

マイクロ RNA 発現解析に基づく
イヌのスーパーオキシドジスムターゼ 1 関連変性性脊髄症の
病態メカニズムの解明

2019 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科
(岐阜大学)

中田 浩平

マイクロ RNA 発現解析に基づく
イヌのスーパーオキシドジスムターゼ 1 関連変性性脊髄症の
病態メカニズムの解明

中田 浩平

目次

略語一覧	3
------	---

緒言	5
----	---

第 1 章

血漿マイクロ RNA 発現解析に基づくイヌのスーパーオキシドジスムターゼ 1 関連

変性性脊髄症の診断バイオマーカーの開発

背景	9
----	---

材料および方法	11
---------	----

結果	16
----	----

考察	20
----	----

図表	25
----	----

第 2 章

脊髄マイクロ RNA 発現解析に基づくイヌのスーパーオキシドジスムターゼ 1 関連

変性性脊髄症の病態関連メカニズムの解明

背景	37
----	----

材料および方法	39
---------	----

結果	46
----	----

考察	50
----	----

図表	56
----	----

結論	66
----	----

謝辞	69
----	----

文献	70
----	----

略語一覧

A/A, A/A allele : 変異型ホモ接合体

A/G, A/G allele : ヘテロ接合体

ALS, amyotrophic lateral sclerosis : 筋萎縮性側索硬化症

AUC, area under the curve : 曲線下面積

cDNA, complementary DNA : 相補的 DNA

Ct, threshold cycle : 閾値サイクル数

CT, computed tomography : コンピューター断層撮影

CSF, cerebrospinal fluid : 脳脊髄液

DM, degenerative myelopathy : 変性性脊髄症

FC, fold change : 相対比

GO, gene ontology : 遺伝子オントロジー

G/G, G/G allele : 野生型ホモ接合体

HA, hemagglutinin : ヘマグルチニン

HC, healthy control : 健常コントロール

IGF1, insulin-like growth factor : インスリン様成長因子 1

IVDH, intervertebral disc herniation : 椎間板ヘルニア

LMN, lower motor neuron : 下位運動ニューロン

miRNA, microRNA : マイクロ RNA

MRI, magnetic resonance imaging : 核磁気共鳴画像法

mRNA, messenger RNA : メッセンジャーRNA

NFKB1, nuclear factor kappa B subunit 1 : 核内因子 kB

PBS-T, phosphate buffered saline-Tween 20 : Tween 20 加リン酸緩衝生理食塩水

PWC, Pembroke Welsh Corgi : ペンブローク・ウェルシュ・コーギー

qPCR, quantitative polymerase chain reaction : 定量ポリメラーゼ転写反応

ROC, receiver operating characteristic : 受信者操作特性

RT, reverse transcription : 逆転写反応

SDS, sodium dodecyl sulfate : ドデシル硫酸ナトリウム

SOD1, superoxide dismutase 1 : スーパーオキシドジスムターゼ 1

TBS-T, tris-buffered saline-Tween 20 : Tween 20 加トリス緩衝生理食塩水

UMN, upper motor neuron : 上位運動ニューロン

UPS, ubiquitin-proteasome system : ユビキチン-プロテアソーム系

WT, wild-type control : 野生型コントロール

緒言

イヌのスーパーオキシドジスムターゼ 1 (superoxide dismutase 1 : SOD1) 関連変性性脊髄症 (Degenerative myelopathy : DM) は進行性の神経変性疾患である (2, 15)。ジャーマン・シェパード・ドッグ (2, 3, 16, 60), ボクサー (3, 38, 60), バーニーズ・マウンテン・ドッグ (46, 59, 60), ペンブローク・ウェルシュ・コーギー (Pembroke Welsh Corgi : PWC) (2, 15, 16, 42, 60) などの犬種における発症が報告されているが, 日本国内においては PWC での発症例が多い。高齢で発症することが知られており, PWC における平均発症年齢は 11 歳とされている (15, 16)。DM の臨床症状は特徴的な経過をたどり進行し, 以下の 4 つのステージに分類される (15, 16, 36)。ステージ 1 では後肢における運動失調から始まり, 上位運動ニューロン (upper motor neuron : UMN) 性不全麻痺が見られるようになる。ステージ 2 では, 後肢の下位運動ニューロン (lower motor neuron : LMN) 性麻痺が見られるようになり, 自力歩行が不可能になる。また, 排泄障害が認められることもある。ステージ 3 では, 前肢の下位運動ニューロン性麻痺による前肢の虚弱が見られるようになり, 次第に起立困難となる。また, このステージから呼吸障害が始まり, 腹式呼吸となる。そしてステージ 4 では前肢も完全麻痺となり, 次第に頭頸部の動きが消失していく。脳幹症状として嚥下障害や声のかすれなどの発声障害, 舌の萎縮が見られることもある。疾患早期に安楽死とならなかった場合は, 呼吸筋の麻痺により発症から約 3 年で死亡する (16, 45)。

これまでの報告において, DM には *SOD1* 遺伝子における 2 種類の変異 (c.118G>A, c.52A>T) が報告されている (3, 59)。これらの点変異により, アミノ酸が 1 残基置換された変異型 SOD1 蛋白 (E40K, T18S) が翻訳される。また, DM 罹患犬の脊髄神経細胞において変異型 SOD1 蛋白の凝集体が形成されることが知ら

れている (3, 41)。SOD1 蛋白は活性酸素のスキャベンジャー機能を有する抗酸化酵素の一つであるが、変異型 SOD1 蛋白は酵素活性を失っていないことから、DM は変異型 SOD1 蛋白が毒性を獲得することにより脊髄神経細胞の変性が誘導される gain of toxic function disease と考えられている (18, 33)。ヒトにおける *SOD1* 遺伝子変異が関与する疾患として筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) が知られている。臨床症状および脊髄の病理組織学的所見において DM は ALS に類似することから、DM は ALS の自然発症モデルとして注目されている (16, 18, 59)。

DM 発症個体は、変異型 *SOD1* 遺伝子をホモ接合体で保有することから、*SOD1* 遺伝子は DM の最も重要なリスクファクターと考えられている。しかし、変異型ホモ接合体を有する個体の全てが DM を発症するわけではなく、*SOD1* 遺伝子型のみで DM を診断することはできない (9, 60)。そのため、DM を確定診断する方法は死後の病理組織学的検査に限られている。また、このことから *SOD1* 遺伝子変異のみで DM の病態を説明することはできず、*SOD1* 遺伝子変異以外にも未知のメカニズムが DM の発症に関与していると考えられるが、その発症メカニズムは解明されておらず、現在までに有効な治療法は存在しない。

マイクロ RNA (microRNA : miRNA) は 18-25 塩基からなるノンコーディング RNA である。その相補的な配列からターゲットとなるメッセンジャー RNA

(messenger RNA : mRNA) と結合し、分解または翻訳阻害することにより蛋白翻訳の制御機構を担うと考えられている (4)。また、ひとつの miRNA が多数の mRNA をターゲットとする可能性を有し、ひとつの mRNA に対して多数の miRNA が翻訳制御を起こすことから、複雑な蛋白翻訳の制御ネットワークを形成することで様々な生体反応に関与していると考えられている (22, 49)。この蛋白翻訳制御ネットワークは細胞増殖、分化、アポトーシスなど細胞内外で多様な働きを有してお

り，神経組織においてもシナプスの可塑性，神経分化および神経炎症などに関与することが知られている（6）。さらに，miRNA は特定の組織において固有の働きを持っており，その miRNA の発現パターンは栄養状態，組織障害，炎症反応など生体環境の変化により変動することが知られている（53, 56）。加えて，特定の miRNA は血液や尿，脳脊髄液などの体液中にエクソソームなどの安定した状態で存在し，離れた組織でその作用を発現することもわかっている（39）。これらの特徴から miRNA の発現プロファイルやターゲット mRNA の機能解析による病態解明，体液や組織中のプロファイル解析による診断や治療効果，予後因子などのバイオマーカー，遺伝子発現の制御機能を利用した新規治療法の開発など様々な臨床研究に用いられており，人医療においては ALS を含む神経変性疾患でも臨床応用が期待されている（14, 21, 50）。

本研究では，第 1 章で血漿 miRNA の解析から DM の診断バイオマーカーを開発することを目的に研究を行なった。まず，DM 症例および健常 PWC の血漿 miRNA のマイクロアレイ解析を行い，診断バイオマーカー候補 miRNA を選出した。続いて，臨床サンプルを用いて診断バイオマーカー候補 miRNA の DM に対する診断精度を明らかにした。第 2 章では，脊髄における miRNA の発現変動が DM の病態に与えるメカニズムを解明することを目的に研究を行なった。DM 群および対照群の脊髄 miRNA のマイクロアレイ解析を行い，DM 群において発現変動を認めた miRNA を選出した。続いて，発現変動 miRNA 群の機能を *in silico* 解析を用いて予測し，SOD1 蛋白との関連を評価した。そして，遺伝子導入細胞を用いて DM 症例の脊髄において発現上昇を認めた miRNA が変異型 SOD1 蛋白の凝集体形成に与える影響を明らかにした。

