

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15994

研究課題名(和文) 褐毛和種牛の封入体病の病態解明とsod1変異に関する検討

研究課題名(英文) Pathological and genetic study of inclusion body disease of Japanese brown cattle.

研究代表者

渡邊 謙一 (WATANABE, Kenichi)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：10761702

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)：過去のIBD8症例、同地域で飼養される健全な褐毛和種牛208頭について病理組織学的検索を実施したところ、健全牛の約3割の脳にもIBD様の封入体が認められた。IBDで認められる封入体はSOD1の免疫染色に陽性であったが、これらの個体にSOD1遺伝子変異は認められなかった。封入体を有する健全牛の脳とIBD発症牛の脳とに組織学的な差異はほぼ認められなかったが、RNA-seqにより封入体を有する健全牛ではミトコンドリア関連分子の有意な発現上昇が認められたことから、これらの封入体はミトコンドリアの異常ないしSOD1の異常凝集による病的意義のある変化であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IBDの病理像はSOD1の凝集などヒトのALSとの共通点が多く、発現解析の結果などは関連疾患の研究にも還元可能な知見であると言える。また、封入体形成がみとめられた健全牛については発症以前の段階あるいは無症状の保因牛であるとも考えられることから、神経変性疾患の病態発生を考える上で貴重なサンプルと言える。IBDの認知度は低く、発生地域もごく限られているが、過去には死亡例なども発生しており、貴重な和牛の系統である褐毛和種牛の血統維持を考える上でIBDのさらなる病態解明が望まれる。

研究成果の概要(英文)：We examined 8 cases of Inclusion body disease of Japanese Brown cattle (IBD) and 208 slaughtered healthy brains (collected from healthy Japanese brown cattle reared in same area). Intraneuronal inclusions were found in all of IBD cases and approximately 30% of the slaughtered brain. The inclusions were immuno-positive for SOD1, but SOD1 gene mutations were not found in these individuals. Although there was no histological difference between slaughtered brains with/without inclusions, RNA-seq revealed a significant upregulation of mitochondria-related molecules in cases with inclusions. These findings suggest that these inclusions are "true" pathological findings due to mitochondrial abnormalities or abnormal aggregation of SOD1.

研究分野：獣医病理学

キーワード：褐毛和種牛 SOD1 神経変性疾患 封入体

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

褐毛和種牛の封入体病（IBD）は褐毛和種牛にのみ発生が確認されるウシの神経変性疾患である。消瘦、興奮、多汗、心悸亢進、振戦、起立難渋などの症状を特徴とし、病理組織学的には脳幹部神経核の大型神経細胞の細胞質内にグニナ小体様の好酸性細胞質内封入体の形成が認められる。IBDは1989年にFukudaらにより初めて報告されたものの、後続研究が進展せず、病態発生機序は長らく不明であった。申請者らの研究グループでは、IBDの封入体がSOD1陽性を示すことを学会にて報告した。SOD1陽性の細胞質内封入体形成を特徴とする動物疾患の自然発生は極めてまれであり、グニナ小体様の形状と合わせ、ヒトの古典的筋萎縮性側索硬化症（ALS1）に類似している。また、IBDは特定地域の褐毛和種牛にのみ発生していることから、IBD発症の背景に何らかの遺伝的な素因があると想定し、本研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究では、IBDが遺伝性疾患であるという病態仮説のもと、①病理組織学的手法によるIBDの病態解明、②IBDに対する遺伝学的調査と原因遺伝子の特定を目的とした。

3. 研究の方法

1) IBD発症牛に対する回顧的研究

1983年から2005年にかけて、本学にて病理解剖を実施した8例のIBD症例の脳について、封入体の分布および特殊染色・免疫染色による構成蛋白の同定を実施した。特殊染色として、マッソントリクローム染色、LFB染色、PTAH染色、ボディアン染色、コンゴ赤染色、ガリアス・ブランク染色、PAS染色を実施した。免疫染色には、Amyloid β 、Tau、phf-Tau、p62、Ubiquitin、Neurofilament、phf-Neurofilament、SOD1、Synuclein、TDP-43、Cytochrome Cなどに対する抗体を用いた。また、一部の症例のFFPE組織からDNAを抽出し、SOD1のエクソン領域に対するサンガーシーケンスを実施した。

