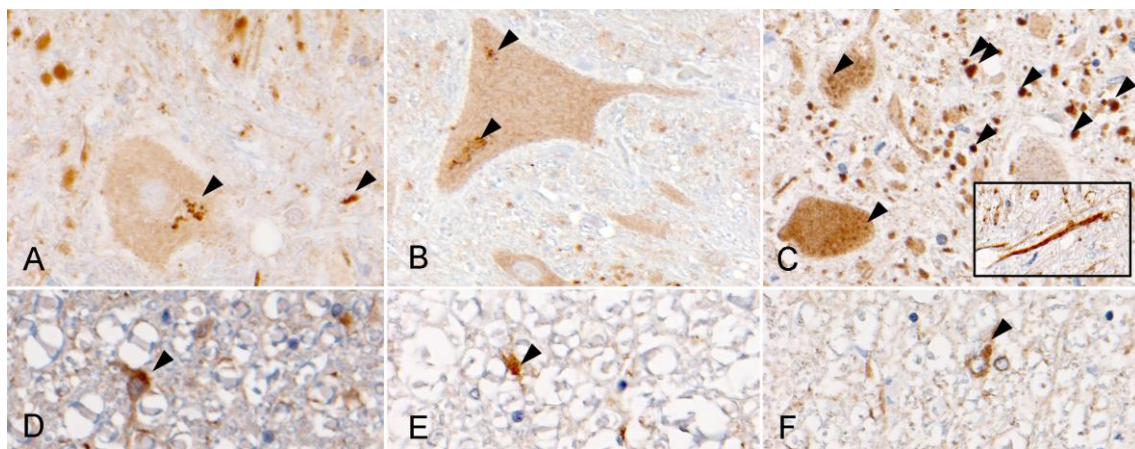


図 3-1 : LC3 免疫染色。

A, D : 症例 2 (ビーグル)、B, E : 症例 9 (non-DM PWC)、C, F : 症例 12 (DM)。  
 A-C : 脊髓腹角 (挿入図 : 樹状突起の拡大像)、D-F : 脊髓白質。LC3 puncta (LC3 強陽性斑点、矢頭)はいずれの症例でも神経細胞体内、樹状突起内に認められる (A-C)。DM 症例では樹状突起で LC3 陽性像が多数認められる (C)。白質にも LC3 陽性細胞を散見する (D-F)。

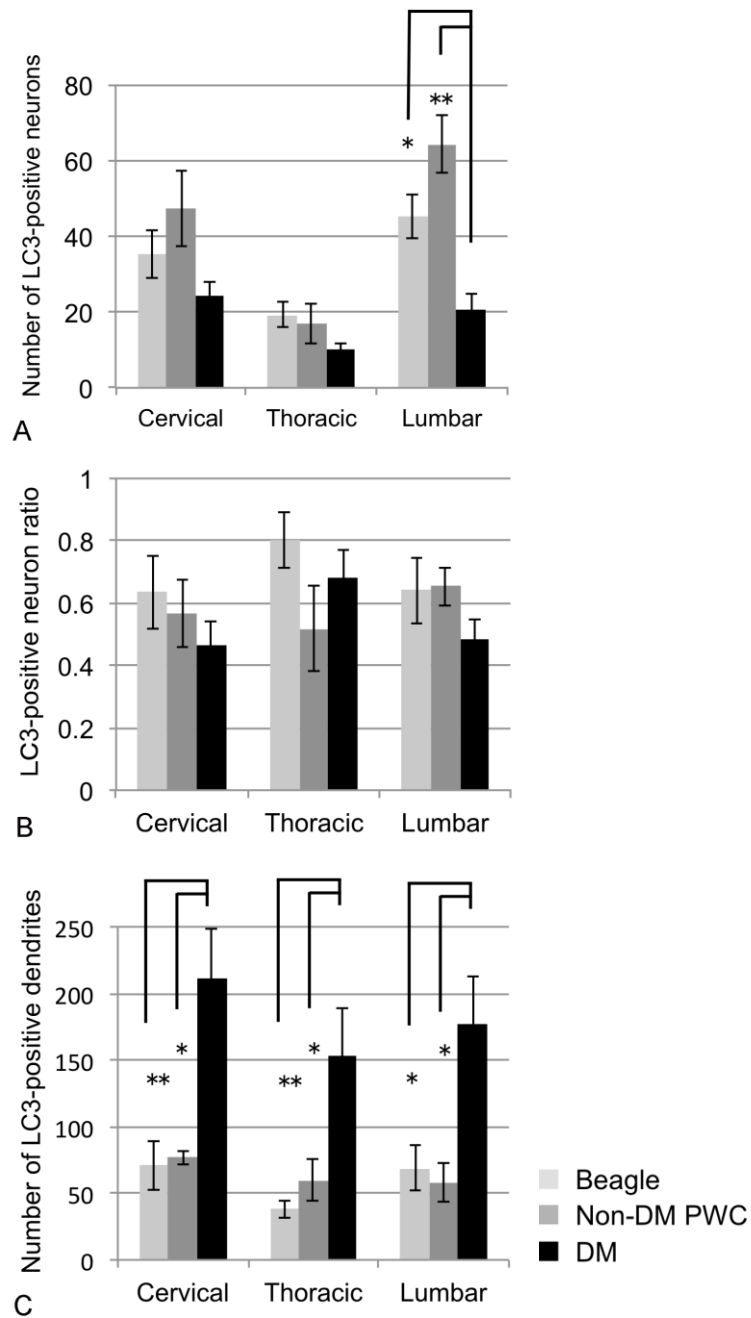


図 3-2 : LC3 陽性斑点を神経細胞体に有する腹角ニューロン数 (A)、その腹角ニューロンに占める割合 (B)、および LC3 陽性斑点を有する樹状突起数 (C)。腹角ニューロンでは腰髄で各群間に差を認めたものの、総数に占める割合では各群間に有意な差を認めない。樹状突起数は他の 2 群と比較して DM で多かった。 \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ 。

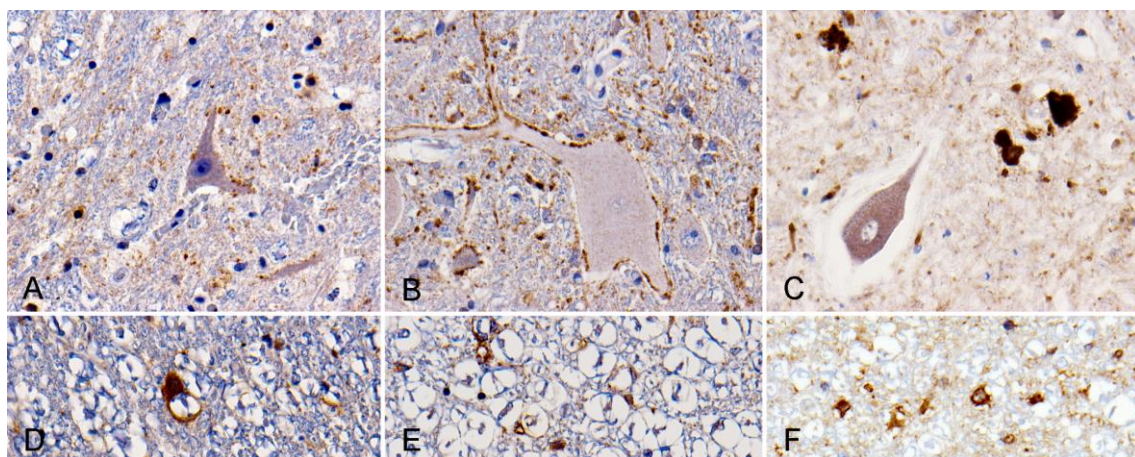


図 3-3 : p62 免疫染色。

A, D : 症例 1 (ビーゲル)、B, E : 症例 11 (non-DM PWC)、C, F : 症例 13 (DM)。

A-C : 頸髄腹角、D-F : 脊髄白質。すべての症例で神経網に顆粒状の p62 陽性像を認める。特に神経細胞体周囲で多くみられる。DM 症例の灰白質 (C) では、神経網で塊状の p62 強陽性像がみられる。いずれの症例でも白質に p62 陽性細胞を散見する (D-F)。

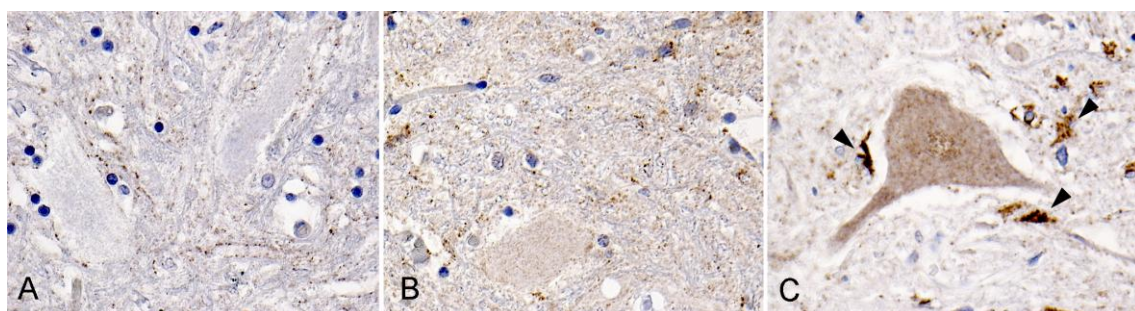


図 3-4 : NBR1 免疫染色。

A : 症例 2 (ビーグル)、B : 症例 7 (non-DM PWC)、C : 症例 15 (DM)、C5、腹角。ビーグル、non-DM PWC では神経網に微細顆粒状に NBR1 陽性像がみられる。DM 症例では主に神経細胞体周囲で強い NBR1 陽性像 (矢頭) を認める。

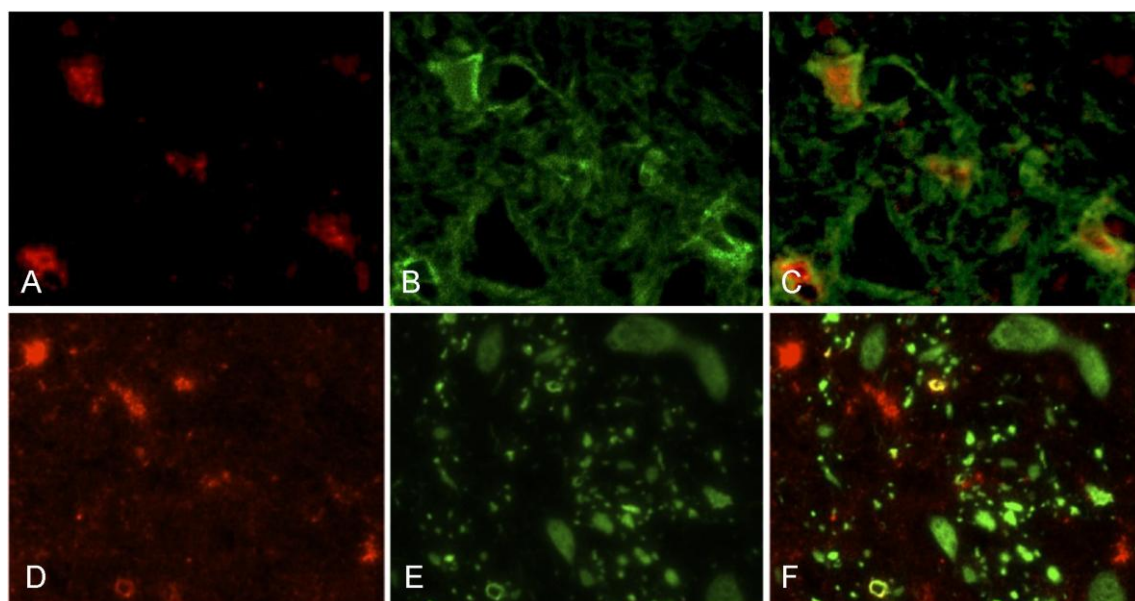


図 3-5 : 蛍光二重染色。

A-F : 症例 12 (DM 症例)、C5 灰白質。A-C : NBR1 (A) と GFAP (B) の蛍光二重染色 (C)。細胞質が NBR1 に陽性の GFAP 陽性細胞が多数みられる。