第 1 章

血漿マイクロ RNA 発現解析に基づく イヌのスーパーオキシドジスムターゼ 1 関連変性性脊髄症の 診断バイオマーカーの開発

背景

DM は高齢犬に発症する慢性進行性の致死性神経変性疾患である。発症には *SOD1* 遺伝子変異 (c.118G>A) の関与が示唆されており、DM 発症犬は少数のヘテロ接合体 (A/G : A/G allele) での報告はあるものの、ほとんどが変異型ホモ接合体 (A/A : A/A allele) における発症である (16, 33, 60)。しかし、A/A 個体であっても DM を発症しない症例があることが知られており (9)、遺伝子検査のみでは DM を診断することはできない。そのため、DM の確定診断は病理組織学的検査に限られており、生前の診断法は確立されていない。このことから、DM の診断は、1) 高齢発症で後肢から始まる無痛性の慢性進行性の麻痺という特徴的な DM の臨床症状、2) *SOD1* 遺伝子が A/A であること、3) 核磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging : MRI) 検査や脊髄造影コンピュータ断層撮影 (computed tomography : CT) 検査、脳脊髄液 (cerebrospinal fluid : CSF) 検査により後肢麻痺を起こしうる疾患の除外という 3 つの診断基準を基にした臨床診断である (16)。しかし、前述のように *SOD1* 遺伝子型が A/A であっても発症しない個体がいること、PWC は椎間板ヘルニア (Intervertebral disc herniation : IVDH) の好発犬種であり、DM と併発した場合、除外診断が成立しないことなどが臨床上の問題として挙げられる。これらの理由から DM の臨床診断に苦慮することがあり、DM の診断バイオマーカーの開発が求められている。

第 1 章では、DM の診断バイオマーカーの開発を行なった。まず、DM 症例および健常 PWC の血漿から miRNA を抽出し、逆転写反応 (reverse transcription : RT) を行なった後、定量ポリメラーゼ転写反応 (quantitative polymerase chain reaction : qPCR) を用いたマイクロアレイ解析により DM において特異的に変動している miRNA を診断バイオマーカー候補として選出した。続いて、臨床サンプル

を用いて診断バイオマーカー候補 miRNA の血漿中濃度を qPCR により測定し，診断バイオマーカーとしての有用性を検討した。最後にパスウェイ解析を用いて診断バイオマーカーとなる miRNA と DM の病態との関連について *in silico* による解析を行なった。

材料および方法

動物福祉

本研究は岐阜大学応用生物科学部動物実験審査委員会および動物臨床試験倫理専門委員会で審査を受け、承認されたものであり（承認番号：16090 および E16008）、組み入れ症例はいずれも飼い主に研究趣旨を説明し、インフォームド・コンセントを得ている。

供試動物

DM および健常 PWC の血漿 miRNA 発現プロファイルの解析を行うために、DM 症例 4 頭および *SOD1* 遺伝子型が野生型ホモ接合体（G/G : G/G allele）である野生型コントロール（wild-type control : WT）4 頭から採取した血漿を用いた。続いて、診断バイオマーカーとしての有用性を検討するため、臨床サンプルとして 2015 年 12 月から 2017 年 3 月までに岐阜大学動物病院または一般動物病院に来院した DM 罹患 PWC（DM 群）18 頭、健常コントロール（healthy control : HC）PWC（HC 群）46 頭および疾患コントロールとして IVDH 罹患 PWC（IVDH 群）5 頭を組み入れた。DM 症例は岐阜大学附属動物病院に来院し、1) 臨床症状として、後肢から始まる無痛性の進行性麻痺を呈すること、2) *SOD1* 遺伝子検査により変異型ホモ接合体（c.118G>A）であること、および 3) 脊髄の MRI 検査および CSF 検査において麻痺の原因となる器質的な病変が認められないことの 3 点の診断基準を満たし、臨床的に DM と診断した症例を組み入れた（15, 16）。DM のステージ分類は既報を基に、運動機能よりステージ 1：後肢における歩行可能な運動失調または UMN 性不全麻痺、ステージ 2：後肢における LMN 性麻痺、ステージ 3：前肢の LMN 性麻痺による体重維持の可能な前肢の虚弱、ステージ 4：前肢の完全麻痺の 4

ステージに分類した (16)。HC 群は，一般動物病院に来院した神経学的に正常な PWC のうち，7 歳以上かつ生命に関わる重篤な疾患を持たないものを組み入れた。IVDH 群は，岐阜大学動物病院または一般動物病院に来院し，急性発症の後肢麻痺または頸部痛を示し，MRI または脊髄造影 CT 検査により椎間板ヘルニアによる脊髄圧迫性病変を示したものを組み入れた。臨床サンプルには DM 群および HC 群にマイクロアレイに用いた個体が含まれているが，保存していた血漿から再度 miRNA を抽出し，解析に用いた。

サンプル採取，miRNA 抽出および逆転写反応

症例から採取した血液は，エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム加真空採血管（ベノジェクト II 真空採血管，テルモ株式会社，Tokyo, Japan）に添加し，4 °C， $1,500 \times g$ で 20 分遠心し，血漿を分離した。分離した血漿は miRNA 抽出まで -80 °C で保存した。トータル RNA を血漿 200 μ l から miRNA 抽出キット（miRNeasy Serum/Plasma Kit, Qiagen, Hilden, Germany）を用いて抽出した。miRNA 抽出時に 6.3×10^8 コピーの合成 *Caenorhabditis elegans* mir-39（miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control, Qiagen）をスパイクイン・コントロールとして添加した。抽出したトータル RNA から，相補的 DNA（complementary DNA : cDNA）合成キット（miScript II RT Kit, Qiagen）および PCR 装置（TaKaRa Thermal Cycler Dice, タカラバイオ株式会社, Shiga, Japan）を用いて cDNA を合成した。反応条件はプロトコールの推奨条件に従って 37 °C，60 分間および 95 °C，10 秒間で実施した。

miRNA の qPCR マイクロアレイ

合成した血漿 cDNA から前増幅キット（miScript PreAMP PCR Kit, Qiagen）

および PCR 装置を用いて、プロトコールの推奨条件に従って 1) 初期活性化を 95 °C, 15 分間, 2) 3 ステップ増幅サイクルとして変性 94 °C, 30 秒間, アニーリング 55 °C, 60 秒間, エクステンション 70 °C, 30 秒間を 2 サイクル, 3) 2 ステップ増幅サイクルとして変性 94 °C, 30 秒間, アニーリングおよびエクステンション 60 °C, 3 分間を 10 サイクルとして前増幅反応を行なった。miRNA 発現プロファイルを解析するために, miRNA アレイプレート (miScript miRNA PCR Array Dog miRNome, Qiagen), qPCR キット (miScript SYBR Green PCR Kit, Qiagen) およびリアルタイム PCR 装置 (TaKaRa Thermal Cycler Dice Real Time System TP800, タカラバイオ株式会社) を用いて 277 種類の miRNA の相対定量を実施した。miRNA アレイプレートは, イヌの miRNA277 種類およびスパイクイン・コントロールの cel-miR-39-3p を検出するためのプローブが結合した 96 ウェルプレートである。また, qPCR は 1) 初期活性化として 95 °C, 15 分間, 2) 3 ステップ増幅サイクルとして変性 94 °C, 15 秒間, アニーリング 55 °C, 30 秒間, エクステンション 70 °C, 30 秒間を 40 サイクルの条件で実施した。ターゲット miRNA の閾値サイクル数 (threshold cycle : Ct) 値を cel-miR-39-3p を用いてプレート間補正を行い, miR-16 を用いて標準化することで miRNA の相対定量値として算出した (1, 26)。 $\Delta\Delta Ct$ 法により DM 群の相対比 (fold change : FC) が WT 群の 2 倍以上または半分以下の変動があり, かつ Mann-Whitney の *U* 検定で *P* 値 0.05 以下のものを血漿 miRNA 濃度上昇または低下と定義し, 診断バイオマーカー候補 miRNA とした。

診断バイオマーカー候補 miRNA の検証

臨床サンプルの血漿サンプルより cDNA を合成した後, 前述の qPCR キットおよびリアルタイム PCR 装置を用いて診断バイオマーカー候補 miRNA の qPCR を行な

った。反応条件はマイクロアレイ時の qPCR サイクルに 3) 融解曲線反応として 95 °C, 15 秒間, 60 °C, 30 秒間, 95 °C, 15 秒間を加え, 融解曲線分析により非特異反応を評価した。診断バイオマーカー候補 miRNA の配列を表 1-1 に示した。それぞれの miRNA の相対定量値は, 標準化に miR-16 を用いた $2^{-\Delta Ct}$ 法により算出し, DM の診断精度を明らかにした。

診断能のあったバイオマーカー候補 miRNA に関しては, DM 発症以外の要因による影響を評価するために, 年齢, 性別および *SOD1* 遺伝子型との関連を評価した。また, バイオマーカー候補 miRNA の組み合わせによる診断精度とそれぞれの相関についても明らかにした。

パスウェイ解析

診断バイオマーカー候補 miRNA のターゲット mRNA を TargetScan データベース version 7.1 (http://www.targetscan.org/vert_71/) を用いて検索し, 3'末端の相補性から推定した context++ scores が-0.4 以下となるものを選出した (49)。続いて, これまでに DM との関連が報告されている *SOD1* (3), 誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase : *iNOS*), ユビキチン (42), グルタミン酸トランスポーター1 (glutamate transporter 1 : *GLT1*), グルタミン酸・アスパラギン酸トランスポーター (glutamate aspartate transporter : *GLAST*), グルタミン合成酵素 (glutamine synthetase : *GS*) (43), 熱ショックタンパク質 70 (heat shock protein 70 : *hsp70*), 腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor α : *TNF α*), インターロイキン-1 β (interleukin-1 β : *IL1 β*) (35), 核蛋白 *SP110* (28) を含むシグナル伝達経路を WikiPathway データベース

(<https://www.wikipathways.org/index.php/WikiPathways>) を用いて検索した。それぞれの経路をバイオインフォマティクスソフトウェア (Cytoscape ver.3.4.0,