2) IBD発症地域における健常な褐毛和種牛の脳を用いた調査

2005年以降、本学においてIBD症例の病理解剖は実施されておらず、臨床獣医師への聞き取り調査では同地域におけるIBDの発生に関する情報は得られなかった。同地域における褐毛和種牛の飼養頭数は年々減少傾向にあり、病的形質としてのIBDは消失している可能性も考えられた。一方、IBDの病態解明には新鮮凍結材料や高品質なDNAが必要であったことから、同地域の食肉衛生検査所に協力を仰ぎ、健常な褐毛和種牛の脳208例を入手した。得られた脳組織について以下の検討項目を実施した。

①病理組織学的手法による封入体保有率、封入体の分布および性状の検討

常法にて病理標本を作成し、1)と同様の染色法により封入体の性状及び分布を比較した。また、ウシSOD1のN末端側（SOD1₇₋₂₃）とC末端側（SOD1₁₂₂₋₁₃₄）のペプチドを抗原としたウサギ抗血清を作製し、免疫染色に用いた。

②バルクセグレグランド法を用いた全ゲノム解析

バルクセグレグランド法は形質の異なる2群からバルクDNAを作成・解析することにより効率的に変異遺伝子を検索する手法である。過去のIBD症例のFFPEからは全ゲノム解析に十分な純度のDNAが抽出できなかったことから、検索には健常牛の組織のみを用いた。病理検索により封

入体が観察された 31 頭、封入体が観察されなかった 29 頭の凍結脳組織から DNA を抽出し、バルク DNA を作成した。作成したバルク DNA は KAPA hyper prep kit for illumine を用いて PCR free なライブラリを作成し、Nextseq300H にてリードデプス x40 を目安に全ゲノムシーケンスを実施した。

③RNA-seq による発現解析

封入体が観察された 26 頭、封入体が観察されなかった 35 頭について、封入体の好発部位である延髄背側迷走神経核の RNA-later 浸漬組織から RNA 抽出を行った。得られた RNA の純度および収量から症例 3 例、対照 4 例を選定し、2 群間における遺伝子発現を total RNA-seq により比較した。シーケンスには Nextseq500 を使い、得られたリードデータは CLC Genomics Workbench にて解析した。

4. 研究成果

1) IBD 発症牛に対する回顧的研究

8 症例の脳では、封入体は間脳の視床内側核、尾状核、赤核、中脳の赤核、動眼神経核、滑車神経核、外側毛帯核、橋の三叉神経動眼核、延髄の迷走神経核、縫線核、舌下神経核、脊髄腹核、脊髄神経根に認められた。封入体の形状は大型で不整形のもの、小型で円形のもの、やや大型で周囲細胞質との境界が不鮮明なものなど多様であった。これらの封入体はマッソントリクローム染色にて赤色を呈し、PTAH 染色では濃青色を呈していた。また、免疫染色では Ubiquitin 陽性のものが大半であったが、8 症例中 2 例で SOD1 陽性であった。その他神経変性疾患に関連する各種抗体には陰性であった。SOD1 陽性の封入体を有する個体の DNA 解析では、*SOD1* のエクソン領域に変異は認められなかった。

