

博士論文

犬の特発性脳炎における
抗トランスグルタミナーゼ自己抗体に関する研究

田中 美穂

目次

諸論-----	1
第1章-----	9-24
犬の特発性脳炎症例における抗 TG 抗体の検出	
第2章-----	25-44
初代培養犬アストロサイトを用いた試験管内モデルにおける 抗 TG2 抗体の影響	
第3章-----	45-61
犬の特発性脳炎における TG2 陽性アストロサイトの分布	
総括-----	62-64
謝辞-----	65
引用文献-----	66-82

諸論

犬に発生する特発性脳炎として、壊死性髄膜脳炎（necrotizing meningoencephalitis: NME）、壊死性白質脳炎（necrotizing leukoencephalitis: NLE）ならびに肉芽腫性髄膜脳脊髄炎（granulomatous meningoencephalitis: GME）という 3 つの疾患が広く知られている。これらは小型～中型犬に好発する重篤な中枢神経系（central nervous system: CNS）疾患である。いずれの疾患も臨床徴候、磁気共鳴画像（MRI）を用いた画像診断および脳脊髄液（cerebrospinal fluid: CSF）検査によって生前診断され、最終的には死亡時の病理組織学的検査で確定診断される。NME、NLE および GME に共通する治療として免疫抑制療法が選択されるが、治療に対する反応性は限定的であり、短期間で死に至る症例が少なくない。従ってこれらの悲惨な疾患の予防法や新たな治療法を確立することが早急に望まれ、このためには病態に関与する因子の特定が重要となる。

NME、NLE、GME の各疾患について、臨床像や病理組織学的所見は数多く報告されてきたが、病因解明には至っていない。現在まで NME、NLE あるいは GME が感染に起因することは否定的であり (Radaelli and Platt, 2002; Maxie and Youssef, 2007; Talarico and Schatzberg, 2010; Barber *et al.* 2010, 2012)、遺伝的素因あるいは自己免疫機序の側面から病態解析が進められている。

NME の特徴として、前脳に非対称性、多巣性の壊死病変が認められる (Young *et al.* 2009; Talarico and Schatzberg, 2010)。NME は、パグ (Cordy and Holiday, 1979)、マルチーズ (Stalis *et al.* 1995)、チワワ (Higgins *et al.* 2008)、ペキニーズ (Cantile *et al.* 2001)、ウェスト・ハイランド・ホワイトテリア (Aresu *et al.* 2007)、ボストン・テ

リア、シー・ズー、ミニチュア・ピンシャーなど限られた小型犬種でみられ、発症時の年齢は 6 ヶ月齢-7 歳齢（平均 29 ヶ月齢）である（Higgins and Le Couteur, 2007; Talarico and Schatzberg, 2010）。このように、NME には犬種特異性があり、とくにパグで発症率が高く、典型的かつ重篤な臨床像を呈することからパグ脳炎（Pug dog encephalitis）の別名もある。パグでは遺伝的素因が検討されているが、NME の発症は単純メンデル遺伝様式では説明できない（Greer *et al.* 2009; Talarico and Schatzberg, 2010）。近年、dog leukocyte antigen (DLA)クラス II 遺伝子とパグの NME の相関が示されたが（Barber *et al.* 2011; Greer *et al.* 2010; Pedersen *et al.* 2011; Safra *et al.* 2011）、高リスクの DLA クラス II ハプロタイプをもつパグでも NME 発症率は 10-20%に留まる（Pedersen *et al.* 2011）。これらのことから、遺伝的素因以外の外部因子が発症を左右する可能性がある（Greer *et al.* 2010; Pedersen *et al.* 2011）。

NME 症例の CSF 中には、健康な犬の凍結大脳組織のアストロサイトの細胞体や突起に結合する IgG が含まれることが示されている（Uchida *et al.* 1999）。この脳脊髄液による犬の大脳組織への反応は、大脳皮質では軟膜下領域や血管周囲、白質ではびまん性に観察され、大部分が抗グリア線維性酸性タンパク質（glial fibrillary acidic protein: GFAP）抗体の反応と一致することが示された（Uchida *et al.* 1999）。さらに、NME 症例の CSF 中から GFAP に対する自己抗体が高率に検出されることが明らかとなり、NME は自己免疫疾患の側面を持つことが予想されている（Matsuki *et al.* 2004, 2009; Shibuya *et al.* 2007; Toda *et al.* 2007; Uchida *et al.* 1999）。

NLE はヨークシャー・テリア (Jull *et al.* 1997; Lezmi *et al.* 2007; Sawashima *et al.* 1996) およびフレンチ・ブルドッグ (Spitzbarth *et al.* 2010; Timmann *et al.* 2007) など極めて限られた犬種で発生し、前脳および脳幹の白質における非対称性かつ多巣性の壊死病変を特徴とする (Kuwamura *et al.* 2002; Lezmi *et al.* 2007)。NLE は過去には NME に分類されていた可能性があり、独立した疾患としての歴史が浅いことから十分な病態解析はなされていない。しかし免疫抑制療法に対する反応が比較的良好であるため、自己免疫機序が関与する疾患であると予想されている。

GME は様々な小型～中型犬種に発生する。GME は病変の局在によりさらに播種型、巣状型、眼型の 3 つの病型に分類され、最も多く報告されているのは播種型である。平均 55 ヶ月齢 (6-144 ヶ月齢) で発症し、病型や病変部位に応じて発作、視覚障害、小脳・前庭症状、頸部脊髄症状などが認められる (Summers *et al.* 1995)。MRI では T2 強調画像および fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) 像で高信号を呈する辺縁不整な白質病変が特徴的に観察される (Cherubini *et al.* 2006, 2008)。病理組織学的には白質を中心とした囲管性細胞浸潤と肉芽腫性炎症病変を特徴とする (Kitagawa *et al.* 2004, 2009; Kipar *et al.* 1998; Suzuki *et al.* 2003; Talarico and Schatzberg 2010)。GME は病原体やワクチンなどの環境因子と遺伝的素因が関与する非特異的な免疫応答の結果であるという説もある (Talarico and Schatzberg, 2010)。

本研究では、NME、NLE および GME という犬の特発性脳炎について、自己免疫性疾患の側面から病態解析を試みることにした。ヒトの CNS 疾患では、視神経脊髄炎における抗アクアポリン 4 抗体 (Fazio *et al.* 2011)、N-メチル D-アスパラギン酸受容体

(NMDAR) 脳炎における抗 NMDAR 抗体 (Irani and Vincent, 2011)、セリアック病における抗トランスグルタミナーゼ (transglutaminase: TG) 抗体 (Caja *et al.* 2011; Dieterich *et al.* 1997,1998; Hadjivassiliou *et al.* 2008; Iismaa *et al.* 2009) などが疾患特異的な自己抗体として知られている。

本研究で着目した TG は、高等動物では TG1-7、血液凝固第 XIII 因子、および触媒活性を持たない赤血球バンド 4.2 からなる酵素タンパク質ファミリーである (Iismaa *et al.* 2009)。TG1-7 および血液凝固第 XIII 因子は触媒領域に共通のアミノ酸配列を有し、Ca²⁺依存性に蛋白質の架橋構造形成を触媒する (Di Sabatino *et al.* 2012; Griffen *et al.* 2002; Gundemir *et al.* 2012; Iismaa *et al.* 2009; Park *et al.* 2010)。アイソザイムはそれぞれ特定の基質と反応することで異なる生体内機能を誘導し、臓器や組織における分布も異なる (Di Sabatino *et al.* 2012)。このうち TG2 は哺乳類の生体内に広く分布し、ヒト、ラット、マウス、イヌの中枢神経組織における発現が報告されている (Lesort *et al.* 2000; Caccamo *et al.* 2004; Jeitner *et al.* 2009; Wakshlag *et al.* 2006)。TG2 は細胞内および細胞外に存在することが知られている。細胞内局在としては細胞質のほか、機序は不明だが核内への移行が確認されている。細胞内 TG2 はアポトーシス過程における蛋白架橋作用のほか、特定基質に対するセリン/スレオニンリン酸化作用を有する。細胞外局在としては細胞膜表面および細胞外基質への分泌が確認されている。細胞外 TG2 は蛋白架橋作用のほか、細胞外基質の安定化に関与し、これは血管新生、骨のリモデリング、創傷治癒過程で重要となる。特に細胞膜 TG2 は細胞外基質への細胞接着や細胞遊走に関与し、TGF- β を誘導するなどの炎症調整作用、細胞内への G 蛋

白シグナルを伝達する GTPase 作用も有する。触媒作用と G 蛋白としての作用は、 Ca^{2+} または GTP のいずれかが結合することで作動するよう制御されている (Iismaa *et al.* 2009)。このように多機能であるため、TG2 は線維化、アテローム性動脈硬化症、神経変性疾患、自己免疫性疾患、腫瘍転移など複数の病態への関与が示唆されている (Aeschlimann and Thomazy, 2000; Grosso *et al.* 2012; Jeitner *et al.* 2009; Lesort *et al.* 2000)。近年では、様々な病態下で細胞の生存に関与することが示されてきたことから、細胞表面 TG2 に関する報告が増える傾向にある (Park *et al.* 2010)。

TG2に対する自己抗体が関与する疾患としてヒトのセリアック病がある (Caja *et al.* 2011)。この疾患は、ヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen; HLA)-DQ2またはDQ8 ハプロタイプをもつヒトが小麦、大麦、ライ麦などのグルテン含有穀物を食べることで発症することが知られている。小腸でグルテンが分解されて生じるグリアジンはタンパク分解反応に耐性を持つ複数の配列を有する。この分解作用に対して耐性のある高分子量グリアジンは小腸粘膜上皮間または上皮細胞内を通過すると考えられており、粘膜固有層に取り込まれる。粘膜固有層のTG2はグリアジンと親和性が高いため、グリアジンと反応し、これを修飾する。修飾されたグリアジンはHLA-DQ2またはDQ-8に高い親和性を示すようになり、抗原として提示され、抗グリアジン抗体が産生される (Di Sabatino *et al.* 2012)。この抗グリアジン抗体がTG2と交差反応を示すことで小腸に対する組織障害が生じると考えられてきた。一方、異なる仮説として、親和性の高いグリアジン-TG2複合体が抗原として提示されることで、抗グリアジン抗体と同時に抗TG2自己抗体が産生されるという仮説が提唱されている (Briani *et al.* 2008; Caja *et al.* 2011; Di

Sabatino *et al.* 2012, Meresse *et al.* 2012)。詳細な病態機序については不明であるが、食事からグリアジン成分を除去することにより消化器症状の改善と抗TG2自己抗体価の低下が認められることから、抗TG2自己抗体による組織障害が関連づけられてきた。

セリアック病の症状は小腸にとどまらず、鉄欠乏性貧血、神経症状、皮膚症状、骨粗鬆症、流産など様々である (Hernandez and Green, 2006; Di Sabatino *et al.* 2012)。神経症状を主体とするセリアック病では主に運動失調が認められ、gluten ataxia の病名がつけられている。この疾患は、TG2 あるいは TG6 に対する自己抗体の結合による小脳プルキニエ細胞障害が原因と考えられている (Cervio *et al.* 2007; Hadjivassiliou *et al.* 2003)。

TG2 の細胞内局在や細胞機能への関与がヒト、ラット、マウスの組織や細胞において研究される中、獣医学領域で TG2 や抗 TG2 抗体に着目した研究は、犬のリンパ球形質細胞性腸炎症例の血清抗 TG2 抗体の報告 (Vincenzetti *et al.* 2006)、犬と猫の乳腺腫瘍組織の TG2 発現の変化に関する報告 (Wakshlag *et al.* 2006)などわずかであり、神経組織における研究報告はこれまでにない。

先行研究では、NME 症例の CSF 中に GFAP 以外のアストロサイト抗原に反応する自己抗体の存在が予想されている (Shibuya *et al.* 2007)。そこで、本研究では、まず NME 症例の CSF 中に存在する抗 GFAP 抗体以外のアストロサイト自己抗体を探索した。その結果、第一章では NME 症例の CSF 中に抗 TG2 自己抗体が存在することを発見したため、探索範囲を NLE と GME 症例にも拡大してサーベイランスを行った。続いて第二章では犬の初代培養アストロサイトに対する抗 TG2 抗体の反応性ならびに

細胞内代謝への影響を検討した。また、第三章では NME、NLE ならびに GME 症例
の脳組織における TG2 の分布を検討した。

第 1 章

犬の特発性脳炎症例における 抗 TG 抗体の検出

【緒言】

犬の NME、NLE、GME は、臨床像や病理組織学的所見に対する報告があるものの、現在までに病態の解明には至っていない。いずれも免疫抑制療法に反応することから、自己免疫性疾患の側面を有すると考えられてきた。また、NME の犬の CSF 中にはアストロサイトマーカーである GFAP に対する自己抗体が高率に存在する (Matsuki *et al.* 2004, 2009; Shibuya *et al.* 2007; Toda *et al.* 2007; Uchida *et al.* 1999)。同時に、GFAP 以外の大脳タンパク質に結合する IgG の存在も確認されている (Shibuya *et al.* 2007)。そこで、本章ではまず NME 症例において GFAP 以外のアストロサイト抗原を認識する自己抗体の探索に着手した。その過程でアストロサイトの TG に対して結合する自己抗体の存在が確認されたため、NLE および GME に範囲を拡大し、犬の特発性脳炎における抗 TG 抗体を探索した。

【材料と方法】

犬 CSF

2001 年から 2010 年に東京大学附属動物医療センターに来院した犬のうち、CNS 疾患を有した 49 頭の犬の CSF を用いた。これらの症例を NME 19 頭（7 ヶ月-6 歳齢）、NLE 7 頭（5-12 歳齢）、GME 11 頭（4-7 歳齢）、その他の CNS 疾患 12 頭（2-8 歳齢）の 4 群に分けた。その他の CNS 疾患の内訳は犬ジステンパーウイルス脳炎 3 頭、CNS 悪性組織球症 2 頭、頭蓋内リンパ腫 2 頭、グリオーマ 1 頭、特発性てんかん 4 頭であった。これらの症例は MRI、CSF 検査、可能なものは剖検にて確定診断された。対照として東京大学附属動物医療センターで飼育される臨床的に健康な犬 20 頭（2-6 歳齢）の CSF を用いた。CSF は全身麻酔下で 23G のスパイナル針を用いた大槽穿刺により採取し、使用直前まで 30℃ で保管したものを用いた。また、症例の CSF を 2 次使用することについては、十分な説明の上で全ての飼い主から書面による許諾を得た。

犬の血清

2004 年から 2011 年の間に東京大学動物医療センターに来院した犬のうち、CNS 疾患と診断された 26 頭の犬の血清を用いた。これらの症例を NME 5 頭（1-7 歳齢）、NLE 4 頭（2-9 歳齢）、GME 3 頭（3-8 歳齢）、その他の CNS 疾患 6 頭（1-8 歳齢）の 4 群に分けた。その他の CNS 疾患の内訳は特発性てんかん 3 頭、原因未特定の脳炎 1 頭、脳梗塞 1 頭、特発性振戦 1 頭であった。対照として臨床的に健康な 8 頭（3-6 歳齢）の血清を用いた。血液は頸静脈または橈側皮静脈から 23G または 25G の注射針を用い

て採取し、血液分離剤入りの遠心管に分注した。室温で 30 分静置後、3,000 rpm 5 分間遠心し、分離した血清を回収し、-30℃に保管したものをを用いた。また、症例の血清を 2 次使用することについては、十分な説明の上で全ての飼い主から書面による許諾を得た。

犬の脳凍結切片に対する間接蛍光抗体法 (IFA)

NME の CSF 中の抗 TG2-IgG の存在を、健康なビーグルの脳凍結切片に対する IFA にて確認した。脳組織は本学獣医外科学教室から分与されたものをコンパウンド (Tissue-Tek O. C. T. compound, Sakura Finechemical, Tokyo, Japan) で包埋し、-80℃で保管したものをを用いた。この凍結組織を 10 μ m に薄切して風乾し、冷アセトン (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) で 5 分間固定した。続いて、リン酸緩衝液 (PBS: 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) で洗浄し、1%正常ヤギ血清 (Wako)を添加した PBS で 30 分間ブロッキングした。PBS で洗浄後 NME の CSF を切片上で室温、60 分間反応させた。また、NME の CSF から予めアストロサイトに対する抗 GFAP 自己抗体を吸着除去するために、精製ウシ GFAP (Progen Biotechnik, Heidelberg, Germany)を 250 μ g/ml で CSF に添加し、室温、60 分間反応させたものも同様に凍結切片上で反応させた。これらの切片は洗浄後、FITC 標識ヤギ抗イヌ IgG (1:100, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, U.S.A.) を室温で 30 分反応させ、洗浄、乾燥後 Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.)で封入した。さらに、抗 TG2 抗体と症例の自己抗体の局在