National Resource for Network Biology) を用いて図示し, miRNA が DM の病態に与える影響に関して考察した。

統計解析

2 群間の比較には Mann-Whitney の U 検定, 3 群以上の比較には χ^2 二乗検定, Kruskal-Wallis 検定および Steel-Dwass 検定を実施した。それぞれの相関は Spearman の相関係数 ρ を用いて 0.4 以上を正の相関, -0.4 以下を負の相関ありと判断した。診断バイオマーカー候補 miRNA の相対定量値から, 診断精度およびカットオフ値を決定するために受信者操作特性 (receiver operating characteristic : ROC) 曲線解析を行い, 曲線下面積 (area under the curve : AUC) を算出した。ROC 曲線の AUC が 0.7 以上の場合を診断能ありとし, Youden index が最大となる際の miRNA の相対定量値をカットオフ値として算出した。また, そのカットオフ値を使用した際の感度および特異度を算出した。バイオマーカー候補 miRNA の組み合わせによる診断精度の評価には, 変数増加法および強制投入法によるロジスティック回帰分析を用いた多変量解析を実施した。

全ての検定は統計ソフトウェア (JMP ver.13.2.0, SAS Institute, North Carolina, USA) を用いて行い, P 値 0.05 以下を統計学的な有意差ありと判断した。

結果

供試動物

各群の症例のシグナルメントおよび *SOD1* 遺伝子型を表 1-2 に示した。血漿 miRNA のマイクロアレイ解析には、DM 群 4 頭および WT 群 4 頭を用いた。臨床サンプルによる診断バイオマーカーの有用性の検証には、DM 群 18 頭、HC 群 46 頭および IVDH 群 5 頭を用いた。研究期間中にマイクロアレイに用いた症例 4 頭中 3 頭、診断バイオマーカーの有用性検証に用いた 18 頭中 7 頭が死亡し、脊髄の病理組織学的検査により DM と確定診断した。DM のステージ分類は、マイクロアレイに用いた 4 頭中 3 頭がステージ 4、1 頭がステージ 3 であった。また、診断バイオマーカーの有用性検証で用いた 18 頭のうち 5 頭がステージ 4、4 頭がステージ 3、5 頭がステージ 2、4 頭がステージ 1 であった。年齢は DM 群が中央値 159 ケ月齢（範囲：110 - 187 ケ月齢）、HC 群が 140 ケ月齢（範囲：89 - 194 ケ月齢）、IVDH 群が 162 ケ月齢（範囲：116 - 173 ケ月齢）で 3 群間に有意差は認められなかった ($P=0.2523$)。性別は DM 群が雄 10 頭、雌 8 頭、HC 群が雄 11 頭、雌 35 頭、IVDH 群は全頭が雄であり、DM 群および IVDH 群と比較して HC 群で有意に雌が多く認められた ($P=0.0007$)。

マイクロアレイによる DM の血漿 miRNA 発現プロファイル解析

DM 群および WT 群に対して実施した RT-qPCR マイクロアレイにおいて測定した 277 種類の miRNA のうち、非特異反応 64 種類および全サンプルで検出できなかった 11 種類を除いた 202 種類の miRNA において相対定量値を算出した。標準化に用いた miR-16 を除いた 201 種類のうち、DM において発現上昇した miRNA を 11 種類、発現低下した miRNA を 7 種類検出した（図 1-1 および表 1-3）。

診断バイオマーカー候補 miRNA の有用性の検証

マイクロアレイにより選出した診断バイオマーカー候補 miRNA 18 種類について、臨床サンプルの血漿から抽出した miRNA の相対定量値を RT-qPCR により測定した。診断バイオマーカー候補 miRNA のうち 7 種類は過半数の症例で非特異反応または測定限界以下であったため除外した。最終的に全症例で測定した 11 種類の miRNA で統計解析を実施した。HC 群と比較して DM 群で miR-26b, miR-98, miR-200c, miR-374a および miR-454 の 5 種類の miRNA の発現が有意に上昇していた (図 1-2)。DM 群で有意に発現低下していた miRNA は認められなかった。また、DM 群と IVDH 群の比較において、有意差は miR-200c および miR-196a でのみ認められたが、miR-26b, miR-98, miR-374a および miR-454 では DM 群において発現上昇傾向を示した。HC 群と IVDH 群の比較では、いずれの miRNA においても有意差は認められなかった。

11 種類の診断バイオマーカー候補 miRNA に対して ROC 曲線解析を実施した (図 1-3, 表 1-4)。miR-26b, miR-98, miR-200c, miR-374a および miR-454 の 5 種類で AUC が 0.7 以上となり、診断能ありと評価した。また、これらの miRNA で Youden index が最大となる時のカットオフ値を用いた際に、感度は miR-200c の 94.44%, 特異度は miR-26b の 86.96% が最も高値であった。このカットオフ値を用いた場合に、miR-26b および miR-98 においては IVDH 群でカットオフ値を超える症例は認められなかった。

続いて、診断能のあった 5 種類の診断バイオマーカー候補 miRNA の相対定量値とその他の要因の関連を評価した。性別に関して、いずれの miRNA においても DM 群内および HC 群内の雌雄間で有意差は認められなかった。年齢に関して、いずれの miRNA においても年齢との相関は認められなかった。遺伝子型に関して

は、5種類とも DM 群と HC 群の A/A 型および DM 群と HC 群の A/G 型において有意差が認められた (図 1-4)。また、miR-200c および miR-454 においては DM 群と HC 群の G/G 型、miR-26b においては HC 群の A/G 型と G/G 型においても有意差が認められた。DM の臨床ステージとの相関においては、miR-26b においてのみ有意な正の相関が認められた (図 1-5)。

5 種類の診断バイオマーカー候補 miRNA の組み合わせによる診断精度を評価するために、ロジスティック回帰分析を行った。変数増加法では P 値が最小である miR-26b を投入した時点で他の診断バイオマーカー候補 miRNA の P 値は 0.05 を超え、DM を診断する上で miR-26b の影響が最も大きいことが明らかとなった。また、強制投入法において、単独の診断バイオマーカー候補 miRNA と比較して、miR-200c と miR-374a および miR-200c と miR-454 の組み合わせにより感度が上昇し、miR-26b と miR-454 の組み合わせにより特異度が上昇した (表 1-5)。しかし、いずれの miRNA の組み合わせでも、2 種類目の miRNA を導入した時点で P 値が 0.05 を超えた。miR-26b と他の診断バイオマーカー候補 miRNA の相関を評価したところ、miR-98 が $\rho = 0.85$ 、miR-200c が $\rho = 0.56$ 、miR-374a が $\rho = 0.71$ 、miR-454 が $\rho = 0.48$ であり、 P 値はいずれも 0.001 以下であった。

パスウェイ解析

DM における病態と発現変動を認めた miRNA との関連を *in silico* によるパスウェイ解析で評価した。まず、TargetScan データベース検索により臨床サンプルで測定可能であった 11 種類の miRNA のターゲット候補 mRNA を 266 種類選出した。また、WikiPathway データベース検索により、これまでに DM との関連が報告されている遺伝子のシグナル伝達経路として Oxidative Stress pathway, TNF-alpha NF-kB Signaling Pathway, Apoptosis Modulation by HSP70 および Amyotrophic

lateral sclerosis SOD1 - CHAMP28 MODEL の 4 種類のパスウェイを選出した。これらのパスウェイと変動 miRNA-mRNA の関連図を組み合わせ、DM の病態関連パスウェイを作成した（図 1-6）。その結果、miR-26b, miR-181a および miR-196a の 3 種類の miRNA のターゲット mRNA が DM の病態と関連が報告されている遺伝子を含むパスウェイに含まれていることが明らかになった。*TNF* は TNF-alpha NF-kB Signaling Pathway, Apoptosis Modulation by HSP70 および Amyotrophic lateral sclerosis SOD1 - CHAMP28 MODEL, *SOD1* は Oxidative Stress pathway および Amyotrophic lateral sclerosis SOD1 - CHAMP28 MODEL に含まれていた。miRNA の直接のターゲット候補である nuclear receptor subfamily 6 group A member 1 (*NR6A1*) およびアミロイド前駆蛋白 (amyloid beta precursor protein : *APP*) は Amyotrophic lateral sclerosis SOD1 - CHAMP28 MODEL に含まれていた。

考察

近年、ヒトの遺伝子研究分野におけるバイオインフォマティクス解析により、血中 miRNA の診断バイオマーカーとしての有用性がアルツハイマー病 (52)、パーキンソン病 (1) および ALS (14, 50) など様々な神経変性疾患において報告されている。しかし、イヌにおける miRNA 研究の多くが腫瘍性疾患に関する研究であり、神経疾患における報告はイヌの起源不明脳脊髄炎に関する 1 報のみに限られており (23)、神経変性疾患や脊髄疾患における miRNA の研究に関する報告はない。一方、DM は確定診断が病理組織学的検査に限られているが、生前の伴侶動物の脊髄から組織を採材することは不可能であることから、DM の生前診断法の確立が求められている。また、ヒトにおいて miRNA の発現プロファイルは年齢や性別、人種、生活環境など様々な因子によって影響を受けることが知られている (55)。DM は犬種特異性が高く、高齢発症であることから、これらの要因の影響が少ないと考えられ、バイオマーカーとしての miRNA の有用性が高いことが期待される。そのため、本章では血漿 miRNA の解析により DM の診断バイオマーカーを開発することを目的とした。本研究はイヌの神経疾患の miRNA 研究において、犬種・年齢を揃えて血漿 miRNA を網羅的に解析した初の研究である。

