

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380169

研究課題名(和文) イヌの変性性脊髄症における神経変性メカニズムの解明と抗体療法の前臨床試験

研究課題名(英文) Study on pathomechanisms of canine degenerative myelopathy and preclinical trial for antibody therapy

## 研究代表者

神志那 弘明 (Kamishina, Hiroaki)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：50506847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、犬の変性性脊髄症(DM)の原因を明らかにし、新しい治療法を開発することである。DMに罹患した犬の脊髄を用いた病理検査の結果から、病変形成の初期段階からミクログリアと呼ばれる炎症細胞が多数出現していることが明らかになった。ミクログリアは神経細胞に対して障害性のサイトカインを産生していると考えられ、そのためミクログリアの活性化を抑える治療法が有効であると考えられた。本研究では、DMの原因遺伝子から産生される異常蛋白に特異的に結合する抗体を作製した。神経細胞死を引き起こすミクログリアの活性を抑え、DMの進行を止める抗体療法の確立を目指している。

研究成果の概要(英文)：This research was conducted to elucidate pathomechanisms of canine degenerative myelopathy and develop a novel antibody therapy for this disease. Immunohistochemistry of spinal cord of affected dogs revealed accumulation of activated microglia in the early phase of the degenerating region. Microglia seemed to produce cytotoxic mediators; therefore inhibition of activated microglia was thought to be a promising therapeutic strategy. In this research, we generated canine mutant SOD1-specific antibodies. We are currently working to develop a novel antibody-based therapy for DM using our canine mutant SOD1-specific antibodies.

研究分野：獣医臨床神経病学

キーワード：神経変性疾患 変性性脊髄症 犬 抗体療法 ミクログリア

### 1. 研究開始当初の背景

変性性脊髄症 (DM) はウェルシュ・コーギーにおいて近年急速に増加している致死性神経変性疾患であり、四肢骨格筋の進行性麻痺から始まり、発症後約 3 年で呼吸筋麻痺により死亡する。現在のところ有効な治療法は存在しない。DM 発症例には、スーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) 遺伝子の変異が存在すると報告されたが (PNAS. 106:2794-9, 2009)、神経細胞死の詳細な病態機序は不明である。人において SOD1 遺伝子変異は、致死性神経難病である家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を引き起こすことが知られている。ALS においては変異 SOD1 トランスジェニック (Tg) マウスを用いた研究から神経細胞死に関わる多くの病態機序が解明されたが、いまだ根治療法の確立には至っていない。犬に発生する DM は、自然発生した SOD1 変異遺伝子により生じるため、変異遺伝子のコピー数は ALS と同じであり、ALS と類似する表現型を示す。そのため、DM を新しい ALS モデルとして捉え、変異 SOD1 蛋白による神経細胞死の病態メカニズムを解明すれば DM と ALS の新規治療法の開発につながると考えるが、このような視点での研究は現在までに皆無である。

### 2. 研究の目的

ミクログリアによる神経細胞死のメカニズムを解明し、ミクログリアの活性化を制御できれば、DM に対する新たな分子標的治療の確立に繋がる。本研究は、その基盤的研究として、変異型犬 SOD1 蛋白特異的抗体を用いて DM 罹患症例の脊髄における神経変性の分布、変異型 SOD1 蛋白の局在、ミクログリアのおよびアストロサイトの活性化、ミクログリアの機能的解析を目的として行なった。

### 3. 研究の方法

DM の病態発生におけるミクログリアの関与を調べるため、変異型 SOD1 ホモ接合体を有する DM 罹患犬、変異型 SOD1 ホモ接合体を有する DM 未発症犬、SOD1 ヘテロ接合体を有する DM 未発症犬、野生型 SOD1 ホモ接合体を有する正常犬の脊髄組織に対する免疫組織化学的解析を行い、脊髄における神経変性病変の分布とアストロサイトおよびミクログリアの集簇の有無を解析した。またミクログリアの機能的解析を目的とし、脊髄組織の real-time RT-PCR および蛍光免疫組織化学を実施した。さらに、犬 SOD1 蛋白特異的ポリクローナル抗体および犬変異型 SOD1 蛋白特異的モノクローナル抗体を作製し、変異型 SOD1 ホモ接合体および SOD1 ヘテロ接合体個体の脊髄における変異型 SOD1 蛋白の局在解析を免疫組織化学により行なった。

