

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15978

研究課題名(和文)蛋白質凝集体および炎症反応を標的としたイヌ変性性脊髄症に対する新規治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel therapy for canine degenerative myelopathy targeting SOD1 aggregates and neuroinflammation

研究代表者

小畠 結 (Kobatake, Yui)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：00805442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イヌの変性性脊髄症における変異型SOD1凝集体形成および神経炎症を制御するため、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)を用いた新規治療法を確立することを目的とした。変性性脊髄症モデル細胞を用いた研究成果から、細胞内MIF濃度を上昇させることで、変異型SOD1凝集体の形成を抑制できることが明らかとなった。免疫組織化学にてMIFがイヌ脊髄の神経細胞に発現していることを確認した。MIF分泌阻害剤を添加することで、細胞内にMIFが蓄積し変異型SOD1凝集体の形成が抑制されると考えたが、MIF分泌阻害剤では細胞内MIF濃度を上昇させることができず、凝集体形成抑制効果も認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、細胞内MIF濃度の上昇により変異型SOD1凝集体の形成が抑制されることが明らかとなった。したがって、細胞内MIF濃度を上昇させることが、変性性脊髄症の治療戦略となりうると考えられた。変性性脊髄症は筋萎縮性側索硬化症というヒトの難病の類似疾患と考えられているため、本知見は獣医療だけでなく人医療への貢献も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish a novel treatment using macrophage migration inhibitory factor (MIF) to regulate mutant SOD1 aggregate formation and neuroinflammation in canine degenerative myelopathy (DM). Using DM model cells, we clarified that the increasing intracellular MIF inhibits the formation of mutant SOD1 aggregates. We revealed that MIF was expressed in neuronal cells of the spinal cord of DM by immunohistochemistry with anti-MIF antibody. We hypothesized that the MIF secretion inhibitor suppresses the accumulation of MIF in cells and the formation of mutant SOD1 aggregates, and we conducted the experiments using DM model cells. In our study, it was not observed that accumulation of MIF and suppressing the aggregate formation by MIF secretion inhibitor.

研究分野：獣医神経病学

キーワード：犬 変性性脊髄症 SOD1 マクロファージ遊走阻止因子 筋萎縮性側索硬化症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

イヌの変性性脊髄症（DM）は慢性進行性の脊髄変性疾患であり、四肢の進行性麻痺から始まり、最終的に発症後約3年で呼吸筋麻痺により死亡する。現在までDMに対する有効な治療法は確立されていない。

DM症例はSOD1遺伝子の変異（SOD1^{E40K}）を有していることが明らかとなっている。変異型SOD1タンパク質は立体構造異常を起こしやすく、SOD1^{E40K}タンパク質凝集体を形成しやすいという特徴を持つ。神経細胞においてSOD1^{E40K}タンパク質凝集体が蓄積することで、細胞内小器官の機能障害をきたし、アポトーシスを起こすことが明らかとなっている。さらに、申請者のこれまでの研究成果から、DM発症犬の脊髄白質および灰白質において、病態初期から神経炎症が引き起こされており、神経炎症によりDMの脊髄障害が助長される可能性が示された。これらのことから、DMの治療を行う上では、SOD1^{E40K}タンパク質凝集体の形成抑制および神経炎症の抑制を同時に行う必要があると考えた。

マクロファージ遊走阻止因子（MIF）は免疫応答に密接に関与するサイトカインとして知られている分子である。神経細胞外に存在するMIFは、遊走してきたマクロファージ/ミクログリアをその場に留まらせ、炎症を悪化させる働きを持つ。一方、神経細胞内に存在するMIFは、立体構造異常を持つタンパク質に働きかけ、立体構造を修正して凝集体形成を抑制する作用を有することが明らかとなっている。神経細胞内のMIF濃度を上昇させ、神経細胞外のMIF濃度を低下させることで、DM脊髄における神経炎症を抑制し、SOD1^{E40K}タンパク質凝集体の形成を抑制できると仮説した。神経細胞にMIF分泌阻害剤を投与すると、細胞外に分泌されるMIFが減少し、細胞内にMIFが蓄積するため、DM症例に対してMIF分泌抑制剤を投与すれば、神経細胞内のSOD1^{E40K}タンパク質凝集体が減少し、神経細胞周囲の炎症反応を抑制できると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題ではDMモデル細胞に対するMIF分泌抑制剤による治療効果を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞内MIFによる変異型SOD1タンパク質凝集体形成抑制効果の評価

ヒト胎児腎（HEK）293A細胞にSOD1^{E40K}遺伝子をコードしたプラスミドを導入し、DMモデル細胞（SOD1^{40K}細胞）を作成した。DMモデル細胞にMIF遺伝子をコードしたプラスミドを導入し、細胞内MIFによるSOD1^{E40K}タンパク質の性質の変化を明らかにした。

細胞内MIFによりSOD1^{E40K}タンパク質の可溶性に変化が起こるかどうかが、ウエスタンブロッティングを用いて評価した。また、細胞内MIFにより、DMモデル細胞内の変異型SOD1タンパク質凝集体の形成が抑制されるか、免疫細胞化学により確認した。