まず、統計処理により変動する miRNA の選出が可能なサンプル数を用いて、DM 群と野生型コントロールの血漿 miRNA のマイクロアレイ解析により、DM における血漿 miRNA 発現プロファイルを明らかにした。DM 群は典型的な臨床経過を辿ったステージ 3 または 4 の症例を用いた。また、過去の報告において変異型ホモ接合体やヘテロ接合体 (A/G 個体) の PWC 脊髄では臨床症状を伴わない個体であっても、脊髄に変性変化があることから (33)、マイクロアレイにおいては G/G 個体をコントロールとした。マイクロアレイ解析により DM において発現が上昇してい

た miRNA を 11 種類、発現が低下していた miRNA を 7 種類選出し、DM の診断バイオマーカー候補 miRNA とした。

組織や細胞と比較して体液中の miRNA 濃度は低いことから、マイクロアレイによる解析のみでは診断精度を評価するには不十分であると考えられている (53)。そこで、バイオマーカー候補 miRNA の DM に対する診断精度を評価するために、RT-qPCR を用いて臨床サンプルの血漿 miRNA 濃度を測定した。その結果、miR-26b, miR-98, miR-200c, miR-374a および miR-454 の 5 種類の miRNA において DM 群で有意な発現上昇を認めた。さらに ROC 曲線解析により、これら 5 種類の miRNA は DM 群と HC 群との鑑別が可能であることが示された。特に miR-26b は特異度が、miR-200c は感度と特異度の両方が高い診断バイオマーカーと考えられた。DM の診療において、生前に脊髄の病理組織学的検査が実施できないため、DM の除外または確定診断が困難である。よって、特異度の高い検査は DM の診断において有用性が高いといえる。また、DM 群と IVDH 群の比較において、この 5 種類の miRNA のうち miR-200c のみで有意な発現上昇を認めたが、他の 4 種類の miRNA でも DM 群で発現上昇傾向を示した。ROC 曲線解析により設定したカットオフ値を用いると、IVDH 群で miR-26b および miR-98 のカットオフ値を超える症例は認められなかった。このことから、これら 5 種類の miRNA の発現量の変動は脊髄の病変を非特異的に反映するのではなく、DM の病変形成に伴い特異的に上昇している可能性がある。特に DM と IVDH との鑑別において、miR-26b および miR-98 の有用性が示された。

続いて DM 群と HC 群の鑑別が可能であった診断バイオマーカー候補 miRNA と *SOD1* 遺伝子型との関連を評価したところ、5 種類の診断バイオマーカー候補はいずれも DM 群で HC 群の A/A 型および HC 群の A/G 型より有意に発現上昇を認めた。また、miR-200c および miR-454 においては DM 群で HC 群の G/G 型より発現

上昇を認めた。DM の発症において *SOD1* 遺伝子の変異が重要な役割を果たしていることは示唆されているが、遺伝子検査単独で DM を診断することはできない。その理由として、変異型 *SOD1* 遺伝子をホモ接合体で有する個体であっても必ずしも DM を発症するとは限らないこと (9, 60) や、DM を発症していない変異型ホモ接合体だけでなく、ヘテロ接合体の個体であっても脊髄白質の変性が存在すること

(33) が挙げられる。そのため、臨床的には DM 症例と未発症 A/A を鑑別することが最も重要となるが、5 種類の診断バイオマーカー候補はいずれも鑑別には有用であった。

DM の臨床ステージとの相関では、miR-26b および miR-374a は DM の臨床ステージと正の相関が認められた。この結果から、miR-26b および miR-374a は DM の診断バイオマーカーだけではなく、DM の進行指標や予後予測マーカーとして利用できる可能性がある。また、本研究におけるマイクロアレイ解析では DM 群と G/G 群の比較により有意差が認められたものを診断バイオマーカー候補としたが、臨床サンプルを用いた診断精度の検証では、miR-26b および miR-374a の発現量は DM 群と G/G 群の間において有意差が認められなかった。この理由として、マイクロアレイに用いたサンプルサイズが小さかったことだけでなく、マイクロアレイに用いた DM 群の臨床ステージが進行した 3 または 4 であり、発現量の少ないステージ 1 や 2 を含む DM 群と HC 群の G/G 型の間では有意差が認められなかったのではないかと考えられた。

それぞれの診断バイオマーカー候補 miRNA の組み合わせによる診断精度を評価するためにロジスティック回帰分析を実施した。強制投入法において、感度または特異度の一方のみが上昇する組み合わせはあるが、Youden index の上昇は認められず、変数増加法および強制投入法において、いずれの組み合わせにおいても 2 つ目の変数を加えた時点で *P* 値は 0.05 を超えたことから、DM の診断精度に対して複数

の診断バイオマーカー候補 miRNA の組み合わせによる影響は低いと考えられた。また、変数増加法では miR-26b のみが組み入れられたことから、miR-26b が DM の診断に最も強い影響を与えていることが示された。診断バイオマーカー候補 miRNA の相関評価において、miR-26b は他の 4 種類の診断バイオマーカー候補 miRNA と有意な正の相関が認められた。これらの結果から miR-98, miR-200c, miR-374a および miR-454 の 4 種類の miRNA は miR-26b と相関があるために二次的に診断能があると評価された可能性が考えられ、DM の診断バイオマーカーとしては miR-26b が最も有用性が高いと考えられた。

最後に診断バイオマーカー候補 miRNA の DM の病態への関与を評価するためにパスウェイ解析を行った。パスウェイ解析により *SOD1* 遺伝子上流に miR-26b, 下流に miR-181a および miR-196a が位置することが明らかとなった。また、構築したパスウェイは核内因子 kB (nuclear factor kappa B subunit 1 : *NFKB1*), TNF, インスリン様成長因子 1 (Insulin-like growth factor : *IGF1*) などの炎症性メディエーターを含んでいた。DM の病態発生において、神経炎症の関与が示唆されており (28, 35, 42, 44), miR-26b は神経炎症を介して *SOD1* の発現に影響している可能性が示唆された。本研究では miR-26b と標的 mRNA の直接的な作用を評価していないが, *in silico* により miRNA と mRNA の親和性からネットワークを構築しているため, 実際に DM 症例で miRNA の変動によって起こる mRNA の発現調節作用を再現した可能性は高いと考えられた。

本研究の制限事項として以下の点が挙げられる。始めに DM の診断が病理組織学的検査に基づいているのは 18 頭中 7 頭の症例であり, 多くの DM 群は臨床症状, *SOD1* 遺伝子検査および除外診断を組み合わせた臨床診断に基づいている。そのため, 実際の脊髄変性の程度と診断バイオマーカー候補 miRNA との関連は不明である。また, 本研究における疾患コントロールは IVDH に限られていることから,

IVDH 以外の脊髄疾患や脊髄疾患以外の疾患がどの程度診断バイオマーカー候補 miRNA の発現レベルに影響を与えるかは不明である。本研究は横断的研究であり、各診断バイオマーカー候補 miRNA の時間的な変化は評価していない。そのため、診断バイオマーカー候補 miRNA がカットオフ値を超えている HC 群の個体が、その後 DM を発症した場合は、その miRNA は DM の発症予測バイオマーカーとして利用できる可能性がある。最後に本研究におけるサンプルサイズは特に G/G 群において不十分であると考えられる。過去の報告において国内の PWC における G/G の分布は 9.0 % と報告されており (9)、実際の G/G 個体数が極端に少ないことが影響していると考えられた。また、実際の臨床現場においては G/G 個体は DM を発症することはないため、遺伝子検査により DM 群と G/G を区別することは可能である。

本研究の結果から、miR-26b, miR-98, miR-200c, miR-374a および miR-454 の 5 種類の miRNA が DM の診断バイオマーカーとして有用である可能性が示された。特に miR-26b は単独での診断特異度が高く、DM の臨床ステージと相関が認められ、パスウェイ解析により炎症性メディエーターを介して SOD1 蛋白の発現に影響を与えている可能性が示唆された。そのため、従来の DM の診断方法である 1) 臨床症状の確認、2) *SOD1* 遺伝子検査、3) 除外診断に 4) 血漿 miR-26b の測定を組み合わせることで、DM の生前診断の精度はより高くなることが期待できる。そして、miRNA の遺伝子発現制御メカニズムを検討することにより、DM のさらなる病態解明につながることを期待される。

図表

表 1-1. 診断バイオマーカー候補 miRNA の塩基配列

miRNA	Cat. no	配列
miR-16	MS00037373	5'UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
miR-26b	MS00030205	5'UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGUU
miR-29b	MS00030247	5'UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
miR-30a	MS00030303	5'UGUAAACAUCCUCGACUGGAAGC
miR-98	MS00031199	5'UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU
miR-146a	MS00029617	5'UGAGAACUGAAUUCCAUGGGUU
miR-146b	MS00029624	5'UGAGAACUGAAUUCCAUAGGCU
miR-181a	MS00029715	5'AACAUUCAACGCUGUCGGUGAG
miR-190b	MS00029869	5'UGAUAUGUUUGAUAUUGGGUU
miR-196a	MS00029918	5'UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG
miR-196b	MS00029925	5'UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGGA
miR-200c	MS00029974	5'UAAUACUGCCGGGUA AUGAUGGA
miR-374a	MS00030534	5'UUAUAAUACAACCUGAU AAGU
miR-378	MS00030583	5'ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC
miR-432	MS00030688	5'UCUUGGAGUAGGUCAUUGGGUGG
miR-454	MS00030744	5'UAGUGCAAUAUUGCUUAUAGGG
miR-542	MS00030912	5'UGUGACAGAUUGAU AACUGAAA
miR-590	MS00030989	5'UAAUUUUAUGUAUAAGCUAGU
miR-1307	MS00029470	5'ACUCGGCGUGGCGUCGGUCGUG