2) IBD 発症地域における健常な褐毛和種牛の脳を用いた調査

①病理組織学的手法による封入体保有率、封入体の分布および性状の検討

208 頭のうち、30.3%に相当する 63 頭に、好酸性細胞質内封入体の形成が認められた。観察された封入体の分布・特殊染色に対する染色性は、1)にて解析した発症牛のものと同様であったが、一部の個体では発症牛よりも多くの封入体が観察された。SOD1 に対する種々の抗体を用いた免疫染色では、封入体はヒト変異 SOD1 に対するカクテル抗体、ヒト SOD1 全長に対する抗体、SOD1₇₋₂₃、SOD1₁₂₂₋₁₃₄ に対し陽性で、特に SOD1₇₋₂₃ に対し最も強い染色性を示した。脳乳剤を用いた western blot では、SOD1 の分子量に大きな変化（断片化、変異、重合体形成など）は認められなかった。また、症例の一部では Ubiquitin や p62 に陽性の封入体も観察された。以降の検索では、封入体形成が認められたものを症例群、封入体が認められなかったものを対照群とした。神経細胞マーカーなど種々の抗体をもちいた免疫染色を実施したが、症例群と対照群の脳組織において、封入体形成以外の組織学的な違いは認められなかった。

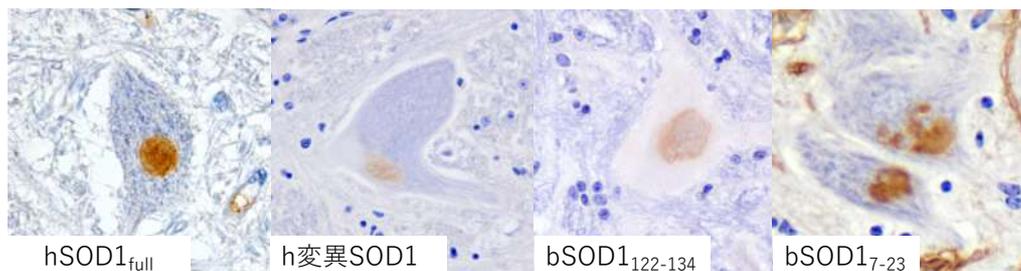


図 1 免疫染色による封入体の染色性の評価

hSOD1full: 抗ヒト野生型 SOD1 (全長)、h 変異 SOD1: ALS 関連の変異を含む SOD1 ペプチドに対するカクテル抗体、bSOD1122-134: 抗ウシ SOD1 C 末端、bSOD17-23: 抗ウシ SOD1 N 末端

②バルクセグレガンド法を用いた全ゲノム解析

リファレンスゲノムである Hereford 種のゲノム (bosTau9) と比較した結果、およそ 7 万箇所 valiant が認められた。これらの多くは両群に共通しており、褐毛和種と Hereford 種との種差によるものと考えられる。両群間にて有意差がみられた valiant については現在再解析中である。5 つの exon と 4 つの intron からなる *SOD1* を例にとると、bosTau9 と得られたデータとの間には intron に 2 箇所の insertion と 14 箇所の SNP が見られた。そのうちの 15 箇所は両群に共通する変異であり、残る 1 箇所は対照群にのみ認められた新規の SNP であった。新規の SNP は intron に位置しており、その病的意義については不明である。その他の遺伝子変異に関しては再解析を継続中であるが、*SOD1* 以外の *TDP-43*、*FUS*、*TARDBP*、*VCP*、*OPTN* といったヒト ALS の原因遺伝子のホモログに関しては大きな変異は認められなかった。

③RNA-seq による発現解析

およそ 25000 の発現遺伝子のうち、2 群間にて差異が認められたものを 76 個選定した。76 遺伝子のうち、症例群にて発現量が上昇していたものが 45 個 (Cluster-2)、低下していたものが 31 個 (Cluster-1) 検出され、それぞれについて GO 解析を実施した。Cluster-2 の遺伝子群では COX1-COX3, ND1 などのミトコンドリア関連蛋白の発現が優位に上昇し、GO 解析ではリン酸脱水素酵素や電子伝達系に関するパスウェイがヒットした。これらの遺伝子はネットワーク解析においても非常に優位なクラスターを形成しており、ミトコンドリアの機能異常などが示唆された。