(2) 犬脊髄におけるMIF発現の確認

DMを発症したイヌ3頭のT10および健康なイヌ3頭のT10を用いて、脊髄組織におけるMIFの発現を確認した。パラフィン包埋した脊髄を抗MIF抗体により免疫染色した。DM発症犬と健康犬との間に染色性およびMIFの発現分布に違いがあるかを評価した。

(3) MIF分泌阻害剤の投与による変異型SOD1タンパク質凝集体形成抑制効果の評価

MIF分泌阻害剤として、GlyburideおよびProbenecidを用いた。SOD1^{40K}細胞にMIF分泌抑制剤を添加し、細胞内MIF濃度が上昇するかウエスタンブロッティングにて評価した。また、MIF分泌阻害剤によりSOD1^{E40K}タンパク質の立体構造異常に変化があるかどうかを確認するために、不溶化タンパク質および可溶化タンパク質のウエスタンブロッティングを実施した。

4. 研究成果

(1) 細胞内MIFによる変異型SOD1タンパク質凝集体形成抑制効果の評価

SOD1^{E40K}細胞では、イヌ野生型SOD1遺伝子をコードしたプラスミドを導入したHEK293A細胞（SOD1^{WT}細胞）と比較して、不溶化したSOD1^{E40K}タンパク質が増加していた。SOD1^{E40K}細胞にMIF遺伝子を導入し細胞内MIF濃度を高めたところ、SOD1^{E40K}細胞内の不溶性SOD1^{E40K}タンパク質量は有意に減少した（図1）。

また、SOD1^{E40K}細胞内にはSOD1^{E40K}タンパク質凝集体が形成されたが、細胞内にMIFを高発現させることで、SOD1^{E40K}タンパク質凝集体形成率が有意に低下した（図2）。

以上の結果から、SOD1^{E40K}タンパク質は不溶化し、凝集体を形成しやすい傾向があるが、細胞内MIF濃度を高めることで、不溶性SOD1^{E40K}タンパク質が減少し、SOD1^{E40K}タンパク質凝集体形成を抑制できると考えられた（図2）。

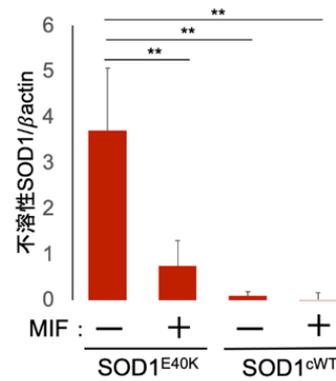
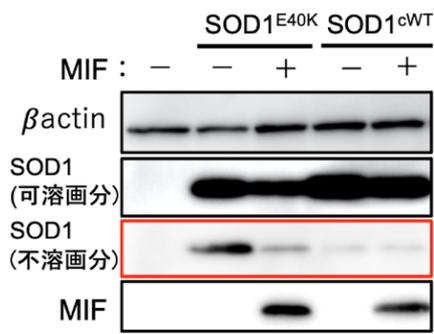


図 1. SOD1^{E40K} 細胞に MIF 遺伝子を導入したところ、不溶性 SOD1^{E40K} タンパク質が有意に減少したことが明らかとなった。

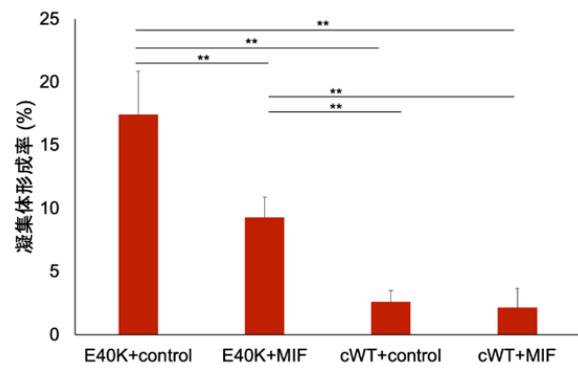
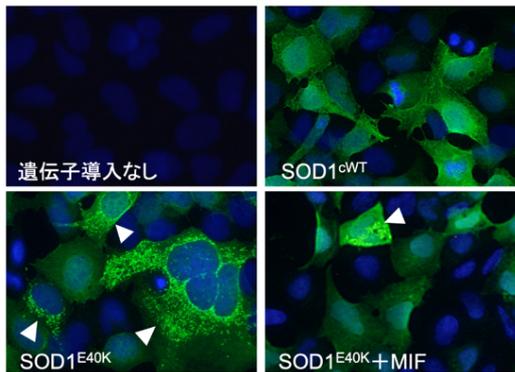


図 2. SOD1^{E40K} 細胞に MIF 遺伝子を導入したところ、SOD1^{E40K} タンパク質凝集体 (矢尻) をもつ細胞の割合が有意に減少した。
(青色：核、緑色：イヌ SOD1)