表 1-2. 供試動物

マイクロアレイ												バイオマーカーの検証											
DM												WT		DM		HC		IVDH					
SOD1 遺伝子型		A/A		G/G		A/A		全体		A/A		A/G		G/G		全体		A/A		A/G			
症例数		Total		4		4		18		46		21		21		4		5		4		1	
Stage 1		0		-		-		4		-		-		-		-		-		-		-	
Stage 2		0		-		-		5		-		-		-		-		-		-		-	
Stage 3		1		-		-		4		-		-		-		-		-		-		-	
Stage 4		3		-		-		5		-		-		-		-		-		-		-	
性		雄		1		3		10		11		4		4		3		5		4		1	
雌		3		1		1		8		35		17		17		1		0		0		0	
年齢 (月)		中央値		159		151		159		140		133		155		152		162		142		163	
範囲		142-161		100-173		110-187		89-194		94-178		89-194		100-173		116-173		121-173		-		-	

表 1-3. 血漿 miRNA のマイクロアレイにより発現変動を認めた診断バイオマーカー
候補 miRNA

変動タイプ	miRNA	FC	<i>P</i> 値
Up-regulation	miR-26b	2.5123	0.0433
	miR-98	2.1138	0.0209
	miR-190b	5.1348	0.0209
	miR-196a	11.8099	0.0202
	miR-196b	12.4116	0.0421
	miR-200c	6.3890	0.0209
	miR-374a	2.2371	0.0209
	miR-432	19.1340	0.0180
	miR-454	6.0227	0.0433
	miR-590	4.7132	0.0433
	miR-1307	4.1845	0.0433
Down-regulation	miR-29b	0.4163	0.0209
	miR-30a	0.3903	0.0304
	miR-146a	0.3775	0.0209
	miR-146b	0.2884	0.0433
	miR-181a	0.1431	0.0209
	miR-378	0.1603	0.0209
	miR-542	0.2214	0.0433

表 1-4. 診断バイオマーカー候補 miRNA の ROC 曲線解析

miRNA	AUC	Youden index	感度	特異度	カットオフ($2^{-\Delta Ct}$)
miR-26b	0.8255	0.5363	0.6667	0.8696	0.1996
miR-98	0.7941	0.5483	0.7222	0.8261	0.0070
miR-196a	0.4487	0.1087	1.0000	0.1087	0.3403
miR-200c	0.9034	0.7487	0.9444	0.8043	0.0015
miR-374a	0.8182	0.5724	0.8333	0.7391	0.0036
miR-454	0.8074	0.6063	0.8889	0.7174	0.0002
miR-30a	0.4082	0.1087	0.1087	1.0000	0.0000
miR-146a	0.6292	0.3189	0.6522	0.6667	0.0170
miR-146b	0.5236	0.2198	0.6087	0.6111	0.0004
miR-181a	0.4903	0.1401	0.1957	0.9444	0.1672
miR-542	0.3659	0.1087	0.1087	1.0000	1.0317

表 1-5. 強制投入法によるロジスティック回帰分析

miRNA組み合わせ (P 値)		AUC	Youden index	感度	特異度
miR-26b (0.0022)	miR-98 (0.4550)	0.8309	0.5362	0.6667	0.8695
miR-26b (0.0056)	miR-200c (0.055)	0.8937	0.6498	0.8889	0.7609
miR-26b (0.0012)	miR-374a (0.6073)	0.8273	0.5266	0.7222	0.8044
miR-26b (0.0110)	miR-454 (0.1228)	0.8188	0.5338	0.5556	0.9782
miR-98 (0.1071)	miR-200c (0.0063)	0.8708	0.6039	0.7778	0.8261
miR-98 (0.0382)	miR-374a (0.0865)	0.8019	0.5604	0.7778	0.7826
miR-98 (0.1148)	miR-454 (0.0071)	0.7989	0.4614	0.7222	0.7392
miR-200c (0.0847)	miR-374a (0.6467)	0.8744	0.6522	1.0000	0.6522
miR-200c (0.0112)	miR-454 (0.0905)	0.9046	0.6957	1.0000	0.6957
miR-374a (0.5050)	miR-454 (0.0104)	0.8164	0.4662	0.9444	0.5218

