

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19580371
 研究課題名（和文）動物の小脳脊髄変性疾患の病理発生解明と生前診断のための基礎研究
 研究課題名（英文）Fundamental researches for pathologic elucidation and antemortem diagnosis in the cerebrospinal degenerative diseases of animals.
 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

研究成果の概要（和文）：本研究の結果、パピオン犬の小脳皮質アビオトロフィー、パピオン犬 (CCA)、チワワ犬の神経軸索ジストロフィー (NAD)、およびチワワ犬の神経セロイド・リポフスチン (NCL) 症の臨床・病理学的特徴が明らかにされた。これらの疾患は、生前検査では、いずれも重度～中度の小脳萎縮を画像診断上の特徴とする。病的には神経細胞の脱落メカニズムは疾患により異なり、CCA では神経細胞のアポトーシス、NCL ではセロイド・リポフスチン蓄積に関連した炎症反応、NAD では、シナプス障害に起因するその他のメカニズムで小脳萎縮が生じることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The research revealed the clinical and pathological features of cerebellar cortical abiotrophy (CCA) in Papillon dogs, neuroaxonal dystrophy (NAD) in Papillon and Chihuahua dogs, and ceroid-lipofuscinosis in Chihuahua dogs. By antemortem image analysis, all these degenerative canine diseases were characterized by moderate to severe cerebellar atrophy. Pathologically, the pathway of neuronal death was differ among these diseases; apoptosis in CCA, inflammatory reaction associated ceroid-lipofuscin deposits in NCL, and some other injury associated synaptic processes in NAD, are suspected as major role of the pathologic events, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：臨床獣医学

キーワード：小脳変性、脊髄変性、神経軸索ジストロフィー、小脳アビオトロフィー、神経細胞死、シナプス

1. 研究開始当初の背景

獣医学領域では、生後ある一定の正常発育を経た後、小脳皮質が変性・萎縮する病態を一括して小脳 **abiotrophy**、また小脳に加え、中枢神経系の多系統が同質の変化を示すものを多系統性 **abiotrophy** として大まかに分類している。これに対し、ヒトの小脳・脊髄変性疾患の多くは、原因遺伝子の CAG リピート配列が異常に伸長するために起きる一連の遺伝性神経変性疾患群として再分類されつつある。これらの疾患に共通した病理発生として、原因遺伝子の CAG リピート増加の結果、形成されたポリグルタミンが主に核内に凝集・沈着し、このポリグルタミンの 3 次構造変化がアポトーシス等を誘発して最終的に神経細胞死に至らしめると考えられている。

現在、ヒトでは、遺伝性脊髄小脳変性症、ハンチントン舞踏病、球脊髄性筋萎縮症など少なくとも 9 種類の小脳・脊髄変性疾患が、この病態の範疇に含まれることが解明された。しかしながら、これらのポリグルタミン病以外にも、小脳あるいは関連領域の神経突起が変性する神経軸索ジストロフィーなど、若齢時に特定領域の神経細胞やその突起が変性・萎縮する原因不明の神経疾患がヒトにも未だ多く存在する。

研究代表者は、これまで動物の中枢神経疾患の病態解明に関する研究に一貫して従事しているが、近年、生後数ヶ月より進行性神経症状を特徴とする特定犬種の疾患例が短期間のうちに収集された。検索の結果、本疾患は、パピオンやチワワ等、近年国内で飼育頭数が急増した犬種に集中し、病理学的には小脳皮質細胞の脱落を主体とする疾患と、小脳への入力や小脳からの出力に関連する神経突起の膨化・変性を特徴とする疾患に大別されることが判明している。前者は小脳皮質 **abiotrophy**、後者は神経軸索ジストロフィーの病態と合致する病態であり、特に後者は、海外でごく少数の症例しか報告されていない稀な病態である。なお、これらの二疾患はいずれも若齢より発症し、障害の主体が小脳である点で類似し、病理発生の一部に何らかの相関があるものと予想される。また過去のイヌにおける報告やヒトの類似疾患における研究成果等から、これらの中枢疾患は常染色体劣性遺伝に基づく疾患と推察され、今後も国内で繁殖・飼育されているパピオンやチワワ等の犬種では、類似疾患が散発的に発生すると予想される。