### 4. 研究成果

脊髄の病理組織学的解析から、DM 罹患犬の脊髄変性病変には高度にミクログリアの集

簇が認められた (図 1)。変異型 SOD1 ホモ接合体を有するが、DM 未発症の個体の脊髄では、軽度の変性が認められ、野生型 SOD1 ホモ接合体と比較すると、ミクログリアの集簇が観察された (図 1)。

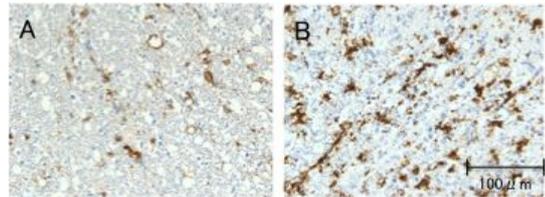


図 1 脊髄ミクログリアの集簇。A, 変異型 SOD1 ホモ接合体の未発症個体、B, 変異型ホモ接合体の発症個体。SOD1 ホモ接合体の個体では、症状発現前から HLA-DR 陽性ミクログリアが出現している。発症症例ではミクログリアの集簇と活性が顕著である。

脊髄病変から total RNA を抽出し、real-time RT-PCR により細胞傷害性因子および保護因子の mRNA 転写量を定量したところ、ミクログリアの集簇が生じた脊髄分節において細胞傷害性因子の転写量が増加していることが明らかになった (図 2)。このことから、DM における脊髄変性病変の形成において、ミクログリアが積極的に関与していることが考えられた。

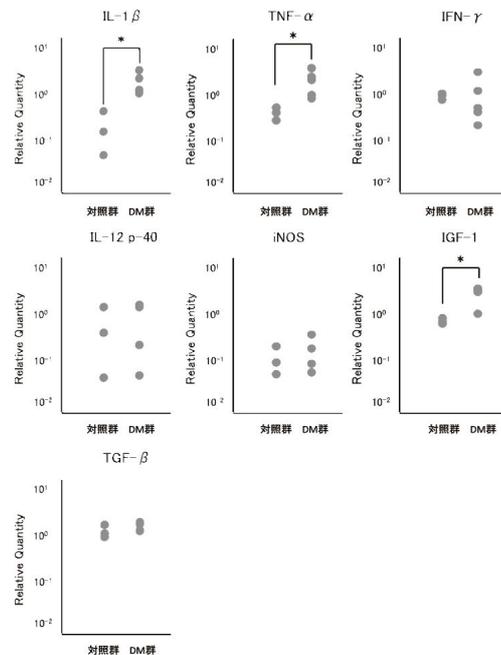


図 2 脊髄組織における細胞傷害性因子および保護因子の発現解析。DM 罹患犬脊髄において IL-1 および TNF- $\alpha$  の高発現が認められる。

犬 SOD1 蛋白特異的抗体を用いて、DM 症例脊髄組織に対する免疫組織化学を行なったところ、神経細胞内への凝集体様構造物の蓄積が認められたことから、変異型 SOD1 蛋白の凝集が DM の病態発生に関与している可能性が示された (図 3)。同抗体による陽性反応は、変性神経細胞周囲に集簇するグリア細胞にも認められた。