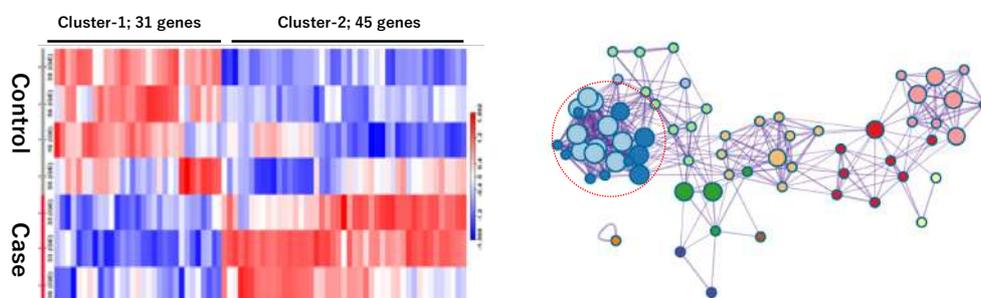


図 2: 症例と対照群との比較 (左: Heatmap 右: 遺伝子ネットワーク解析 (Metascape により作成 <https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)). 赤丸で囲った Cluster-2 の遺伝子群のうち 12 遺伝子がミトコンドリアの機能異常を示唆するタームに該当した。

3) 結論

IBD に認められた封入体の性状はヒト ALS 関連の封入体に類似していたが、病変分布や臨床症状は異なっていた。また、封入体形成が認められた神経細胞に生じる変化は HE 染色標本や免疫染色では描出困難であり、健常牛の脳にも多数の封入体が認められたことから、好酸性封入体の病的意義について懐疑的な見方も強かったが、RNA-seq の結果からミトコンドリアの機能異常が示唆されたことは大きな発見であった。IBD は臨床的に代謝性疾患や感染症などの鑑別が困難であることから、IBD の正確な発生状況は把握困難であるが、調査地域の牛群には同様の形質を持つものが現在も 3 割程度存在していることが明らかとなった。封入体が認められた個体も出

荷の段階では無症状であり、現時点では生産上の問題となっていないが、繁殖牛など長期間飼養される個体については今後も継続的な監視が必要と思われる。IBDの臨床的な診断方法、症状と脳病変との関係、ミトコンドリアの機能異常とSOD1の細胞内蓄積の因果関係など、検討すべき課題は多数残されているが、少なくとも細胞内に蓄積したSOD1はユビキチン・プロテオーム分解系やオートファジーなどの修飾を受けながら封入体を形成するものと考えられる。これらの特徴はALS1を含めたヒトの神経変性疾患の病態仮説にも矛盾せず、本症の病態解明がヒトの神経変性疾患研究につながるものと期待している。

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 Kiuchi Takeru, Watanabe Kenichi, Nakagun Shotaro, Miyahara Kazurou, Horiuchi Noriyuki, Kobayashi Yoshiyasu	4. 巻 35
2. 論文標題 Chronic otitis externa with heat shock protein 70-positive intranuclear inclusion bodies in the ceruminous gland epithelium of a Chihuahua dog	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Toxicologic Pathology	6. 最初と最後の頁 83 ~ 87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1293/tox.2021-0033	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木内建, 渡邊謙一, 宮原和郎, 古岡秀文, 堀内雅之, 古林与志安
2. 発表標題 イヌの外耳道
3. 学会等名 第39回実験動物病理標本交見会集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊謙一、佐野恵奈、青木亮太、Andrew D Miller、古林与志安
2. 発表標題 褐毛和種牛封入体病に関する調査研究報告
3. 学会等名 第164回日本獣医学会
4. 発表年 2021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
研究協力者	平野 貴 (Hirano Takashi) (50605087)	東京農業大学・農学部・教授 (32658)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	篠澤 章久 (Shinozawa Akihisa)	東京農業大学・生命科学部・助教 (32658)	

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		
米国	Cornell University	Animal Health Diagnostic Center	