

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380171

研究課題名(和文) 伴侶動物における遺伝性神経疾患の遺伝子診断のための基礎研究

研究課題名(英文) Basic studies for the genetic diagnoses of hereditary neurological diseases in companion animals

研究代表者

内田 和幸 (UCHIDA, Kazuyuki)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10223554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、その発生に遺伝的背景が疑われる動物の神経疾患について検討した。検討の結果、神経軸索ジストロフィーの原因遺伝子の変異を特定した。ヒトのALSに類似するイヌの脊髄変性症については、本研究で病理発生機構を明確にできたが、SOD1変異は、絶対条件ではなく、その他の因子が関与することが確認された。この他、アレキサンダー病様疾患、グロボイド細胞型白質ジストロフィー等の新規疾患が発見され、一部については原因遺伝子が発見された。本研究成果は疾患予防に寄与するのみならず、ヒト疾患のモデル動物作出にも可能性を開くものである。

研究成果の概要(英文)：The research works focused on neuronal diseases in animals that possibly have hereditary etiology to know the pathogenesis and genetic factors. The investigations successfully revealed the causative gene mutation of canine neuroaxonal dystrophy. The studies also revealed the detailed pathogenesis of canine degenerative myelopathy. The mutation of SOD1 gene had a limited role and some additional factors would be necessary for the pathogenesis of the ALS-like-diseases. Throughout the research works, some neurodegenerative disorders such as Alexander-like disease and Globoid cell leukodystrophy have been newly found, and causative genes of the diseases were elucidated. The achievements of the series of research will provide useful information to prevent the hereditary neuronal diseases and to produce animal models for similar human diseases.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・臨床獣医学

キーワード：神経疾患 伴侶動物 遺伝性疾患 神経軸索ジストロフィー 変性性脊髄症 壊死性髄膜炎 イヌネコ

## 1. 研究開始当初の背景

小動物臨床分野の医療技術の向上により、様々な伴侶動物疾患の病態が解明されると同時に、その疾患分類も詳細化されている。特に CT、MRI などの画像診断技術の向上により、これまでブラック・ボックスであった神経疾患について、かなりの精度での生前診断が可能となりつつある。しかしながら、特に、炎症性疾患や変性性疾患等の詳細な病態解明や診断分類には剖検後の病理形態学的検索が必須とされる。

これらの疾患には遺伝的背景をもって発症するものが少なからず存在する。代表的な遺伝性神経疾患であるリソソーム病の一部については現在、生前の遺伝子診断や体細胞の生化学的検査によりその疾患分類が可能になっているが、有効な治療方法は存在しない。医学領域でもこれらの疾患は難治性疾患であり、根治的治療方法はなく、遺伝子治療などの新たな技術応用が期待される分野である。したがって、これらの遺伝性神経疾患に罹患した伴侶動物の病態解明や治療方法の検討は、小動物臨床分野に直接寄与するばかりでなく、ヒトの類似疾患の病理発生解明や治療方法の検討にも非常に有用な情報をもたらす可能性が高い。

伴侶動物については、神経学的機能の評価方法、画像診断技術、一般状態の維持のための様々な医療技術が蓄積されており、治療成績そのものがヒトの類似疾患の医療に外挿可能な知見となると考えた。

## 2. 研究の目的

伴侶動物、特にイヌの神経疾患には、明らかな犬種特異性が存在する。国内では特定犬種が一定時期に集中してブリーディングされ、ある時期に同一の神経疾患が多発することが多い。しかしながら、これらの詳細な病態解明や原因遺伝子の特定に至らないものが殆どである。

本研究では、臨床、獣医病理、および遺伝学・分子生物学を専門とする研究者で強固なネットワークを構築し、各疾患の病態情報を臨床・病理において収集解析し、症例の遺伝子を保存する。臨床症状と病理形態学的特徴よりそれぞれの疾患を特定したのちに、関連すると思われる遺伝子についてその変異や欠損等の検索を実施して、伴侶動物の神経疾患の遺伝的背景を明確にして、各疾患の摘発に実用化すると同時に、ヒトの疾患モデルとしての応用を図る。