本研究では上記の 2 疾患を中心に、類似の小脳変性疾患を収集し、これらの病理発生機構の詳細を解明することで、動物における小脳脊髄変性性疾患の理解と生前診

断のための基礎的知見を得ることを志向した。

2. 研究の目的

本研究では、近年、パピオンやチワワ等の犬種に発生している小脳皮質 **abiotrophy** や神経軸索ジストロフィーの臨床・病理像を明確にして、これらの疾患の基本的な病理発生機構を解明すると同時に、疫学調査による遺伝形式解明、病因遺伝子特定などを通じて、生前診断方法の確立に必要な基礎的情報を収集することを目的とする。

本研究では、家族背景の判明していないパピオン種 3 例、パピオン×チワワ交雑種 1 例が既に病理解剖症例として収集され、臨床・病理学的検索により、3 例が神経軸索ジストロフィー、1 例が小脳皮質 **abiotrophy** と診断された。これらの症例の家系調査を臨床獣医師の協力を得て実施し、遺伝的背景を確認すると同時に、これらの疾患の保管臓器を利用して、さらに詳細な病理学的解析を加える。

病理検索の項目として、罹患症例の脳における病変分布の局在の明確化、プルキンエ細胞などの小脳皮質神経細胞の変性・消失程度、小脳の入出力経路における軸索変性の分布等を予定している。さらにプルキンエ細胞等の神経細胞核内におけるポリグルタミンやユビキチン等の凝集の有無、神経細胞のアポトーシス頻度、神経細胞体や軸索突起における α シヌクレイン、リン酸化 Tau、リン酸化ニューロフィラメント凝集の有無、さらにカルシウム結合蛋白の凝集の有無、あるいはシナプス関連タンパクの凝集の有無を詳細に検討して、ヒトの類似疾患との相違を明確にする。

これらの一連の病理学的検索結果に基づき、小脳皮質 **abiotrophy** と神経軸索ジストロフィーで障害される神経経路を明らかにして、ヒトの類似疾患の研究成果を参照しつつ、神経細胞死や軸索変性の詳細な病理発生機構を明らかにする。得られた情報は、国内外の学会や学術誌などに公表する。同時に国内の MRI 検査施設を有する臨床獣医師の協力を幅広く求め、可能な限り新規罹患例を複数摘発して、家系情報、生前の臨床症状、ならびに組織材料を収集する。小脳皮質 **abiotrophy** あるいは神経軸索ジストロフィーの責任遺伝子解明や家系解析等に利用する予定であるが、本研究計画の予定期間では、病態解明と新規症例収集までを現実的な達成目標とした。

3. 研究の方法

(1) 臨床データの収集・解析

臨床情報の検討：本研究の対象となるイヌの

小脳脊髄変性疾患については、既に小脳皮質 abiotrophy、神経軸索ジストロフィーの4症例が収集され、これらの症例に関しては、その臨床症状の経過、一般生化学的検査、神経学的検査、CTおよびMRI画像診断等が比較的詳細に検討・記録されている。平成19年度中に、これらの症例間の共通点や相違点を明確にするために、全てのデータを比較・解析する。この作業は、症例の診療を担当した臨床獣医師の協力も得て実施する。

臨床情報の客観評価：解析した臨床データについて、小動物の神経系疾患を専門とする複数の獣医系大学の臨床教員にコンサルトを依頼し、小脳皮質 abiotrophy と神経軸索ジストロフィーに特異的な臨床症状や画像診断上のポイントを明確化する。なお、臨床的な類似点の多い各種ライソゾーム蓄積症との相違点については個別に、本疾患を専門とする獣医師に協力を依頼し、対象疾患との相違を明確にする。

症例の家系解析と遺伝子保存：前述の症例について、診療を担当した臨床獣医師ならびに症例の飼主の協力を得て、罹患動物の家族歴を調査する。血縁関係がある程度判明した症例に関しては、現在も生存している例があれば、飼主の同意を得て、血液サンプル等採取し、遺伝子解析用に保管する。

(2) 病理形態学的検索

病変分布解析および数量的評価：既に収集した4症例については、病理検査が実施され、既にその病理形態学的特徴については、把握している。平成19年度中に、これら4症例の中樞神経および末梢神経について、より複数の病理組織を作成し、部位別および系統別の病変分布を把握する。この検索では、特に軸索変性と神経細胞体の変化について着目し、軸索変性は、軸索球 Spheroid の出現頻度、神経細胞体については、特に小脳皮質のプルキンエ細胞と皮質顆粒層の神経細胞数を評価指標とし、数量的解析を行い、4例の相違を明確化する。