D-F : NBR1 (D) と  $\beta$ III-tubulin (E) の蛍光二重染色 (F)。稀に共局在を認める。



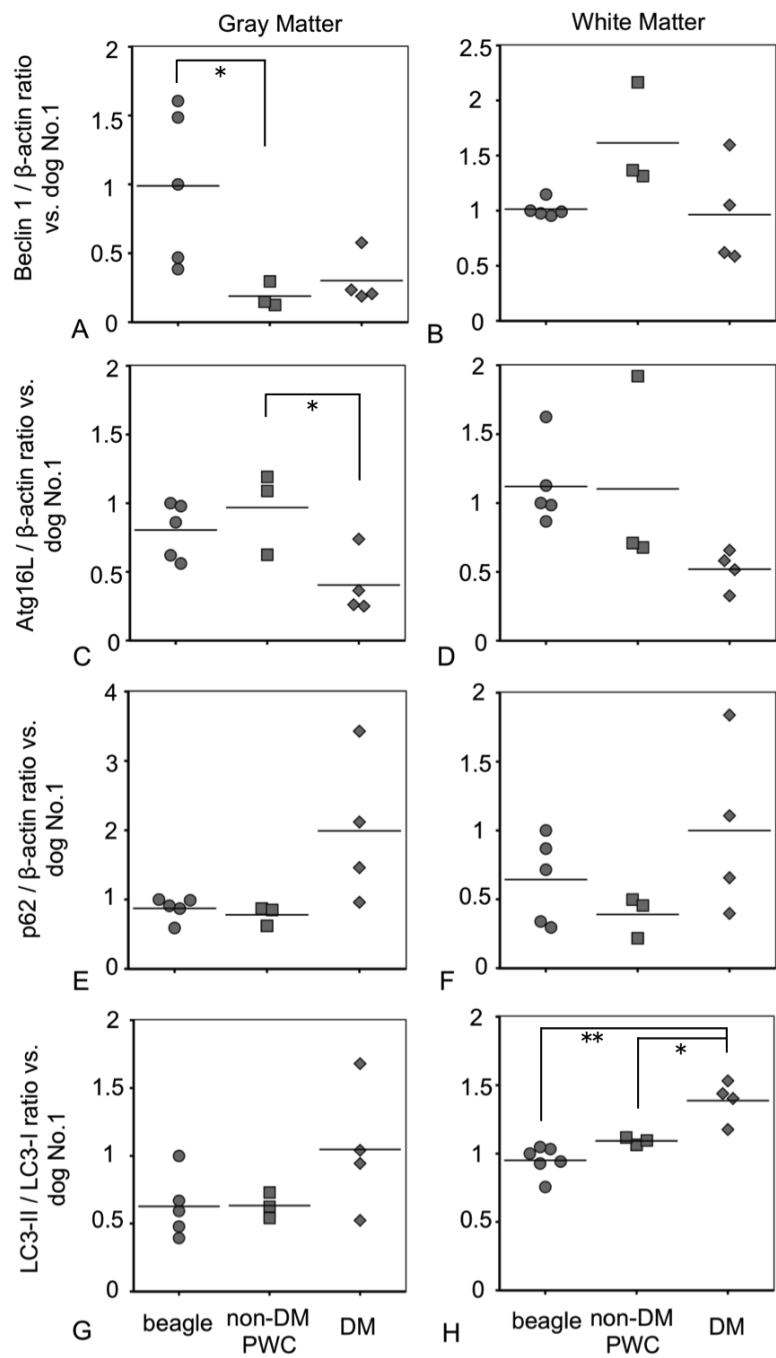


図 3-6 : ウェスタンブロッティングによる灰白質、白質における各種オートファジー関連タンパク質の定量。A, C, E, G : 灰白質、B, D, F, H : 白質。A, B : Beclin-1 /  $\beta$ -actin、C, D : Atg 16L /  $\beta$ -actin、E, F : p62 /  $\beta$ -actin、G, H : LC3-II / LC3-I。 \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ 。

## 第 4 章

**SOD1<sup>G93A</sup>** トランスジェニックマウスの  
脊髄病変に対する rotenone 投与の影響

序

ヒト変異 SOD1 遺伝子を導入した SOD1 トランスジェニックマウスは、ALS の病態モデルマウスとして汎用されてきた。この遺伝子を導入したマウスでは運動ニューロンの脱落がみられる[Gurney ME *et al.* 1994]のに対し、SOD1 遺伝子をノックアウトしたマウスでは神経系に異常が認められないこと[Reaume *et al.*, 1996]から、この ALS モデルでは SOD1 の機能不全 (loss of function) ではなく、変異 SOD1 タンパクが何らかの病的機序を獲得して神経傷害性を示す (gain of function) と考えられている。

最も汎用されている SOD1<sup>G93A</sup> トランスジェニックマウス (SOD1<sup>G93A</sup> マウス) は、生後 90 日齢ごろから明瞭な運動機能障害を呈し、およそ 120~130 日齢で死亡する[Gurney ME *et al.*, 1994]。このマウスでは、運動ニューロンの脱落に先立って、脊髓腹角の神経網およびニューロン細胞体において空胞変性がみられることが特徴である。この空胞はミトコンドリアの膜間腔の膨化に由来し、また変異 SOD1 がこの膜間腔に局在していると考えられている[Jaarsma *et al.*, 2000, Higgins *et al.*, 2003, Sasaki *et al.*, 2004]。ミトコンドリアは活性酸素種 (ROS) の主要な産生場である上、酸化ストレスによるダメージを受けやすいミトコンドリア DNA や呼吸鎖に関連した酵素が存在している。これらのことから、ミトコンドリアの機能障害に由来する酸化ストレスが ALS における神経変性機序の一つとして有力である。

一方、慢性投与により中枢神経系にミトコンドリア障害に由来する酸化ストレスをもたらす薬物として、rotenone が知られている。rotenone はミトコンドリア呼吸鎖複合体 I を阻害する作用を持つ天然の毒物で、呼吸鎖の反応を抑制することで余剰な ROS を発生させると考えられている。Rotenone を Lewis ラットに長期全身投与すると中脳黒質病変を誘発するため、主にパーキンソン病モデルの作製に用いられる[Alam, and Schmidt, 2002]。さらに Lewis ラットでは rotenone

投与による脊髄病変も報告されており [Samantaray *et al.*, 2007]、腹角ニューロンのアポトーシスの促進とグリオシスの増強が示されている。マウスではrotenoneを用いた研究は少なく [Richter *et al.*, 2007]、C57BL/6マウスへの長期経口投与により中脳黒質病変がみられることが報告されている [Inden *et al.*, 2011]ものの、脊髄病変について検討した報告はない。

SOD1<sup>G93A</sup>マウスでは、明瞭な機能障害が現れる前に上述のニューロン細胞体および神経網に空胞変性が出現するため、ミトコンドリアの変化が一連の病変形成の引き金であると考えられている [Kong and Xu, 1998]。したがって、このマウスでは発症前のミトコンドリア障害の程度がその後の病変の進行を規定している可能性がある。

本章では、SOD1<sup>G93A</sup>マウスの脊髄病変をALS患者およびDM症例のそれと比較するとともに、発症前のミトコンドリア障害の程度が病態進行に与える影響を明らかにする目的で、発症前にrotenoneを投与し、そのSOD<sup>G93A</sup>マウスへの影響を病理学的に検索した。また、主要な興奮毒性関連因子であるglutamate transporter-1 (GLT-1) と、オートファジー活性の指標であるMicrotubule-associated protein light chain (LC3) -II/LC3-I発現比率についても検索した。

## 材料と方法

### 動物

SOD1<sup>G93A</sup> [B6SJL-Tg (SOD1G93A) 1Gur/J, JAX Mice #002726]マウスおよび野生型の[B6SJL] (wild type : Wt) マウスは、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から購入した。実験には、雄性SOD1<sup>G93A</sup> (+/-) マウス (ヘミ接合体変異をもつマウス) と雌性Wtマウスとの交配により生まれたSOD1<sup>G93A</sup> (+/-) マウス (SOD1<sup>G93A</sup>マウス) の雄と、対照として同腹のWtマウスの雄を用いた。遺伝子型検査は、生後4週齢で採取したマウスの尾組織からMighty Amp Genotyping Kit (TaKaRa Bio、滋賀) を用いてDNAを抽出し、メーカーのプロトコルに従い standard PCRにより行った。PCRにはG93A変異SOD1プライマー (Forward : 5'-CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA-3'、Reverse : 5'-CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA-3') および内因性コントロールプライマー (Forward : 5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3'、Reverse : 5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-3') を用いた。

マウスは、自由給水、ペレット状固形飼料を給餌した。設定温度: 23°C (許容範囲: 20~26°C)、設定湿度: 55% (許容範囲: 40~70%)、明期 14 時間 (照明: 午前 8:00~午後 10:00)、暗期 10 時間に維持された動物飼育室で飼育した。また本試験では、マウスの正向反射が 30 秒間消失した時点を病態末期と定義し、この状態になった個体については即日安楽殺し、解剖した。動物実験は東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物委員会の承認を得たうえで、東京大学動物実験実施規定に従って行った。

### 薬物投与

6 週齢 (42 日齢) から薬物投与試験を開始した (表 4-1、図 4-1)。SOD1<sup>G93A</sup>

マウスは rotenone 投与群 (Rot 群) と溶媒投与群 (DMSO/polyethylene glycol 300 : D/P 群) のそれぞれにつき 70 日齢 (発症前)、100 日齢 (発症前後)、120 日齢 (発症後) で解剖する計 6 群、Wt マウスは Rot 群、D/P 群のそれぞれ 120 日齢で解剖する 2 群、合計で 8 群を設定した。Rotenone の投与には浸透圧ポンプ (The alzet osmotic pump 2004、ALZET Osmotic Pumps、Cupertino、CA、USA) を用い、メーカーのプロトコルに従い 28 日間投与した。投与速度が 3.0 mg/kg/day となるよう 1:1 (v/v) の DMSO/polyethylene glycol 300 混合液に rotenone を溶解し、ポンプに充填した。これを抱水クロラル鎮静下でマウスの背部皮下に埋め込んだ。6 週間経過後、必要に応じてポンプを摘出した。

#### 体重・運動評価

投与開始後、週 1 回体重を計測した。運動評価については 120 日齢解剖群 (n=3~5) を用い、以下の 2 種類の試験を行った。

##### 1) 後肢伸展試験

マウスの尾を保持した状態で後肢の伸展について、2:両後肢伸展、1:片後肢のみ伸展または両後肢ともに伸展せず、0:両後肢拘縮 (伸展不能) の 3 段階でスコアリングした。後肢伸展試験は週 1 回行った。

##### 2) 金網ぶらさがり試験

Weydt らによる報告[Weydt *et al.*, 2003]を参考に設定した。地面から 30 cm の高さに目の大きさが 6 mm × 6 mm の十分な面積のあるアルミニウム製網を水平に置き、マウスを 10 秒程度置いた後に金網を上下逆にしてマウスがぶら下がるようにした。この時点を 0 秒とし、マウスが金網から落下するまでの時間を最大 120 秒まで計測した。30 秒未満で落下した場合は、最大 3 回まで再試験し、最も長い時間を記録した。この試験は週 1 回行った。

## 病理組織学・免疫組織化学・蛍光二重染色

解剖時にマウスの脊髄組織を採取し、10%リン酸緩衝ホルマリンで固定後、常法に従い4  $\mu\text{m}$  の厚さでパラフィン切片を作製した。この切片を用いてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、ルクソール・ファスト・ブルー (LFB) -HE 染色、クリューバー・バレラ (KB) 染色、TUNEL 法および免疫組織化学を行った。脊髄腹角における空胞変性の程度は LFB-HE 染色標本を用いて評価し、0 (なし) ~3 (重度) の4段階でスコアリングした。腹角ニューロンは脊髄腹角に認められた NeuN 陽性かつニューロンの形態的特徴をもつ細胞とした。

免疫組織化学に用いた抗体を表 4-2 に示した。脱パラフィンした組織切片を表に示した条件で、オートクレーブにより 120°C 10 分間の抗原賦活化を行った。以降、切片の洗浄には 0.2% の Tween20 を添加したトリス緩衝液 (Tris-buffered solution, TBST) を用いた。全ての切片を 3% 過酸化水素・メタノール溶液で室温 5 分間処理して内因性ペルオキシダーゼの不活化を行い、ブロッキング溶液 (8% スキムミルク・TBST) で 37°C、40 分間処理して非特異反応を抑制した後、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体と 4°C で一晩反応させた。二次抗体は horseradish peroxidase (HRP) 標識ポリマー試薬 (抗ウサギ-または抗マウス-IgG, Envision polymer, Dako, Glostrup, Denmark) を使用し、37°C、40 分間反応させた。0.05% の DAB (Dojindo Laboratories、大分) 溶液に最終濃度 0.1% になるよう  $\text{H}_2\text{O}_2$  (和光純薬、大阪) を添加して発色に用いた。対比染色にはヘマトキシリンを用いた。

蛍光二重染色は上記免疫組織化学と同様に脱パラフィンした切片に抗原賦活化を行い、切片を一次抗体と反応させた後、TBST を用いて洗浄した後に他方の一次抗体と反応させた。使用した一次抗体は表 2 に示した。その後、TBST で希

積したフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識マウス IgG 抗体 (1:100 希釈、Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) または Alexa 488 標識ヤギ抗体 (1:100 希釈、Invitrogen Life Technologies) と Alexa 594 標識ウサギ IgG 抗体 (1:100、Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) の混合液と室温で 1 時間反応させた。その後、封入剤 (Vector Laboratories) で封入後、蛍光顕微鏡 DMI3000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて観察した。

#### TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出

アポトーシス細胞の検出は *In situ* apoptosis detection kit (TaKaRa Bio) を用いて TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法により行った。脱パラフィンした切片を 100 µg / ml Proteinase K と 37°C、30 分反応させた。その後、TdT 酵素反応液と 37°C で 90 分、HRP ラベリング反応液と 37°C で 60 分反応させ、0.05% の DAB (Dojindo Laboratories) 溶液に最終濃度 0.1% になるよう H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (和光純薬) を添加して発色に用いた。対比染色にはメチルグリーンを用いた。

#### データ解析

脊髄の病理組織学的変化は、頸髄 (C5)、頭側胸髄 (T5)、尾側胸髄 (T10)、腰髄 (L3) の 4 ヶ所で観察し、定量的評価には T10 を用いた。脊髄標本の組織像は Nikon DM-U3 デジタルカメラおよび NIS-Elements ソフトウェア (Nikon Instruments, 東京) を用いて撮影した。画像解析は National Institutes of Health (NIH) Image J ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて行った。すなわち、カラーチャンネルを RGB 8-bit イメージに分離し、閾値 (threshold) の設定により陽性領域を検出し、その面積比率を測定した。GFAP、Iba1、Ubiquitin の陽性面積は脊髄断面積に対する比率として、GLT-1 の陽性領域は灰白質全体の