を観察するために二重染色を行った。ウサギ抗 TG2 ポリクローナル IgG (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.) と GFAP 吸収後の NME-CSF を一次抗体としてイヌ大脳凍結切片上で室温、60 分間反応させた。洗浄後、FITC 標識ヤギ抗イヌ IgG (1:100, Bethyl) およびローダミン標識ヤギ抗ウサギ IgG (1:100, Santa Cruz) を室温、30 分間反応させ、洗浄後、Vectashield で封入した。得られた切片は蛍光顕微鏡 (Optiphot-2, Nikon, Tokyo, Japan) で観察し、ORCA-1394 image analyzing system (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) で記録した。

TG に対するイムノブロット

組換えヒト TG2 (Immunodiagnostik AG, Bensheim, Germany)、組換え犬 TG2 (Zedira GmbH, Darmstadt, Germany)、組換えヒト TG6 (Zedira) をそれぞれ 1 レーン当たり 0.5 µg、10% のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、ニトロセルロース膜 (Amersham Hybond ECL, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, U. K.) に転写した。転写後のニトロセルロース膜は 5% のスキムミルク (Becton Dickinson, Sparks, MD, U.S.A.) と 0.1% の Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) を含むトリス緩衝液 (TBS-T) で室温、120 分間ブロッキングした。TBS-T で 3 回洗浄し、0.1% BSA 加 PBS で希釈した CSF (NME 2 頭、NLE 2 頭、GME 2 頭、健康犬 1 頭 ; 1:100) を室温、60 分間反応させた。その後 3 回洗浄し、HRP 標識ヤギ抗イヌ IgG (1:4000, Bethyl) で 60 分間反応させた。3 回洗浄後、ECL Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて化学

発光させ、High Performance Chemiluminescence Film (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) 上で検出した。

ELISA による抗 TG 2 自己抗体の検出

96 穴マイクロタイタープレート (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) に組換えヒト TG2 を 0.2 µg/well、4°C、オーバーナイトでコーティングした。プレートは 3% のウシ血清アルブミン (BSA Fraction V; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) を添加した PBS で 2 時間ブロッキングした。続いて TBS-T で 3 回洗浄し、0.1% の BSA を加えた PBS で希釈した CSF (1:20) または 0.5% の BSA を加えた PBS で希釈した血清 (1:20) を 50 µl/well でそれぞれ添加し、室温で 2 時間反応させた。さらに TBS-T で 3 回洗浄後、HRP 標識ヤギ抗イヌ IgG (Bethyl, 1:2000) を 100 µl ずつ添加して室温で 60 分間反応させた。洗浄後、50 µl/well の発色液 (1 mg/ml 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) と反応させ、Model 680 プレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.) を用いて 405 nm の吸光度 (OD) を測定した。全ての測定は 1 バッチの 2 重測定で行い、各サンプルから得られた OD の平均を結果とした。

ELISA による CSF 中の抗小麦グリアジン抗体の検出

96 穴マイクロタイタープレートに、70%エタノール (Wako) ・ 0.05 N 水酸化ナトリウム (Wako) 保存溶液に溶解した小麦グリアジン (Sigma) を 10 µg/well、4°C、オー

バーナイトでコーティングした。続いて、BSA 加 PBS で 2 時間ブロッキングした後、TBS-T で 3 回洗浄し、0.1% BSA 加 PBS で希釈した CSF (1:20) または 0.5% BSA 加 PBS で希釈した血清 (1:20) を 50 μ l/well でそれぞれ添加し、室温で 2 時間反応させた。さらに TBS-T で 3 回洗浄後、HRP 標識ヤギ抗イヌ IgG (Bethyl, 1:2000) を 100 μ l ずつ添加して室温で 60 分間反応させた。洗浄後、50 μ l/well の発色液 (1 mg/ml 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) と反応させ、Model 680 プレートリーダーを用いて 405 nm の OD を測定した。全ての測定は 1 バッチの 2 重測定で行い、各サンプルから得られた OD の平均を結果とした。

【統計】

ELISA の結果は Prism (Version 5, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, U.S.A.) を使い、Kruskal-Wallis 検定を行った。また、CSF 中の抗 TG2-IgG と抗グリアジン-IgG の相関は Spearman の相関係数で示した。各々の解析では $p < 0.05$ を有意とみなした。

【結果】

犬の脳凍結切片に対する間接蛍光抗体法 (IFA)

図 1 に健康犬の脳凍結切片に対する CSF の反応を示した。健康犬の CSF は脳凍結切片には反応しなかった (A)。一方、NME 症例の CSF はアストロサイトに強く反応した (B)。また、NME 症例の CSF を精製ウシ GFAP で吸収した後にもアストロサイトに対する反応は完全には消失しなかった (C)。GFAP 吸収後の NME 症例の CSF と抗ヒト TG2 抗体を用いた二重染色では、両者の反応部位がよく一致した (C-E)。

TG 蛋白に対するイムノブロット

NME、NLE、GME 各々2症例の CSF は、組み換えヒト TG2 (78 kDa)、組み換えイヌ TG2 (78 kDa)および組み換えヒト TG6 (78 kDa)と反応した。この反応は健康犬の CSF および二次抗体のみでは認められなかった (図 2)。

ELISA

CNS 疾患症例ならびに健康犬における CSF 中の抗 TG2 自己抗体の ELISA 結果を図 3A に示した。NME 症例の CSF における ELISA-OD 値は健康犬に比べて有意に高値であった。NLE、GME および特発性脳炎以外の CNS 疾患症例でも、有意ではないものの抗 TG2 抗体が認められた。一方、健康犬における ELISA-OD 値は全例で低かった。血清中抗 TG2-IgG の ELISA 結果を図 3B に示した。特発性脳炎の各群、その

他の中枢神経疾患群、健康群の全ての血清中に抗 TG2-IgG が存在し、群間に差は認められなかった。NME、NLE、GME およびその他の CNS 疾患群では健康群に対して抗グリアジン抗体が有意に上昇していた (data not shown)。抗 TG2-IgG と抗グリアジン-IgG の抗体価は正の相関を示した ($r=0.846$ 、 $p<0.001$) (図 3C)。

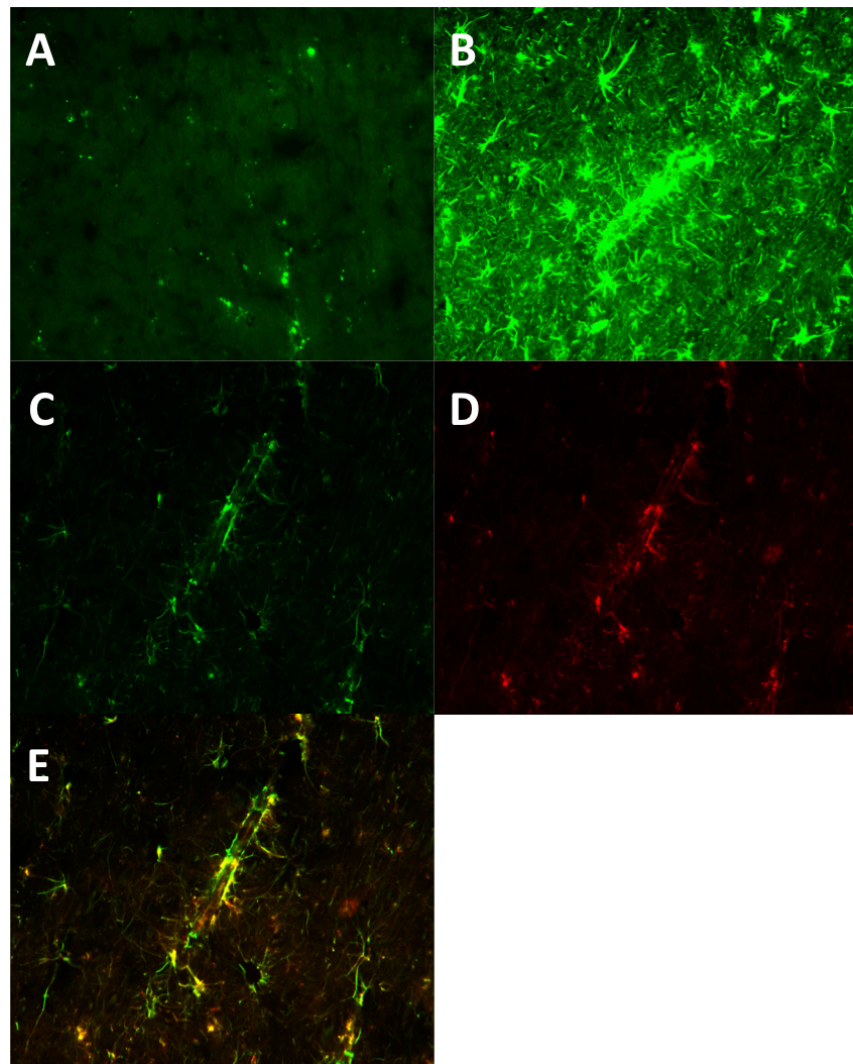


図1 凍結イヌ脳組織に対する IFA

イヌの脳組織の凍結組織に対する IFA。健康なイヌの CSF 中 IgG は脳組織と反応しなかった (A)。NME の CSF 中 IgG はアストロサイト と強く反応した(B)。NME の CSF に含まれる抗 GFAP 自己抗体を精製ウシ GFAP で吸収した後の IFA でも、アストロサイトに対する反応は残った (C)。この反応は抗ヒト TG2 ポリクローナル抗体の反応部位 (D) とよく一致した (E)。

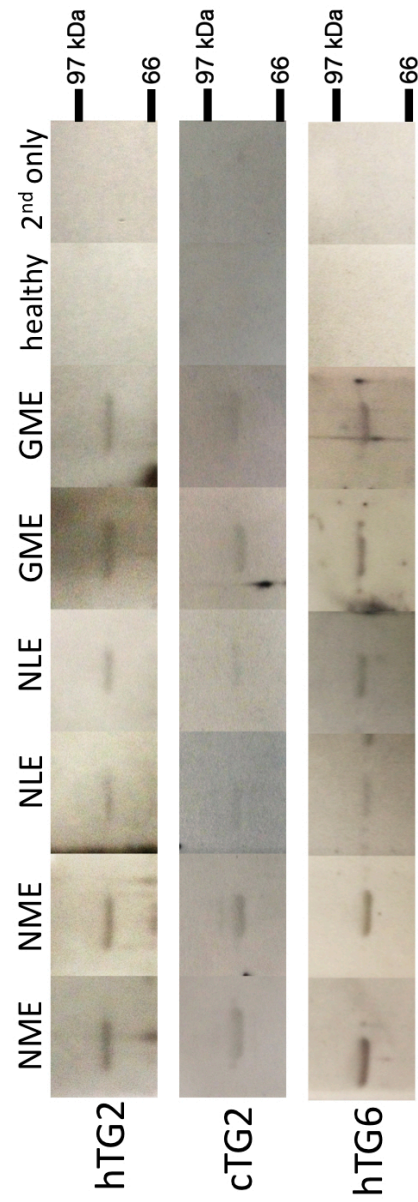


図2 各種のTG蛋白に対して犬のCSFを用いたイムノブロット
 組換えヒトTG2 (hTG2)、組換えイヌTG2 (cTG2)、組換えヒトTG6 (hTG6) に対して特異性
 脳炎 (NME、NLE、GME) および健康 (healthy) なイヌのCSFを用いたイムノブロット。特
 発性脳炎症例の脳脊髄液は3種類の組換えTG (いずれも分子量78 kDa)と反応した。健康なイヌ
 の脳脊髄液および2次抗体のみ (2nd only)では反応は認められなかった。

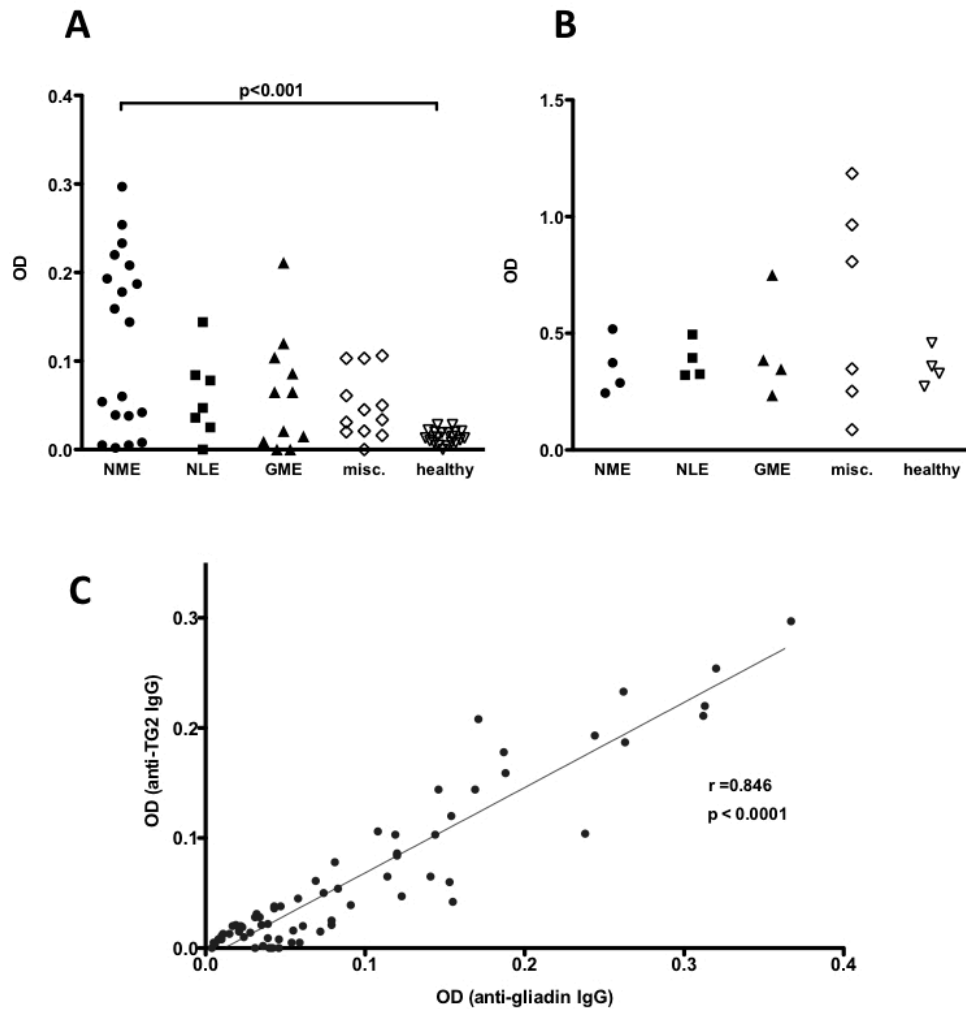


図3 犬のCSF中の自己抗体に対するELISA

A : CNS疾患症例ならびに健康犬におけるCSF中抗TG2抗体のELISA結果。
misc. ; 特発性脳炎を除くCSN疾患群、healthy ; 健康犬。

B : CNS疾患症例ならびに健康犬における血中抗TG2抗体のELISA結果。

C : 全ての測定例におけるCSF中抗TG2抗体と抗グリアジン抗体の相関。

【考察】

犬の特発性脳炎に関するこれまでの報告から、各々の疾患の臨床像や病理組織学的特徴が明らかになってきたが、根本的な病因はいまだ不明である。これまでに NME の CSF 中には抗 GFAP 自己抗体が存在することが報告されてきたが (Matsuki *et al.* 2004, 2009; Shibuya *et al.* 2007; Toda *et al.* 2007)、*in vitro* では NME の抗 GFAP 自己抗体は直接的なアストロサイト障害をもたらさないことが示され (Pham *et al.* 2008)、抗 GFAP 抗体以外の自己抗体が NME の病態に関与する可能性が示唆されていた (Shibuya *et al.* 2007)。このため、本章ではまず NME 症例の CSF 中に含まれる抗 GFAP 抗体以外の自己抗体を探索した。

NME 症例の CSF 中に存在する抗 GFAP 自己抗体を精製ウシ GFAP で吸収したところ、吸収後にも大脳組織のアストロサイトに反応する IgG が認められた。ヒトの自己免疫性脳炎の標的抗原となるタンパク質群に対する抗体を用いて検索した結果、NME 症例の脳脊髄液により得られた結果は、抗 TG2 抗体による反応とよく一致することが明らかになった。そこで対象を NME、NLE および GME に拡大し、組み換えヒト TG2 およびイヌ TG2 蛋白に対するイムノブロットを行ったところ、NME のみならず NLE および GME も CSF が TG2 に反応することが示された。一方、健康犬の CSF は TG2 蛋白に反応しなかった。また、健康犬を含め、犬の血中からは抗 TG2 抗体が検出され、特定の疾患との関連は観察されなかった。このことから、CSF 中の抗 TG2 抗体は破綻した血液脳関門を通過した血中の抗 TG2 抗体に由来すると考えた。