(2) 犬脊髄における MIF 発現の確認

DM 犬では健常犬と同様脊髄の神経細胞体において MIF が発現していることが明らかとなった (図 3)。この結果から、神経細胞内からの MIF の分泌を抑制することで、細胞内に MIF が蓄積し、細胞内 MIF 濃度を高めることができるのではないかと考えた。

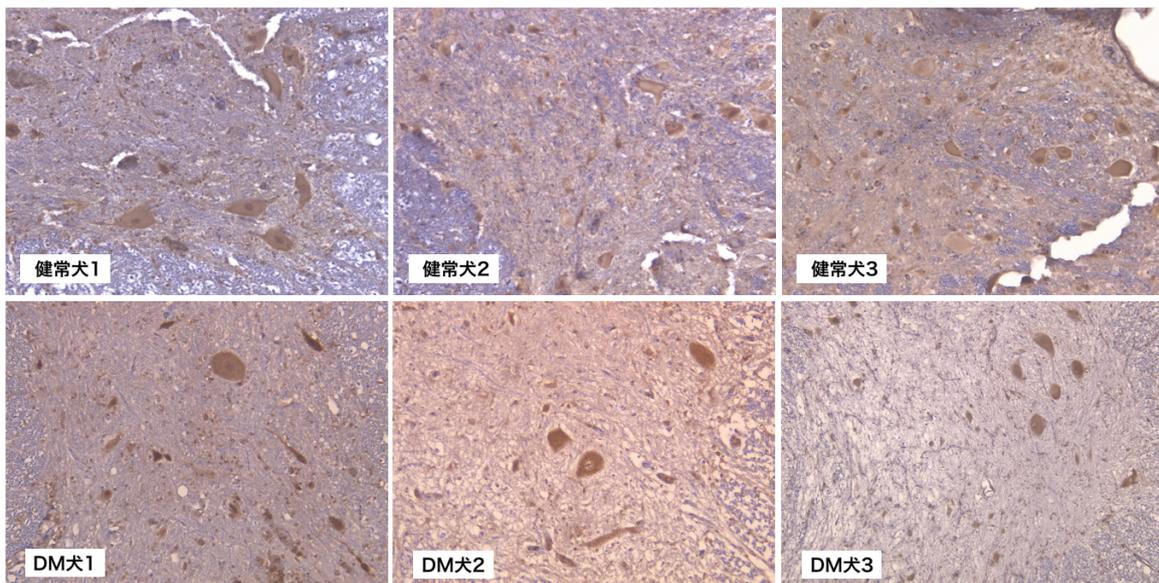


図 3. 健常犬および DM 発症犬の脊髄の抗 MIF 抗体による免疫組織化学 (褐色：抗 MIF 抗体陽性)

(3) MIF 分泌阻害剤の投与による変異型 SOD1 タンパク質凝集体形成抑制効果

MIF 分泌抑制剤として、Glyburide および Probenecid を用いて検証した。HEK293A 細胞に SOD1^{E40K} 遺伝子を導入した後、培地に Glyburide を 1 μ M、10 μ M、100 μ M の濃度で添加し 48 時間培養した。また、Probenecid を 0.1 μ M、5 μ M、10 μ M で添加して 48 時間培養した。いずれの条件においても細胞内 MIF 濃度は上昇しなかった。また、SOD1^{E40K} タンパク質凝集体形成抑制効果および不溶性 SOD1^{E40K} タンパク質の減少効果は認められなかった。HEK293A 細胞に SOD1^{E40K} 遺伝子を導入する 48 時間前に、Glyburide および Probenecid を培地へ添加し、その後 SOD1^{E40K} 遺伝子を導入して同様の実験を実施したが、細胞内 MIF 濃度は上昇しなかった。MIF 分泌抑制剤の投与のみでは、細胞内 MIF 濃度を上昇させることができない可能性が考えられた。

本研究から、細胞内 MIF 濃度を上昇させることで、SOD1^{E40K} タンパク質凝集体の形成が抑制されることが明らかとなった。SOD1^{E40K} タンパク質凝集体が細胞内に蓄積すると、細胞小器官の機能障害が起こり、神経細胞死が引き起こされると考えられる。DM における神経変性を抑制するために細胞内 MIF 濃度を上昇させるという治療戦略は有効である可能性が高いと考えられた。

細胞内 MIF 濃度を上昇させるために、本研究では MIF 分泌阻害剤の投与を実施したが、細胞内 MIF 濃度は上昇しなかった。より MIF 濃度を高めるために MIF 分泌抑制薬と MIF 発現量を亢進させる薬剤の同時投与を行うなど、治療法を更に検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nomura Saki, Kobatake Yui, Takashima Satoshi, Kamishina Hiroaki, Urushitani Makoto, Nishii Naohito	4. 巻 147
2. 論文標題 The inhibitory effects of MIF on accumulation of canine degenerative myelopathy-associated mutant SOD1 aggregation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Research in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 7~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rvsc.2022.03.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野村咲, 小島結, 高島諭, 神志那弘明, 漆谷真, 西飯直仁
2. 発表標題 イヌ変性性脊髄症のin vitroモデルにおける変異型SOD1凝集体形成抑制に関するMIFの効果
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------