面積に対する比率として算出した。

得られた結果は、平均値±標準誤差で示した。データは 2 群間については Student の  $t$  検定、多群間については一元配置分散分析 (one-way ANOVA) における Sheffe's  $F$  test を用いて検定し、 $p < 0.05$  のとき統計学的に有意であると判断した。

#### 組織からのタンパク質の抽出

頸髄 (C1~3) 材料は使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。タンパク質抽出用緩衝溶液 (1 mM EDTA および protease inhibitor cocktail (5% v/v) を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) ) を添加し、氷冷しながら攪拌子 (Tissue Prep, Nippi、東京) を用いて攪拌した。これを 12,000G、 $4^{\circ}\text{C}$ で 20 分間遠心した後、上清を回収して組織タンパク質サンプルとした。サンプルは $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。タンパク質量はタンパク質定量システム (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) および吸光光度計 (Bio-Rad Laboratories) を用いて Lowry 法により定量した。サンプルは5%のメルカプトエタノールを含む sodium dodecyl sulfate (SDS) 処理液 ((Laemmli sample Buffer, Bio-Rad Laboratories) と 1:1 の割合で混合し、 $100^{\circ}\text{C}$ で 10 分間煮沸した後、ウェスタンブロッティング法に用いた。

#### ウェスタンブロッティング

15%ポリアクリルアミドゲル(ATTO、東京)を用いて室温で 90 分電気泳動 (ゲル 1 枚あたり 20mA 定電流) 後、あらかじめ 100% メタノールで親水化処理したタンパク質ブロッティング用ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) に、90 分間ブロッティング (25 mV 定電圧) を行った。ブロッティング終了後、膜を TBST (0.05% Tween-20 および 137 mM

NaCl を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液、pH 7.5) で洗浄し、3% スキムミルクを含む TBST で 60 分間ブロッキングを行った。この膜を TBST で 5 分間洗浄した後、3% スキムミルクを含む TBST で希釈した抗 LC3 抗体 (表 4-2) と 4°C で振盪しながら一晩反応させ、反応後 TBST で 5 分間 3 回洗浄した。次に、3% スキムミルクを含む TBST で希釈した HRP 標識 2 次抗体 (GE Healthcare, 1:5,000) と室温で 2 時間～一晩反応させ、反応後 TBST で 10 分間 3 回洗浄した。その後、化学発光検出試薬 (ECL prime、 GE Healthcare) と反応させ、ルミノ・イメージアナライザー (Chemi-Doc、 Bio-Rad) および画像解析ソフト (Image Lab、 Bio-Rad) を用いて陽性バンドを検出・定量した。

## 結果

### 生存率

SOD1<sup>G93A</sup> マウスの D/P 群のうち 1 匹を 120 日齢で方法に示した基準により病態末期と判定し、解剖した。その他のマウスについては解剖予定日齢までに病態末期と判定したものはなかった。上記の 1 個体は判定日が解剖予定日齢であったため、以降の解析において他の個体と区別しなかった。

### 体重、運動機能の変化

D/P 群と Rot 群それぞれの SOD1<sup>G93A</sup> マウスは、Wt マウスの間 105 日齢以降で有意に体重が少なく、119 日齢で後肢伸展試験のスコアが有意に低かった。ぶら下がり試験では D/P 群で 105 日齢以降、Rot 群で 112 日齢以降で有意にスコアが低下した。投与開始時から解剖時（120 日齢）まで、SOD1<sup>G93A</sup> マウス、Wt マウスともに D/P 群と Rot 群の間に体重、後肢伸展試験およびぶら下がり試験の結果に有意な差は認められなかった（図 4-2）

### 病理組織学

SOD1<sup>G93A</sup> マウスの脊髄、特に 100 日齢と 120 日齢では、D/P 群、Rot 群ともに、腹角を中心に灰白質ニューロンの細胞体および樹状突起の変性、膨化、スフェロイドの形成および脱落を認めたが、明瞭な封入体は認められなかった。各日齢の神経網および 70 日齢と 100 日齢のニューロン細胞体内には空胞がみられた（図 4-3、A、B）。これら空胞の辺縁はミトコンドリアマーカである SOD2 に陽性、部分的に SOD1 強陽性であった（図 4-3、C-F）。脊髄腹角における空胞変性の程度を 0（なし）～3（重度）の 4 段階でスコアリングした（図 4-3）ところ、70 日齢では Rot 群で D/P 群と比較して強い傾向が、100 日齢では同程度、120 日

齢では Rot 群でより弱い傾向がみられた。SOD2 の陽性像は空胞の辺縁以外に Wt マウス、SOD1<sup>G93A</sup> マウスともに正常な形態をもつニューロンの細胞質にも顆粒状に充満して認められ、神経網には顆粒状、疎に認められた。

SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは、日齢に比例して腹角における NeuN 陽性ニューロン数の顕著な減少がみられ、Rot 群、D/P 群ともに 120 日齢では大型の腹角ニューロンが消失していた (図 4-4)。Rot 群では D/P 群と比較して 100 日齢で NeuN 陽性ニューロンが少ない傾向がみられ、120 日齢では有意に少なかった。Wt マウスでは、D/P 群と Rot 群の間に差を認めなかった。SOD1<sup>G93A</sup> マウスの白質では軽度の空胞化を認めたものの、形態的变化に乏しかった。脊髓断面に占める LFB 陽性面積には Wt マウス、SOD1<sup>G93A</sup> マウスのいずれの日齢とも D/P 群と Rot 群の間に差を認めず、また、日齢による差、Wt マウスと SOD1<sup>G93A</sup> マウスとの差も認められなかった (図 4-5)。

#### TUNEL 法および酸化的損傷の評価

髄膜においてまれに TUNEL 陽性のアポトーシス細胞が認められたが、脊髓実質にはいずれの群でも陽性細胞は認められなかった。また、細胞の酸化的損傷を調べるため 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の免疫組織化学により検索したが、有意な染色性は認められなかった (データは示していない)。

#### ユビキチン陽性面積の変化

ユビキチン陽性像は 120 日齢の SOD1<sup>G93A</sup> マウスでのみ認められた (図 4-6)。脊髓断面に占めるユビキチン陽性面積率は、Rot 群で D/P 群と比べて有意に高かった (図 4-6、A-E)。蛍光二重染色の結果、ユビキチン陽性像の大部分は NeuN 陽性のニューロン細胞体内および樹状突起内でみられ、稀にユビキチンと GFAP

の共局在が認められた (図 4-6、F、G)。またユビキチンはごく一部で Cytochrome C と共局在していた。

#### *グリオシスの程度*

アストロサイトとミクログリアの増生の程度を調べるため、脊髄断面に対する GFAP と Iba1 の陽性面積率を算出した。SOD1<sup>G93A</sup> マウス、Wt マウスともに 120 日齢において GFAP 陽性面積率は Rot 群で D/P 群と比較して有意差は認められなかったものの、高い傾向がみられた (図 4-7)。SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは 70 日齢において Iba1 陽性面積は Rot 群で D/P 群と比べて有意に高く、100 日齢、120 日齢では Rot 群でやや高値の傾向がみられた (図 4-8)。

#### *GLT-1 陽性面積の変化*

灰白質に占める GLT-1 の陽性面積の割合は、SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは 70 日齢、100 日齢いずれにおいても Rot 群で D/P 群に比べて低い傾向がみられ、120 日齢では有意に低かった (図 4-9)。Wt マウスでは D/P 群と Rot 群の間に差はなかった。D/P 群では Wt マウスと SOD1<sup>G93A</sup> マウスの間に差はなかった。

#### *LC3-I、LC3-II の変換率の変化*

120 日齢の脊髄を用いて、LC3-I から LC3-II への移行についてウェスタンブロッティング法により検索した (図 4-10)。18kDa の LC3-I と 16kDa の LC3-II の 2 本のバンドが得られた。これらのバンドについて定量し、発現比率 (LC3-II/LC3-I) を求めた結果、LC3-II の比率は Wt マウスでは Rot 群で D/P 群に比べて高い傾向がみられたが、SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは Rot 群と D/P 群との間に有意差はなかった。

## 考察

神経網およびニューロンの空胞変性を特徴とする SOD1<sup>G93A</sup> マウスの腹角病変は D/P 群と Rot 群で共通してみられ、過去の報告に一致した[Higgins *et al.*, 2003]。この空胞は SOD2 の染色性からミトコンドリア膜間腔内に生じたものと考えられ、またそこに SOD1 が蓄積している点でも報告と一致した。ニューロンにはこの他に膨化と色質融解がみられたが、今回の検索では封入体は認められず、SOD1<sup>G93A</sup> マウスのニューロンに封入体が見られたという報告[Watanabe *et al.*, 2001]と矛盾した。120 日齢の SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは D/P 群、Rot 群ともに大型ニューロンが残存していなかったことから、ALS の場合と同様、大型ニューロンの選択的脱落が示唆された。一方、ALS や DM では腹角ニューロンの脱落と並んで最も特徴的な病変である側索や背索における顕著な髄鞘・軸索の脱落は SOD1<sup>G93A</sup> マウスでほとんどみられず、SOD1<sup>G93A</sup> マウスと ALS および DM では病変形成の過程が異なると考えられた。さらに蓄積したユビキチン陽性像の局在から、異常タンパクの蓄積はニューロンの細胞体内に限局していることも示された。このように、SOD1<sup>G93A</sup> マウスに認められる主要な病理学的変化は、一部を除いて ALS、あるいは DM とは大きな相違があった。これらの事実から、このトランスジェニックマウスを ALS の病態モデルマウスとして扱うことについては慎重さを要すると考えられた。

SOD1<sup>G93A</sup> マウスでみられた空胞変性は Rot 群で D/P 群と比較してより早期から認められていることから、rotenone 投与によるミトコンドリア呼吸鎖の制止がミトコンドリアの空胞化を促進し、この結果としてニューロンの脱落やユビキチン沈着が増強されたものと推察された。また、このニューロン脱落にアポトーシスは関与しないと考えられた。さらに、Wt ではニューロン細胞数に D/P 群、Rot 群間に差がなかったことから、rotenone の毒性は SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは組織

学的変化を誘導するが、Wt では病変を形成しないことが示された。この点は Lewis ラットでの報告[Samantaray *et al.*, 2007]と異なっていた。

SOD1<sup>G93A</sup> マウスではアストロサイトおよびミクログリアの増生が rotenone 投与終了直後に増強される傾向がみられた。Rotenone 投与による顕著なグリオシスは過去に報告されている[Samantaray *et al.*, 2007]。今回観察されたグリオシスは投与終了直後の 70 日齢では 100 日齢や 120 日齢と比較して両群ともに弱く、また主に灰白質でみられたことから、空胞変性やニューロンの脱落などに続く二次的な変化であると考えられた。

GLT-1 はアストロサイト膜上に発現する主要な興奮性アミノ酸トランスポーターであり、この発現が低下すると興奮毒性の原因となる。ALS 患者では GLT-1 の発現が低下することが知られており、運動ニューロンは特に興奮毒性に脆弱であるため、重要な病態進行因子と考えられている[Rotherin *et al.*, 1992 and 1995]。GLT-1 の発現は、第 2 章での検索により DM 症例においても低下していることが示された。SOD1<sup>G93A</sup> マウスの脊髄における GLT-1 の発現レベルの低下については、時期や程度が報告により様々である[Bendotti *et al.*, 2001、Deitch *et al.*, 2002、Guo *et al.*, 2010、Hong *et al.*, 2003]。今回の検索の結果、D/P 群では、SOD1<sup>G93A</sup> マウスで Wt マウスと比較して GLT-1 の明瞭な発現低下はみられなかったことから、このマウスでは興奮毒性が病変の形成には積極的に関わっていないと考えられた。一方で、SOD1<sup>G93A</sup> マウスの Rot 群では 70 日齢から D/P 群と比較して GLT-1 の発現が低下する傾向がみられた。Wt マウスでは D/P 群と Rot 群の間に差を認めなかったことから、SOD1<sup>G93A</sup> マウスでみられた GLT-1 の発現低下は、GLT-1 発現低下が置きやすいという素因に加えて、rotenone によるストレスによるものと考えられた。

LC3-I から LC3-II への変換はオートファゴソーム形成過程における重要な段

階であり、オートファゴソーム形成の指標となる。SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは、オートファジー関連因子の病態への関与を裏付ける情報が蓄積されつつあり、オートファゴソーム形成促進が、病変形成の増悪因子になることが示されている [Morimoto *et al.*, 2007、Zhang *et al.*, 2011]。しかし今回の検索では、120 日齢の Wt マウスで D/P 群と Rot 群の間に LC3-II/LC3-I 比率に有意な差を認めたが、ニューロン脱落などの病変に差はなかった。これに対し、同日齢の SOD1<sup>G93A</sup> マウスの D/P 群と Rot 群の間では LC3-II/LC3-I 比率に差を認めなかったものの、病変には差がみられた。このことから、rotenone は Wt マウスでは LC3-I から LC-3II への変換に影響を与えている可能性があると考えられたが、SOD1<sup>G93A</sup> マウスではその影響はなく、LC3-II への変換と病変形成は関連しないと考えられた。