神経細胞核内の凝集物に関する研究：ヒトの小脳脊髄変性症では、核内にポリグルタミンを始め、様々な関連蛋白が凝集し、一部には核内封入体を形成することが、既に判明している。このため、ポリグルタミン、ハンチンチン蛋白、HSP70、ユビキチン、アンドロゲン・レセプター等の核内凝集の有無について、特に小脳皮質を中心に検討する。これらの物質に対する特異抗体により免疫組織化学的手法により、罹患症例における核内凝集の有無を検索し、ヒトの関連疾患との相違を明確にする。

変性軸索内の凝集物に関する研究：ヒトの若年性神経軸索ジストロフィーでは、変性膨化した神経突起に様々な物質が凝集していることが知られている。その代表的なものは、シナプス関連物質（シナプトフィシン等）、細胞骨格関連蛋白（リン酸化ニューロフィラメント、微小管関連蛋白、Tau 蛋白、 α シヌクレイン等）、およびカルシウム結合蛋白（カルバインディン、カルモジュリン、パラバルミン等）である。動物の類似症例でも、同様の所見が一部確認されているが（Siso S, et al. *Acta Neuropathologica* 2001）、本研究でも、これらの物質の軸索内における凝集有無を全て詳細に検討・解析し、それぞれの物質の機能や組織内分布の特性より、本疾患における軸索傷害の発生機構を明確にする。特にヒトの若年性神経軸索ジストロフィーの一部には鉄イオンの細胞内代謝に関連する蛋白の異常が指摘されており、本研究では特に、カルシウムイオンに結合する蛋白の動態に特に注目して、検討を実施する予定である。

4. 研究成果

平成19年度は、パピオン犬に発生した小脳皮質 abiotrophy (CCA)、神経軸索ジストロフィー (NAD)の合計4例について、各症例間の共通点や相違点を明確にするために、臨床データを比較・解析した。その結果、これら2つの神経変性疾患の臨床症状や画像診断所見については非常に類似しているものの、病理組織学的特徴が極めて異なり、CCAでは小脳プルキンエ細胞と顆粒細胞の重度の脱落を特徴とするのに対し、NADでは、これらの神経細胞の脱落所見は軽度である一方、軸索変性が著明であり、特に感覚神経路に多数の軸索球形成が認められた。これらのパピオン犬のCCAとNADについては、臨床的所見と基本的な病理所見をとりまとめ学術報告として、本年度中に既に公表をすませた(*J. Vet. Med. Sci.* 69: 1047-1052, 2007, Nibe, K. et al.)。

また、4例中1例については、特にそのMRI画像上の特徴について検討した結果を海外の小動物臨床系学術雑誌に公表を済ませた(*Small Animal Practice*, 48:458-461, 2007, Tamura S. et al.)。

パピオン犬のNADにおける変性軸索内の凝集物に関する研究を実施しており、シナプス関連物質（シナプトフィシン等）、細胞骨格関連蛋白（リン酸化ニューロフィラメント、微小管関連蛋白、Tau 蛋白、 α シヌクレイン等）、およびカルシウム結合蛋白（カルバインディン、カルモジュリン、パラバルミン等）凝集の有無を免疫組織化学的に検討・解析している。その結果の一部は2008年3月の第

145 回日本獣医学会で公表した。

平成 20 年度には、イヌの神経軸索ジストロフィーにおける膨化神経突起に、シナプス関連物質（シナプトフィシン）、細胞骨格関連蛋白（リン酸化ニューロフィラメント、Tau 蛋白、 α/β シヌクレイン等）、およびカルシウム結合蛋白（カルビンディン、カルモジュリン、パラバルミン等）の凝集をそれぞれ明らかにし、これらの結果を取りまとめ海外の学術雑誌に公表した（Vet Pathol. 2009）。検索の結果、パピオン犬の神経軸索ジストロフィーでは、シナプスの機能異常により、これらの分子がシナプス内に凝集し、特徴的な軸索球（スフェロイド）を形成するものと予想された。また神経軸索ジストロフィー、小脳皮質アビオトロフィー、およびその他の変性性中枢疾患における小脳プルキンエ細胞と顆粒細胞の細胞脱落のメカニズムを知る目的で、病変部における TUNEL 染色により、これらの細胞におけるアポトーシスの有無を明確にすると同時に、活性型カスパーゼ 3 や P53 などの基本的なアポトーシス関連分子について免疫組織化学的手法などにより検索し、本疾患における神経細胞アポトーシス経路などについて検索している。これらのアポトーシス関連の研究と同時に、各疾患における脂質過酸化についても検討しているが、この細胞傷害経路については、十分な知見が得られていない。