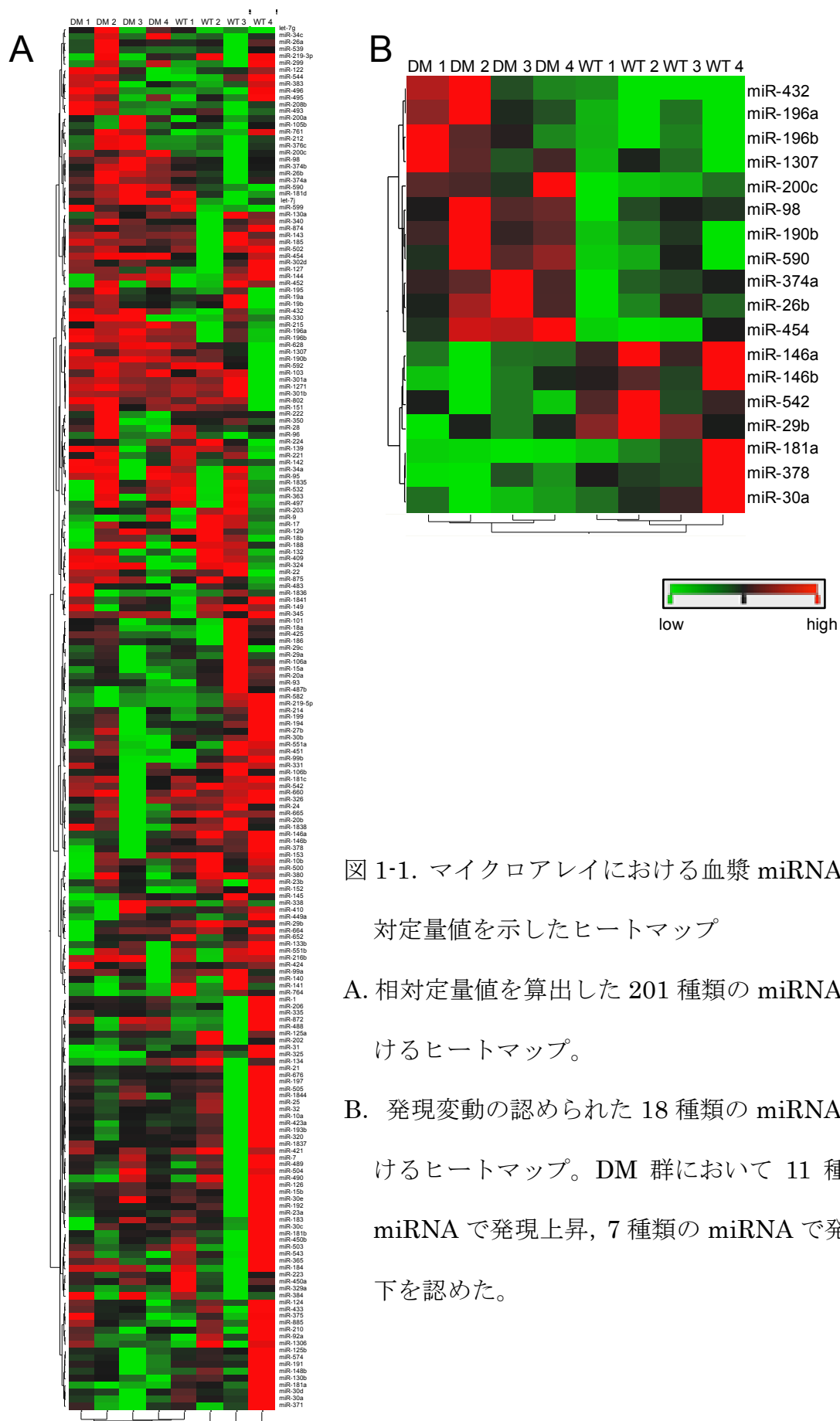


図 1-1. マイクロアレイにおける血漿 miRNA の相対定量値を示したヒートマップ

A. 相対定量値を算出した 201 種類の miRNA におけるヒートマップ。

B. 発現変動の認められた 18 種類の miRNA におけるヒートマップ。DM 群において 11 種類の miRNA で発現上昇, 7 種類の miRNA で発現低下を認めた。

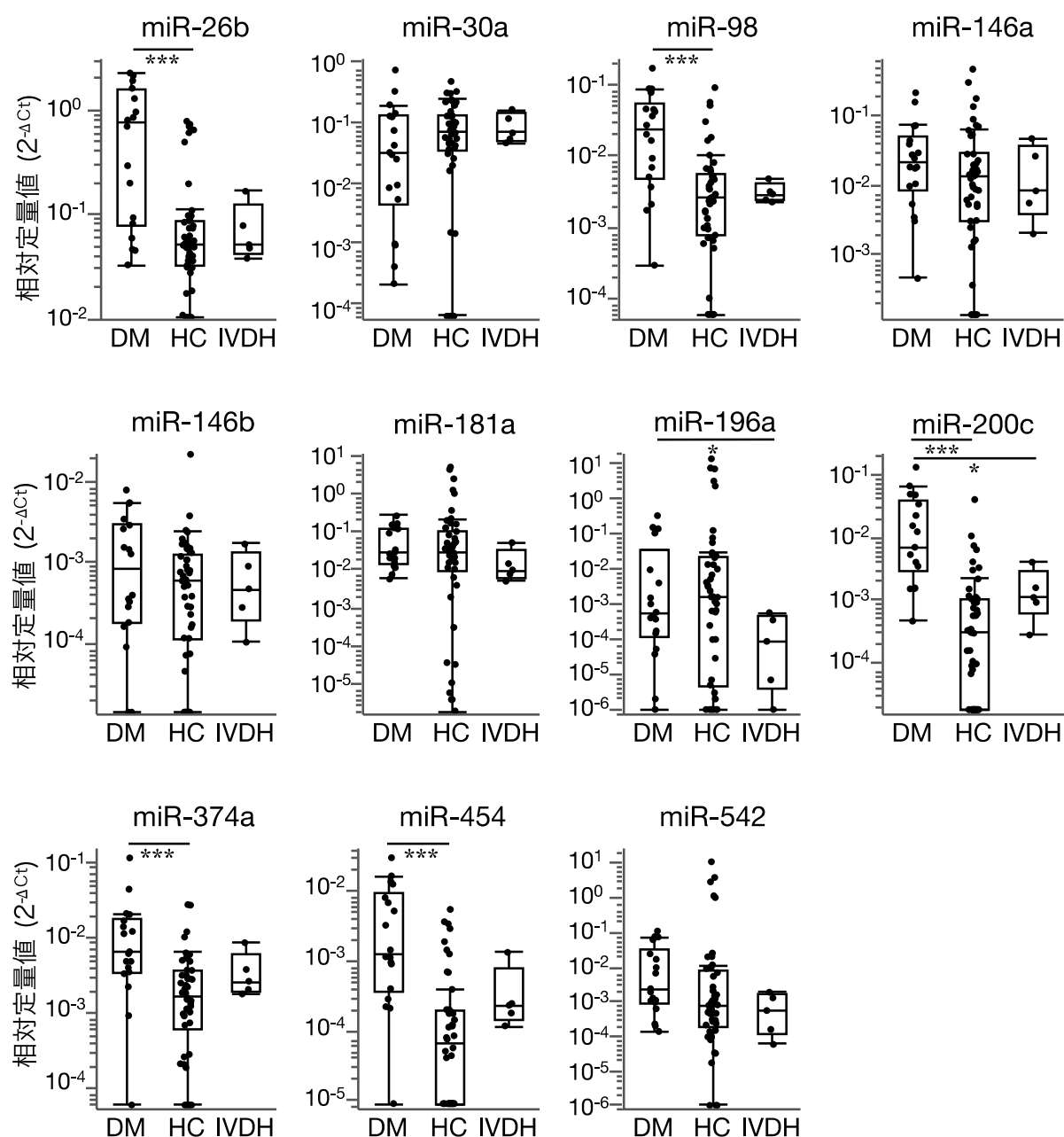


図 1-2. 臨床サンプルにおける診断バイオマーカー候補 miRNA の血漿相対定量値

DM 群の miR-26b, miR-98, miR-200c, miR-374a および miR-454 は HC 群より有意な発現上昇を認めた。また, DM 群の miR-196a および miR-200c は IVDH 群より有意な発現上昇を認めた (Steel-Dwass 検定: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$)。

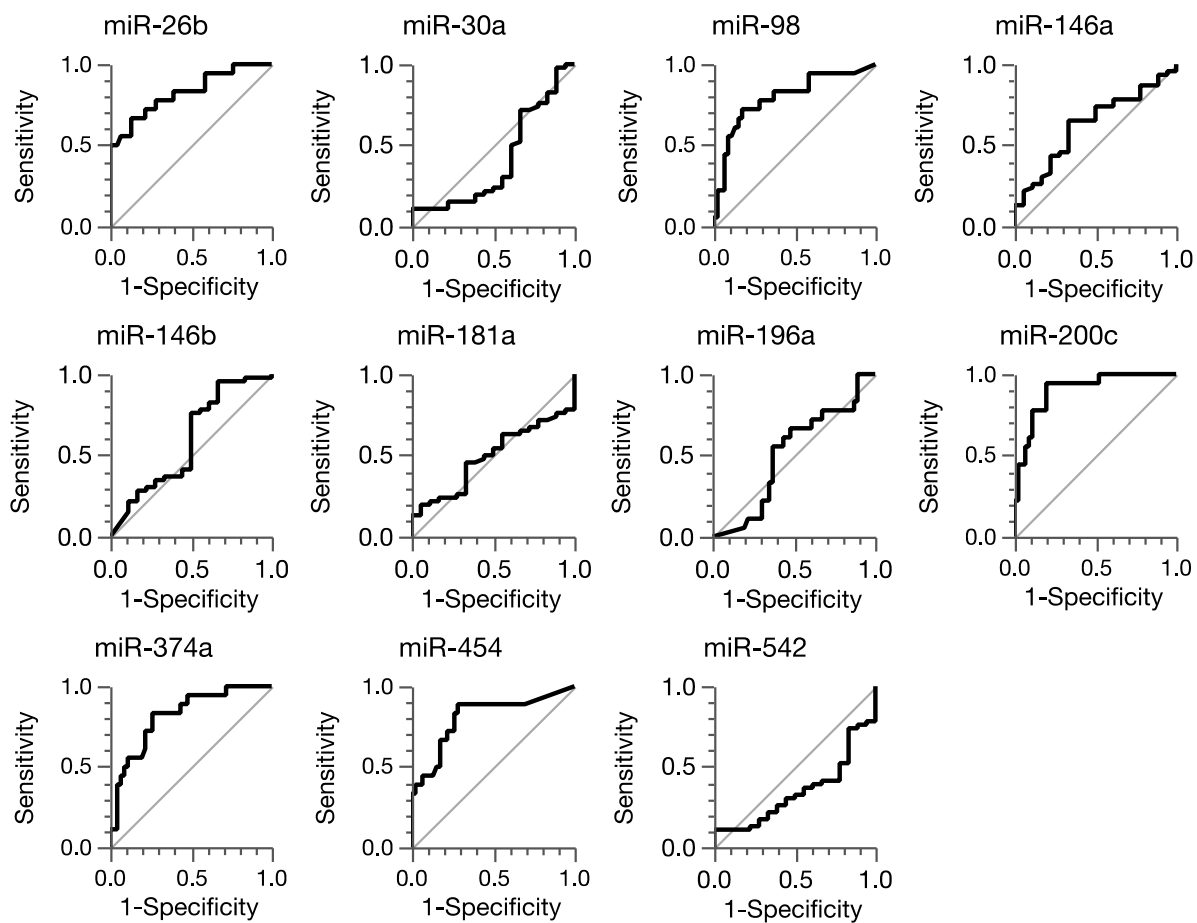


図 1-3. 診断バイオマーカー候補 miRNA の ROC 曲線

miR-26b, miR-98, miR-200c, miR-374a および miR-454 の 5 種類で AUC が 0.7 以上であり、DM 群と HC 群との鑑別が可能であることが示された。

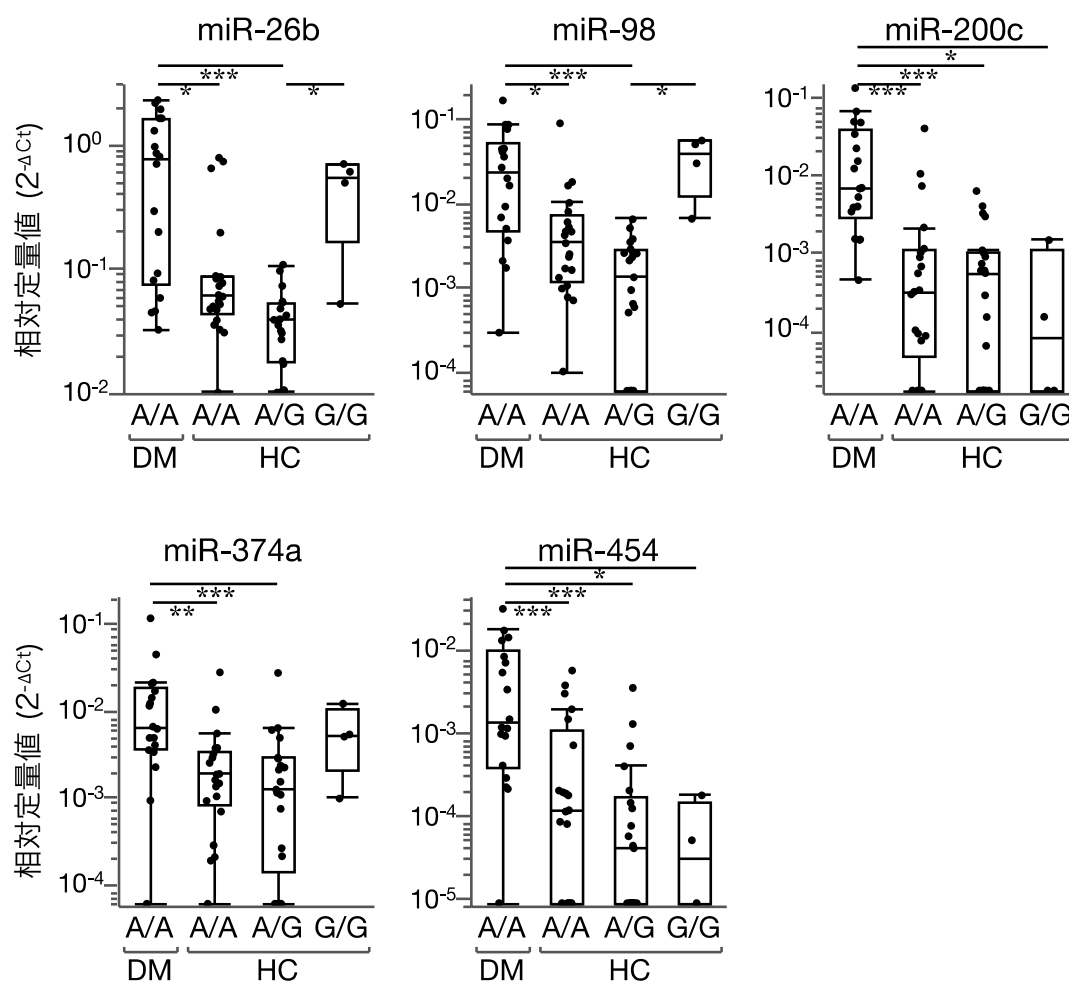


図 1-4. *SOD1* の各遺伝子型における診断バイオマーカー候補 miRNA の相対定量値

5 種類の miRNA の血漿中濃度は、DM 群において HC 群の A/A 型および A/G 型より有意な発現上昇を認めた。また、miR-200c と miR-454 の血漿中濃度は DM 群において HC 群の G/G 型より有意な発現上昇を認めた (Steel-Dwass の検定: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$)。