本研究を通じて、イヌやネコの遺伝性神経疾患の病態と原因遺伝子を明らかにすることができれば、これらの疾患の遺伝子診断法を確立することが可能となり、発症例の生前診断や一斉スクリーニングによる不適切なブリーディング防止など、小動物臨床領域に直結する有用な情報を提供できる。また、一部の疾患については、遺伝子スクリーニングの結果をもとに交配により家系を維持して、

ヒトの関連疾患のモデル動物として確立し、その病態解析や先端的治療法の治験を行い、ヒトの難治性神経疾患の治療方法について検討することが可能となる。

## 3. 研究の方法

本研究は、既に収集された症例の解析と、ネットワークによる新規症例の摘発という 2 方面より実施する。既に申請者が収集した伴侶動物の神経疾患のうち遺伝性である可能性が高い疾患を選別して様々な状態で保管されている症例の組織より DNA 抽出し、これを遺伝子検索用に保管する。リソソーム病は、他機関で進行中の研究協力にとどめ研究対象より除外する。

当初の研究対象として、イヌの小脳皮質アピオトロフィー (CCA)、神経軸索ジストロフィー (NAD)、アレキサンダー病様疾患、ALS 様脊髄変性症、ネコの高綿状脳変性症を予定している。また、明確な犬種特異性のある炎症性疾患であるパグの灰白質型壊死性髄膜脳炎 (NME) とヨークシャーテリアの白質型 NME の DNA サンプルの抽出保管も実施する。これらの DNA サンプルで、予想される個々の遺伝子の変異や欠損を検索し、各疾患の原因遺伝子の特定を試みる。

## 4. 研究成果

本研究ではその発生に遺伝的背景が疑われる神経疾患について、網羅的な検討を行った。研究項目としては、新規疾患の摘発に比べ、これまでの収集された神経疾患のうち遺伝性疾患の可能性が高い症例より、血液およびパラフィン包埋組織より DNA を抽出し解析した。疾患別に研究結果の概要を以下に記載する。

### (1) パピオンの神経軸索ジストロフィー (NAD)

過去にパピオンの NAD については 3 例を収集し、その病理学的特徴について検討を進めていたが (論文業績 12)、平成 23 年度に追加で新規 2 症例を発見し、各種病理検索により NAD と確定診断した。1 症例については、獣医師とブリダーの協力が得られたため、罹患例に加え、その両親の血液より DNA と RNA が採取され、過去の NAD 症例とともに次世代型シーケンサーにより全ゲノムを解析し、罹患例に特有の遺伝子変異を検索した。平成 24 年～25 年度の *in silico* 解析結果、パピオン犬の NAD の原因遺伝子とその変異部位、および変異様式を特定した。この変異については、他機関で保管されていたパピオン犬の NAD 症例でも確認することができた。さらに NAD 症状のないイヌ多症例を用いた追加検討でも、本研究で確認された遺伝子に変異が存在しないことが確認できた。原因遺伝子とその変異パターンについては、特許申請等の可能性も考慮し本報告書では明記しないが、多症例による解析の結果、比較的今回摘発できた遺伝子変異の浸透率は低いこ

とが確認できているため、学術雑誌へのデータの公表を優先し、在論文作成を行っている。この研究結果は、国内で初めて動物の遺伝性神経疾患の原因遺伝子を直接解明したものであり、海外でも同犬種に NAD の発生が確認されているため、海外症例にも応用可能な貴重な情報をもたらすものと考えられる。さらに特定された遺伝子はヒトの幼児型神経軸索ジストロフィーの原因遺伝子とも関連するものであり、ヒトの疾患のモデル系としての研究進展を計画している。