抗 TG2 抗体はヒトのセリアック病の血清診断マーカーとなっている (Caja *et al.*

2011)。この疾患は HLA の特定のハプロタイプと深い関連があり、小腸で TG2 により脱アミノ化されたグリアジンに対する免疫反応が原因で発症する自己免疫性疾患と考えられている。詳細な病態についてはまだ不明な点はあるが、小腸粘膜固有層で抗原として提示されたグリアジンと TG2 に対して産生された自己抗体が原因であるとされている。このため、本章では、抗 TG2 抗体が犬の CSF 中から検出されたことを受け、イヌの CSF 中の抗グリアジン抗体の検出も試みた。その結果、検討したイヌの CSF 中抗グリアジン抗体と抗 TG2 抗体価は相関した。これは、抗 TG2 自己抗体が抗グリアジン抗体と同様の機序によって産生されるというヒトのセリアック病の仮説がイヌにおいても当てはまることを示唆する結果、あるいは、イヌの CSF 中の抗 TG2 自己抗体がグリアジンと交差反応を起こすことを示唆する結果と考えられた。一方、本章の材料として用いた NME 症例の多くは CSF 中の抗 GFAP 抗体が陽性であったが、抗 GFAP 抗体と抗 TG2 抗体価は相関しなかった (data not shown)。また、本研究の NLE と GME 症例の多くは抗 GFAP 抗体陰性であった。これらのことから、抗 GFAP 抗体と抗 TG2 抗体は異なる要因によって生じたものであると考えられた。

運動失調などの神経症状を主体とするセリアック病には *gluten ataxia* という別名称がある (Caja *et al.* 2011)。近年では、*gluten ataxia* の自己抗原が TG2 ではなく TG6 であるとする報告もあることから、(Hadjivassiliou *et al.* 2008, 2013)本研究でも特発性脳炎症例および健康犬の CSF を用いて組換えヒト TG6 に対するイムノブロットを行った。その結果、TG2 に対する結果と同じ反応が得られた。TG6 については大脳や (Fukui *et al.* 2013; Hadjivasiliou *et al.* 2008)、その他の組織からも検出されるという

報告があるが (Fukui *et al.* 2013)、情報は極めて少ない。TG6 は TG2 と相同性が高いことが知られており (Grenard *et al.* 2001; Aeschliman, 2006)、今回の結果からは、血清中から CSF に移行した抗 TG2 自己抗体が TG6 と交差反応性を示したと考えた。

大脳組織における TG2 発現の報告は複数あり (Lesort *et al.* 2000; Caccamo *et al.* 2004; Jeitner *et al.* 2009)、正常な血液脳関門の維持への関与や (Aeschlimann and Paulsson, 1991; Hadjivassiliou *et al.* 2008, 2010)、神経変性疾患や多発性硬化症の病態に関与することが示されている (Caccamo *et al.* 2004; Grosso and Mouradian 2012; Jeitner *et al.* 2009; van Strien *et al.* 2011)。また、セリアック病患者の血清抗 TG2 自己抗体を元に作製した抗体を脳室内投与したマウスに一過性の運動失調が生じることから、抗 TG2 抗体による神経組織障害作用が示唆された (Boscolo *et al.* 2010)。本章で、健康犬に認められなかった CSF 中抗 TG2 自己抗体が特発性脳炎症例に存在したことより、この疾患の病態に抗 TG2 自己抗体が関与する可能性が示された。

【小括】

NME, NLE、GME という犬の特発性脳炎に共通して、症例の CSF 中に TG2 に反応する自己抗体が存在することが示された。そこで以後の章では抗 TG2 抗体が犬のアストロサイトに与える影響を検討するとともに、NME、NLE および GME 症例の剖検例について大脳における TG2 の発現を検討した。

第 2 章

初代培養イヌアストロサイトを用いた
試験管内モデルにおける抗 **TG2** 抗体の影響

【緒言】

自己抗体が細胞の機能障害に関与するかを検討する上で、抗原が細胞表面に存在することが重要となる。これまでに抗 TG2 抗体が細胞膜を貫通して細胞内に入り込むという報告はなく、抗 TG2 抗体による細胞への作用は、細胞表面への結合に起因すると考えられている(Di Simone *et al.* 2010, 2013)。抗 TG2 抗体の結合による細胞機能の変化に関する *in vitro* 報告には、ヒト結腸細胞株、乳腺細胞株、マウス線維芽細胞株における細胞遊走能と接着能の低下 (Barone *et al.* 2007)、ヒト臍静脈内皮細胞株におけるアクチンフィラメントの配列の崩壊、細胞接着能の低下、細胞質の柔軟性の低下 (Di Simone *et al.* 2013)、ヒトの初代培養胎盤栄養膜細胞における細胞内シグナリングの低下、アポトーシス誘導 (Di Simone *et al.* 2010)、ヒト臍帯組織 (Esposito *et al.* 2002) およびヒト胎盤合体細胞 (Anjum *et al.* 2009)における TG2 酵素活性低下などがある。

アストロサイトは神経組織の恒常性の維持に不可欠な役割を有する。一例として、炎症調節機能が挙げられる。アストロサイトは各種炎症性サイトカインによって活性化され、病変の経過や病変の局在によって状況特異的に異なるシグナル経路を活性化させ、炎症の促進と抑制の両方の機能を呈することができる (Gimsa *et al.* 2013; Sofroniew and Vinters 2010)。このため、アストロサイト障害は神経炎症性疾患を増悪させる要因となると考えられる。

初代培養アストロサイトにおける TG2 発現はラットで確認されており、IL-1 β や TNF- α などの炎症性サイトカインによる TG2 の転写活性および発現の亢進

(Monsonogo *et al.* 1997)、グルタミン酸を用いた興奮性毒性による細胞内過酸化物の増加とグルタチオンの低下に伴う TG2 発現の増加 (Campisi *et al.* 2003, 2004)が報告されている。

第一章では、特発性脳炎に罹患した犬の CSF 中に、アストロサイトの TG2 を認識する IgG 自己抗体が存在することが示された。そこで、本章では抗 TG2 抗体が犬のアストロサイトに与える影響を検証するため、初代培養イヌアストロサイトを用い、抗 TG2 抗体との反応実験を行った。また、抗 TG2 抗体ならびに NME 症例 CSF 存在下で培養したイヌアストロサイトの代謝変動を、メタボローム解析により検討した。

【材料と方法】

初代培養イヌアストロサイト

ビーグル犬の死亡新生子由来アストロサイトは、既報 (Pham *et al.* 2008) で樹立され、凍結保存されたものを用いた。解凍した細胞は、15%牛胎子血清 (FBS; JRH Biosciences) を含む DMEM high-glucose に 50 µg/ml のゲンタマイシン (Zenoaq, Fukushima, Japan) を加えた培地中で培養し、4-5 日毎に継代した。

初代培養アストロサイトの性質評価

アストロサイトを φ18mm (Matsunami Glass Industries, Osaka, Japan) のカバーガラス上で培養し、約 80%コンフルエントの時点で冷アセトンにより 2 分間固定した。続いて、PBS で洗浄し、1%正常ヤギ血清 (Wako) を添加した PBS で 30 分間ブロッキングした。PBS で洗浄後、マウス抗 GFAP モノクローナル IgG (1:50, BD Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A)、マウス抗 TG2 モノクローナル抗体 (Abcam, Cambridge, U.K.)、ウサギ抗 TG2 ポリクローナル IgG (1:50, Santa Cruz) をそれぞれ室温で 60 分間反応させた。洗浄後、FITC 標識ヤギ抗マウス IgG (1:100, Santa Cruz) または FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG (1:100, Santa Cruz) を室温で 30 分間反応させた。洗浄後、Vectashield で封入し、蛍光顕微鏡で観察し、ORCA-1394 image analyzing system で記録した。

人工 CSF の調製

人工 CSF は A 液 (0.3 M NaCl、6.0 mM KCL、2.8 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.6 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、22.2 mM glucose) と B 液 (1.6 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.35 mM $\text{NH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、20 mM HEPES、pH 7.4) を使用直前に 1:1 で混和して用いた。

培養イヌアストロサイトへの抗 TG2 抗体の反応試験

15% FBS (JRH Biosciences) 加 DMEM high-glucose 液で ϕ 8 mm のカバーガラス (Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) に培養した約 80%コンフルエントの犬アストロサイトを用いた。カバーガラスは 24 穴のマイクロタイタープレート (Corning Incorporated, Corning, NY, U.S.A.) に移し、1000 μl の人工 CSF 中で 12 時間培養した。アストロサイトに対する抗 TG2 抗体の結合実験としては、人工 CSF 中にマウス抗 TG2 モノクローナル抗体 (Abcam)、ウサギ抗 TG2 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz)、正常マウス IgG (Bethyl) あるいは正常ウサギ IgG (Santa Cruz) をそれぞれ最終濃度が 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加した。これらの抗体および正常 IgG はアジ化ナトリウムなどの夾雑物を除去するため、事前に透析膜 (Spectra/Por Biotech, Regenerated Cellulose Membrane, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, U.S.A.) を用いて PBS 液で 4°C、75 時間、さらに人工 CSF で 4°C、24 時間透析した。12 時間の反応後、各抗体の存在下で培養した犬アストロサイトのカバーガラスを冷アセトンで 2 分間固定した。PBS で洗浄し、FITC 標識ヤギ抗マウス IgG (1:100) または FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG (1:100) のいずれかを遮光下で 30 分間反応させ、

Vectashield で封入後に蛍光顕微鏡で観察し、ORCA-1394 image analyzing system で記録した。

培養イヌアストロサイトの形態評価

φ 8mm のカバーガラス上に培養したイヌアストロサイトを用い、人工 CSF 中にマウス抗 TG2 モノクローナル抗体 (Abcam)、ウサギ抗 TG2 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz)、正常マウス IgG (Bethyl)、正常ウサギ IgG (Santa Cruz) をそれぞれ最終濃度が 20 µg/ml となるよう添加して 12 時間培養した。これに対して人工 CSF のみで 12 時間培養したイヌアストロサイトを対照とした。位相差顕微鏡 (Nikon) で観察後、カバーガラスをメタノール (Wako) で 2 分間固定し、ライト染色液 (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan)、ギムザ染色液 (Muto)、リン酸緩衝液 pH 6.7 の混合液を用いて 5 分間染色し、光学顕微鏡 (BX43, Olympus, Tokyo, Japan) で観察し、顕微鏡用デジタルカメラ (DP21, Olympus) で記録した。

抗 TG2 抗体による培養イヌアストロサイトの GFAP 発現の検討

φ 8mm のカバーガラス上に培養したイヌアストロサイトを用い、人工 CSF 中にウサギ抗 TG2 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz) または正常ウサギ IgG (Santa Cruz) をそれぞれ最終濃度が 20 µg/ml となるよう添加した。人工 CSF のみで培養したイヌアストロサイトを対照とした。12 時間培養後、冷アセトンで 2 分間固定し、PBS で洗浄後、1%正常ヤギ血清 (Wako) で 30 分間ブロッキングした。PBS で洗浄後、マウス抗

GFAP モノクローナル IgG (1:50, BD Pharmingen) を室温、60 分間反応させた。洗浄後、FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG (1:100, Santa Cruz) を室温、30 分間反応させた。洗浄後、Vectashield で封入し、蛍光顕微鏡で観察し、ORCA-1394 image analyzing system で記録した。

アストロサイト代謝産物の抽出およびそのメタボローム解析

φ 35 mm の細胞培養用シャーレ (Sumitomo Bakelite) に培養した約 80%コンフルエントの犬アストロサイトを用いた。ウサギ抗 TG2 ポリクローナル IgG (Santa Cruz) を 20 µg/ml (T 群)、NME 症例 3 頭 (パグ 2 頭、チワワ 1 頭) の CSF (N 群) または健康犬 3 頭 (ラブラドル・レトリバー 2 頭、ビーグル 1 頭) の CSF (H 群) をそれぞれ人工 CSF に対して 25% v/v となるよう添加し、総液量は 800 µl とした中でアストロサイトを培養した。また、800 µl の人工 CSF のみで培養したものを対照 (C 群) とし、各々の条件で 12 時間培養した。その後 Human Metabolome Technologies (HMT) Inc. (Yamagata, Japan) のプロトコルに基づいて以下の手順にて細胞内容物を抽出した。まず、シャーレから細胞培養液を吸引除去後、超純水を用いて作成した 5% (w/w) マンニトール液 (一度目は 2.5 ml、二度目は 0.5 ml を添加) を用いて培養細胞を 2 回洗浄した。続いてメタノール (Wako) を 220 µl 添加して 30 秒間静置し、酵素を不活化させた。次に、10 µM となるように超純水を用いて調整した内部標準溶液を 138 µl 加えてゆっくりと数回ピペッティングした。さらに 30 秒間静置後、抽出溶液を全て回収した。この抽出液は $2,300 \times g$ 、4°C、5 分間遠心分離した。上清を

250 μL ずつ回収して限外ろ過チューブ（ウルトラフリーMC PLHCC HMT 遠心式フィルターユニット 5 kDa, Millipore, Billerica, MA, U.S.A.）に移し、 $9,100 \times g$ 、 4°C 、3 時間遠心して限外ろ過による除蛋白処理を行った。濾液は -80°C 下で HMT 社に輸送し、遠心エバポレーターによる乾燥濃縮を行い、25 μL の超純水に溶解して測定に供した。測定は Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) を用いて CSF 中の代謝産物を測定した。CE-TOFMS にて検出された各物質のピークを自動分析ソフトウェアである MasterHands ver.2.9.0.9（慶應義塾大学）を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 (m/z)、泳動時間およびピーク面積値を得た。

【統計】

メタボローム解析で得られた各群の結果は Prism (Version 5, GraphPad) を用い、Kruskal-Wallis 検定で比較し、 $p < 0.05$ を有意とみなした。

【結果】

培養イヌアストロサイトの性質

培養した犬のアストロサイトは紡錘形から多角形で、中央に位置する卵円形の核と比較的狭い細胞質を有し、1 本から数本の長く伸びた突起を有した。これらは 98%以上が GFAP 陽性、90%以上が TG2 陽性を示した（図 4）。

培養イヌアストロサイトへの抗 TG2 抗体の反応

イヌアストロサイトを抗 TG2 モノクローナルおよびポリクローナル抗体の存在下で 12 時間培養し、その後に細胞を固定して二次抗体を用いて観察したところ、アストロサイトに抗 TG2 抗体が反応した（図 5A、B）。対照として加えた正常マウス IgG および正常ウサギ IgG は培養イヌアストロサイトに反応しなかった（図 5C、D）。

抗 TG2 抗体の培養イヌアストロサイトの形態への影響

抗 TG2 抗体の存在下で 12 時間培養したイヌアストロサイトの形態を位相差顕微鏡およびメタノール固定後のギムザ染色にて観察したところ、対照となる細胞と比較して形態的な変化は認められなかった（図 6、7）。

抗 TG2 抗体による培養イヌアストロサイトの GFAP 発現

ウサギ抗 TG2 ポリクローナル抗体の存在下で 12 時間培養したイヌアストロサイトの GFAP 発現を観察したところ、GFAP は細胞質全域に線維状に発現していた。この

現象は、人工 CSF あるいは正常ウサギ IgG 存在下で培養したアストロサイトには認められなかった (図 8)。

培養イヌアストロサイト内代謝産物のメタボローム解析

CE-TOFMS によるメタボローム解析の結果、培養犬アストロサイト内容抽出溶液からは計 108 種類の代謝産物が検出された。このうち、アストロサイトに豊富に含まれ、酸化還元調整に関わるグルタチオン代謝系、ニコチン酸およびニコチンアミド代謝系、アストロサイト活性の指標となるイノシトール代謝系の代謝物の群間比較を行った (表 1)。

還元型グルタチオン (glutathione: GSH) は C 群に対して T 群で低値であった。グルタミン酸は H 群に対して T 群で低値であった。また、N 群のアスパラギン酸量は C 群に対して低値であり、H 群に対してミオイノシトール 1 リン酸が低値であった。