本章で得られた結果から、SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは、Rot 群で rotenone 投与終了以降、脊髄の病変が D/P 群と比べて重度になる傾向がみられたことから、rotenone 投与によるミトコンドリアの機能障害の増悪が病態の進行を速めることが分かった。このことは同時に、ミトコンドリア障害が発症の引き金になることも示している。体重および運動機能には Rot 群と D/P 群の間に差がみられなかったことから、脊髄の器質的変化が直ちに運動機能に反映されるわけではないことも示された。また、Wt マウスでは D/P 群と Rot 群の間に病変の差を認めなかったことから、rotenone はニューロン変性の素因をもたない個体には影響を与えないことも明らかとなった。



## 要約

第4章ではALSモデルとして最も汎用されているSOD1<sup>G93A</sup>トランスジェニックマウスを用いた検索を行った。このマウスの主要な脊髄病変はミトコンドリア障害に由来するニューロンと神経網の空胞変性である。ミトコンドリア障害を促進するため、呼吸鎖複合体Iの阻害作用をもつrotenoneを発症前に28日間継続投与し、運動機能の変化および発症前（70日齢）、発症後（100日齢）および末期（120日齢）における脊髄組織病変を検討した。この結果、SOD1<sup>G93A</sup>マウスにrotenoneを投与した群（Rot群）では、溶媒のみを投与した群（D/P群）と比較して、120日齢でより重度の腹角ニューロンの脱落がみられた。腹角の空胞変性については70日齢ではRot群でみられ、D/P群ではほとんどみられなかったが、100日齢では両群で同程度、120日齢ではRot群の方がD/P群より弱い傾向であり、Rot群ではより早く病変が形成され収束したものと考えられた。またSOD1<sup>G93A</sup>マウスにおけるグリア細胞の増生はRot群でD/P群より強い傾向がみられた。また、アストロサイト膜上に存在する興奮性アミノ酸トランスポーターであるGLT-1の発現はRot群で低かった。このようなグリア細胞の変化がニューロン変性後の反応性のものとする、すべての病変形成がrotenone投与によってより早期におこっていると考えられた。一方でSOD1<sup>G93A</sup>マウスのLC3-II/LC3-I比に対するrotenoneの影響はみられず、この病変形成の早期化にはオートファジーが積極的に関わっていないと考えられた。以上の結果より、SOD1<sup>G93A</sup>マウスでは、発症前にミトコンドリア障害を増強すると脊髄病変がより早く進行すること、すなわちミトコンドリア障害が病態の発症に重要であることが推察された。

表4-1：投与群の概要

遺伝子型	投与物質	投与経路	投与量	投与日齢（期間）	匹数	解剖日齢
SOD1 <sup>G93A</sup>	DMSO/PEG300	SC via osmotic pump	300 µl/kg/d	42-70 (for 28 days)	3	70
SOD1 <sup>G93A</sup>	Rotenone	SC via osmotic pump	3 mg/kg/d	42-70 (for 28 days)	3	70
SOD1 <sup>G93A</sup>	DMSO/PEG300	SC via osmotic pump	300 µl/kg/d	42-70 (for 28 days)	3	100
SOD1 <sup>G93A</sup>	Rotenone	SC via osmotic pump	3 mg/kg/d	42-70 (for 28 days)	3	100
SOD1 <sup>G93A</sup>	DMSO/PEG300	SC via osmotic pump	300 µl/kg/d	42-70 (for 28 days)	3	120
SOD1 <sup>G93A</sup>	Rotenone	SC via osmotic pump	3 mg/kg/d	42-70 (for 28 days)	4*	120
Wt	DMSO/PEG300	SC via osmotic pump	300 µl/kg/d	42-70 (for 28 days)	3	120
Wt	Rotenone	SC via osmotic pump	3 mg/kg/d	42-70 (for 28 days)	5*	120

Wt: 同腹のワイルドタイプ (B6SJL) マウス。

\*ウエスタンブロットはこのうち3匹を用いた。

表4-2：用いた一次抗体

抗体名	種類	認識細胞・構造	抗原賦活化	希釈倍率	販売元、製品番号
GFAP	Rabbit, p	アストロサイト	なし	1:1000	Dako, Glostrup, Denmark, #Z0334
GFAP	Goat, p	アストロサイト	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:200 (IF)	Santa Cruz, CA, USA, #sc-6170
Iba1	Rabbit, p	ミクログリア	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:500	Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan, #019-19741
NeuN	Mouse, m (A60)	ニューロン	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:200	Millipore, Billerica, MA, USA, #MAB377
ubiquitin	Rabbit, p	-	なし	1:200	Dako, #Z0458
SOD1	Rabbit, p	-	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:200	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, US, #ADI-SOD-100
SOD2	Rabbit, p	-	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:200	ENZO Life Sciences, #ADI-SOD-110
EAAT2 (GLT-1)	Rabbit, p	-	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:1000	Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan #015-16421
LC3	Rabbit, p	-	Citrate Buffer (pH 6.0)	1:1000 (WB)	MBL, Nagoya, Aichi, Japan #PM036

GFAP: Glial fibrillary acidic protein, Iba1: Ionized calcium-binding adapter molecule 1, EAAT: Excitatory amino acid transporter, GLT-1: Glutamate transporter 1, m: Monoclonal, p: Polyclonal, IF: Immunofluorescence, WB: Western blot

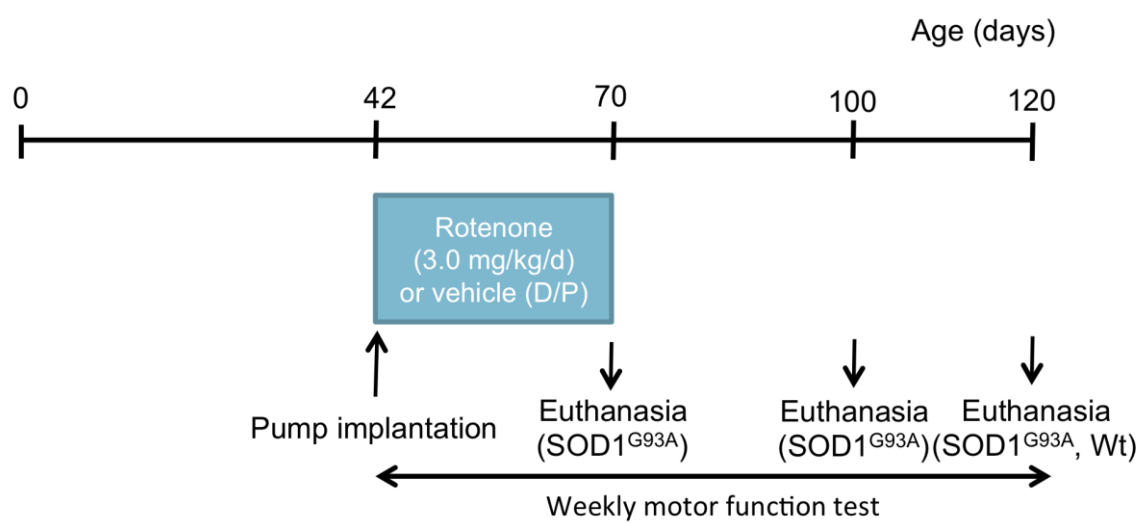


図 4-1 : 実験プロトコル。

42 日齢（6 週齢）のマウスの背部皮下に溶媒（DMSO/polyethylene glycol 300 等量混合液）または rotenone を溶解した溶媒を充填した浸透圧ポンプを埋め込んだ。

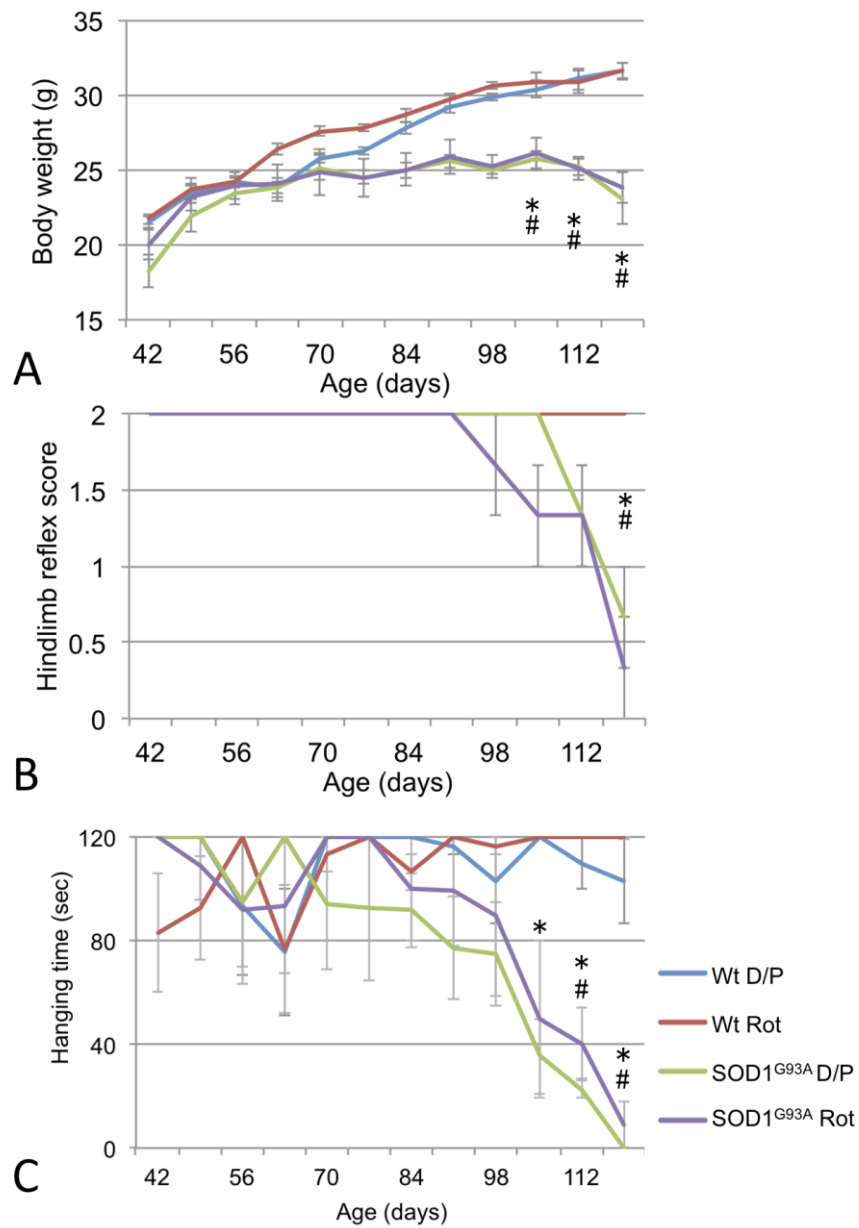


図 4-2 : 体重と運動機能の変化。

A : 体重、B : 後肢伸展試験、C : 金網ぶら下がり試験。体重、運動機能試験とともに、Wt マウスと SOD1<sup>G93A</sup> マウスのそれぞれで、D/P 群と Rot 投与群の間に有意な差を認めない。\*Wt マウスと SOD1<sup>G93A</sup> マウスの D/P 群間、# Wt マウスと SOD1<sup>G93A</sup> マウスの Rot 群間、 $p < 0.05$ 。