#### (2) ウェルシュ・コーギー (PWC) 犬の ALS 様脊髄変性症 (DM)

平成 23 年度に新たに 3 症例が収集された。また平成 22 年度に実施した SOD1 や NOS の発現状態については、学術雑誌にその内容を公表した(研究業績 8)。平成 24 年度より DM の神経細胞脱落メカニズムについて新規症例を加え検索し、PWC の DM では脊髄腹角神経の神経脱落とともに GLT-1 の特異的減少が生じること明らかになった。このことから興奮性傷害による神経細胞死が DM の神経脱落に重要であることが明らかになった。本内容は平成 24 年度に学術雑誌に公表した(研究業績 3)。さらに平成 25 年度には DM の神経脱落に関連したオートファジー経路の異常について検証し、向上的オートファジー機能の異常が本疾患に関連することが判明した。本成果は既に平成 25 年度内に学術論文としてとりまとめを行い、現在投稿中である。なお、これらの一連の研究に使用した PWC の剖検症例については、鹿児島大学の和教授の協力を得て、すべて SOD1 遺伝子の変異について検証したが、DM を発症した PWC はすべて SOD1 遺伝子の変異をホモで有する個体であることが確認されている。しかしながら、同年齢で、DM 未発症個体には同様の SOD1 遺伝子の変異をヘテロあるいはホモで有する対象例が複数存在することが確認されていることから、SOD1 変異は PWC の DM の要因にはなりえるものの、絶対条件ではなく、その他の複数の因子が関与することが確認された。

#### (3) ウェルシュコーギー (PWC) の組織球性肉腫

上記疾患の検索に関連し、PWC の多発性筋炎(研究業績 15)や頭蓋内組織球性肉腫の症例(研究業績 9)が収集された。これらの内容はそれぞれ平成 23 年度に海外の科学雑誌に公表したが、国内の PWC には特に組織球性肉腫の罹患例が非常に多いことが判明したため、疾患関連遺伝子について平成 23 年度に次世代型シーケンサーを用いて検討し、BMX 遺伝子を原因遺伝子候補として絞り込んだ。しかし、他犬種を含む多症例による解析の結果、イヌの BMX 遺伝子は本研究で確認された遺伝子配列が、多くの犬種で保存されたものであり、現在、世界的な標準とされているボクサー犬の BMX 遺伝子の配列がむしろ特殊であることが最終的に明らか

になった。このため、次世代型シーケンサーで得られたデータを再検討するとともに、組織球性肉腫より細胞株を樹立して、腫瘍細胞において発現亢進や低下が見られる遺伝子を網羅的に検討し、組織球性肉腫の腫瘍化のメカニズムを検証している。

#### (4) イヌの壊死性髄膜脳炎 (NME)

本疾患については、研究期間中に海外の他機関より、パグ犬の NME において発症犬に特定の白血球型 (MHC - Class II) の遺伝子型が存在することが報告され、その疫学的検証についても既に報告されたため、本研究機関では、その病態の詳細解明に主なテーマを移行し研究を展開した。まずパグとヨークシャーテリアを中心とする犬種ごとの病態の相違を中心に病理的知見を比較検討し、病理学的特徴についてはその概要をとりまとめ平成 24 年度に科学雑誌にその概要を報告した(研究業績 6)。さらに、平成 24 年度よりケモカイン等の液性因子について、犬種間あるいは NME と肉芽腫性髄膜脳炎(GME)間の類似性と相違について検証した結果、Th1 cytokines 中、IFN- $\gamma$  は NME で高く、Th2 cytokines 中、IL-4 は NLE 及び GME の 1 症例で高値を示し、さらに Th17 cytokines の IL-17 及び IL-23 は GME で高いことが明らかになった。形態学的比較検討では、明確にできなかったが、これらの 3 疾患には、液性因子の面からは明瞭な相違が存在することが明らかになった。この結果は平成 25 年に海外の学術論文に既に公表した(研究業績 4)。さらに NME の皮質型と白質型の相違を明確にするためにラットのモデル系の作出を試み、皮質型の病態の作出に成功した。本成果については平成 25 年度に学術論文として投稿し、すでに受理されている(研究業績 2)。これらの一連の研究により NME が免疫介在性の疾患であり、犬種特異性が存在する背景には既に明らかになった白血球遺伝型が関与する可能性が非常に高いことが示された。