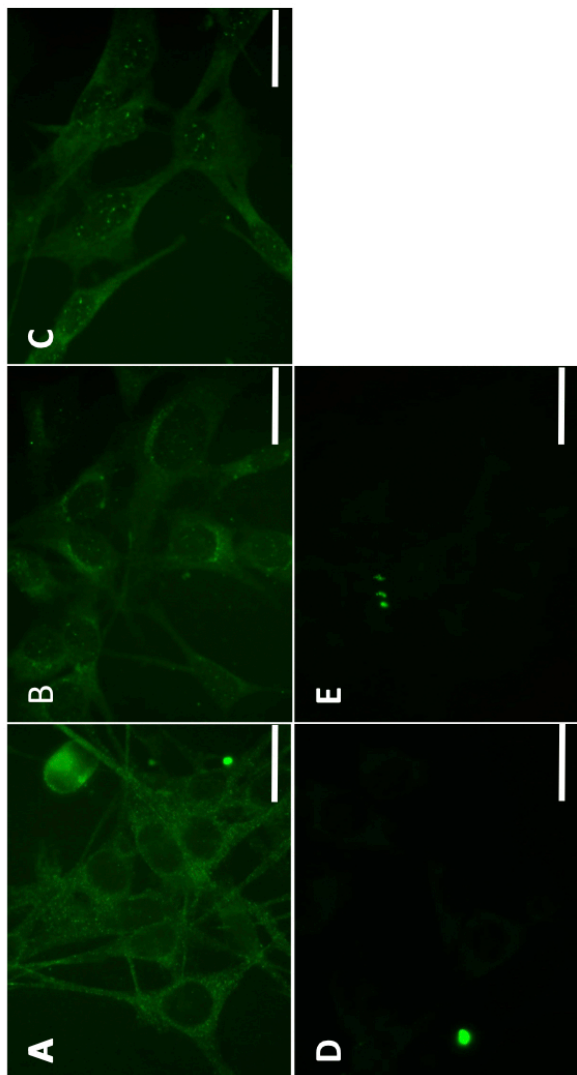


図4 培養イスアストロサイトに対する免疫染色
初代培養したイスアストロサイトに対して、一次抗体として A: 抗 GFAP マウスモノクローナル抗体、B: 抗 TG2 マウスモノクローナル抗体、C: 抗 TG2 ウサギモノクローナル抗体を用いた結果。D: FITC 標識抗マウス IgG、E: FITC 標識抗ウサギ IgG のみを用いた結果。
スケールバーは 25 μm 。

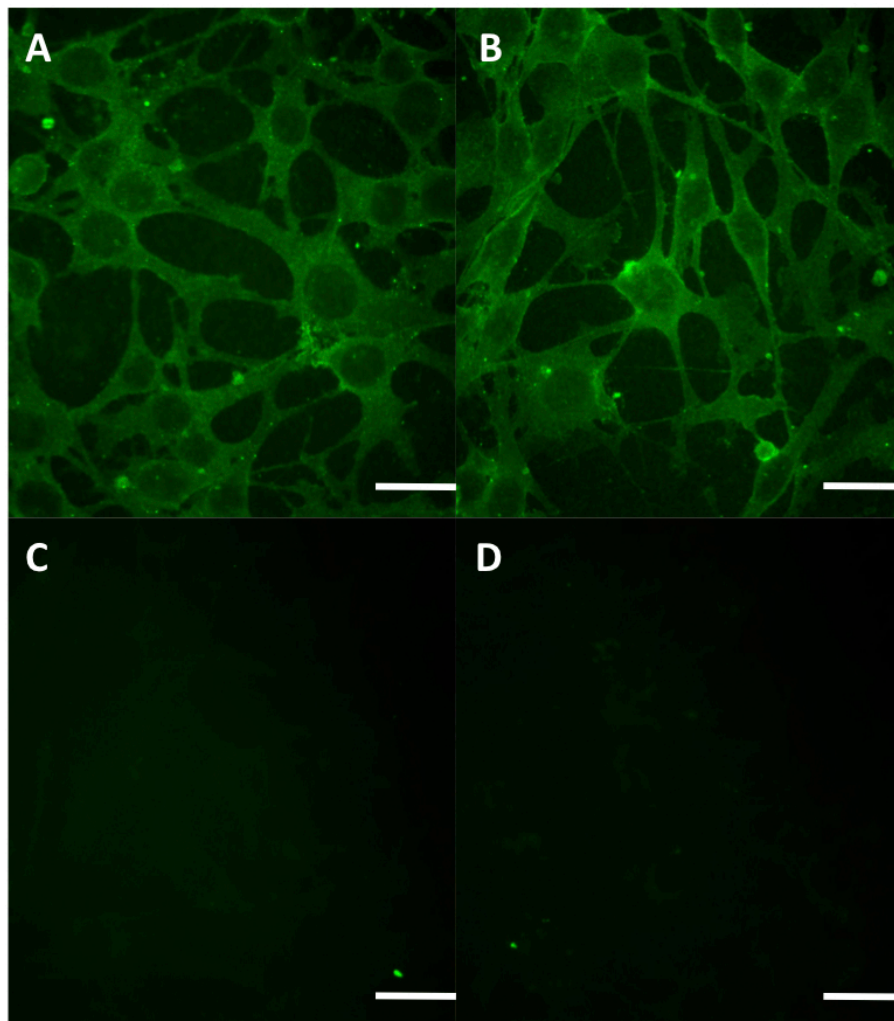


図5 培養イヌアストロサイトの抗TG2抗体の反応実験

抗TG2モノクローナル抗体(A)、抗TG2ポリクローナル抗体(B)、正常マウスIgG(C)、正常ウサギIgG(D)を20 $\mu\text{g/ml}$ で添加した人工CSF中でイヌアストロサイトを12時間培養し、FITC標識二次抗体を反応させて観察した。アストロサイトに抗TG2抗体が反応している。スケールバーは25 μm 。

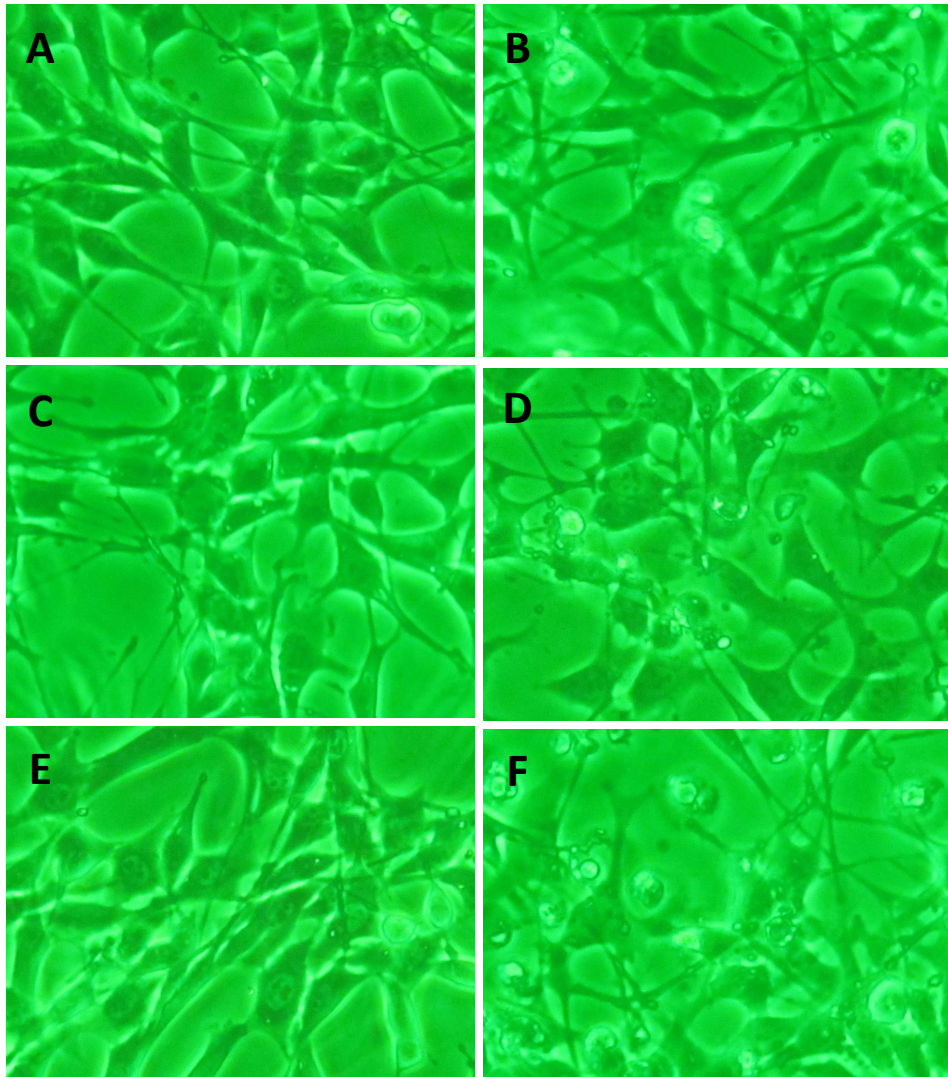


図6 抗TG2抗体の培養イヌアストロサイトの形態への影響（位相差顕微鏡）
 A：培養前、B：人工CSFで12時間培養後、C：抗TG2モノクローナル抗体および
 D：抗TG2ポリクローナル抗体存在下で培養後、E：正常マウスIgGおよびF：正常
 ウサギIgG存在下で培養後。いずれも形態変化は認められない。×100

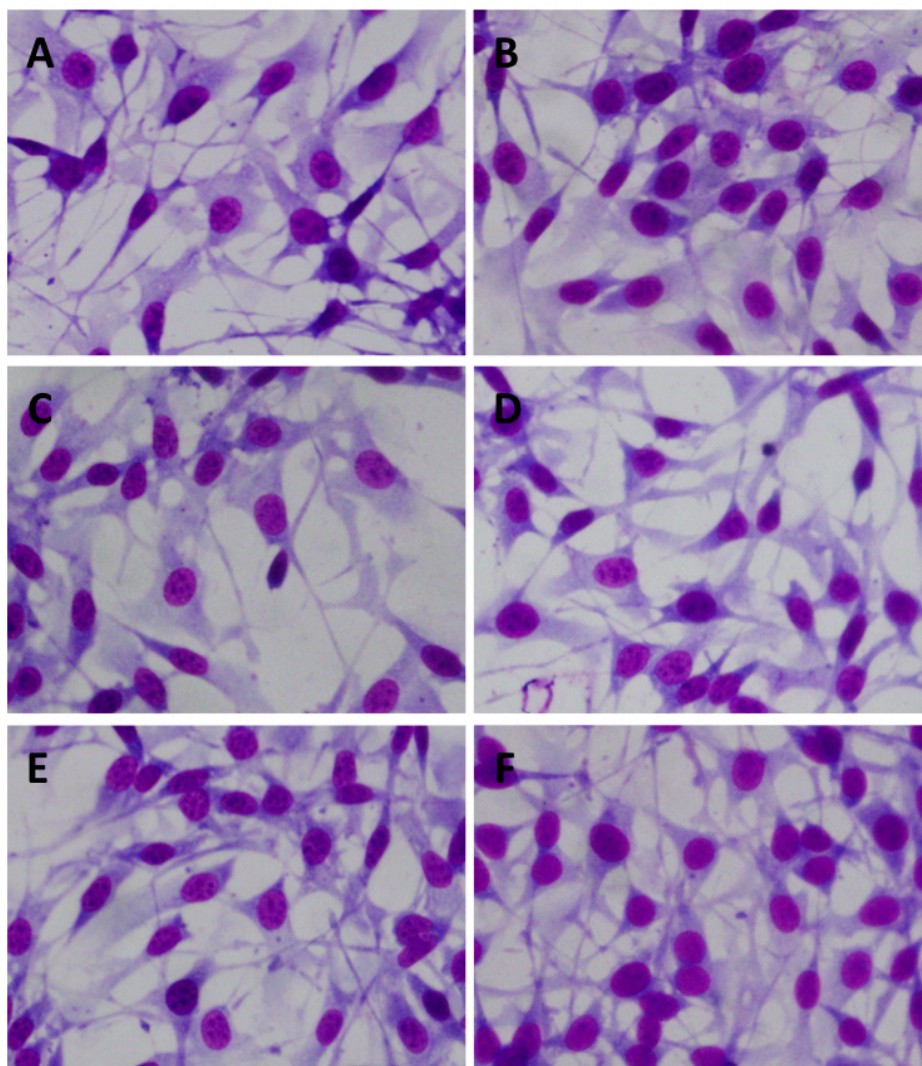


図7 抗TG2抗体の培養イヌアストロサイトの形態への影響（メタノール固定後ギムザ染色）

A：培養前、B：人工CSFで12時間培養後、C：抗TG2モノクローナル抗体およびD：抗TG2ポリクローナル抗体存在下で培養後、E：正常マウスIgGおよびF：正常ウサギIgG存在下で培養後。いずれも形態変化は認められない。×100

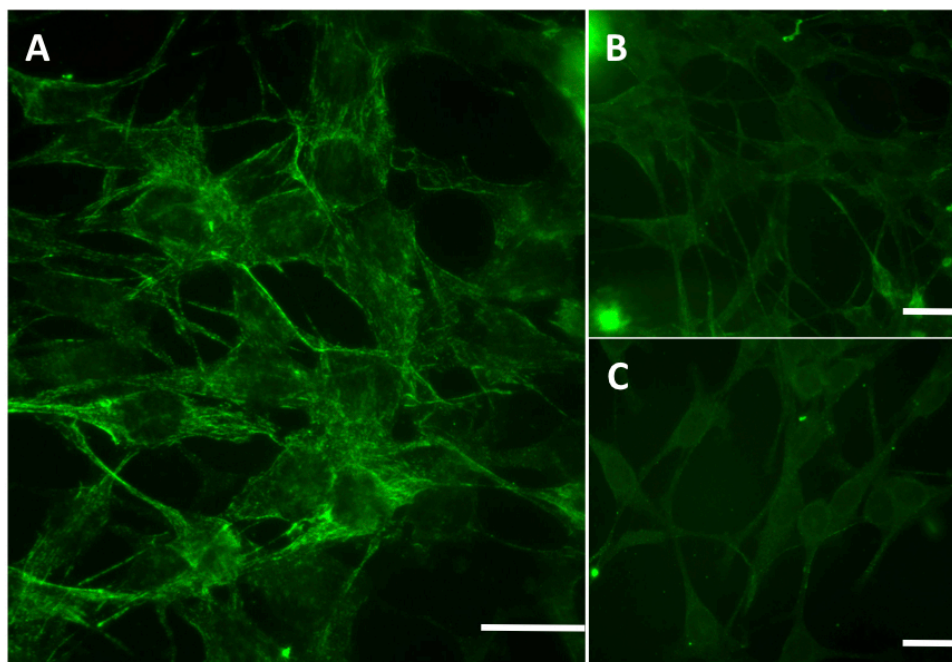


図 8 抗 TG2 抗体の存在下で 12 時間培養したイヌアストロサイトにおける GFAP 発現の増強

抗 TG2 ポリクローナル抗体 (A)、正常ウサギ IgG (B) を 20 $\mu\text{l/ml}$ で添加した人工 CSF、または人工 CSF のみ (C) で培養したイヌアストロサイトの GFAP 発現。

スケールバーは 25 μm 。

表 1 抗 TG2 抗体、壊死性髄膜脳炎症例の CSF、あるいは健康犬 CSF の存在下で培養したイヌアストロサイトの細胞内代謝産物

	T	N	H
Glutathione (GSH)	0.177 ± 0.063 *	0.276 ± 0.026	0.542 ± 0.239
Glutathione disulfide (GSSG)	0.431 ± 0.092	1.022 ± 0.046	0.901 ± 0.136
Gln	0.758 ± 0.115	1.572 ± 0.283	0.91 ± 0.182
Glu	0.708 ± 0.059 †	1.075 ± 0.113	1.18 ± 0.152
Gly	0.471 ± 0.054	0.836 ± 0.036	0.762 ± 0.163
Asp	0.76 ± 0.078	0.468 ± 0.099 *	0.879 ± 0.054
Asn	0.408 ± 0.052	0.318 ± 0.053	0.712 ± 0.188
Ala	1.751 ± 0.338	0.69 ± 0.02	1.888 ± 0.493
Ser	1.015 ± 0.117	0.519 ± 0.053	0.852 ± 0.036
5-Oxoproline	0.353 ± 0.061 †	0.901 ± 0.394	0.866 ± 0.163
<i>myo</i> -Inositol 1-phosphate	0.52 ± 0.144	0.4 ± 0.044 †	1.73 ± 0.291
Acetyl CoA	0.628 ± 0.149	0.855 ± 0.311	1.121 ± 0.234
NADPH	0.876 ± 0.042	0.365 ± 0.11	1.238 ± 0.465
NADP+	0.585 ± 0.057	0.793 ± 0.089	0.779 ± 0.107
NAD+	0.562 ± 0.1	0.948 ± 0.173	0.985 ± 0.214
NADH	0.456 ± 0.252	1.662 ± 0.799	1.206 ± 0.548

T : 抗 TG2 抗体、N : 壊死性髄膜脳炎症例 CSF、H : 健康犬 CSF。数値は人工 CSF のみで培養したアストロサイト (C 群) を 1 とした相対値。