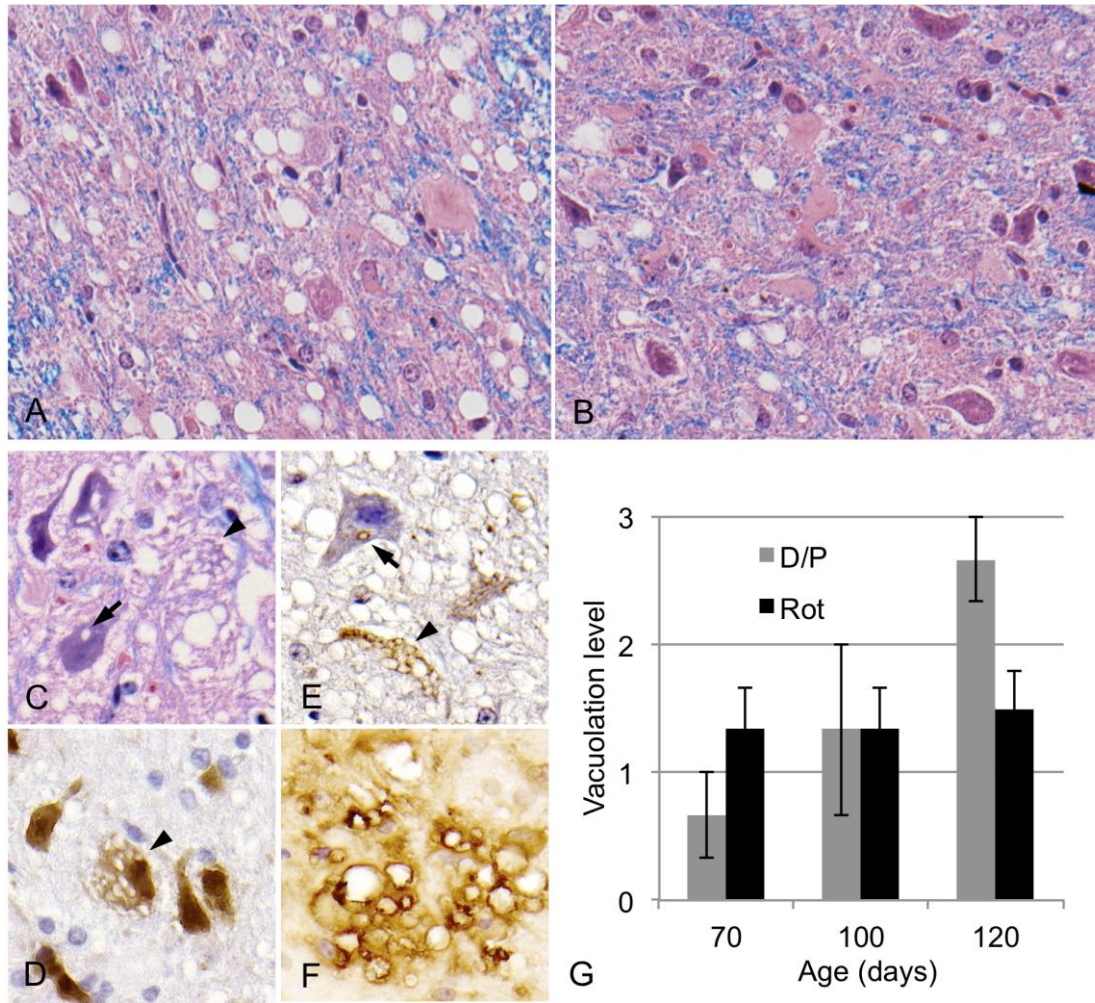


図 4-3 : SOD1<sup>G93A</sup> マウスの腹角の病理組織学的変化。

A、B : SOD1<sup>G93A</sup> マウス、120 日齢、尾側胸髄、腹角、D/P 群 (A)、Rot 群 (B)。LFB-HE 染色。SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは D/P 群と R 群両方の脊髄、特に腹角においては様々な程度に空胞変性が認められる。またニューロンの細胞体や突起の変性 (膨化)、スフェロイドの形成も認められる。封入体はみられない。C-F : SOD1<sup>G93A</sup> マウス、100 日齢、D/P、尾側胸髄、腹角。LFB-HE (C)、NeuN (D)、SOD2 (E)、SOD1 (F)。空胞は神経網およびニューロンの細胞体内に認められ、細胞体に単数 (矢印) または多数の空胞をもつニューロン (矢頭) がみられる。細胞体内外いずれも、これらの空胞の辺縁は SOD2 および SOD1 に陽性。G : SOD1<sup>G93A</sup> マウスの尾側胸髄の腹角における空胞化の程度を 0~3 の 4 段階に数値化したもの。70 日齢では Rot 群でより強く、100 日齢では同程度、120 日齢では D/P 群でより強い傾向がみられた。

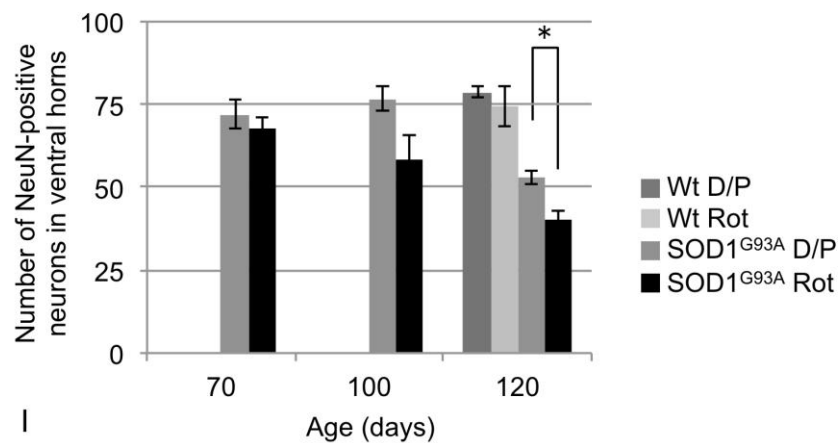
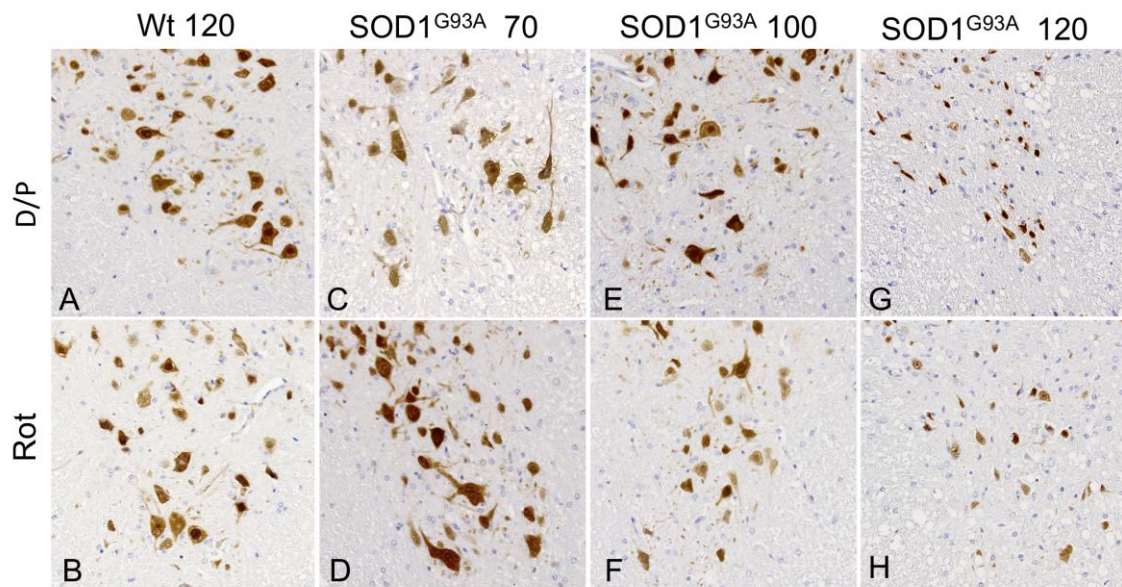


図 4-4 : NeuN 免疫染色。

A-H : 尾側胸髄、腹角。Wt の 120 日齢 (A, B)、SOD1<sup>G93A</sup> マウスの 70 日齢 (C, D)、100 日齢 (E, F)、120 日齢 (G, H)。A, C, E, G : D/P 群、B, D, F, H : Rot 群。

I: 腹角の NeuN 陽性ニューロン数。ニューロン数は SOD1<sup>G93A</sup> マウスの 70 日齢、100 日齢で D/P 群と比較して Rot 群で少ない傾向がみられ、120 日齢では有意に少ない。Wt マウスでは D/P 群と Rot 群の間に差がない。120 日齢の SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは他の群に認められた大径ニューロンを認めない。\* $p < 0.05$ 。

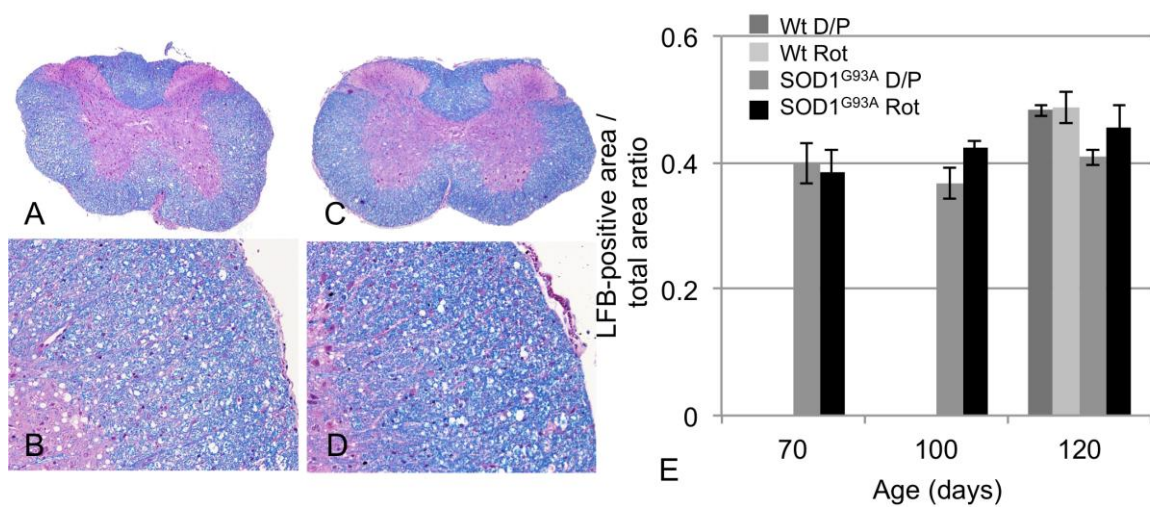


図 4-5 : LFB-HE 染色。

A-D : 尾側胸髄断面 (A, C) および側索の拡大像 (B, D) A, B : SOD1<sup>G93A</sup> マウス、120 日齢、D/P 群。C, D : SOD1<sup>G93A</sup> マウス、120 日齢、Rot 群。E : 脊髄断面面積に占める LFB 陽性面積の割合。D/P 群、Rot 群いずれも白質で軽度の空胞変性を認めるものの、特記すべき形態的变化は認められず、また LFB 陽性面積率に Wt マウス、SOD1<sup>G93A</sup> マウスを含む全ての群間に有意差を認めない。



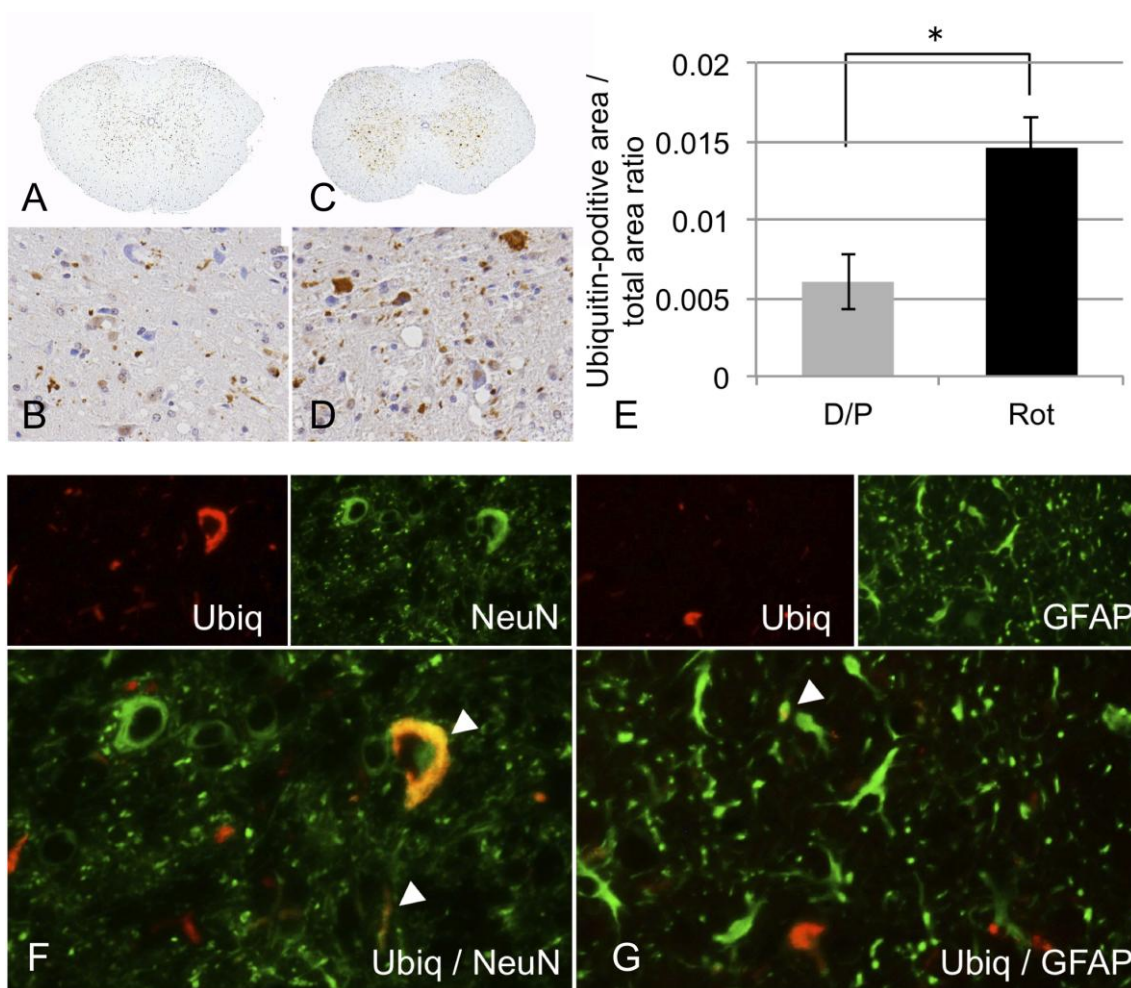


図 4-6 : ユビキチン免疫染色。

尾側胸髄。A、B : SOD1<sup>G93A</sup> マウス、120 日齢、D/P 群。C、D : SOD1<sup>G93A</sup> マウス、120 日齢、Rot 群。B、D は A、C の腹角強拡大像。ユビキチン陽性像は 120 日齢の SOD1<sup>G93A</sup> マウスでのみ認められる。E : SOD1<sup>G93A</sup> マウス、120 日齢ユビキチン陽性面積率。Rot 群で有意に大きい。F、G : SOD1<sup>G93A</sup> マウス、120 日齢、Rot 群、腹角、蛍光二重染色。F : ユビキチン (赤)、NeuN (緑)、陽性像の大部分は NeuN 陽性のニューロン細胞体内および樹状突起内に認められる。G : ユビキチン (赤)、GFAP (緑)。ユビキチン。稀にユビキチンと GFAP の共局在が認められる。\*  $p < 0.05$ 。