#### (5) 平成 22 年～25 年に新規摘発された遺伝性神経疾患について

本研究期間において、研究協力者より提供を受けたイヌ・ネコの症例についてそれぞれ病理学的に検索し、複数の神経疾患を摘発した。中には国内で初めて発生が確認された疾患が含まれ、今後の研究対象として検証する予定である。ここでは、概要を述べる。

フレンチ・ブルドックのアレキサンダー病様疾患：食道拡張症を主な臨床症状とする若齢のフレンチ・ブルドックを検討し、中枢病変の特徴より本例がアレキサンダー病様疾患あることを確認した。本疾患は国内で初めて発症が確認された疾患でありその病理像を中心に症例報告として科学雑誌に公表した(研究業績 11)。本疾患については GFAP 遺伝子の解析を実施するが、本病は de novo の遺伝子変異が考えられており、新規性あるいは今後の応用性は乏しいと考えている。

グロバイド細胞型白質ジストロフィー：平

成 24 年度にネコ、平成 25 年度にイヌの症例がそれぞれ収集された。これらはいずれも国内での初発例である。ネコの症例については、単発症例であり、家族歴や兄弟が不明であったため、病理所見を中心に症例報告として学術雑誌に平成 25 年度に公表した(研究業績 1)。なお、本例の原因遺伝子については、ヒトの Krabbe 病と同様の遺伝子変異が確認されており、今後ネコの同疾患の生前疾患に汎用されると期待される。また平成 25 年度のイヌの症例については、罹患症例 2 例と正常同腹兄弟 2 例の DNA が保管された。罹患症例のうち一例は病状悪化のため病理解剖が実施され、病理学的にグロボイド細胞型白質ジストロフィーと確定診断された。本疾患については鹿児島大学の大和教授らと協力して、今後原因遺伝子の特定を進める。

その他の神経変性疾患：上記の疾患以外に単発的に収集された神経疾患については、研究協力者との共同研究としてそれぞれ病理学的解析に加わり学術雑誌にその内容を公表した(研究業績 5、7、10、13、14)。なお、フェレットの神経セロイド・リポフスチン症は(研究業績 10)、同動物種における初発例の報告である。

以上の一連の研究より、複数のイヌの遺伝性神経疾患の病態が詳細に解明されるとともに、一部については原因遺伝子が発見された。特に NAD の原因遺伝子特定については、国内で新規原因遺伝子が初めて特定されたものであり、特に顕著な研究成果と考える。NAD については、今後キャリア犬の摘発による疾患予防に寄与するのみならず、ヒト疾患との類似性を重視し、キャリア犬の積極的な交配によるモデル動物作出にも可能性を開くものであろう。

#### 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 15 件)

Ogawa M, Uchida K, Isobe K, Saito M, Harada T, Chambers JK, Nakayama H. Globoid cell leukodystrophy (Krabbe 's disease) in a Japanese domestic cat. 2014. *Neuropathology*. 34(2):190-196. (査読有)  
Park, E.S. Uchida K, Nakayama H. Establishment of a Rat Model for Canine Necrotizing eningoencephalitis (NME). 2014. *Vet Pathol*. In press. doi: 10.1177/0300985813519115 (査読有)  
Ogawa M, Uchida K, Yamato O, Inaba M, Uddin MM, and Nakayama H. Neuronal loss and decreased GLT-1 expression observed in the spinal cord of Pembroke Welsh Corgi dogs with canine degenerative myelopathy. 2013. *Vet Pathol*. 51(3):591-602. doi: 10.1177/0300985813495899 (査読有)

Park ES, Uchida K, Nakayama H. Th1-, Th2-, and Th17-Related Cytokine and Chemokine Receptor mRNA and Protein Expression in the Brain Tissues, T Cells, and Macrophages of Dogs With Necrotizing and Granulomatous Meningoencephalitis. 2013. *Vet Pathol*. 50(6):1127-1134. doi: 10.1177/0300985813488957 (査読有)

Tsuboi M, Uchida K, Ide T, Ogawa M, Inagaki T, Tamura S, Saito M, Chambers JK, Nakayama H. Pathological features of polyneuropathy in three dogs. 2013. *J Vet Med Sci*. 75(3): 327-335. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.12-0224> (査読有)

