

論文審査の結果の要旨

おがわ みずえ

申請者氏名 小川 瑞恵

ヒトの筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は運動ニューロンの選択的変性・脱落を特徴とする進行性・難治性の神経変性疾患で、家族性 ALS の一部は superoxide dismutase 1 (SOD1) の変異を伴う。ALS の病因としては、初期のミトコンドリア障害、発症後の酸化ストレス、興奮毒性および異常なタンパク質の蓄積が知られている。ALS 研究では、ヒト変異 SOD1 を発現させた Tg マウスを用いて多くの仮説が検証されてきたが、その有用性は疑問視されている。一方で、他の動物種で ALS 類似の自然発生疾患を解析することで、有用な情報を得られると考えられる。

イヌの変性性脊髄症 (Degenerative Myelopathy ; DM) は運動失調をきたす脊髄変性疾患であり、ALS との臨床的な類似性に加え、SOD1 変異との関連が報告され、ALS に相当する可能性が示唆されている。国内ではペンブローク・ウェルシュ・コーギー (Pembroke Welsh Corgi ; PWC) に発生が集中しており、また SOD1 遺伝子変異の保有率が高く、PWC の DM は自然発症の fALS モデル疾患となる可能性がある。

本研究の第 1 章～第 3 章ではイヌの DM の病理発生について、過去の ALS およびそのモデルマウスで報告されている病態関連因子に着目して検索し、第 4 章では SOD1<sup>G93A</sup> マウスを用いて DM では検証が困難である発症前のミトコンドリア機能障害に着目して検索した。

第 1 章では、脊髄灰白質の病理組織学的変化、特に酸化ストレス関連因子の発現と変性タンパク質の蓄積について検索した。DM と診断された PWC の 2 症例の脊髄病変部では、神経細胞体に封入体はなかったが、SOD1 の陽性像をび漫性に認め、神経網に塊状のユビキチン陽性像を認めたことから、DM の病態は神経網における変化が主体であると考えられた。一方、反応性アストロサイトは、iNOS と SOD1 に陽性で、PWC の DM でも ALS 同様にアストロサイトの機能変化による酸化ストレスが病態進行に関与していると推察された。

第 2 章では、DM 症例の腹角ニューロンの脱落様式およびグルタミン・グルタミン酸サイクルで主要な役割を担うグリア細胞性興奮性アミノ酸トランスポーター (GLT-1、GLAST) の発現を検索した。DM 症例群では対照の 2 群と比べ腹角ニューロンの数が有意に少なく、また顕著なシナプス脱落も観察された。また、DM 症例では GLT-1 の著しい発現低下がみられたが、GLAST の発現には各群で差を認

めなかった。これらの結果から、DMではALSと同様にアストロサイト膜上のGLT-1に発現低下がみられるものの、神経細胞の脱落メカニズムについてはALSとDMとで異なっていると推察された。

第3章では、オートファジー関連因子の発現パターンを検討した。DM症例におけるオートファジー小胞マーカーLC3およびアダプタータンパク質のNBR1、p62の発現局在と、オートファジー経路のBeclin 1、Atg16L、p62、LC3のタンパク発現レベルを検索した。LC3強陽性顆粒をもつ神経細胞体の割合には各群で差がなく、陽性神経突起はDMで有意に多かった。DM症例ではNBR1は反応性アストロサイトに局在し、p62陽性像は神経網に塊状にみられた。またウェスタンブロッティングにより、DM症例でBeclin 1およびAtg16Lの発現レベルの低下がみられた。以上より、DM症例脊髄の神経突起におけるオートファゴソームの蓄積と、その形成初期の抑制が示唆された。

第4章ではALSモデルであり、ミトコンドリアに由来する脊髄の空胞変性が特徴であるSOD1<sup>G93A</sup> Tgマウスを用いて、呼吸鎖複合体Iの阻害作用をもつrotenoneを発症前に28日間継続投与し、運動機能と病理組織学的変化を検索した。この結果、Tgマウスにrotenoneを投与した群(R群)は、溶媒のみを投与した群(D/P群)と比較して、120日齢で腹角ニューロンが有意に少なかった。腹角の空胞変性は70日齢ではR群、120日齢ではD/P群で強い傾向であった。R群ではより早く病変が形成、収束したものと考えられた。またTgマウスのグリア増生はR群でより強い傾向がみられた。異常より、Tgマウスでは、ミトコンドリア障害が病態発症に重要であり、これを増強することで脊髄病変の進行を促進すると考えられた。

本研究の結果から、ALSでは運動ニューロンの細胞体の封入体が特徴的であるのに対し、DMでは変性の主体は神経突起や軸索にあることが推察された。またアストロサイトの酸化ストレス・興奮毒性関連因子の発現は類似し、グリア細胞の病態における役割はALSとDMとで共通すると推察された。SOD1<sup>G93A</sup>マウスでは発症前のrotenone投与による病態促進から、病態の主体はミトコンドリア障害にあると考えられ、ALSやDMと異なると推察された。本研究はDM罹患犬およびSOD1<sup>G93A</sup>マウスではニューロン病変と分布がALS患者と異なる一方で、増悪因子であるグリア細胞の反応は共通することを明らかにした。この成果はDMの病態理解を深めるとともに、発症後の病態進行を遅らせるためのグリア細胞を標的とした研究に用いる動物モデルとしての適性を示唆するものと思われる。

本研究で得られた一連の知見は、イヌのDMの病理発生機序を明確にするとともにヒトのALSの病態解明の一助となると思われる。よって審査委員一同は本論文が博士(獣医学)の学位を授与するに値すると認めた。