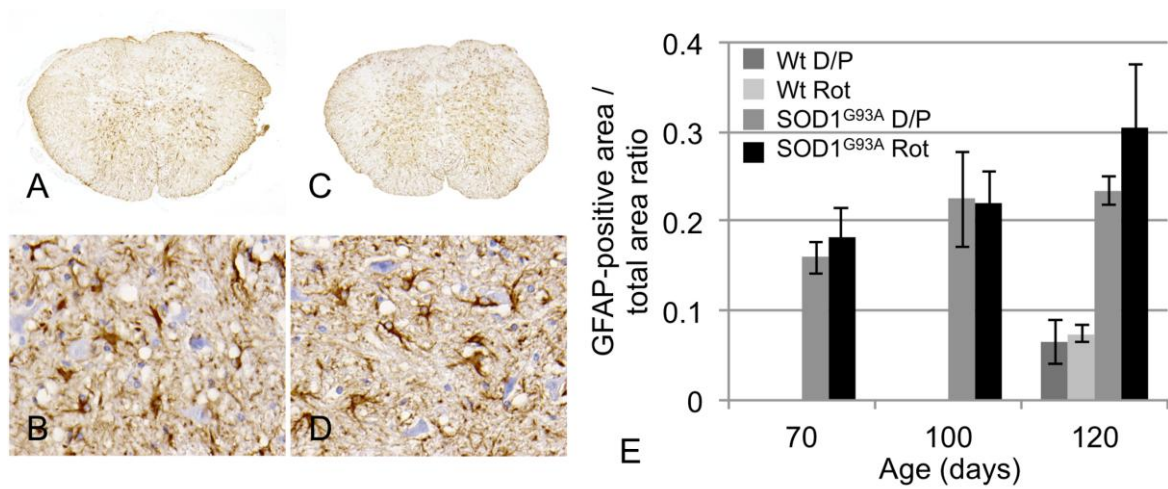


図 4-7 : GFAP 免疫染色。

A-D : 尾側胸髄断面 (A, C) および腹角の拡大像 (B, D) A, B : SOD1<sup>G93A</sup> マウス、120 日齢、D/P 群。C、D : SOD1<sup>G93A</sup> マウス、120 日齢、Rot 群。E : 脊髄断面積に占める GFAP 陽性面積の割合。SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは 120 日齢において Rot 群で GFAP 陽性率がより高い傾向がみられるが、他の日齢では D/P 群と R 群の間に差を認めない。

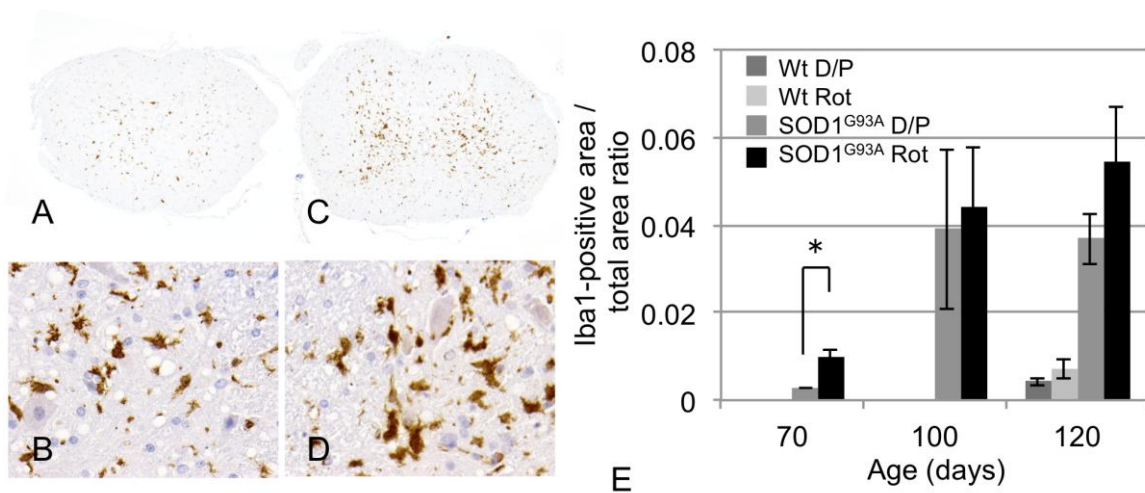


図 4-8 : Iba1 免疫染色。

A-D : 尾側胸髄断面 (A, C) および腹角の拡大像 (B, D)。A, B : SOD1<sup>G93A</sup> マウス、120 日齢、D/P 群。C、D : SOD1<sup>G93A</sup> マウス、120 日齢、Rot 群。E : 脊髄断面積積に占める Iba1 陽性面積の割合。SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは 70 日齢において Rot 群で D/P 群に比べて Iba1 陽性率が有意に高く、また 120 日齢でも Rot 群で高い傾向がみられる。\*  $p < 0.05$ 。

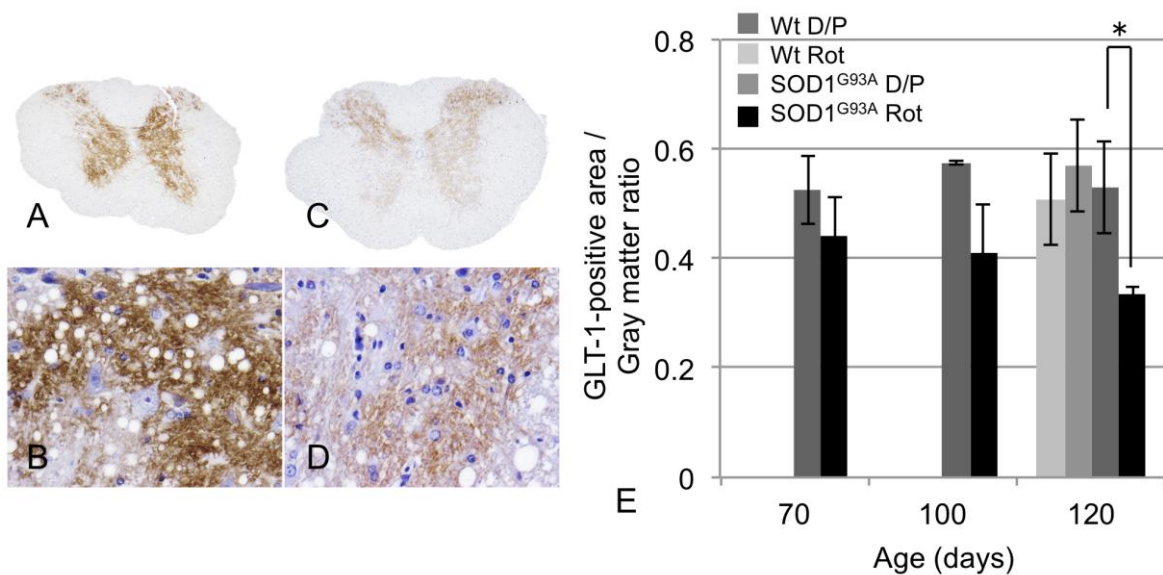


図 4-9 : GLT-1 免疫染色。

A-D : 尾側胸髄断面 (A, C) および腹角の拡大像 (B, D)。A、B : SOD1<sup>G93A</sup> マウス、120 日齢、D/P 群。C、D : SOD1<sup>G93A</sup> マウス、120 日齢、Rot 群。GLT-1 の陽性像は灰白質に限局してみられる。E : 灰白質に占める GLT-1 陽性面積の割合。SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは 70 日齢、100 日齢いずれにおいても D/P 群より Rot 群の方が低い傾向がみられ、120 日齢では有意に低い。Wt マウスでは D/P 群と Rot 群の間に差を認めない。Wt マウスと SOD1<sup>G93A</sup> マウスの D/P 群の間に差を認めない。\*  $p < 0.05$ 。

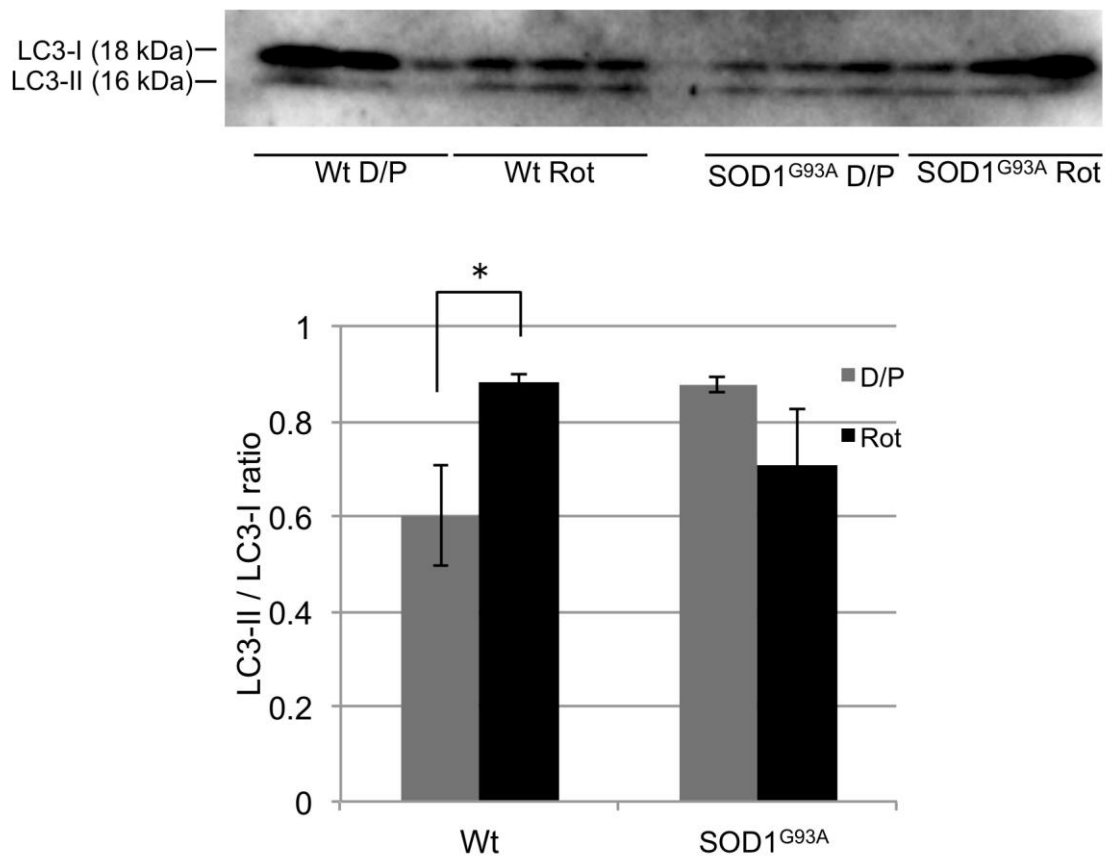


図 4-10 : ウェスタンブロッティングによる LC3-II / LC3-I 発現量比。  
 各レーンは個体 (各群につき 3 個体) を示す。頸髄、120 日齢、Wt マウスおよび SOD1<sup>G93A</sup> マウス。Wt マウスでは Rot 群で D/P 群に比べ発現量の比が高いが、SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは、D/P 群と Rot 群の間に有意な差はみられない。\*  $p < 0.05$ 。

# 総括

本研究の第1章～第3章では、国内のペンブローク・ウェルシュ・コーギー（PWC）におけるイヌの変性性脊髄症の病理発生について、ヒトのALSおよびそのモデルマウスで報告されている病態関連因子に着目して検索した。また、第4章ではALSモデルマウスについて発症前のミトコンドリア機能障害に着目して検索した。

第1章では、PWCにおけるイヌのDMの病態を把握するため、脊髄灰白質の病理組織学的変化、特に酸化ストレス関連因子の発現と変性タンパク質の蓄積について検索した。その結果、SOD1遺伝子にc.118G>Aの変異を持ち、臨床的および病理組織学的にDMと診断されたPWCの2症例の脊髄病変部では、ニューロンの細胞体に封入体や凝集物はなく、SOD1の陽性像がび漫性に認められた。また病変部の神経網には塊状のユビキチン陽性像を認めた。これらの所見から、タンパク分解系の異常がDMの病態に関与するが、ニューロン細胞体よりむしろ突起における変化が主体であると考えられた。一方、灰白質の反応性アストロサイトでは、iNOSおよびSOD1の発現が認められた。本所見はiNOSによる酸化ストレスの増強や、反応性のSOD1の発現増強を示唆するものであり、ALSやSOD1トランスジェニックマウスで報告されている発現分布に類似していることから、PWCのDMでもALS同様にアストロサイトの機能変化による酸化ストレスが病態進行に関与していると推察された。

第2章では、SOD1遺伝子変異を伴うPWCのDM症例5例、DMに罹患していないPWC5例、対照例としてビーグル6例について、腹角ニューロンの脱落様式およびグルタミン・グルタミン酸サイクルで主要な役割を担うグリア細胞性興奮性アミノ酸トランスポーター（GLT-1、GLAST）の発現レベルを検索した。この結果、DM症例群では対照の2群と比較して腹角ニューロン数は有意に少なかったが、残存ニューロンの大きさには差がなかった。また顕著なシナプス脱落も示された。ニューロンのアポトーシス像はみられず、活性型caspase 3の陽性率にも