* $p < 0.05$ vs C、† $p < 0.05$ vs H

【考察】

本章の実験から、初代培養イヌアストロサイトの多くは細胞質内に TG2 を有し、さらに抗 TG2 抗体が生きたイヌアストロサイトに反応することも明らかになった。つまり、イヌアストロサイトは細胞質内および細胞膜上に TG2 を発現していることが示された。抗 TG2 抗体の存在下で培養したイヌアストロサイトは光学顕微鏡的な形態変化を示さなかったが、GFAP の発現増強と配列の変化が観察された。本章で用いた抗 TG2 抗体濃度（約 2 mg/dl）は、犬の特発性脳炎の脳脊髄液中 IgG 濃度が 50-200 mg/dl に達することを考えると、現実の病態を反映しうる濃度であると考えられる。

他種動物のアストロサイトに抗 TG2 抗体を反応させた先行研究はないが、ヒト結腸細胞株、乳癌細胞株、あるいはマウス皮膚細胞株にセリアック病患者由来抗 TG2 抗体を反応させると、濃度依存性にアクチン配列の変化が生じることが認められている (Barone *et al.* 2007)。また、抗 TG2 抗体はヒト子宮内膜内皮細胞表面の TG2 に結合してアクチン配列を変化させ、細胞骨格再構築のシグナル調整因子である FAK 発現を低下させる (Di Simone *et al.* 2013)。本章では抗 TG2 抗体で処理したイヌアストロサイトのアクチン配列を直接検討していないが、少なくとも中間径フィラメントである GFAP の配列を変化させることが示された。本章で示された GFAP の発現増強と配列の変化は、抗 TG2 抗体によって直接的にアストロサイトが活性化されたことを示唆すると考えられた。

本章では、抗 TG2 抗体で処理したイヌアストロサイト内の代謝変動を検討するためにメタボローム解析を実施した。メタボローム解析は、細胞、体液、組織内の低分子代

謝産物を網羅的に解析する手法である。神経疾患や自己免疫性疾患のバイオマーカーの特定や分子学的メカニズムの解析にも広く用いられている (Caudle *et al.* 2010; Fitzpatrick and Young, 2013)。

本章でのメタボローム解析の結果、T 群では細胞内 GSH および細胞内グルタミン酸の低下が顕著であった。GSH は CNS における主要な抗酸化物質で、ヒトのパーキンソン病、マウスのハンチントン病モデル (Dringen and Hirrlinger, 2003)、マウス (Smeland *et al.* 2013) およびラット (Melo *et al.* 2005) のてんかんモデルでは脳の GSH 含有量の低下が報告されている。CNS においてアストロサイトは最も多く GSH を含む細胞種であり、GSH はアストロサイト内に常に一定量存在するように調節され、細胞内 GSH 濃度はアストロサイト障害の指標となる (Dringen and Hirrlinger, 2003; Hirrlinger and Dringen, 2010; Li *et al.* 2012)。また、ラットの初代培養アストロサイトでは生理的条件下で multidrug resistance protein 1 トランスポーターを介して GSH を放出し、これは他種の細胞への GSH 供給を反映する (Dringen and Hamprecht, 1998)。一方、グルタミン酸は GSH 合成の基質であり、ラットの初代培養アストロサイトを用いた実験では、グルタミン酸を培養液から枯渇させると GSH 合成が抑制される (Dringen and Hamprecht, 1996)。T 群、つまり抗 TG2 抗体で処理されたアストロサイト内の GSH の低下は細胞内グルタミン酸量の減少、あるいは細胞外への放出によると考えられ、結果としてアストロサイトの抗酸化能低下を招いた可能性がある。

N 群では H 群に対してミオイノシトール 1 リン酸が低下し、T 群でも低下する傾向にあった。ミオイノシトール 1 リン酸はアストロサイトに豊富に含まれ (Glanville *et*

*al.*1989; Brand *et al.* 1993)、浸透圧調節や脂質合成などの細胞内代謝に重要な役割を有する(Fisher *et al.* 2002)。ミオイノシトール 1 リン酸の減少がアストロサイト代謝に与える影響については不明であるが、T 群と N 群においてともに減少したことから、培養アストロサイトに結合した抗 TG2 抗体が原因であることが示唆された。

以上より、抗 TG2 抗体は培養イヌアストロサイトを活性化させるとともに、細胞内の GSH やグルタミン酸濃度を低下させ、細胞機能に影響することが明らかとなった。

【小括】

抗 TG2 抗体は、培養イヌアストロサイトに結合することが示された。また、抗 TG2 抗体が細胞膜上に結合することにより、培養イヌアストロサイトの GFAP 発現は増強され、線維配列に変化が生じた。培養アストロサイトの内因性代謝物に対するメタボローム解析からは、抗 TG2 抗体の存在下で培養した培養イヌアストロサイト内の GSH ならびにグルタミン酸含有量が低下していた。これらの結果から、培養イヌアストロサイトにおいて、細胞膜上に結合した抗 TG2 抗体は、細胞内の GFAP 発現や GSH 代謝を変化させることが示された。

第 3 章

犬の特発性脳炎における TG2 陽性アストロサイトの分布

【緒言】

TG2 はラット (Ohashi *et al.* 1995; Reichelt and Poulsen, 1992) やヒト (Beninati and Piacentini, 2004; Caccamo *et al.* 2004; Kim *et al.* 1999; Ruan and Johnson 2007; Siegel and Khosla, 2007) の大脳に豊富に含まれることが報告されている。ヒトの正常な大脳組織では TG2 は血管内皮細胞に発現している。また、多発性硬化症の患者では大脳の病変部の活性化アストロサイトに TG2 が発現する (van Strien *et al.* 2011)。一方、犬の大脳における TG2 の局在や疾患による発現の変化に関する報告はない。

第一章では、特発性脳炎に罹患した犬の CSF 中にアストロサイトの TG2 を認識する自己抗体が存在することが示された。第二章では抗 TG2 抗体が犬の培養アストロサイトの細胞膜に結合し、同時にアストロサイトの活性化と細胞内 GSH およびグルタミン酸の減少が生じた。本章では、特発性脳炎による死亡症例の大脳組織に対する免疫組織化学を行い、TG2 の分布を観察することで、脳炎における TG2 の動態を検討した。

【材料と方法】

健康犬および特発性脳炎症例に対する TG2 の免疫組織化学的検索

本学獣医病理学教室から分与され、病理組織学的に診断された NME 6 頭（パグ 3 頭、シー・ズー、マルチーズ、チワワ各 1 頭）、NLE 1 頭（チワワ）、GME 3 頭（マルチーズ、ヨークシャー・テリア、トイ・プードル各 1 頭）の犬の脳の一部のパラフィン包埋ブロックを用いた。対照として、健康ビーグル犬のパラフィン包埋犬脳組織を用いた。組織は 4 μm に薄切し、脱パラフィン処理後、TG2 の免疫染色に対して 121°C 10 分間の抗原の賦活化処理を行った。TBS で洗浄後、全ての標本を内因性ペルオキシダーゼの不活化のために 3% の過酸化水素を含むメタノール液に室温、5 分間浸漬した。洗浄後、8% のスキムミルクを含む TBS 液で 37°C、40 分間ブロッキングをし、一次抗体を 4°C、一晩反応させた。一次抗体はウサギ抗 GFAP ポリクローナル抗体 (1:500、Dako) またはマウス抗 TG2 モノクローナル抗体 (1:50、Abcam) を用いた。洗浄後、二次抗体として EnVision System HRP 標識ポリマー抗ウサギまたは抗マウス試薬 (Dako) を 37°C、40 分間反応させた。発色はジアミノベンジジン四塩酸塩 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を最終濃度 0.1% となるよう過酸化水素 (Wako) を添加して用い、マイヤーのヘマトキシリンで核染色を行い、光学顕微鏡下で観察、記録した。

【結果】

健康犬および特発性脳炎症例に対する免疫組織化学的検索

健康ビーグル犬の髄膜の一部の血管では内皮細胞が TG2 陽性であった (図 9A)。大脳皮質表層のグリア境界膜が TG2 陽性を呈し、皮質にも TG2 陽性アストロサイトが散見された (図 9B)。白質にも TG2 陽性のアストロサイトが観察されたが (図 9C)、GFAP 陽性アストロサイト (図 9D) と比較して少なかった。白質の血管には TG2 陽性のアストロサイトの足突起が伸長していた (図 9E)。

NME 症例では、大脳表層の剥離が重度であった領域を除き、グリア境界膜は TG2 陽性で、壊死が及んでいない皮質には健康犬と比較して広い細胞質を有する TG2 陽性アストロサイトが散在していた (図 10A)。皮質の一部の血管では TG2 陽性の肥大した内皮細胞が観察された (図 10B)。白質には TG2 陽性アストロサイトが観察され、互いの突起が重複しない程度の密度で存在していた (図 10C)。白質の血管には TG2 陽性アストロサイトが足突起を伸長していた (図 10D)。血管周囲を取り囲む TG2 陽性アストロサイトの足突起は大脳皮質でも観察されたが、皮質の囲管性細胞浸潤のある血管では発現が低下 (図 11A、B) または消失 (図 11C、D) していた。また、グリオース領域によって TG2 陽性アストロサイトの密度に差が認められたが、いずれも健康犬の皮質にくらべて密度は高かった。(図 11E、F)。

NLE では健康犬や NME 症例同様グリア境界膜が TG2 陽性であった (図 12A)。皮質には TG2 陽性アストロサイトが散在していた (図 12B)。白質の TG2 陽性アストロサイトは健康犬や NME 症例の白質と比較して細胞質が広く、密に存在した (図 12C)。

白質の血管では、健康犬や NME 症例同様に TG2 陽性のアストロサイトから足突起が伸長していた (図 12D)。白質のグリオーシス領域には TG2 陽性のアストロサイトが観察できた (図 12E、F)。

GME 症例の髄膜の一部の血管では、TG2 陽性の肥大した内皮細胞が観察された (図 13A)。また、健康犬、NME および NLE 症例と異なり GME の全症例において大脳皮質に TG2 発現は認められなかった (図 13B)。白質には TG2 陽性のアストロサイトが存在した (図 13C)。白質の小血管周囲には TG2 弱陽性の足突起が観察された (図 13D)。囲管性細胞浸潤巣周囲や、肉芽腫性病変周囲に観察されたアストロサイトは TG2 陰性であった (図 13E-H)。

表 2 には本章の観察結果を一覧表としてまとめた。

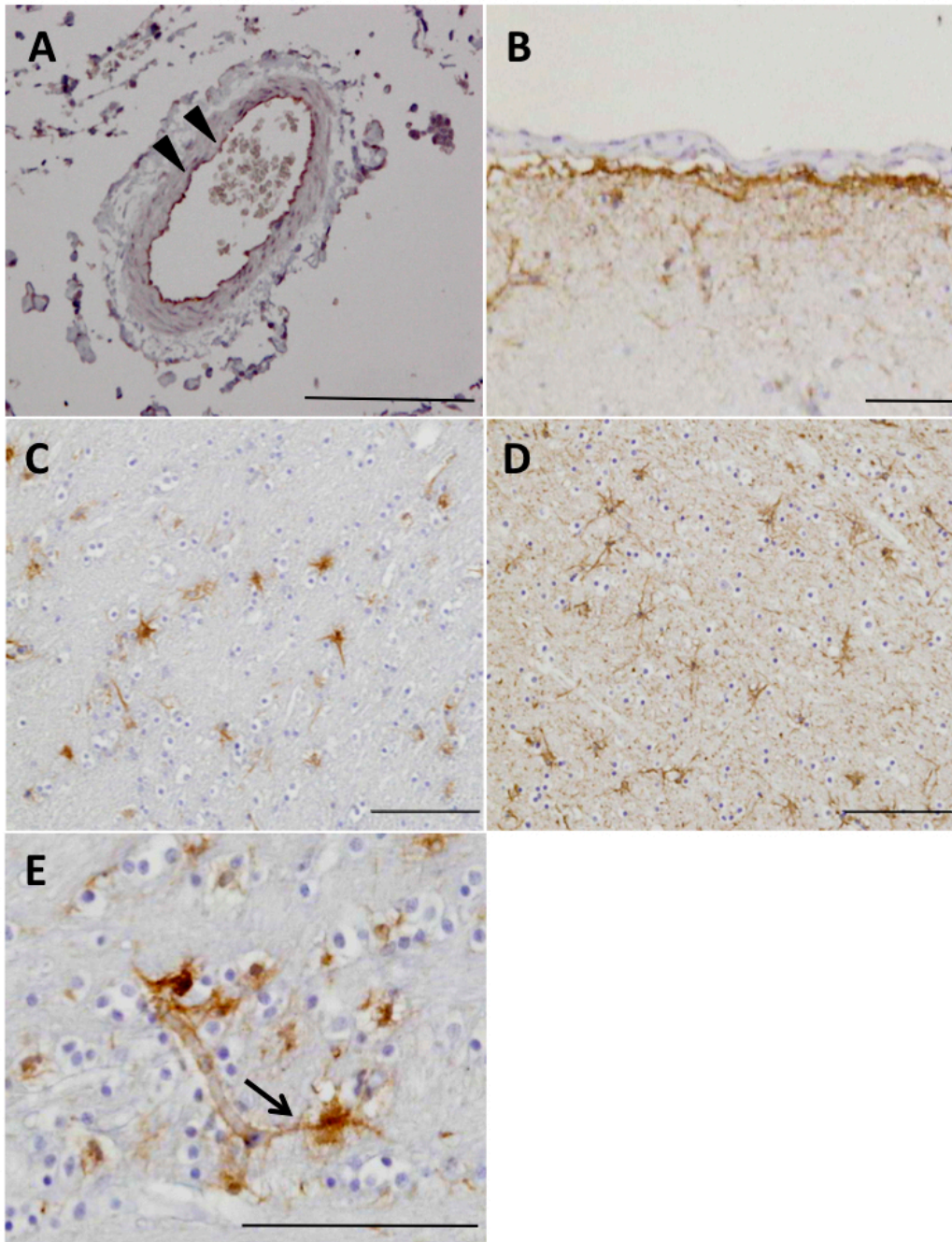


図9 健康なビーグル犬の脳組織における TG2 の分布

A：髄膜の血管内皮細胞が TG2 陽性を示した（矢頭）。B：グリア境界膜には TG2 が発現しており、皮質には TG2 陽性アストロサイトが散見された。C：白質に観察された TG2 陽性アストロサイトと D：同部位の GFAP 陽性アストロサイト。TG2 陽性を示すアストロサイトは GFAP 陽性アストロサイトに比べて少なかった。E：白質の小血管に向かって TG2 陽性アストロサイトの足突起が伸長していた（矢印）。スケールバーは 200 μm 。

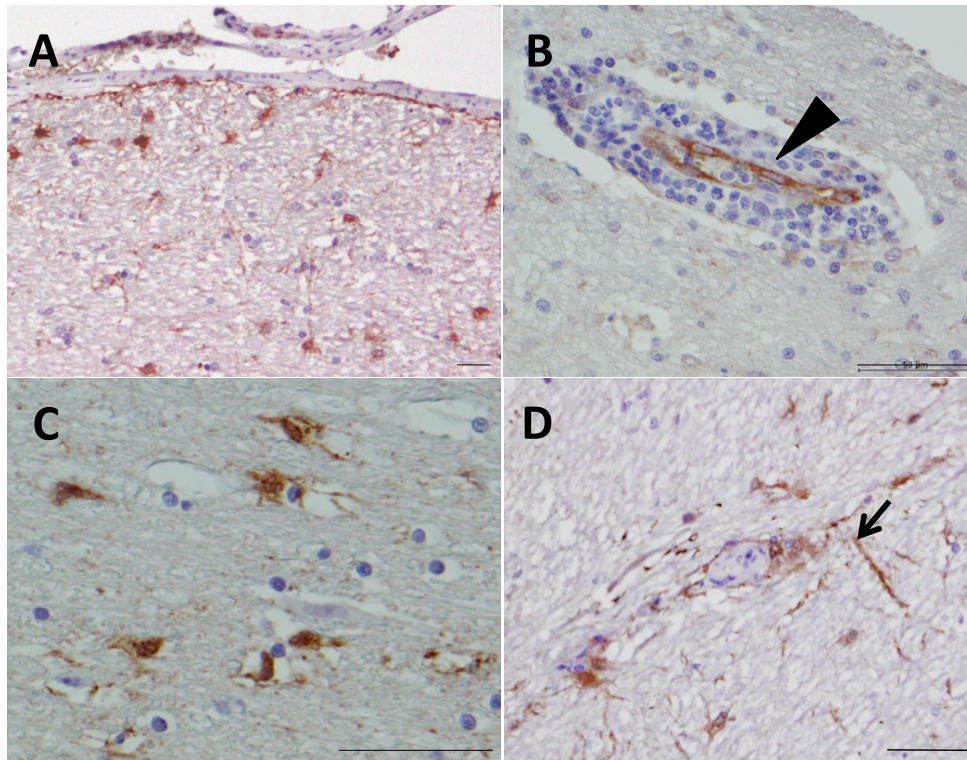


図 10 NME 症例の脳組織における TG2 の分布

A : NME のパグの脳表層部。グリア境界膜は TG2 を発現しており、皮質には肥大した TG2 陽性アストロサイトが散在していた。B : NME のパグの皮質。一部の血管では肥大した内皮細胞が TG2 陽性であった (矢頭)。C : NME のマルチーズの白質。TG2 陽性アストロサイトが観察された。D : NME のパグの白質。血管には TG2 陽性アストロサイトが足突起を伸長していた (矢印)。スケールバーは 50 μm 。

