

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 田中 美穂

指導教員名 松木 直章

論文題目

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

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 meningoencephalomyelitis: GME) という 3 つの疾患が広く知られている。これらの疾患はすべて原因不明であり、痙攣発作、運動障害、視覚障害などの急性進行性の症状を呈し、多くの症例は早期に死亡する。このため、犬の特発性脳炎の原因を究明し、有効な予防法または治療法を確立することが望まれてきた。NME、NLE、GME は、それぞれ病変の好発部位は異なるが、初期には T 細胞の浸潤を主体とする炎症が生じ、その後に NME と NLE では壊死巣を、GME では肉芽腫性炎症巣を形成する。好発犬種として NME はパグ、NLE はヨークシャー・テリアが知られており、とくに NME では犬白血球抗原 (DLA) クラス II 遺伝子型と発症との関連が知られている。また、NME、NLE、GME ともに発症における感染因子の関与は否定的である。このような疾患像や、臨床的にグルココルチコイドおよび免疫抑制剤の投与が部分的に有効であることから、3 疾患ともに自己免疫性疾患であるという仮説が有力である。実際に、NME 症例で

はアストロサイトのグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) に対する自己抗体が脳脊髄液 (CSF) 中に高率 (95%以上) に認められる。さらに、NME では GFAP 以外のアストロサイト抗原に対する自己抗体の存在も示唆されてきた。一方、NLE や GME では疾患と相関する自己抗体は発見されていない。そこで第 1 章では、まずは 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。これにより抗トランスグルタミナーゼ (TG) 抗体の存在を確認したため、対象を NLE および GME に拡大して抗 TG 抗体について検討した。続いて第 2 章では、初代培養犬アストロサイトに対する抗 TG2 抗体の結合実験を行うとともに、抗 TG2 抗体がアストロサイトの代謝に与える影響をメタボローム解析により検討した。さらに第 3 章では、NME、NLE および GME により死亡した剖検例の脳組織における TG2 陽性アストロサイトの分布を検討した。

第 1 章：犬の特発性脳炎症例における抗 TG 抗体の検出

本研究は、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することから開始した。東京大学附属動物医療センターに来院した NME 症例 1 頭の CSF について、精製ウシ GFAP を用いて抗 GFAP 抗体を吸収した後に、正常犬の脳凍結切片に対する間接蛍光抗体法 (IFA) を行ったところ、CSF 中には依然としてアストロサイトに反応する IgG が存在した。ヒトの自己免疫性中枢神経疾患で自己抗原となるタンパク質に対する抗体数種を用いて 2 重染色を実施した結果、この NME 症例の CSF 中 IgG の反応性は抗ヒト TG2 抗体のそれとよく一致した。次に、NME 症例 2 頭の CSF を用いて組換えヒト TG2、組換え犬 TG2 および組換えヒト TG6 に対するイムノブロッティングを行ったところ、これらすべての TG に対する反応が認められた。この TG に対する反応は NLE 症例 2 頭および GME 症例 2 頭の CSF でも認められたが、健康犬の CSF では認められなかった。このことから、NME、NLE および GME 症例に共通して、CSF 中に抗 TG 抗体が存在する可能性が示された。そこで、NME19 症例、NLE 7 症例、GME 11 症例、その他の中枢神経疾患症例 11 例ならびに健康犬 20 例について、組換えヒト TG2 を固相化抗原とする ELISA を実施したところ、NME、NLE、GME およびその他の中枢神経疾患の症例では抗 TG2 抗体が検出され、とくに NME 群は健康犬と比較して有意に上昇していた。一方、血中の抗 TG2 抗体は健康犬を含む全ての犬で検出された。以上より、NME を主体とする特発性脳炎、そしてその他の中枢神経疾患の一部の症例では、CSF 中に抗 TG2 抗体が存在することが明らかとなった。また、この TG2 抗体は血中の抗 TG2 抗体に由来し、中枢神経疾患に伴う血液脳関門の破綻によって CSF 中に移行した可能性も示された。

第 2 章：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

ヒトのセリアック病では抗 TG2 自己抗体が病態に関与すると考えられており、小腸粘膜や脳の血管周囲への沈着が確認されている。また、多くの報告では抗 TG2 抗体による TG2 活性の低下が示されてきた。TG2 発現は細胞生存に必須であるとする報告や、TG2 発現を消失させると細胞のアポトーシスが抑制されるとする報告があり、ヒトの神経組織においても TG2 の機能に関する統一した見解はない。そこで、本章では犬の死亡新生仔から樹立した初代培養犬アストロサイトを用い、抗 TG2 抗体の結合性およびそれが代謝に与える影響を観察した。