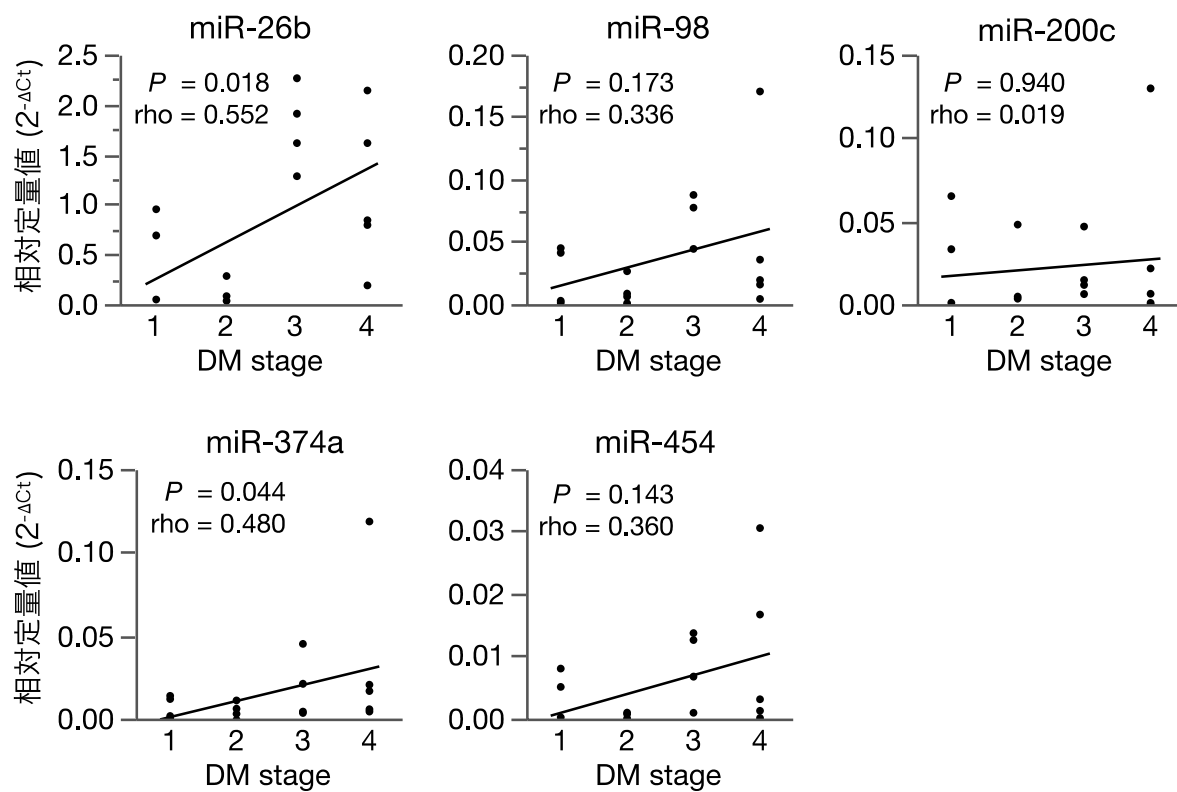


図 1-5 診断バイオマーカー候補 miRNA と DM の臨床ステージの相関

miR-26b および miR-374a の血漿中濃度と DM の臨床ステージの間に有意な正の相関が認められた。

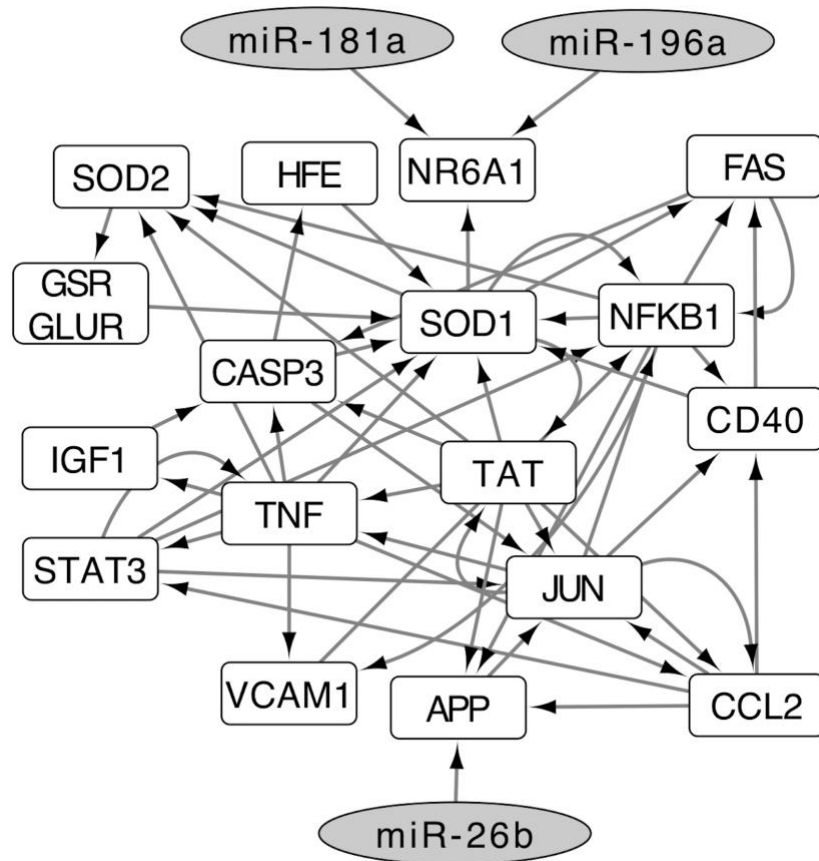


図 1-6. 診断バイオマーカー候補 miRNA におけるパスウェイ解析

丸のノードが miRNA, 四角のノードが mRNA を示す。miR-26b が *SOD1* の上流, miR-181a および miR-196a が *SOD1* の下流に存在する可能性が示唆された。

APP: amyloid beta precursor protein, *CASP3*: caspase 3, *CCL2*: C-C motif chemokine ligand 2, *CD40*: CD40 molecule, *FAS*: Fas cell surface death receptor, *GSR/GLUR*: glutathione-disulfide reductase, *HFE*:

hemochromatosis, *IGF1*: insulin like growth factor 1, *JUN*: Jun proto-oncogene, *NFKB1*: nuclear factor kappa B subunit 1, *NR6A1*: nuclear receptor subfamily 6 group A member 1, *SOD1*: superoxide dismutase 1,

SOD2: superoxide dismutase 2, *STAT3*: signal transducer and activator of transcription 3, *TAT*: tyrosine aminotransferase, *TNF*: tumor necrosis factor, *VCAM1*: vascular cell adhesion molecule 1

第 2 章

脊髄マイクロ RNA 発現解析に基づく
イヌのスーパーオキシドジスムターゼ 1 関連変性性脊髄症の
病態メカニズムの解明

背景

DM の発症メカニズムに関して、ゲノムワイド関連解析により *SOD1* 遺伝子変異をホモ接合で有することが DM の発症に最も重要であると報告された (3)。これまでに 2 種類の遺伝子変異 (c.118G>A, c.52A>T) が報告されており、それぞれ 1 アミノ酸残基置換 (E40K, T18S) が起こり、変異型 SOD1 蛋白が翻訳される (2, 59)。SOD1 蛋白は抗酸化酵素の一種であるが、変異型 SOD1 蛋白はその酵素活性が維持されていると報告されている (18)。また、変異型 SOD1 蛋白は生化学的特性の変化により凝集体形成が促進されると考えられており (41)、免疫組織化学により DM 症例の脊髄の神経細胞内に抗 SOD1 抗体陽性の凝集体として観察される (3, 33, 41, 42)。これらのことから、DM は変異型 SOD1 蛋白の毒性獲得によって起こる gain of toxic function disease である可能性が高い。

ヒトにおいて *SOD1* 遺伝子変異は ALS を引き起こすことが知られている (7, 51)。ヒトの変異型 SOD1 蛋白も DM と同様に、神経細胞に凝集体を形成することや酵素活性を保持していることが明らかとなっている (31, 40, 54)。また、ヒトの変異型 *SOD1* 遺伝子導入マウスでは ALS 様の症状を発現するのに対し、*SOD1* ノックアウトマウスは症状を発現しないことから、ALS は変異型 SOD1 蛋白に関連した gain of toxic function disease であると考えられている (24, 47)。しかし、ALS が変異型 *SOD1* 遺伝子ヘテロ接合体で発症するのに対し、DM ではヘテロ接合体での発症例は極めて稀であり、変異型ホモ接合体を有する個体でも DM を発症する個体と発症しない個体が存在することが知られている (9, 60)。このことから、DM においては *SOD1* 遺伝子変異以外の要因がその発症に関与する可能性が高い。

miRNA は標的となる mRNA の 3'非翻訳領域に結合し、mRNA の翻訳抑制や分解に働き、遺伝子の発現を制御する。そのため、miRNA は発生 (4) や細胞増殖