Park ES, Uchida K, Nakayama H. Comprehensive immunohistochemical studies on canine necrotizing meningoencephalitis (NME), necrotizing leukoencephalitis (NLE), and granulomatous meningoencephalomyelitis (GME). 2012. *Veterinary Pathology*. 49(4): 682-692. doi: 10.1177/0300985811429311. (査読有)

Okabayashi S, Uchida K, Nakayama H, Ohno C, Hanari K, Goto I, Yasutomi Y. Periventricular leukomalacia (PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*). 2011. *J Comp Pathol*. 144: 204-211. doi: 10.1016/j.jcpa.2010.06.006. (査読有)

Ogawa M, Uchida K, Park ES, Kamishina H, Sasaki J, Chang HS, Yamato O, Nakayama H. Immunohistochemical observation of canine degenerative myelopathy in two Pembroke Welsh Corgi dogs. 2011. *J Vet Med Sci*. 73(10):1275-1279.

<http://dx.doi.org/10.1292/jvms.11-0097> (査読有)

Ide T., Nakayama H, Uchida K. Pathological and immunohistochemical features of subdural histiocytic sarcomas in 15 dog. 2011. *J Vet. Diagn. Invest*. 23(1):127-132. doi: 10.1177/104063871102300123 (査読有)

Nibe, K., Miwa, Y., Matsunaga, S., Uetsuka, K., Nakayama, H., Uchida, K. Clinical and pathologic features of neuronal ceroid-lipofuscinosis in a ferret (*Mustela putorius furo*). 2011. *Vet Pathol*. 72(11):1495-1499. doi: 10.1177/0300985811400441 (査読有)

Ito T, Uchida K, Nakamura M, Nakashima K, Suzuki K, Nakayama H. Fibrinoid Leukodystrophy (Alexander 's disease-like disorder) in a Young Adult French Bulldog. 2010. *J. Vet. Med. Sci*. 72(10):1387-1390. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.10-0085> (査読有)

Nibe K, Nakayama H, Uchida K. Comparative study of cerebellar degeneration in canine neuroaxonal dystrophy, cerebellar cortical abiotrophy, and neuronal ceroid-lipofuscinosis. 2010. J. Vet. Med. Sci. 72(11): 1495-1499. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.10-0072> ( 査読有 )

Nakamoto, Y., Yamato, O., Uchida K., Nibe, K., Tamura, S., Ozawa, T., Ueoka, N., Nukaya, A., Yabuki, A., Nakaichi, M. Neuronal ceroid-lipofuscinosis in long-haired Chihuahuas: clinical, pathological and magnetic resonance imaging findings. 2010. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 47(4) e64-70. doi: 10.5326/JAAHA-MS-5564. ( 査読有 )

Tamura, S., Tamura, Y., Uchida K., Nibe, K., Nakaichi, M., Hossain, M. A., Chang, H. S., Rahman, M. M., Yabuki, A., Yamato, O. GM2 gangliosidosis variant 0 (Sandhoff-like disease) in a family of toy poodles. 2010. J. Vet. Intern. Med. 24(5): 1013-1019. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0564.x. ( 査読有 )

Toyoda K, Uchida K, Matsuki N, Sakai H, Kitagawa M, Saito M, Sasaki J, Nakayama H. Inflammatory myopathy with severe tongue atrophy in Pembroke Welsh Corgi dogs. 2010. J Vet. Diagn. Invest. 22): 876-885. doi:10.1177/104063871002200605 ( 査読有 )

〔学会発表〕(計 1件)

小川瑞恵、内田和幸、中山裕之. ペンブロープ・ウェルシュコーギー犬の変性性脊髄症の免疫組織科学的検討. 日本神経病理学会.平成 23 年 6 月 3 日(京都)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/byouri/research03/research03.htm>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

内田 和幸 ( UCHIDA, Kazuyuki )

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号 : 10223554

### (2)研究分担者

中山 裕之 ( NAKAYAMA, Hiroyuki )

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号 : 40155891