GFAP の発現を確認した初代培養犬アストロサイトを、市販の抗 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 時間培養した後に固定し、蛍光標識 2 次抗体で検出したところ、アストロサイトに対する抗 TG2 抗体の反応が観察され、GFAP 発現の増強も認められた。なお、市販の抗 TG2 抗体は、添加物のアジ化ナトリウムなどを除去するために 3 回透析して使用した。次に、人工 CSF 中に抗 TG2 ポリクローナル抗体を添加して培養した犬アストロサイトを T 群、NME 3 症例の CSF をそれぞれ添加した細胞群を N 群、健康犬 3 例の CSF をそれぞれ添加した細胞群を H 群、人工 CSF のみで培養した細胞群を C 群とし、12 時間培養後のアストロサイト内代謝産物に対するメタボローム解析を行ったところ、T 群の還元型グルタチオン(GSH)含有量は C 群に対して有意に減少していた。また、GSH の基質である細胞内グルコースは T 群が H 群に対して有意に減少していた。さらに、ニコチン酸・ニコチンアミド系の物質は T 群において還元型の物質が減少する傾向にあった。以上より、抗 TG2 抗体は犬のアストロサイトの細胞膜に結合し、細胞内 GSH の低下をはじめとする酸化還元調節系への影響を有することが示された。

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

ヒトの脳組織では、正常な血管内皮細胞や、多発性硬化症の病変部のアストロサイトに TG2 が発現することが知られているが、犬の脳における TG2 の局在や疾患による変化の報告はない。そこで、NME 6 症例、NLE 1 症例、GME 3 症例および健康犬 1 例について脳のパラフィン包埋ブロックから組織標本を作成し、GFAP および TG2 に対する免疫組織化学を実施した。

健康犬では大脳皮質および白質のアストロサイトの細胞体と足突起に TG2 が認められた。上皮細胞は TG2 陰性であった。また一部の血管内皮細胞が TG2 陽性

を示した。NME 症例の脳皮質および脳白質の TG2 の局在は健康犬とほぼ同様であったが、脳皮質の病変部に TG2 陽性アストロサイトの明らかな増生が認められた。ただし重度の血管性細胞浸潤巣の血管周囲には GFAP 陽性で TG2 陰性の肥大したアストロサイトが観察された。また NME 症例の一部では TG2 陽性の上皮細胞や血管内皮細胞が認められた。NLE 症例の脳における TG2 の局在は NME とほぼ同様で、壊死領域における TG2 発現の増強が認められた。血管内皮細胞の TG2 発現は確認できなかった。一方、GME の 3 症例に共通して脳皮質のアストロサイトに TG2 発現が認められなかった。脳白質のアストロサイトおよび上皮細胞は TG2 陽性であった。また、1 症例では神経細胞が TG2 陽性の顆粒を含み、TG2 陽性の血管内皮細胞が一部で認められた。

健康犬の結果から、ヒトと異なり犬は生理的に TG2 陽性アストロサイトが存在していると考えられた。NME、NLE とともに病変部における TG2 発現の増強が認められ、TG2 発現はこの 2 疾患においては炎症と関連して変化することが示唆された。NME に認められた重度の血管性細胞浸潤巣では周囲のアストロサイトは TG2 陰性であったため、炎症の進行に伴い TG2 発現が低下する可能性が示された。GME は NME や NLE と異なる TG2 分布を示し、脳皮質に TG2 発現が認められず、肉芽腫性病変部のアストロサイトも TG2 陰性であった。このため、GME には脳皮質においてアストロサイトの TG2 発現を低下させる機序が存在することが疑われた。

本研究より、犬の特発性脳炎の症例では、CSF 中に抗 TG2 抗体が存在することが明らかとなった。この TG2 抗体は血中の抗 TG2 抗体に由来し、中枢神経疾患に伴う血液脳関門の破綻によって CSF 中に移行した可能性が考えられた。また、抗 TG2 抗体は初代培養犬アストロサイトに結合し、GFAP 発現を増強させ、さらに酸化還元調節系の代謝物に影響を与える可能性が示唆された。免疫組織化学からは、アストロサイトの TG2 発現は NME と NLE において炎症に伴い発現が増減することが示唆され、GME では TG2 発現を抑制する病態が存在すると考えられた。このように、抗 TG2 抗体が犬の特発性脳炎の病態を修飾することが示されたことは、これらの疾患の今後の研究に有意義であると考えられた。