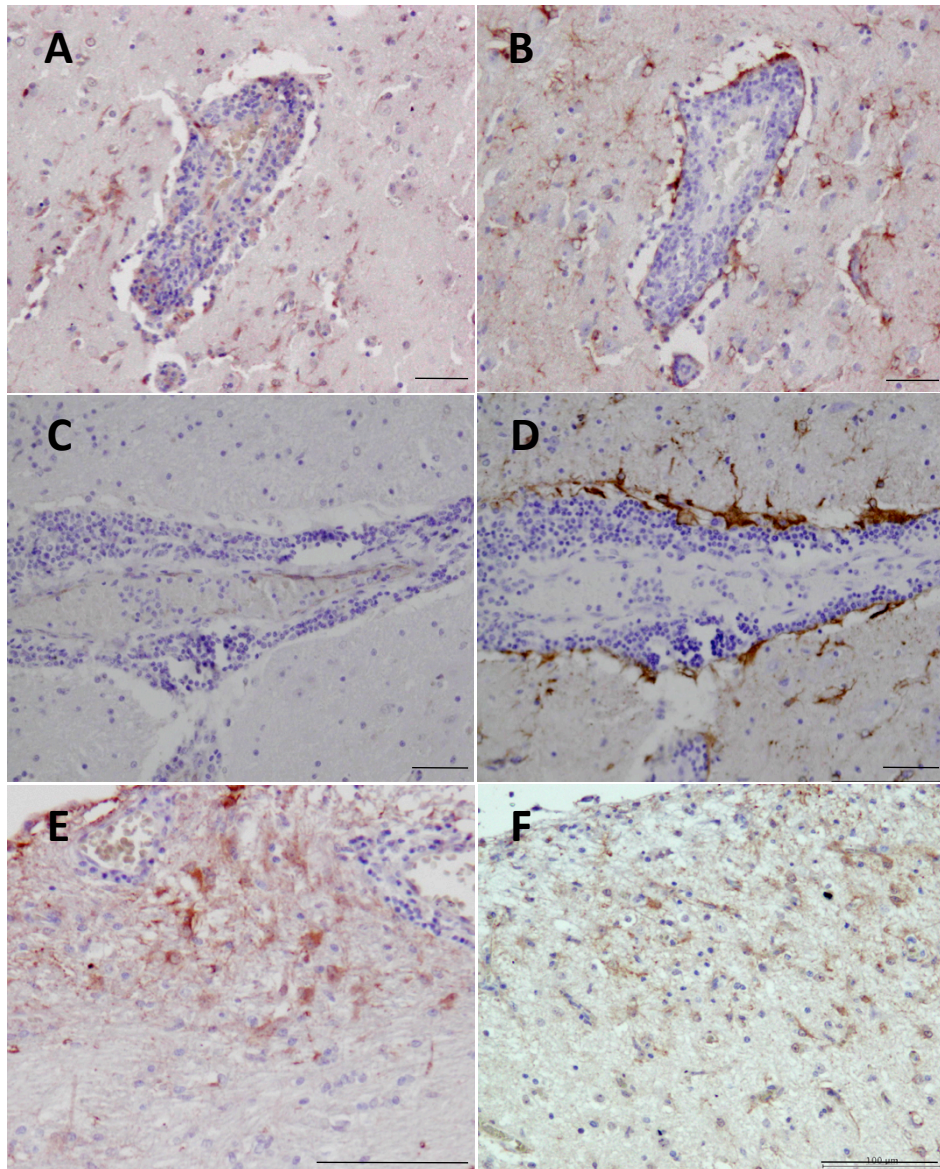


図 11 NME の大脳病変における TG2 または GFAP に対する免疫組織化学
NME のパグの大脳皮質に認められた囲管性細胞浸潤巣周囲において、アストロサイトの TG2 発現の低下 (A)、または消失 (C) が認められた。同部位の GFAP に対する免疫染色の結果を B、D に示した。NME のシー・ズーの大脳皮質に認められたグリオーシス領域 (E,F) では肥大した TG2 陽性アストロサイトが健康犬の皮質に比較して増生していた。スケールバーは 200 μm 。

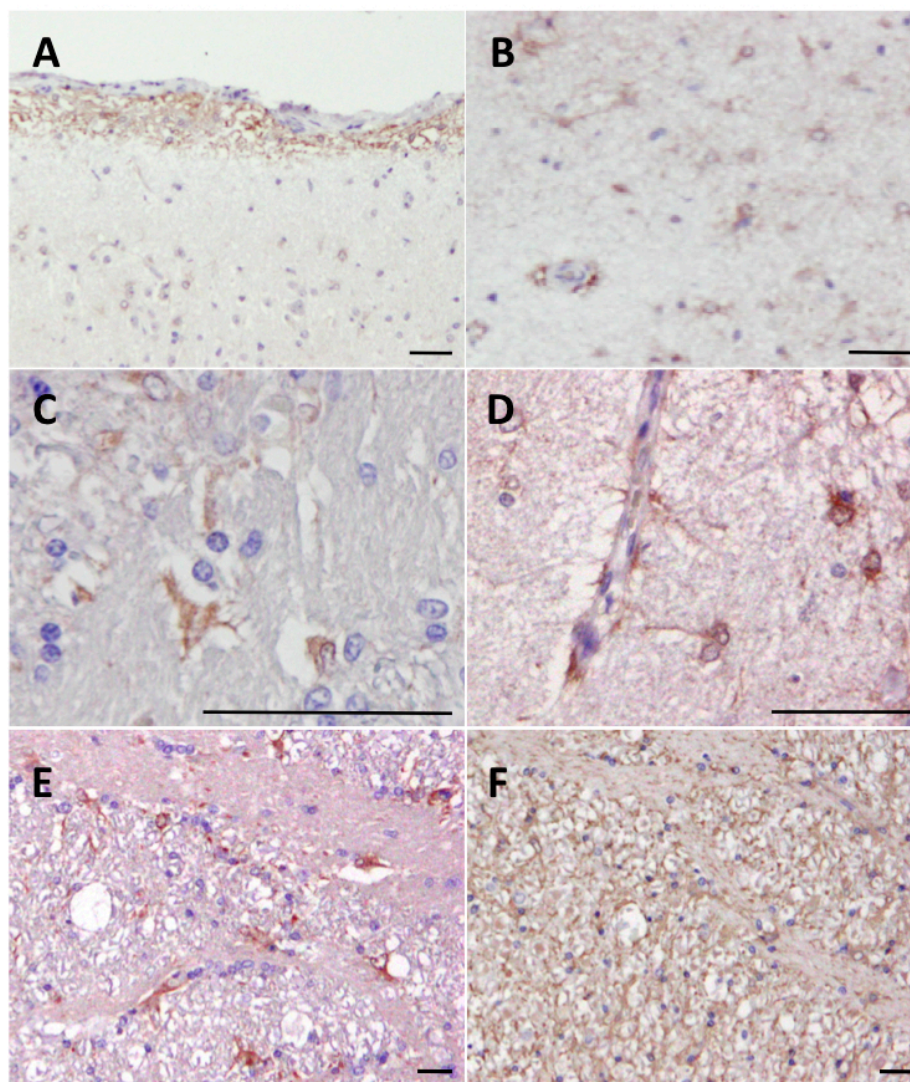


図 12 NLE の大脳組織における TG2 および GFAP に対する免疫組織化学
 A : 脳溝のグリア境界膜が TG2 陽性を示した。B : 大脳皮質には TG2 陽性アストロサイトが散在していた。C : 白質に認められた TG2 陽性アストロサイトは健康犬とくらべて多かった。D : 白質の血管に向かって TG2 陽性アストロサイトの足突起が伸長していた。E : 白質のグリオシス領域で認められた TG2 陽性アストロサイトと F : 同部位の GFAP に対する免疫染色。
 スケールバーは 50 μm 。

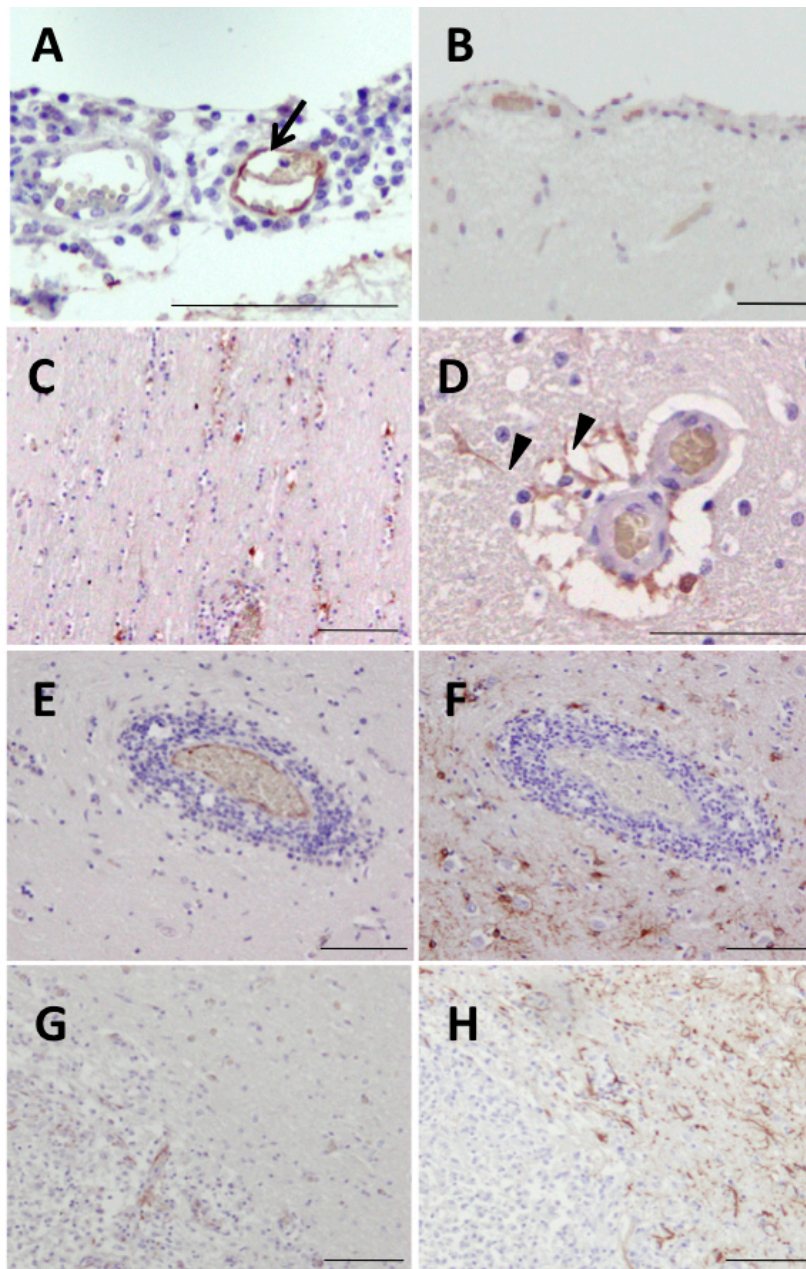


図 13 GME の大脳における TG2 と GFAP に対する免疫組織化学

A : GME のトイ・ブードルの髄膜の一部の血管では肥大した内皮細胞が TG2 陽性であった。B : GME のマルチーズの大脳皮質。TG2 発現は陰性であった。C : GME のマルチーズ。白質 (写真右半分) には TG2 陽性アストロサイトが観察された。D : GME のヨークシャー・テリアの白質の小血管には TG2 陽性アストロサイトの足突起が伸長していた。E : GME のマルチーズに認められた囲管性細胞浸潤巣周囲は TG2 陰性であった。F : 同部位では GFAP 陽性アストロサイトは散見された。G : GME のヨークシャー・テリアの肉芽腫性病変周囲のアストロサイトは TG2 陰性であった。H : 同部位の GFAP に対する免疫染色。スケールバーは A,D : 50 μ m、他 : 200 μ m。

表 2 健康犬および特発性脳炎症例のアストロサイトの TG2 発現

		グリア境界膜	大脳皮質	大脳白質	小血管周囲
healthy	ビーグル	+	+	+	+
NME	パグ	+	+	+	+
NME	パグ	—	+	+	+
NME	パグ	+/-	+	+	+
NME	チワワ	+	NE	+	+
NME	シー/ズー	+	+	+	+
NME	マルチーズ	+	+	+	+
NLE	チワワ	+	+	+	+
GME	マルチーズ	—	—	+	+
GME	ヨークシャー・ テリア	—	—	+	+
GME	トイ・プードル	—	—	+	+

＋：TG2 陽性アストロサイトが存在した、－：アストロサイトは TG2 陰性であった、NE：評価不能。

【考察】

本章では健康犬および特発性脳炎の犬における大脳の TG2 の分布を免疫組織化学により観察した。健康犬では TG2 陽性アストロサイトが大脳実質全域で観察された。ヒトの正常な大脳組織において TG2 は血管内皮細胞のみで発現していることが報告されているため (van Strien *et al.* 2011)、犬の大脳組織における TG2 の発現と分布はヒトと異なることが示された。ヒトでは、血管内皮細胞表面にセリアック病患者由来の抗 TG2 自己抗体が結合すると血管透過性の亢進が生じることが *in vitro* 研究で報告されている (Myrsky *et al.* 2009a)。また、セリアック病の小腸病変や小脳病変の血管壁には抗 TG2 自己抗体の沈着が認められている (Korponay-Szabó *et al.* 2004; Hadjivassiliou *et al.* 2006; Myrsky *et al.* 2009b)。このような血管周囲への抗体の沈着は血液脳関門の破綻につながり、中枢神経組織障害の引き金となると考えられている (Hadjivassiliou *et al.* 2006)。一方、健康犬や特発性脳炎の犬ではごく一部の内皮細胞における TG2 発現しか確認されなかった。さらに GME と NME の TG2 陽性内皮細胞は肥大しており、大脳の炎症の波及による二次的な変化である可能性も考えられた。このため、これらの症例の末梢の抗 TG2 自己抗体は血液脳関門を構成する内皮細胞への直接的な作用を有するとは考えにくく、抗 TG2 抗体が CSF 中に出現するためには別の機序が存在することが伺えた。

NME 症例と NLE 症例では、健康犬同様に大脳実質のほぼ全域において TG2 陽性アストロサイトが存在した。NME 症例の皮質および NLE 症例の白質の TG2 陽性アストロサイトは健康犬の同部位と比較して肥大または増生しており、アストロサイトが活性

化していると考えられた。ヒト肝細胞株、肝芽細胞腫株、半月板細胞、ウシ肺動脈内皮細胞において TG2 の発現は TNF- α 、IL-18、IL-6 などの炎症誘発性サイトカインに誘導されることが知られている(Gundemir *et al.* 2012)。本章の結果より、NME 症例において炎症が存在する大脳皮質において TG2 陽性アストロサイトが増生していたことはこの報告を支持するものであった。

さらに、NME および NLE 症例のグリオーシス領域においても TG2 陽性アストロサイトが確認され、とくに NME 症例では増生していた。ヒトでは、活性化した TG2 陽性アストロサイトが多発性硬化症患者の大脳の病変部で認められている(van Strien *et al.* 2011)。多発性硬化症の病変部へのアストロサイトの遊走およびフィブロネクチンをはじめとする細胞外基質とアストロサイトとの接着反応は、グリオーシスやグリア瘢痕形成など局所の神経組織修復に重要で、この過程に TG2 が関与することが報告されている (van Strien *et al.* 2011 ; Gundemir *et al.* 2012)。本章の結果、アストロサイトの TG2 発現の増強が NME のグリオーシス領域で認められたことは、ヒトの多発性硬化症病変の所見と一致しており、TG2 が犬の大脳組織修復過程におけるアストロサイトの遊走・接着にも関与することが示唆された。

健康犬ならびに NME、NLE および GME 症例において、白質の血管を取り囲む TG2 陽性のアストロサイトの足突起が観察された。NME では大脳皮質の血管にも TG2 陽性アストロサイトの足突起が観察された。これに対し、NME および GME の囲管性細胞浸潤巣および GME の肉芽腫性炎症巣周囲のアストロサイトの TG2 発現は低下または消失していた。さらに GME 症例では、健康犬や NME および NLE 症例と