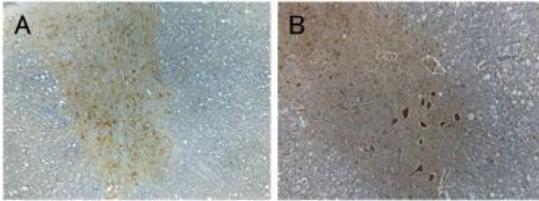


図3 脊髄における SOD1 蛋白の局在。A, ヘテロ接合体の未発症個体、B, 変異型 SOD1 ホモ接合体の発症個体。発症個体においては腹角神経細胞内と灰白質に集属するグリア細胞への高度の SOD1 蛋白の蓄積が認められる。ヘテロ接合体においては神経細胞への SOD1 蛋白の蓄積は軽度であり、グリア細胞への蓄積が認められる。

変異型 SOD1 蛋白特異的モノクローナル抗体を用いて、DM の初期病態を反映すると考えられる SOD1 ヘテロ接合体個体の脊髄組織を解析した結果、神経細胞への変異型 SOD1 蛋白の蓄積は軽度であり、主に集簇した活性型アストロサイトに蓄積していることが確認された。これらの個体に認められた初期の変性病変にもミクログリアの集簇が認められた。これらのことから、DM の脊髄変性病変の発生において、活性型アストロサイトへの変異蛋白の蓄積とミクログリアの活性化が重要であると考えられた。以上の解析結果から、DM の神経細胞死に深く関与すると考えられるグリアの活性化制御が DM に対する新しい治療戦略として有効である可能性が示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Chang H.S., Kamishina H., Mizukami K., Momoi Y., Katayama M., Rahman M.M., Uddin M.M., Yabuki A., Kohyama M., Yamato O. Genotyping Assays for the Canine Degenerative Myelopathy-Associated c.118G>A (p.E40K) Mutation of the SOD1 Gene Using Conventional and Real-Time PCR Methods: A High Prevalence in the Pembroke Welsh Corgi Breed in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 査読有、2013;75:795-8.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328634>

〔学会発表〕(計 4 件)

Kobatake Yui, Oyake Kanae, Tsukui Toshihiro, Sakai Hiroki, Yamato Osamu, Saito Miyoko, Urushitani Makoto, Kato Shinsuke, Sasaki Jun, Shibata Sanae, Maeda Sadatoshi, Kamishina Hiroaki. Clinical, histopathological, and biochemical characterization of the canine model of SOD1-mediated amyotrophic lateral sclerosis. 第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜 (横浜)

山田修平, 酒井洋樹, 千村直輝, 漆谷真, 大和修, 加藤信介, 内田和幸, 小川瑞恵, 前田貞俊, 神志那弘明. イヌの変性性脊髄症におけるミクログリアの組織学的解析と細胞傷害因子の定量. 第 154 回日本獣医学会学術集会. 2012 年 9 月 16 日、岩手大学 (盛岡)

並木まり子, 漆谷真, 大和修, 津久井利広, 鈴木理恵子, 加藤信介, Janice Robertson, Kate Banks, 前田貞俊, 神志那弘明. イヌの変性性脊髄症に認められる変異型 SOD1 蛋白の生化学的解析. 第 154 回日本獣医学会学術集会. 2012 年 9 月 16 日、岩手大学 (盛岡)

中前早百合, 漆谷真, 加藤信介, 酒井洋樹, 大和修, 内田和幸, 小川瑞恵, 津久井利広, 鈴木理恵子, 前田貞俊, 神志那弘明. イヌの変性性脊髄症における変異型 SOD1 蛋白凝集体の証明. 第 154 回日本獣医学会学術集会. 2012 年 9 月 16 日、岩手大学 (盛岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

神志那 弘明 (KAMISHINA HIROAKI)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号: 50506847

##### (2) 研究分担者

前田 貞俊 (MAEDA SADATOSHI)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号： 50377694

漆谷 真 (URUSHITANI MAKOTO)

京都大学・医学部・准教授

研究者番号： 60332326

加藤 信介 (KATO SHINSUKE)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号： 60194817

(3)連携研究者

( )

研究者番号：