3群間で差がなかった。また、DM症例ではGLT-1の著しい発現低下がみられたが、GLASTの発現には各群で差を認めなかった。これらの結果から、DMの脊髄ではALSと同様にグリア細胞膜上のGLT-1発現低下がみられるものの、ニューロンの脱落メカニズムについてはDMとALSとに相違があると推察された。

第3章では、オートファジー関連因子の発現について検討した。細胞質内の主要なタンパク分解系であるオートファジーの異常は、神経変性疾患を含む様々な疾患で徐々に明らかになっており、近年ALSでもその関与が指摘されている。そこで、SOD1遺伝子変異を伴うPWCのDM症例の8例、DMに罹患していないPWCの5例、対照例としてビーグル6例について、オートファジー小胞マーカであるLC3およびアダプタータンパク質であるp62とNBR1の発現局在を検索するとともに、オートファジー経路のBeclin 1, Atg16L, p62およびLC3のタンパク発現レベルを検索した。各群間でLC3強陽性顆粒をもつニューロン細胞体の割合には差を認めないものの、LC3陽性顆粒をもつ樹状突起の数はDM症例で他の2群と比較して多かった。また、DM症例ではp62陽性像が神経網に塊状にみられた一方で、NBR1が反応性アストロサイトに局在していたことから、p62とNBR1はそれぞれ異なる役割を果たしていると考えられた。またウェスタンブロッティングの結果、DM症例ではBeclin 1およびAtg16Lの発現レベルが低い傾向が認められた。これらの結果から、DMの脊髄ではオートファゴソーム形成初期の抑制が起こっている一方で、特に樹状突起内ではオートファゴソームの分解に異常があると考えられた。

第4章ではALSモデルとして最も汎用されているSOD1<sup>G93A</sup>トランスジェニックマウスを用いた検索を行った。このマウスの主要な脊髄病変はミトコンドリア障害に由来する空胞変性である。そこでミトコンドリア障害を促進するため、呼吸鎖複合体Iの阻害作用をもつrotenoneを発症前に28日間継続投与し、



運動機能の変化および発症前（70 日齢）、発症後（100 日齢）および末期（120 日齢）における脊髄病変の形態的变化を検討した。この結果、SOD1<sup>G93A</sup> マウスに rotenone を投与した群（Rot 群）では、溶媒のみを投与した群（D/P 群）と比較して、120 日齢でより重度の腹角ニューロンの脱落がみられた。腹角の空胞変性については、70 日齢では Rot 群でみられ D/P 群ではほとんどみられなかったが、100 日齢では両群で同程度、120 日齢では Rot 群でむしろ弱い傾向であり、Rot 群ではより早く病変が形成され収束したものと考えられた。また SOD1<sup>G93A</sup> マウスにおけるグリア細胞の増生は Rot 群でより強い傾向がみられ、GLT-1 の発現は Rot 群で低かった。これらのグリア増生がニューロン変性後の反応性のものであるとすると、すべての病変形成が Rot 群で D/P 群と比べて早期におこっていると考えられた。これらの結果より、SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは、発症前にミトコンドリア障害を増強することで脊髄病変の進行を促進すること、すなわちミトコンドリア障害が発症に重要な病態機序であることが推察された。

これまでに報告されている情報と本研究で得られた一連の結果にもとづき、sALS と ALS1 の患者、DM 症例、SOD1<sup>G93A</sup> マウスの病理学的特徴の比較を表 5-1 に示した。DM と ALS との病理学的類似性については、以下のように考えられた。すなわち、ALS では主に運動ニューロンの細胞体に封入体を形成して大径のニューロンから選択的に脱落するのに対し、DM 症例の脊髄ではニューロンの細胞体は封入体などの形態的变化に乏しく、腹角ニューロンの脱落は非選択的である。一方、ユビキチンや LC3 の局在から、DM 症例の脊髄では異常タンパクの蓄積やニューロン変性過程の主体は神経突起や軸索にあり、ニューロン細胞体の脱落はこれに続発するものでネクロシスが主体であると考えられる。免疫グロブリンの沈着や T 細胞浸潤による炎症反応を伴わない点は DM と ALS とで類似しており、炎症性疾患である可能性は低い。また DM と ALS とでは発

症後の二次的な反応と考えられている重度のグリオシスと、アストロサイトにおける酸化ストレス関連因子や興奮毒性関連因子の発現パターンが類似していることから、グリア細胞が病態進行に重要であることも共通していると考えられる。

一方、SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは rotenone による発症前のミトコンドリア障害が脊髄病変を促進したことから、病変の主体はミトコンドリアの変性とこれに起因する空胞化にあり、ALS、DM のいずれの病変とも異なると考えられた。一方で、グリア細胞の増生は病態の進行に応じて強くなっており、ALS、DM の両疾患と同様グリア細胞の反応が起こっていると推察された。しかし今回の検索では、rotenone 投与によっては SOD<sup>G93A</sup> マウスの脊髄でアストロサイト膜上に存在する GLT-1 の発現低下を認めたものの、明瞭な酸化的損傷を検出できなかったため、このグリア細胞の反応は必ずしも病変の増悪因子とはなっていないのかもしれない。

本研究では、DM 症例の病理学的理解を深めるとともに、ALS 患者での過去の報告や既存の ALS モデルである SOD1<sup>G93A</sup> マウスとの比較により、その類似点、相違点を示した。また既存の ALS モデルである SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは、発症前のミトコンドリア障害が発症に重要であることを示した。

ALS に限らず、多くの神経変性疾患の本質は異常タンパク質の凝集であり、主に凝集タンパク質を標的とした治療法の研究が行われている[Marciniuk *et al.*, 2013, Krishnamurthy and Sigurdsson, 2011]。しかしその多くが抗体療法であることから、動物モデルを用いた知見をヒトに外挿することが難しく、実際にヒトの神経変性疾患で有効性が確認された例がない。加えて、本研究でも示したように、病的因子と考えられるタンパク質の凝集パターンが異なることから、SOD1<sup>G93A</sup> マウスおよび DM 症例はいずれもこうした治療法の研究においては

ALS モデルとして適切ではないと考えられる。さらに、発症前から起こり、特に発症の引き金として重要と考えられたミトコンドリアの変化は 3 疾患で異なる一方で、発症後の増悪因子となりうるグリア細胞の反応が 3 疾患で比較的共通していること、加えて ALS 患者および DM 症例では実際に治療が開始されるのは発症が認められた後であることを考慮すると、発症後グリア細胞の機能変化を制御することを目的とした治療法が有効であることが期待され、その開発のためのツールとしては、SOD1<sup>G93A</sup> マウスやイヌの DM 症例は有用なモデルとなりうる。特にアストロサイトを標的とした治療法は、ALS[Rizzo *et al.*, 2013, Foust *et al.*, 2013]や他の神経変性疾患[Rappold and Tieu, 2010, Hamby and Sofroniew, 2010]で近年注目されており、マウスモデルでは一定の結果が得られている。しかし、今回の検索で SOD1<sup>G93A</sup> マウスにおけるグリア細胞の反応性変化の病態増悪効果を証明できなかったことや、先述のようにマウスモデルでの知見が今のところヒトの ALS の治療法開発に反映されていないことを考慮すると、マウスモデルでの検討では不十分である可能性が高い。したがって、ヒト ALS への応用するための補助的なデータを得るため、また伴侶動物としてのイヌにおける治療法開発のためにも、イヌ DM に対するグリアを標的とした治療法の試験的応用は有意義であると考えられる。

本研究から、神経変性の本態である異常タンパクの凝集やニューロンの脱落パターンに ALS、DM、SOD1<sup>G93A</sup> マウスで差異がみられた一方、病態進行の増悪因子となりうる因子については共通点が多かったことから、動物モデルを用いる際には「発症」と「進行」、あるいは「ニューロン」と「グリア」を区別して利用すべきであると考えられる。既存のマウスモデルは、このうち「進行」「グリア」についてのモデルとして適当であると考えられるが、その報告にはばらつきがある。この背景には、例えば SOD1<sup>G93A</sup> トランスジェニックマウスでは今

回使用した系統を含め、バックグラウンドの異なる少なくとも 5 系統以上が市販されていることや、短期間で繁殖がくり返されることから、系統を維持する実験施設ごとに別の形質を獲得している可能性などが考えられる。一方で、今回の検索では「進行」「グリア」についてイヌの DM 症例では ALS における報告と極めて近いことを示す知見が得られた。イヌは体の大きさ、ライフスパンなどの点でよりヒトに近い。高齢発症の神経変性疾患はヒトに特有か、あるいは他の動物では問題にならないものが多いが[Jucker, 2010]、イヌの DM はヒト ALS の表現型をよく再現した自然発症疾患といえる。加えて、PWC における SOD1 c.118 G>A 変異の保有率の高さ[Chang *et al.*, 2013]から、国内の PWC は遺伝的に極めて均一性が高いと考えられる。PWC は純血統を重視される人気犬種であること、海外からの異なる血統が導入されにくい日本の地理的条件を考慮すると、当面の間 PWC における DM の発生は継続すると考えられる。よって、PWC の DM 症例の収集と、発症後をターゲットとした治療法についての研究を継続することによって、この疾患は有用な ALS モデルになると考えられた。イヌの DM に関する研究は、ALS 治療法開発ばかりでなく、伴侶動物としてのイヌの医療に直ちに貢献するものと期待される。

表5-1 : sALSとALS1患者, DM罹患犬, SOD1<sup>G93A</sup> マウスにおける脊髄病変の比較

		sALS	ALS1	DM	SOD1 <sup>G93A</sup> mouse
遺伝形式		-	AD	AR	AD
変異SOD1の凝集性			+	+	+
白質の変性		+	+	+	-
腹角ニューロン	細胞数	↓	↓	↓	↓
	大きさ	↓	↓	→	↓
	封入体形成	+	+	-	+/-
	空胞変性	-	-	-	+
	TDP43病理	+/-	-	-	-
	アポトーシス	+/-	-	-	-
酸化ストレス	iNOS	+	+	+	+
	SOD1活性	ND	→	→/↑	→
T細胞の浸潤		ND	ND	-	+
免疫グロブリンの沈着		ND	ND	-	-
アストロサイトの興奮毒性関連因子	GLT-1	↓	↓	↓	↓ / →
	GLAST	→	→	→	→
	GS	ND	ND	→	ND
タンパク質分解系関連因子の局在	Ubiquitin	封入体	封入体	神経網	細胞体
	LC3	封入体、細胞体	封入体、細胞体	樹状突起	細胞体
	p62	封入体	封入体	神経網	細胞体
	NBR1	ND	ND	細胞体、アストロサイト	細胞体

AD : 常染色体優性遺伝、AR : 常染色体劣性遺伝。ND : 情報なし,赤字は本研究による結果を示す。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、研究の機会を与えて頂き、懇篤なる御指導・御鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科病理学研究室の中山裕之教授、病理組織学の初歩から論文作成に至るまで、終始懇切なる御指導・御鞭撻を頂きました同研究室の内田和幸准教授に敬意を表するとともに深く感謝いたします。また常に研究環境を整え、支えて下さった土居千代さんに感謝いたします。

イヌの SOD1 遺伝子型検査に御協力頂きました鹿児島大学農学部臨床病理学研究室の大和修教授、Hye-Sook Chang さん、Mohammad Mejbah Uddin さん、貴重な抗イヌ GLAST 抗体をご供与いただいた北海道大学獣医学研究科診断治療学講座の稲葉睦教授に深謝いたします。

本研究において不可欠である貴重なイヌ症例の収集に御協力頂きましたとがさき動物病院の諸角元二博士、麻布大学病理学研究室の代田欣二教授、宇根有美教授、麻布大学外科学第二研究室の齋藤弥代子准教授、岐阜大学応用生物科学部臨床放射線学研究室の神志那弘明准教授、みのり動物クリニックの柴藤徳洋先生、関内どうぶつクリニックの牛草貴博先生、P2 ペットワールドの加藤浩一郎先生、東京大学動物医療センターの先生方ならびに症例の飼い主の方々に感謝いたします。

最後に、同期として、且つ教員として本研究室の神経病研究を牽引し、有益な御助言を頂いた James K. Chambers 助教、ならびに症例の収集、実験や実験動物維持など様々な面で多大なる御協力と御援助を頂きました獣医病理学研究室の皆様心より感謝いたします。

## 引用文献

- Alam M and Schmidt WJ, Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res.* 2002;136(1):317-324
- Almer G, Vukosavic S, Romero N *et al.*, inducible nitric oxide synthase up- regulation in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 1999;72: 2415-2425.
- Andersen JK, Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.* 2004;10 Suppl:S18-25
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, *et al.*, TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;351(3):602-611.
- Averill DR, Jr. Degenerative myelopathy in the aging German Shepherd dog: clinical and pathologic findings. *J Am Vet Med Assoc.* 1973;162(12):1045-1051.
- Awano T, Johnson GS, Wade CM, *et al.* Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(8):2794.
- Barclay KB and Haines DM, Immunohistochemical evidence for immunoglobulin and complement deposition in spinal cord lesions in degenerative myelopathy in German shepherd dogs. *Can J Vet Res.* 1994;58(1):20-24
- Bendotti C, Tortarolo M, Suchak SK *et al.*, Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT- 1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *J Neurochem.* 2001;79(4):737-746.
- Bos I, Hoogland G, Meine Jansen C, *et al.* Increased glutamine synthetase but normal EAAT2 expression in platelets of ALS patients. *Neurochem Int.* 2006;48(4):306-311.
- Bruijn L, Becher M, Lee M, *et al.* ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron.* 1997;18(2):327-338.
- Carriedo SG, Yin HZ, Weiss JH. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci.* 1996;16(13):4069-4079.
- Chang HS, Kamishina H, Mizukami K, *et al.* 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.* 2013;75(6):795-798
- Chen S, Zhang X, Song L *et al.*, Autophagy dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol.* 2012;22(1):110-116.