異なり、大脳皮質のアストロサイトは TG2 陰性であった。また、第 2 章より、TG2 は犬のアストロサイトの表面にも発現していることが示された。細胞表面の TG2 は酸化ストレスに対する感受性が高く、軽度または初期の酸化障害に対して発現が増強されるが、重度の酸化ストレス下では完全に消失することが、HeLa 細胞に対して過酸化水素投与、紫外線照射、ドキソルビン添加による酸化を導入した実験および、組換えヒト TG2 蛋白に酸化型グルタチオンを添加した実験で報告されている (Stamnaes *et al.* 2010; Caccamo *et al.* 2012)。このため、本章で得られた NME および GME のアストロサイトの TG2 発現の低下は、炎症に伴う酸化障害が進行したためであると考えた。ただし、GME は白質の病変を特徴とし、白質の病変と大脳皮質の TG2 発現の消失との関連性は不明であった。

抗 TG2 抗体はセリアック病の原因とされているが、ヒトではさらに I 型糖尿病 (Lampasona *et al.* 1999)、リウマチ性関節炎、紅斑性狼瘡 (Luft 2003)、封入体筋炎 (Gendek *et al.* 2005) などの炎症性疾患の患者の血清中からも抗 TG2 抗体が検出される。これについて、抗 TG2 自己抗体の出現は各々の組織細胞の変性や破壊に伴って漏出した TG2 が原因であると考えられる研究者もいる (Kim 2006)。犬の特発性脳炎は神経細胞に先立ってアストロサイトの変性・脱落が観察される疾患であり、本章において犬の脳ではアストロサイトが TG2 を発現していることが示されたことから、アストロサイトの変性や破壊に伴って漏出した TG2 に対して抗 TG2 自己抗体が産生された可能性を否定することはできない。しかし、第 2 章より抗 TG2 抗体はアストロサイトに結合すると GFAP 発現が増強されることが示され、本章の結果、活性化した GFAP 陽

性アストロサイトは過去の報告 (Talarico and Schatzberg 2010) 同様病変部周囲に存在したため、第 1 章で検出された CSF 中の抗 TG2 自己抗体は血液脳関門を通過した末梢血液中の抗体であると考えた。

セリアック病患者の小腸組織には粘膜上皮基底膜、固有層の線維芽細胞、血管基底膜に抗 TG2 自己抗体の沈着が報告されており、小腸病変は粘膜固有層の異常細胞増殖による腸陰窩の消失と粘膜絨毛の平坦化、腸上皮細胞のターンオーバーの停止、粘膜上皮バリア障害を伴う (Caja *et al.* 2011; Mäki and Collin 1997)。抗 TG2 自己抗体の結合による TG2 機能の抑制は、培養ヒト小腸粘膜上皮細胞に対する S 期への移行 (Barone *et al.* 2007)、ヒトの腸陰窩細胞モデルにおける TGF β 依存性腸上皮細胞の分化抑制 (Halttunen and Mäki 1999)、ヒト臍静脈内皮細胞モデルにおける血管透過性の亢進 (Myrsky *et al.* 2009a) として報告されている。また、ヒト神経芽細胞腫株において抗 TG2 抗体によってミトコンドリア介在性のアポトーシスが誘発された (Cervio *et al.* 2007)。一方、第 2 章の結果、培養イヌアストロサイトに対して抗 TG2 抗体は GFAP 発現の増強と線維配列の変化、細胞内 GSH およびグルタミン酸の減少を引き起こした。このように、抗 TG2 抗体が結合する細胞の種類によって異なる機能変化が生じるため、犬のアストロサイトにおける TG2 の詳細な機能の解明と抗 TG2 抗体による細胞機能変化を検討することが必要であると考えた。

本章の結果から、イヌの脳組織においては主にアストロサイトが TG2 を発現していることが示された。さらに、NME および NLE の病変部では TG2 陽性アストロサイトが活性化し、GME の脳皮質においては TG2 発現を抑制する機序が存在するこ

とが示唆された。抗 TG2 自己抗体の結合によって生じるアストロサイトの機能変化を
解明することは、特発性脳炎における病態の解明、あるいは、新たな治療法の確立に役
立つと考えた。

【小括】

健康犬および特発性脳炎症例の犬脳パラフィン包埋組織を用い、TG2 に対する免疫組織化学を行ってその発現分布を観察した。その結果、健康犬では犬脳皮質および白質のアストロサイトに広く TG2 が存在した。犬脳実質の小血管周囲には TG2 陽性のアストロサイトの足突起が観察されたが、重度の血管性細胞浸潤巣や肉芽腫性病変では TG2 陰性であったため、炎症の重篤化に伴い TG2 発現が低下したことが示唆された。

また、NME の犬脳皮質および NLE の犬脳白質には活性化した TG2 陽性アストロサイトが観察され、GME の犬脳皮質に TG2 発現が認められなかった。以上より、NME および NLE の病変主座では TG2 陽性アストロサイトが活性化する一方で、GME の犬脳皮質においては TG2 発現を抑制する機序が存在することが疑われた。

総括

本研究では、NME、NLE および GME という犬の特発性脳炎を自己免疫疾患であると仮定し、アストロサイトを標的とする脳脊髄液中の自己抗体を探索し、その自己抗体がアストロサイトに与える影響を検討し、さらに *in vivo* の病態との関連性も検討した。

第一章では、まず NME 症例を対象として CSF および血中に存在する抗 GFAP 抗体以外の自己抗体を探索した。この過程で抗トランスグルタミナーゼ (TG) 抗体の存在を確認した。さらに、NME のみならず NLE と GME 症例の CSF 中にも健康犬の CSF 中には認められない抗 TG2 抗体の存在を確認した。抗 TG2 抗体は健康犬を含む犬の血清中に広く存在したことから、CSF 中抗 TG2 抗体は末梢血に由来する可能性が示唆された。

第二章では、生きた培養イヌアストロサイトの細胞表面に抗 TG2 抗体が反応することを確認した。抗 TG2 抗体の存在下で培養したイヌアストロサイトの生細胞率や顕微鏡的形態に明らかな変化は認められなかったが、GFAP の発現増強と細胞内配列に変化が生じたことから、抗 GFAP 抗体はイヌアストロサイトを活性化すると考えられた。さらにメタボローム解析では、抗 TG2 抗体の存在下で培養したイヌアストロサイト内で還元型グルタチオン (GSH) ならびにグルタミン酸量の減少が観察され、抗 TG2 抗体がイヌアストロサイトの抗酸化能を低下させる可能性が示された。

第三章では、健康犬および特発性脳炎症例の犬脳組織における TG2 の分布を免疫組織化学で検討した。その結果、犬では正常犬脳組織のアストロサイトが TG2 を発現しており、ヒト脳内の TG2 分布と異なることが示された。NME 症例の犬脳皮質および NLE 症例の犬脳白質、つまり病変の主座で活性化した TG2 陽性アストロサイトが顕

著に認められた。一方、GME 症例の脳皮質のアストロサイトは TG2 陰性であった。

また、血管性細胞浸潤巣や肉芽腫性病変に存在するアストロサイトは TG2 陰性であり、重度の炎症に伴う酸化的状況では、酸化に脆弱とされる TG2 発現が低下する可能性が示された。

以上より、犬の NME、NLE および GME 症例では、血中に存在する抗 TG2 抗体が脳内に侵入すると、脳アストロサイトの細胞膜に結合して細胞を活性化するとともに、酸化に対する脆弱性をもたらすことが示された。また、NME と NLE では TG2 陽性アストロサイトが活性化する一方で、GME では脳皮質アストロサイトの TG2 発現が低下するなど、異なる作用を及ぼすことが示唆された。これが脳における壊死と肉芽腫性炎の 2 通りの病変と関連するのかは今後検討する必要がある。また、GFAP は細胞質内タンパク質であるため、アストロサイト変性による漏出が生じない限り、自己抗原として認識されることはないと考えられる。このため、犬の特発性脳炎において抗 TG2 自己抗体はアストロサイトの TG2 機能を変化させることで病態の進行を助長し、その結果障害されたアストロサイトから漏出した GFAP が炎症細胞に提示されて抗 GFAP 自己抗体の産生に至ると考えた。本研究より、抗 TG2 自己抗体は犬の特発性脳炎の病態の修飾因子であることが示唆された。

【謝辞】

本研究を行うにあたりご指導賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医臨床病理学研究室 松木 直章教授に深謝申し上げます。また、実験の遂行にあたり貴重なご助言を頂戴しました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医臨床病理学研究室 米澤 智洋准教授、玉原 智史助教に感謝申し上げます。

さらに、貴重な研究試料をご提供・共有させていただきました 東京大学 佐々木 伸雄名誉教授、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室 内田 和幸先生、チェンバーズ ジェームズ助教、川畑動物病院 川畑 健先生に感謝の意を表します。

最後に、本研究に大いにご協力くださいました東京大学動物医療センターの皆様、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室ならびに内科学研究室、そして獣医臨床病理学研究室の各位に心から御礼申し上げます。

引用文献

Aeschlimann, D., Paulsson, M. (1991) Cross-linking of laminin-nidogen complexes by tissue transglutaminase. A novel mechanism for basement membrane stabilization. *J. Biol. Chem.* 266; 15308-15317.

Aeschlimann, D., Thomazy, V. (2000) Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. *Connect. Tissue Res.* 41; 1-27.

Aeschliman, D. (2006) Novel transglutaminase gene products. *US. Patent.* 7:52.

Anjum, N., Baker, P. N., Robinson, N. J., Aplin, J. D. (2009) Maternal celiac disease autoantibodies bind directly to syncytiotrophoblast and inhibit placental tissue transglutaminase activity. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7:16.

Aresu, L., D'Angelo, A., Zanatta, R., Valenza, F., Capucchio, M. T. (2007) Canine necrotizing encephalitis associated with anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *J. Comp. Pathol.* 136; 279-282.

Barber, R. M., Porter, B. F., Li, Q., May, M., Claiborne, M. K., Allison, A. B., Howerth, E. W., Butler, A., Wei, S., Levine, J. M., Levine, G. J., Brown, D. R., Schatzberg, S. J. (2012) Broadly reactive polymerase chain reaction for pathogen detection in canine granulomatous meningoencephalomyelitis and necrotizing meningoencephalitis. *J. Vet. Intern. Med.* 26; 962-968.

Barber, R. M., Schatzberg, S. J., Corneveaux, J. J., Allen, A. N., Porter, B. F., Pruzin, J. J., Platt, S. R., Kent, M., Huentelman, M. J. (2011) Identification of risk loci for necrotizing

meningoencephalitis in Pug dogs. *J. Hered.* 102 Suppl. 1; S40-S46.

Barber, R. M., Li, Q., Diniz, P. P., Porter, B. F., Breitschwerdt, E. B., Claiborne, M. K., Birkenheuer, A. J., Levine, J. M., Levine, G. J., Chandler, K., Kenny, P., Nghiem, P., Wei, S., Greene, C. E., Kent, M., Platt, S. R., Greer, K., Schatzberg, S. J. (2010) Evaluation of brain tissue or cerebrospinal fluid with broadly reactive polymerase chain reaction for Ehrlichia, Anaplasma, spotted fever group Rickettsia, Bartonella, and Borrelia species in canine neurological diseases (109 cases). *J. Vet. Intern. Med.* 24; 372-378.

Barone, M. V., Caputo, I., Ribocco, M. T., Maglio, M., Marzari, R., Sblattero, D., Troncone, R., Auricchio, S., Esposito, C. (2007) Humoral immune response to tissue transglutaminase is related to epithelial cell proliferation in celiac disease. *Gastroenterology*. 132; 1245-1253.

Beninati, S., Piacentini, M. (2004) The transglutaminase family: an overview: minireview article. *Amino Acids*. 26; 367-372.

Boscolo, S., Lorenzon, A., Sblattero, D., Florian, F., Stebel, M., Marzari, R., Not, T., Aeschlimann, D., Ventura, A., Hadjivassiliou, M., Tongiorgi, E. (2010) Anti transglutaminase antibodies cause ataxia in mice. *PLoS. One*. 5: e9698.

Brand, A., Richter-Landsberg, C., Leibfritz, D. (1993) Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. *Dev. Neurosci.* 15; 289-298.

Briani, C., Samaroo, D., Alaedini, A. (2008) Celiac disease: from gluten to autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 7; 644-650.

Caccamo, D., Currò, M., Ferlazzo, N., Condello, S., Ientile, R. (2012) Monitoring of transglutaminase 2 under different oxidative stress conditions. *Amino Acids*. 42; 1037-1043.

Caccamo, D., Campisi, A., Curro, M., Li Volti, G., Vanella, A., Ientile, R. (2004) Excitotoxic and post-ischemic neurodegeneration: Involvement of transglutaminases. *Amino Acids*. 27; 373-379.

Caja, S., Mäki, M., Kaukinen, K., Lindfors, K. (2011) Antibodies in celiac disease: implications beyond diagnostics. *Cell. Mol. Immunol*. 8; 103-109.

Campisi, A., Caccamo, D., Li Volti, G., Currò, M., Parisi, G., Avola, R., Vanella, A., Ientile, R. (2004) Glutamate-evoked redox state alterations are involved in tissue transglutaminase upregulation in primary astrocyte cultures. *FEBS. Lett*. 578; 80-84.

Campisi, A., Caccamo, D., Raciti, G., Cannavò, G., Macaione, V., Currò, M., Macaione, S., Vanella, A., Ientile, R. (2003) Glutamate-induced increases in transglutaminase activity in primary cultures of astroglial cells. *Brain. Res*. 978; 24-30.

Cantile, C., Chianini, F., Arispici, M., Fatzer, R. (2001) Necrotizing meningoencephalitis associated with cortical hippocampal hamartia in a Pekingese dog. *Vet. Pathol*. 38; 119-122.

Caudle, W. M., Bammler, T. K., Lin, Y., Pan, S., Zhang, J. (2010) Using 'omics' to define pathogenesis and biomarkers of Parkinson's disease. *Expert. Rev. Neurother*. 10; 925-942.

Cervio, E., Volta, U., Verri, M., Boschi, F., Pastoris, O., Granito, A., Barbara, G., Parisi, C.,

Feliciani, C., Tonini, M., De Giorgio, R. (2007) Sera of patients with celiac disease and neurologic disorders evoke a mitochondrial-dependent apoptosis *in vitro*. *Gastroenterology*. 133; 195-206.

Cherubini, G., Platt, S. R., Howson, S., Baines, E., Brodbelt, D. C., Dennis, R. (2008) Comparison of magnetic resonance imaging sequences in dogs with multi-focal intracranial disease. *J. Small Anim. Pract.* 49; 634-640.

Cherubini, G., Platt, S. R., Anderson, T., Rusbridge, C., Lorenzo, V., Mantis, P., Cappello, R. (2006) Characteristics of magnetic resonance images of granulomatous meningoencephalomyelitis in 11 dogs. *Vet. Rec.* 159; 110-115.

Cordy, D. R., Holliday, T. A. (1989) A necrotizing meningoencephalitis of pug dogs. *Vet. Pathol.* 26; 191-194.

Dieterich, W., Laag, E., Schopper, H., Volta, U., Ferguson, A., Gillett, H., Riecken, E. O., Schuppan, D. (1998) Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology*, 115;131713-21.

Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E. O., Schuppan, D. (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine*. 3; 797-801.

Di Sabatino, A., Vanoli, A., Giuffrida, P., Luinetti, O., Solcia, E., Corazza, G. R. (2012) The function of tissue transglutaminase in celiac disease. *Autoimmun. Rev.* 11; 746-753.

Di Simone, N., De Spirito, M., Di Nicuolo, F., Tersigni, C., Castellani, R., Silano, M., Maulucci, G., Papi, M., Marana, R., Scambia, G., Gasbarrini, A. (2013) Potential new mechanisms of placental damage in celiac disease: anti-transglutaminase antibodies impair human endometrial angiogenesis. *Biol. Reprod.* 89:1-11.

Di Simone, N., Silano, M., Castellani, R., Di Nicuolo, F., D'Alessio, M. C., Franceschi, F., Tritarelli, A., Leone, A. M., Tersigni, C., Gasbarrini, G., Silveri, N. G., Caruso, A., Gasbarrini, A. (2010) Anti-tissue transglutaminase antibodies from celiac patients are responsible for trophoblast damage via apoptosis *in vitro*. *Am. J. Gastroenterol.* 105; 2254-2261.

Dringen, R., Hirrlinger, J. (2003) Glutathione pathways in the brain. *Biological Chemistry*. 384; 505-516.

Dringen, R., Hamprecht, B. (1998) Glutathione restoration as indicator for cellular metabolism of astroglial cells. *Dev. Neurosci.* 20; 401-407.

Dringen, R., Hamprecht, B. (1996) Glutathione content as an indicator for the presence of metabolic pathways of amino acids in astroglial cultures. *J. Neurochem.* 67; 1375-1382.

Esposito, C., Paparo, F., Caputo, I., Rossi, M., Maglio, M., Sblattero, D., Not, T., Porta, R., Auricchio, S., Marzari, R., Troncone, R. (2002) Anti-tissue transglutaminase antibodies from coeliac patients inhibit transglutaminase activity both *in vitro* and *in situ*. *Gut.* 51; 177-181.

