

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 22 年度博士課程 入学

氏 名 小川 瑞恵

指導教員名 中山 裕之

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

ヒトの筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は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 は孤発性 ALS (sporadic ALS, sALS) と家族性 ALS (familial ALS, fALS) に大別され、全体の 5-10% を占める fALS では 23 の原因遺伝子が同定されている。このうちの最初に発見された superoxide dismutase 1 (SOD1) 変異を伴う fALS は約 20% で、ALS1 と呼ばれる。ALS の病因として、初期のミトコンドリアや軸索輸送の障害、発症後の酸化ストレス、興奮毒性および変性タンパク質の分解異常と蓄積が存在し、これらが互いに関連して病態が進行すると考えられている。特に発症後はアストロサイトやミクログリアの機能異常が重要であり、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の機序で起こると推測されている。

ALS 研究では、変異 SOD1 を強制発現させたトランスジェニック (Tg) マウスが運動ニューロン変性の動物モデルとして利用されてきた。上述の病因仮説の多くはこの Tg マウスを用いて検証されたものである。しかし、このマウスに対し

て延命効果があった薬剤が ALS 患者に対しても有効であった例はなく、このマウスの有用性が疑問視されており、原因として動物種差などが指摘されている。そこで、体の大きさやライフスパンなどの点で、マウスよりもヒトに近い動物種で ALS に類似する自然発生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性病変が認められる疾患の総称である。これらの疾患は一般に進行性かつ致死的である。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。DM の病因として免疫介在性、代謝性、遺伝性など複数のメカニズムの関与が示されてきたが、臨床的な類似性に加えて、2008 年に PWC を含む DM 症例に SOD1 のミスセンス変異があることが報告され、DM が ALS1 に相当する疾患である可能性が示唆されている。SOD1 ホモ接合体変異を持つ個体に DM が必ず発症するわけではないが、国内の PWC の SOD1 遺伝子変異の保有率は非常に高く、疾患の犬種特異性と遺伝的背景の均一性から、PWC が DM に罹患するリスクは他犬種と比べ非常に高いと推察される。PWC の 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、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、PWC は伴侶動物であるため、病理学的な検索は死亡例のみで可能であり、発症前、発症初期を病理学的検索の対象とするのは困難である。したがって、発症前または発症直後の検索にはマウスモデルを用いるほかない。

本研究の第 1 章～第 3 章ではイヌの DM 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、第 4 章では ALS モデルマウスを用いた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 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、臨床的・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、ニューロン細胞体に封入体や凝集物を認めなかったが、SOD1 の陽性像をび漫性に認めた。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、DM の病態にはユビキチン・プロテアソーム系の異常が関与するが、ニューロン細胞体より突起の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には、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と、SOD1の反応性発現増強を示唆しており、ALS患者やSOD1 Tgマウスの脊髄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、PWCのDM症例 5例、DMに罹患していないPWC5例、対照としてビーグル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症例では、他の2群に比べ、腹角ニューロンの大きさには差がないものの、その数が有意に少なかった。顕著なシナプス脱落も観察された。しかし、ニューロンにアポトーシスの形態的特徴はみられず、活性型caspase 3陽性細胞率にも3群間で差はなかった。また、DM症例ではアストロサイトでGLT-1の著しい発現低下がみられたが、GLASTの発現は各群で差を認めなかった。これらの結果から、DMではALSと同様にアストロサイト膜上のGLT-1に発現低下がみられるものの、神経細胞の脱落メカニズムはDMとALSとで異なると推察された。

第3章では、オートファジー関連因子の発現パターンについて検討した。細胞質内の主要な蛋白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、PWCのDM症例8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、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NBR1、p62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。LC3強陽性斑点を有するニューロン細胞体の割合については各群に差を認めないものの、LC3陽性斑点を持つ樹状突起はDMで有意にその数が多かった。NBR1はDM症例の反応性アストロサイトに局在し、p62は神経網に塊状の陽性像がみられた。またウェスタンブロッティングにより、DM症例でBeclin 1およびAtg16Lの発現レベルの低下が認められた。これらの結果から、DM症例の脊髄、特に神経突起においてオートファゴソームが蓄積する一方で、オートファゴソーム形成初期の抑制が起っていることが示唆された。以上より、オートファジーの異常がDM病態に関連することが示された。

第4章ではALSモデルとして汎用されているSOD1^{G93A} Tg (SOD1^{G93A})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腹角のミトコンドリア空胞変性であり、その病理発生にはミトコンドリア障害が重要であると考えられる。

そこでミトコンドリア呼吸鎖複合体 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脊髄の病理組織学的変化について検討した。この結果、SOD1^{G93A} マウスの rotenone 投与群 (Rot 群) は、溶媒投与群 (D/P 群) と比較して 120 日齢で腹角ニューロンが多く脱落していた。腹角の空胞変性は 70 日齢では Rot 群でのみ明らかに観察され、100 日齢では両群で同程度、120 日齢では Rot 群で弱い傾向であった。すなわち、Rot 群で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^{G93A} マウスにおけるグリア細胞の増生は Rot 群でより顕著な傾向がみられたが、アストロサイト膜上の GLT-1 の発現は Rot 群で低かった。これらのグリア細胞の変化がニューロン変性後に反応性に起こったものとする、Rot 群ではすべての病変形成が早期化していると考えられた。これらの結果から、SOD1^{G93A} マウスでは、発症前のミトコンドリア障害の増強が病態発症の引き金となることが推察された。

本研究の一連の結果から、ALS とイヌの DM との病理学的な類似性について、以下のように推察された。ALS では主に運動ニューロン細胞体に封入体が形成され、大径のニューロンが選択的に脱落する。一方、イヌの DM では腹角ニューロンの細胞体は形態的变化に乏しく、その脱落は非選択的であり、ユビキチンや LC3 の局在から、変性の主体は突起や軸索にあると考えられた。ニューロンの細胞死がネクローシスである点、また免疫細胞の浸潤を伴わない点は ALS と DM とで類似していた。また、発症後の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の類似性から、グリア細胞の病態進行における重要性も DM と ALS とで共通していると推察された。SOD1^{G93A} マウスでは発症前の rotenone 投与が脊髄病変を促進しことから、ミトコンドリア障害が発症の引き金であり、ALS、DM のいずれとも異なる主要病変の空胞変性はその結果と考えられた。一方で、グリア細胞の増生は発症後顕著にみられ、これが病態進行に関与している可能性が推察された。

本研究の成果は、DM 罹患犬および SOD1^{G93A} マウスでみられる脊髄病変とその分布が ALS 患者とは異なることを示した一方で、発症後の増悪因子となりうるグリア細胞の反応はいずれの疾患でも類似していることを明らかにした。この成果はイヌの DM の病態についての理解を大いに深めるとともに、ヒト ALS のグリア細胞を標的とした治療法に関する動物モデルとして DM が適していることを示している。