Chu CT, Autophagic Stress in Neuronal Injury and Disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65(5):423-432

Coates JR, March PA, Oglesbee M, *et al.* Clinical characterization of a familial degenerative myelopathy in Pembroke Welsh Corgi dogs. *J Vet Intern Med.* 2007;21(6):1323-1331.

Crisp MJ, Beckett J, Coates JR *et al.*, Canine degenerative myelopathy: biochemical characterization of superoxide dismutase 1 in the first naturally occurring non-human amyotrophic lateral sclerosis model. *Exp Neurol.* 2013;248:1-9

Dal Canto MC and Gurney ME, Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res.* 1995;676(1):25-40

D'Amelio F, Eng LF, Gibbs MA. Glutamine synthetase immunoreactivity is present in oligodendroglia of various regions of the central nervous system. *Glia.* 1990;3(5):335-341.

Deitch, JS, Alexander GM, Del Valle L *et al.*, GLT-1 glutamate transporter levels are unchanged in mice expressing G93A human mutant SOD1. *J Neurol Sci.* 2002;193(2), 117-126.

Foust KD, Salazar DL, Likhite S *et al.*, Therapeutic AAV9-mediated Suppression of Mutant SOD1 Slows Disease Progression and Extends Survival in Models of Inherited ALS. *Mol Ther.* 2013, doi: 10.1038/mt.2013.211.

Fray AE, Dempster S, Williams RE, *et al.* Glutamine synthetase activity and expression are not affected by the development of motor neuronopathy in the G93A SOD-1/ALS mouse. *Mol Brain Res.* 2001;94(1-2):131-136.

Fray AE, Ince PG, Banner SJ, *et al.* The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *Eur J Neurosci.* 1998;10(8):2481-2489.

Gal J, Ström AL, Kwinter DM *et al.*, Sequestosome 1/p62 links familial ALS mutant SOD1 to LC3 via an ubiquitin-independent mechanism. *J Neurochem.* 2009;111(4):1062-1073

Guo Y, Duan W, Li Z *et al.*, Decreased GLT-1 and increased SOD1 and HO-1 expression in astrocytes contribute to lumbar spinal cord vulnerability of SOD1-G93A transgenic mice. *FEBS Lett.* 2010;584:1615-1622

Gurney ME, Pu H, Chiu AY *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science.* 1994;264(5166):1772-1775.

Hamby ME, Sofroniew MV, Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics.* 2010;7(4):494-506



Hara T, Nakamura K, Matsui M, *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006;441(7095):885-889

Higgins CM, Jung C and Xu Z, ALS-associated mutant SOD1<sup>G93A</sup> causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci*. 2003;4:16

Hong G, Liching L, Matthew ER *et al.*, Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(19), 2519-2532.

Howland DS, Liu J, She Y, *et al.* Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99(3):1604.

Ida T, Hara M, Nakamura Y, *et al.* Cytokine-induced enhancement of calcium-dependent glutamate release from astrocytes mediated by nitric oxide. *Neurosci Lett*. 2008;432(3):232-236.

Ikemoto A, Kawanami T, Llana JF, *et al.* Immunocytochemical studies on synaptophysin in the anterior horn of lower motor neuron disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1994;53(2):196.

Ince PG, Slade J, Chinnery RM, *et al.*, Quantitative study of synaptophysin immunoreactivity of cerebral cortex and spinal cord in motor neuron disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995;54(5):673.

Inden M, Kitamura Y, Abe M *et al.*, Parkinsonian rotenone mouse model: reevaluation of long-term administration of rotenone in C57BL/6 mice. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(1):92-96

Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JA *et al.*, Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol Dis*. 2000;7(6), 623-643.

Johnston PE, Barrie JA, McCulloch MC *et al.*, Central nervous system pathology in 25 dogs with chronic degenerative radiculomyelopathy. *Vet Rec*. 2000;146(22):629-633.

Jucker M, The benefits and limitations of animal models for translational research in neurodegenerative diseases *Nat Med*. 2010;16:1210-1214

Kato S. Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*. 2008;115(1):97-114.

King's College London, The Institute of Psychiatry. Amyotrophic Lateral Sclerosis online Database (ALSod). <http://alsod.iop.kcl.ac.uk>. Published 1999, Updated December 3 2013, Accessed December 3, 2013

Komatsu M, Waguri S, Koike M *et al.*, Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*. 2007;131(6):1149-1163.

Kong J and Xu Z, Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci*. 1998;18(9):3241-3250.

Krishnamurthy PK and Sigurdsson EM, Therapeutic applications of antibodies in non-infectious neurodegenerative diseases. *New Biotech*. 2011;28(5), 511-517.

Kusaka H, Imai T, Hashimoto S, *et al.* Ultrastructural study of chromatolytic neurons in an adult-onset sporadic case of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 1988;75(5):523-528.

Lee J, Ryu H and Kowall NW., Differential regulation of neuronal and inducible nitric oxide synthase (NOS) in the spinal cord of mutant SOD1 (G93A) ALS mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;387: 202-206.

Levine B and Kroemer G, Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008;132(1):27-42.

Manfredi and Xu, Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion* 2005;5(2):77-87.

March PA, Coates JR, Abyad RJ, *et al.* Degenerative myelopathy in 18 Pembroke Welsh corgi dogs. *Vet Pathol*. 2009;46(2):241.

Marciniuk K, Taschuk R, Napper S. Evidence for Prion-Like Mechanisms in Several Neurodegenerative Diseases: Potential Implications for Immunotherapy. *Clin Dev Immunol*, 2013; doi:10.1155/2013/473706

Martin LJ. Mitochondrial pathobiology in ALS. *J Bioenerg Biomembr*. 2011:1-11.

Miller AD, Barber R, Porter BF, *et al.* Degenerative Myelopathy in Two Boxer Dogs. *Vet Pathol*. 2009;46(4):684.

Milton ID, Banner SJ, Ince PG, *et al.* Expression of the glial glutamate transporter EAAT2 in the human CNS: an immunohistochemical study. *Mol Brain Res*. 1997;52(1):17-31.

Mizushima N, Yoshimori T and Levine B, Methods in mammalian autophagy research. *Cell*. 2010;140(3):313-326.

Morimoto N, Nagai M, Ohta Y *et al.*, Increased autophagy in transgenic mice with a <sup>G93A</sup> mutant *SOD1* gene. *Brain Res*. 2007;1167:112-117.

Nagai M, Aoki M, Miyoshi I *et al.*, Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J Neurosci*. 2001;21(23):9246-9254.

Nassif M and Hetz C., Autophagy impairment: a crossroad between neurodegeneration and tauopathies. *BMC Biol.* 2012;10:78

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK *et al.*, Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 2006;314(5796):130-133.

Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med.* 2013;19(8):983-997

Odagiri S, Tanji K, Mori F *et al.*, Autophagic adapter protein NBR1 is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions and is involved in aggregate formation in  $\alpha$ -synucleinopathy. *Acta Neuropathol.* 2012;124(2):173-186.

Pardo AC, Wong V, Benson LM, *et al.* Loss of the astrocyte glutamate transporter GLT-1 modifies disease in SOD1<sup>G93A</sup> mice. *Exp Neurol.* 2006;201(1):120-130.

Phul RK, Shaw PJ, Ince PG *et al.*, Expression of nitric oxide synthase isoforms in spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lat Scler Other Motor Neuron Disord.* 2000;1(4): 259-267.

Rao SD and Weiss JH. Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends Neurosci.* 2004;27(1):17-23.

Rappold PM, Tieu K. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics.*2010;7(4):413-423

Rauen T and Kanner BI. Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae. *Neurosci Lett.* 1994;169(1-2):137-140.

Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK *et al.* Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 1996;13: 43-47.

Richter F, Hamann M and Richter A, Behavioral effects but no pathological signs of Parkinsonism in mice. *J Neurosci Res.*2007;85:681-691

Rizzo F, Riboldi G, Salani S *et al.*, Cellular therapy to target neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Mol Life Sci.* 2013;doi: 10.1007/s00018-013-1480-4

Rosen DR, Siddique T, Patterson D *et al.*, Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993;362(6415):59-62.

Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, *et al.* Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron.* 1996;16(3):675-686.

Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 1992;326(22):1464-1468.

Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, *et al.* Selective loss of glial glutamate transporter GLT- 1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1995;38(1):73-84.

Rué L, López-Soop G, Gelpi E *et al.*, Brain region- and age-dependent dysregulation of p62 and NBR1 in a mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 2013;52:219-228.

Samantaray S, Knaryan VH, Guyton MK *et al.*, The Parkinsonian neurotoxin rotenone activates calpain and caspase-3 leading to motoneuron degeneration in spinal cord of Lewis rats. *Neurosci.* 2007;146:741-755

Sasaki S, Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011;70(5):349-359

Sasaki S and Iwata M. Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 1996;204(1-2):53-56.

Sasaki S<sup>1</sup> and Maruyama S. Decreased synaptophysin immunoreactivity of the anterior horns in motor neuron disease. *Acta Neuropathol.* 1994;87(2):125-128.

Sasaki S<sup>2</sup> and Maruyama S. Synapse loss in anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 1994;88(3):222-227.

Sasaki, S., Shibata, N., Komori, T *et al.*, iNOS and nitrotyrosine immunoreactivity in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 2000;291:44-48.

Sasaki S, Warita H, Murakami T *et al.*, Ultrastructural study of mitochondria in the spinal cord of transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol.* 2004;107(5):461-474

Sato K, Inaba M, Suwa Y *et al.*, Inherited defects of sodium-dependent glutamate transport mediated by glutamate/aspartate transporter in canine red cells due to a decreased level of transporter protein expression. *J Biol Chem.* 2000;275(9):6620-7.

Shelton GD, Johnson GC, O'Brien DP, *et al.*, Degenerative myelopathy associated with a missense mutation in the superoxide dismutase 1 (SOD1) gene progresses to peripheral neuropathy in Pembroke welsh corgi and Boxers. *J Neurol Sci.* 2012;318:55-64

Smith C, Carney J, Starke-Reed P, *et al.* Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88(23):10540.

Sobue G, Hashizume Y, Yasuda T, *et al.*, Phosphorylated high molecular weight neurofilament protein in lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases involving ventral horn cells. *Acta Neuropathol.* 1990;79(4):402-408.

Summers BA, Cummings JF and DeLahunta A. *Veterinary neuropathology*. Mosby, St. Louis, MO;1995.

Swarup and Julien, ALS pathogenesis: recent insights from genetics and mouse models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(2):363-9.

Tansey FA, Farooq M, Cammer W. Glutamine synthetase in oligodendrocytes and astrocytes: new biochemical and immunocytochemical evidence. *J Neurochem*. 1991;56(1):266-272.

Uchiyama Y, Shibata M, Koike M *et al.*, Autophagy-physiology and pathophysiology. *Histochem Cell Biol*. 2008;129(4):407-420

Van Den Bosch L, Vandenberghe W, Klaassen H, *et al.* Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J Neurol Sci*. 2000;180(1-2):29-34.

Washington University Neuromuscular Disease Center. Neuromuscular Home Page. <http://neuromuscular.wustl.edu/>. Updated November 2013, Accessed December 3, 2013

Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC *et al.*, Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis*. 2001;8(6):933-941

Waxman FJ, Clemmons RM, Hinrichs DJ, Progressive myelopathy in older German shepherd dogs. II. Presence of circulating suppressor cells. *J Immunol*. 1980;124(3):1216-1222

Weydt P, Hong SY, Kliot, M *et al.*, Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *Neuroreport*, 2003;14(7):1051-1054.

Willamson TL and Cleveland DW, Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci*. 1999;2(1):50-56.

Wininger F, Zeng R, Johnson G, *et al.* Degenerative Myelopathy in a Bernese Mountain Dog with a Novel SOD1 Missense Mutation. *J Vet Intern Med*. 2011.

Winslow AR, Rubinsztein DC. Autophagy in neurodegeneration and development. *Biochem Biophys Acta*. 2008;1782(12):723-729.

Won SJ, Kim DY, Gwag BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Bio*. 2002;35(1):67-86.

Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR *et al.*, An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*. 1995;14(6):1105-1116

Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA *et al.*, Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105: 7594-7599.

Yamazaki M, Esumi E, Nakano I. Is motoneuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis apoptosis? *Neuropathology*. 2005;25(4):381-387.

Zang DW, Lopes EC, Cheema SS. Loss of synaptophysin- positive boutons on lumbar motor neurons innervating the medial gastrocnemius muscle of the SOD1<sup>G93A</sup> G1H transgenic mouse model of ALS. *J Neurosci Res*. 2005;79(5):694-699.

Zhang X, Li L, Chen S *et al.*, Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy*. 2011;7(4):412-425

新潟大学脳研究所. e-Learning 神経病理. <http://pd21.cihbs.niigata-u.ac.jp/menu.php>.