Fazio, R., Radaelli, M., Furlan, R. (2011) Neuromyelitis optica: concepts in evolution. *J.*

Neuroimmunol. 231;100-104.

Fisher, S. K., Novak, J. E., Agranoff, B. W. (2002) Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J. Neurochem.* 82; 736-754

Fitzpatrick, M., Young, S. P. (2013) Metabolomics-a novel window into inflammatory disease. *Swiss. Med. Wkly.* 143:w13743.

Fukui, M., Kuramoto, K., Yamasaki, R., Shimizu, Y., Itoh, M., Kawamoto, T., Hitomi, K. (2013) Identification of a highly reactive substrate peptide for transglutaminase 6 and its use in detecting transglutaminase activity in the skin epidermis. *FEBS. J.* 280; 1420-1429.

Gendek, E. G., Kedziora, J., Gendek-Kubiak, H. (2005) Can tissue transglutaminase be a marker of idiopathic inflammatory myopathies? *Immunol. Lett.* 97; 245-249.

Gimsa, U., Mitchison, N. A., Brunner-Weinzierl, M. C. (2013) Immune privilege as an intrinsic CNS property: astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation. *Mediators Inflamm.* 2013:320519.

Glanville, N. T., Byers, D. M., Cook, H. W., Spence, M. W., Palmer, F. B. (1989) Differences in the metabolism of inositol and phosphoinositides by cultured cells of neuronal and glial origin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1004; 169-179.

Greer, K. A., Wong, A. K., Liu, H., Famula, T. R., Pedersen, N. C., Ruhe, A., Wallace, M., Neff, M.

W. (2010) Necrotizing meningoencephalitis of Pug dogs associates with dog leukocyte antigen class II and resembles acute variant forms of multiple sclerosis. *Tissue Antigens*. 76; 110-118.

Greer, K. A., Schatzberg, S. J., Porter, B. F., Jones, K. A., Famula, T. R., Murphy, K. E. (2009) Heritability and transmission analysis of necrotizing meningoencephalitis in the Pug. *Res. Vet. Sci*. 86; 438-442.

Grenard, P., Bates, M. K., Aeschlimann D. (2001) Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X and a novel gene family member, transglutaminase Z. *J. Biol. Chem*. 276; 33066-33078.

Griffin, M., Casadio, R., Bergamini, C. M. (2002) Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem. J*. 368; 377-396.

Grosso, H., Mouradian, M. M. (2012) Transglutaminase 2: biology, relevance to neurodegenerative diseases and therapeutic implications. *Pharmacol. Ther*. 133; 392-410.

Gundemir, S., Colak, G., Tucholski, J., Johnson, G. V. (2012) Transglutaminase 2: a molecular Swiss army knife. *Biochim. Biophys. Acta*. 1823; 406-419.

Hadjivassiliou, M., Aeschlimann, P., Sanders, D. S., Mäki, M., Kaukinen, K., Grünewald, R. A., Bandmann, O., Woodroffe, N., Haddock, G., Aeschlimann, D. P. (2013) Transglutaminase 6 antibodies in the diagnosis of gluten ataxia. *Neurology*. 80; 1740-1745.

Hadjivassiliou, M., Sanders, D. S., Grünewald, R. A., Woodroffe, N., Boscolo, S., Aeschlimann, D. (2010) Gluten sensitivity: from gut to brain. *Lancet. Neurol.* 9; 318-330.

Hadjivassiliou, M., Aeschlimann, P., Strigun, A., Sanders, D. S., Woodroffe, N., Aeschlimann, D. (2008) Autoantibodies in gluten ataxia recognize a novel neuronal transglutaminase. *Ann. Neurol.* 64; 332-343.

Hadjivassiliou, M., Mäki, M., Sanders, D. S., Williamson, C. A., Grünewald, R. A., Woodroffe, N. M., Korponay-Szabó, I. R. (2006) Autoantibody targeting of brain and intestinal transglutaminase in gluten ataxia. *Neurology.* 66; 373-377.

Hadjivassiliou, M., Grünewald, R., Sharrack, B., Sanders, D., Lobo, A., Williamson, C., Woodroffe, N., Wood, N., Davies-Jones, A. (2003) Gluten ataxia in perspective: epidemiology, genetic susceptibility and clinical characteristics. *Brain.* 126; 685-691.

Halttunen, T., Mäki, M. (1999) Serum immunoglobulin A from patients with celiac disease inhibits human T84 intestinal crypt epithelial cell differentiation. *Gastroenterology.* 116; 566-572.

Hernandez, L., Green, P. H. (2006) Extraintestinal manifestations of celiac disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 8; 383-389.

Higgins, R. J., Dickinson, P. J., Kube, S. A., Moore, P. F., Couto, S. S., Vernau, K. M., Sturges, B. K., Lecouteur, R. A. (2008) Necrotizing meningoencephalitis in five Chihuahua dogs. *Vet. Pathol.* 45; 336-346.

Higgins, R. J., Le Couteur, R. A. (2007) GME, NME, and breed specific encephalitis and allied disorders: variations of the same theme or different diseases? A clinical and pathological perspective. 20th Annual Symposium of the European College of Veterinary Neurology. Bern, Switzerland. 35-37.

Hirrlinger, J., Dringen, R. (2010) The cytosolic redox state of astrocytes: Maintenance, regulation and functional implications for metabolite trafficking. *Brain. Res. Rev.* 63; 177-188.

Iismaa, S. E., Mearns, B. M., Lorand, L., Graham, R. M. (2009) Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol. Rev.* 89; 991-1023.

Irani, S. R., Vincent, A. (2011) Autoimmune encephalitis - new awareness, challenging questions. *Discov. Med.* 11; 449-458.

Jeitner, T. M., Pinto, J. T., Krasnikov, B. F., Horswill, M., Cooper, A. J. L. (2009) Transglutaminases and neurodegeneration. *J. Neurochem.* 109; 160-166.

Jenner, P., Olanow, C. W. (1998) Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 44; S72-S84.

Jull, B. A., Merryman, J. I., Thomas, W. B., McArthur, A. (1997) Necrotizing encephalitis in a Yorkshire terrier. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 211:1005.

Kim, S. Y. (2006) Transglutaminase 2 in inflammation. *Front. Biosci.* 11; 3026-3035.

Kim, S. Y., Grant, P., Lee, J. H., Pant, H. C., Steinert, P. M. (1999) Differential expression of multiple transglutaminases in human brain. Increased expression and cross-linking by transglutaminases 1 and 2 in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 274; 30715-30721.

Kipar, A., Baumgärtner, W., Vogl, C., Gaedke, K., Wellman, M. (1998) Immunohistochemical characterization of inflammatory cells in brains of dogs with granulomatous meningoencephalitis. *Vet. Pathol.* 35; 43-52.

Kitagawa, M., Kanayama, K., Satoh, T., Sakai, T. (2004) Cerebellar focal granulomatous meningoencephalitis in a dog: clinical findings and MR imaging. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 51; 277-279.

Kitagawa, M., Okada, M., Watari, T., Sato, T., Kanayama, K., Sakai, T. (2009) Ocular granulomatous meningoencephalomyelitis in a dog: magnetic resonance images and clinical findings. *J. Vet. Med. Sci.* 71; 233-237.

Korponay-Szabó, I. R., Halttunen, T., Szalai, Z., Laurila, K., Király, R., Kovács, J. B., Fésüs, L., Mäki, M. (2004) *In vivo* targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut.* 53; 641-648.

Kuwamura, M., Adachi, T., Yamate, J., Kotani, T., Ohashi, F., Summers, B. A. (2002) Necrotising encephalitis in the Yorkshire terrier: a case report and literature review. *J. Small*

Anim. Pract. 43; 459-463.

Lampasona, V., Bonfanti, R., Bazzigaluppi, E., Venerando, A., Chiumello, G., Bosi, E., Bonifacio, E. (1999) Antibodies to tissue transglutaminase C in type I diabetes. *Diabetologia*. 42; 1195-1198.

Lesort, M., Tucholski, J., Miller, M. L., Johnson, G. V. (2000) Tissue transglutaminase: a possible role in neurodegenerative diseases. *Prog. Neurobiol.* 61; 439-463.

Lezmi, S., Toussaint, Y., Prata, D., Lejeune, T., Ferreira-Neves, P., Rakotovo, F., Fontaine, J. J., Marchal, T., Cordonnier, N. (2007) Severe necrotizing encephalitis in a Yorkshire terrier: topographic and immunohistochemical study. *J. Vet. Med. A*. 54; 186-190.

Li, W., Busu, C., Circu, M. L., Aw, T. Y. (2012) Glutathione in cerebral microvascular endothelial biology and pathobiology: implications for brain homeostasis. *Int. J. Cell. Biol.* 2012;434971.

Luft, L. M., Barr, S. G., Martin, L. O., Chan, E. K., Fritzler, M. J. (2003) Autoantibodies to tissue transglutaminase in Sjögren's syndrome and related rheumatic diseases. *J. Rheumatol.* 30; 2613-2619.

Mäki, M., Collin, P. (1997) Coeliac disease. *Lancet*. 349; 1755-1759.

Matsuki, N., Takahashi, M., Yaegashi, M., Tamahara, S., Ono, K. (2009) Serial examinations of anti-GFAP autoantibodies in cerebrospinal fluids in canine necrotizing meningoencephalitis. *J. Vet. Med. Sci.* 71;99-100.

Matsuki, N., Fujiwara, K., Tamahara, S., Uchida, K., Matsunaga, S., Nakayama, H., Doi, K., Ogawa, H., Ono, K. (2004) Prevalence of autoantibody in cerebrospinal fluids from dogs with various CNS diseases. *J. Vet. Med. Sci.* 66; 295-297.

Maxie, M. G., Youssef, S. (2007) Nervous system. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals. 5th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders. 425-428.

Melø, T. M., Nehlig, A., Sonnewald, U. (2005) Metabolism is normal in astrocytes in chronically epileptic rats: a ¹³C NMR study of neuronal-glial interactions in a model of temporal lobe epilepsy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25; 1254-1264.

Meresse, B., Malamut, G., Cerf-Bensussan, N. (2012) Celiac disease: an immunological jigsaw. *Immunity.* 36; 907-919.

Monsonogo, A., Shani, Y., Friedmann, I., Paas, Y., Eizenberg, O., Schwartz, M. (1997) Expression of GTP-dependent and GTP-independent tissue-type transglutaminase in cytokine-treated rat brain astrocytes. *J. Biol. Chem.* 272; 3724-3732.

Myrsky, E., Caja, S., Simon-Vecsei, Z., Korponay-Szabo, I. R., Nadalutti, C., Collighan, R., Mongeot, A., Griffin, M., Mäki, M., Kaukinen, K., Lindfors, K. (2009a) Celiac disease IgA modulates vascular permeability *in vitro* through the activity of transglutaminase 2 and RhoA. *Cell. Mol. Life. Sci.* 66; 3375-3385.

Myrsky, E., Syrjänen, M., Korponay-Szabo, I. R., Mäki, M., Kaukinen, K., Lindfors, K. (2009b)

Altered small-bowel mucosal vascular network in untreated coeliac disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 44; 162-167.

Ohashi, H., Itoh, Y., Birekbichler, P. J., Takeuchi, Y. (1995) Purification and characterization of rat brain transglutaminase. *J. Biochem.* 118; 1271-1278.

Park, D., Choi, S. S., Ha, K. S. (2010) Transglutaminase 2: a multi-functional protein in multiple subcellular compartments. *Amino Acids.* 39; 619-631.

Pedersen, N., Liu, H., Millon, L., Greer, K. (2011) Dog leukocyte antigen class II-associated genetic risk testing for immune disorders of dogs: simplified approaches using Pug dog necrotizing meningoencephalitis as a model. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23; 68-76.

Pham, N. T., Matsuki, N., Shibuya, M., Tamahara, S., Ono, K. (2008) Impaired expression of excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2) and glutamate homeostasis in canine necrotizing meningoencephalitis. *J. Vet. Med. Sci.* 70; 1071-1075.

Radaelli, S. T., Platt, S. R. (2002) Bacterial meningoencephalomyelitis in dogs: a retrospective study of 23 cases (1990-1999). *J. Vet. Intern. Med.* 16; 159-163.

Reichelt, K. L., Poulsen, E. (1992) gamma-Glutamylaminotransferase and transglutaminase in subcellular fractions of rat cortex and in cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 59; 500-504.

Ruan, Q., Johnson, G. V. (2007) Transglutaminase 2 in neurodegenerative disorders. *Front. Biosci.* 12;891-904.

Safra, N., Pedersen, N. C., Wolf, Z., Johnson, E. G., Liu, H. W., Hughes, A. M., Young, A., Bannasch, D. L. (2011) Expanded dog leukocyte antigen (DLA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping reveals spurious class II associations. *Vet. J.* 189; 220-226.

Sawashima, Y., Sawashima, K., Taura, Y., Shimada, A., Umemura, T. (1996) Clinical and pathological findings of a Yorkshire terrier affected with necrotizing encephalitis. *J. Vet. Med. Sci.* 58; 659-661.

Shibuya, M., Matsuki, N., Fujiwara, K., Imajoh-Ohmi, S., Fukuda, H., Pham, N. T., Tamahara, S., Ono, K. (2007) Autoantibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluids from Pug dogs with necrotizing meningoencephalitis. *J Vet Med Sci.* 61; 241-245.

Siegel, M., Khosla, C. (2007) Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in disease states. *Pharmacol. Ther.* 115; 232-245.

Smeland, O. B., Hadera, M. G., McDonald, T. S., Sonnewald, U., Borges, K. (2013) Brain mitochondrial metabolic dysfunction and glutamate level reduction in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33; 1090-1097.

Sofroniew, M. V., Vinters, H. V. (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta. Neuropathol.* 119; 7-35.

Spitzbarth, I., Schenk, H. C., Tipold, A., Beineke, A. (2010) Immunohistochemical characterization of inflammatory and glial responses in a case of necrotizing leucoencephalitis in

a French bulldog. *J. Comp. Pathol.* 142; 235-241.

Stalis, I. H., Chadwick, B., Dayrell-Hart, B., Summers, B. A., Van Winkle, T., J. (1995) Necrotizing meningoencephalitis of Maltese dogs. *Vet. Pathol.* 32; 230-235.

Stamnaes, J., Dorum, S., Fleckenstein, B., Aeschlimann, D., Sollid, L. M. (2010) Gluten T cell epitope targeting by TG3 and TG6; implications for dermatitis herpetiformis and gluten ataxia. *Amino Acids.* 39; 1183-1191.

Summers, B. A., Cummings, J. F., De Lahunta, A. (1995) Neuropathology. Mosby, St. Louis, MO, U.S.A.

Suzuki, M., Uchida, K., Morozumi, M., Hasegawa, T., Yanai, T., Nakayama, H., Tateyama, S. (2003) A comparative pathological study on canine necrotizing meningoencephalitis and granulomatous meningoencephalomyelitis. *J. Vet. Med. Sci.* 65; 1233-1239.

Talarico, L. R., Schatzberg, S. J. (2010) Idiopathic granulomatous and necrotising inflammatory disorders of the canine central nervous system: a review and future perspectives. *J. Small. Anim. Pract.* 51; 138-149.

Timmann, D., Konar, M., Howard, J., Vandeveld, M. (2007) Necrotising encephalitis in a French bulldog. *J. Small Anim. Pract.* 48; 339-342.

Toda, Y., Matsuki, N., Shibuya, M., Fujioka, I., Tamahara, S., Ono, K. (2007) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and anti-GFAP autoantibody in canine necrotising meningoencephalitis.

Vet. Rec. 161; 261-264.

Uchida, K., Hasegawa, T., Ikeda, M., Yamaguchi, R., Tateyama, S. (1999) Detection of an autoantibody from Pug dogs with necrotizing encephalitis (Pug dog encephalitis). *Vet. Pathol.* 36; 301-307.

van Strien, M. E., Drukarch, B., Bol, J. G., van der Valk, P., van Horssen, J., Gerritsen, W. H., Breve, J. J., van Dam, A. M. (2011) Appearance of tissue transglutaminase in astrocytes in multiple sclerosis lesions: a role in cell adhesion and migration? *Brain. Pathol.* 21; 44-54.

Vincenzetti, S., Rossi, G., Mariani, P., Pengo, G., Cammertoni, N., Vita, A. (2006) Evidence of anti-gliadin and transglutaminase antibodies in sera of dogs affected by lymphoplasmacytic enteritis. *Vet. Res. Commun.* 30; 219-221.

Wakshlag, J. J., McNeill, C. J., Antonyak, M. A., Boehm, J. E., Fuji, R., Balkman, C. E., Zgola, M., Cerione, R. A., Page, R. L. (2006) Expression and activity of transglutaminase II in spontaneous tumours of dogs and cats. *J. Comp. Pathol.* 134; 202-210.