平成 21 年度には、イヌの小脳皮質アビオトロフィー、神経軸索ジストロフィー、神経セロイド・リポフスチン症等の小脳変性（萎縮）を示す疾患複数例について、その小脳神経細胞脱落のメカニズムを解明する目的で、それぞれの症例の小脳組織を比較検討した。なお、本研究に使用したチワワ犬のセロイド・リポフスチン症については、家系調査の結果等を含め別途海外学術雑誌にその結果を公表した（Nakamoto Y., J. Am. Anim. Hosp. Assoc. In press）。

通常の組織検索では小脳細胞の脱落程度が疾患ごとに小脳虫部と片葉で明瞭な相違が存在することが明らかになった。また種々の特殊染色により、アポトーシス細胞（TUNEL 法、活性型カスパーゼ 3 免疫染色等）の程度、星状膠細胞増殖（GFAP 免疫染色）、小膠細胞/マクロファージ浸潤増殖（HLA-DR 免疫染色）、および T 細胞浸潤（CD3 免疫染色）の程度をそれぞれ評価した。

その結果、小脳皮質アビオトロフィー

の小脳では、カスパーゼ 3 陽性細胞が最も多く、セロイド・リポフスチン症では殆ど陽性細胞が観察されなかった。これに対し炎症性細胞である T 細胞浸潤や小膠細胞/マクロファージの浸潤増殖程度はセロイド・リポフスチン症で最も重度であり、小脳皮質アビオトロフィーでは最も軽度であった。

神経軸索ジストロフィーの症例では、アポトーシスと炎症細胞浸潤程度のいずれもその他の 2 疾患の中間的数値を示した。この結果より、小脳皮質アビオトロフィーにおける小脳細胞脱落は主にアポトーシスにより生じており、セロイド・リポフスチン症における小脳細胞脱落の過程には炎症反応が深く関与することが示された。神経軸索ジストロフィーにおける小脳細胞の脱落には、アポトーシスの他、ネクローシス等の機構も複雑に関与すると予想される。

以上の結果は日本獣医学会で口頭発表すると同時に、英文論文として既に取りまとめを行い、学術雑誌での公開のために既に投稿し、現在 2 回目の審査中である。

以上の本研究の成果を受けて、平成 22 年度より今回収集されたイヌの各種変性性神経疾患について、原因遺伝子を特定し、生前の遺伝子診断をそれぞれの疾患で確立するための研究を開始した。また平成 19 年度～21 年度には本研究に関連して、小脳変性以外の病態を特徴とするイヌ・ネコの神経疾患も収集されたので、これらの疾患についても今後病態を明らかにするとともに原因遺伝子を特定する予定である。

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 4 件）

- ① Nibe K, Uchida K, (他 6 名, 8 番目). Clinicopathological Features of Canine Neuroaxonal Dystrophy and Cerebellar Cortical Abiotrophy in Papillon and Papillon-related Dogs. J. Vet. Med. Sci. 69(10): 1047-1052, 2007
- ② Tamura S, Tamura Y, Uchida K. Magnetic resonance imaging findings of neuroaxonal dystrophy in a Papillon puppy. Journal of Small Animal Practice. 48: 458-461, 2007
- ③ Nibe K., Uchida K, and Nakayama H. Immunohistochemical features of dystrophic axons in Papillon Dogs with neuroaxonal dystrophy. Veterinary

Pathology. 46: 474-483, 2009

- ④ Nakamoto Y, Yamato O, Uchida K. (他7名8番目). Neuronal ceroid-lipofuscinosis in long-haired Chihuahuas: clinical, pathological and magnetic resonance imaging findings. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. In press.

〔学会発表〕(計2件)

- ① 二瓶和美、内田和幸、山口良二. イヌ神経軸索ジストロフィーの変性軸索におけるシナプス関連タンパクおよびカルシウム結合タンパク蓄積の検討. 第145回日本獣医学会(麻布大学). 2008, 3月
- ② 二瓶和美、中山裕之、内田和幸. イヌの神経軸索ジストロフィー、小脳皮質アビオトロフィーおよび神経セロイド・リポフスチン症における小脳変性に関する病理学的研究. 第148回日本獣医学会(鳥取大学). 2009, 9月

〔その他〕

特記事項なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

内田和幸 (UCHIDA KAZUYUKI)

研究者番号 : 10223554