(5), 分化 (10), アポトーシス (13) など様々な生命現象に重要な役割を果たしている。また, miRNA と mRNA の結合は完全相補だけでなく一部相補的な配列でも結合可能であり, 一つの miRNA は数十から数百の mRNA をターゲットにすると考えられている (22)。この特性から, 特定の疾患における miRNA の発現プロファイルの解析とターゲット mRNA 群の機能予測により, 疾患病態に対する新たな知見が得られると期待される。

近年のゲノム解読技術の急速な発達により, 多くの生物種の塩基配列情報がデータベースに蓄積されている。また, 蛋白の構造や機能, 遺伝子相互作用などのデータベースの発展も目覚ましい。これらの多様なデータベースを横断的に解析できるように共通の語彙をつけるプロジェクトが遺伝子オントロジー (gene ontology : GO) である。GO では遺伝子情報を生物学的プロセス, 細胞の構成要素および分子機能に大別し, そこから体系的に細かく分類された GO term がそれぞれの遺伝子につけられている。この GO term の発現パターンを解析することで, 特定の遺伝子群の作用を検討することができる。このように *in silico* によるバイオインフォマティクスでは, マイクロアレイなどで得られた大量の遺伝子データから, 既存の膨大な生物学的情報データベースを用いて新たな知見を得ることが可能となる。

第 2 章では, miRNA の発現異常が DM の病態メカニズムに与える影響を解明することを目的として実験を行なった。まず, DM 群と対照群の脊髄における miRNA の発現をマイクロアレイにより網羅的に解析し, 発現プロファイルを比較した。続いて *in silico* による GO 解析を用いて DM 群において発現変動の認められた miRNA 群の機能予測を行なった。そこで検出した miRNA 群の機能に対して, 変異型 SOD1 プラスミド導入細胞を用いた DM の *in vitro* モデルおよび DM 群の免疫組織化学により, DM との関連を評価した。そして, 発現変動を認めた miRNA と変異型 SOD1 プラスミドとの共導入により, DM 病態の再現性を評価した。

材料および方法

供試動物

DM 群は、DM に典型的な臨床症状を呈して岐阜大学附属動物病院に来院した PWC8 頭 (DM 1 - 8) を用いた。*SOD1* 遺伝子検査で変異型ホモ接合体 (A/A) であり、病理組織学的検査により DM と診断した。対照群は、神経症状がみられなかったイヌ 7 頭 (Control 1 - 7) を用いた。*SOD1* 遺伝子検査で野生型 (G/G) であり、病理組織学的検査において脊髄に病変を認めなかった。

脊髄の miRNA プロファイル解析には死後 24 時間以内に脊髄組織を採取した個体を供した。また、miRNA プロファイル解析と脊髄の免疫組織化学は、それぞれ DM 群 4 頭と対照群 4 頭で実施した。

miRNA 抽出および逆転写反応

死後 24 時間以内に剖検を行い、採取した脊髄組織を直ちに RNA 安定化剤 (RNAlater, サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社, Tokyo, Japan) に浸漬し、4 °C で一晩インキュベートしたのち、miRNA 抽出まで -30 °C にて保存した。第 12 胸髄分節の脊髄組織を横断面方向に約 25 mg を切り出し、miRNA 抽出キット (miRNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) およびビーズ式細胞破碎装置 (Micro Smash MS-100R, 株式会社トミー精工, Tokyo, Japan) を用いてトータル RNA を抽出した。 6.3×10^8 コピーの合成 *Caenorhabditis elegans* mir-39 (miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control, Qiagen) をスパイクイン・コントロールとして添加した。抽出したトータル RNA を分光光度計 (BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg, Germany) で濃度測定し、500 ng のトータル RNA から cDNA 合成キット (miScript II RT Kit,

Qiagen) および PCR 装置 (TaKaRa Thermal Cycler Dice, タカラバイオ株式会社, Shiga, Japan) を用いて cDNA を合成した。反応条件はプロトコールの推奨条件に従って 37 °C, 60 分間および 95 °C, 10 秒間とした。

miRNA の qPCR マイクロアレイ

合成した脊髄 cDNA から, miRNA アレイプレート (miScript miRNA PCR Array Dog miRNome, Qiagen), qPCR キット (miScript SYBR Green PCR Kit, Qiagen) およびリアルタイム PCR 装置 (TaKaRa Thermal Cycler Dice Real Time System TP800, タカラバイオ株式会社) を用いて相対定量を実施した。qPCR は 1) 初期活性化として 95 °C, 15 分間, 2) 3 ステップ増幅サイクルとして変性 94 °C, 15 秒間, アニーリング 55 °C, 30 秒間, エクステンション 70 °C, 30 秒間を 40 サイクルの条件で実施した。ターゲット miRNA の Ct 値を cel-miR-39-3p を用いてプレート間補正を行い, 全検出 miRNA の平均を用いて標準化することで miRNA の相対定量値を算出した (37)。 $\Delta\Delta Ct$ 法により DM 群の FC が健常群の 2 倍以上または半分以下の変動があり, かつ Mann-Whitney の *U* 検定で *P* 値 0.05 以下のものを脊髄 miRNA 濃度の有意な上昇または低下と定義した。

遺伝子オントロジー解析

TargetScan データベース version 7.1 (http://www.targetscan.org/vert_71/) を用いて, バイオマーカー候補 miRNA のターゲット候補 mRNA を発現上昇, 発現低下ごとに検索し, context++ scores が -0.4 以下となるものを選出した (49)。選出した mRNA から重複する mRNA を除外したのち, DAVID データベース version 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov>) を用い GO 解析を行った。Functional Annotation Tool より Functional Annotation Clustering を実行し, Enrichment Score が 1.3 以上の

クラスターを有意な変動ありとした (27)。

細胞培養および遺伝子導入

FLAG をカルボキシル基末端に融合したイヌ SOD1 cDNA (野生型 : WT-SOD1-FLAG, 変異型 : E40K-SOD1-FLAG) を EcoRV/XhoI 部位に導入した pcDNA3 を用いて培養細胞への遺伝子導入を行った。また, ユビキチンの導入にはヘマグルチニン (hemagglutinin : HA) をカルボキシル基末端に融合したユビキチン cDNA (Ub-HA) を EcoRV/XhoI 部位に導入した pcDNA3 を使用した。合成 miRNA (miRNA Mimic, Qiagen) は脊髄の miRNA マイクロアレイにて発現上昇を認めた miRNA を用いた。

ヒト胎児由来腎臓細胞 293 (Human Embryonic Kidney cells 293 : HEK293A) を 6 穴細胞培養用プレート (TrueLine Cell Culture Plates, 日本ジェネティクス株式会社, Tokyo, Japan) または 13 mm 径丸カバーガラス (松浪硝子工業, Osaka, Japan) を設置した 24 穴細胞培養用プレート (TrueLine Cell Culture Plates) の各ウェルに播種し, 10 % 牛胎仔血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium : DMEM, ナカライテスク, Kyoto, Japan) 中で, 37 °C, 5 % CO₂ 環境下で一晩培養した。細胞の接着を確認後, 遺伝子導入試薬 (Attractene Transfection Reagent, Qiagen) を用い, 製品プロトコールに従って 6 穴細胞培養用プレートの細胞に対しては 1.2 µg/well, 24 穴細胞培養用プレートの細胞に対しては 0.4 µg/well のプラスミドおよび合成 miRNA を最終濃度 5 nM となるよう細胞に導入した。48 時間培養後, 免疫沈降または免疫細胞化学に用いた。プロテアソーム阻害には, 遺伝子導入 24 時間後にラクタシスチン (バイオリンクス株式会社, Kanagawa, Japan) を最終濃度 10 µM となるように添加した。

免疫沈降

6 穴細胞培養用プレートで培養したプラスミド導入 HEK293A 細胞を PBS で洗浄後、セルスクレーパーで回収し、4 °C, 100 × *g*, 5 分間遠心し、細胞ペレットを分離した。プロテアーゼ阻害剤 (cOmplete Mini, Roche, Basel, Switzerland) 加 TNG-T バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 % glycerol, 1 % Triton-X) を添加し、氷上で 30 分間溶解した後、超音波破碎機 (Bioruptor, コスモバイオ株式会社, Tokyo, Japan) を用いて細胞ライセートを作製した。蛋白質定量キット (Bradford Protein Assay Kit, タカラバイオ株式会社, Shiga, Japan) と分光光度計 (BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg, Germany) を用いたブラッドフォード法により蛋白濃度を測定し、一部を input サンプルとして -30 °C で保存した。細胞ライセート 150 µg にビーズ付加抗 FLAG 抗体 (ANTI-FLAG M2 Affinity Gel, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を 20 µl 添加し、4 °C で一晩インキュベートすることにより SOD1-FLAG とそれに結合した蛋白のみを免疫沈降した。免疫沈降物を RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0.25 % ドデシル硫酸ナトリウム Sodium dodecyl sulfate : SDS) により 5 回洗浄し、4 % SDS サンプルバッファーを加え、95 °C で 5 分間加熱した。4 °C, 10,000 × *g*, 10 分間遠心分離し、上清を回収することにより、SOD1-FLAG 蛋白とそれに結合している蛋白を抽出した。

ウエスタンブロット

蛋白抽出液 8 µl/lane を SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を実施した。泳動したゲルからポリフッ化ビニリデン膜 (Immobilon-P, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) にブロッティング装置 (Trans-Blot Turbo, Bio-

Rad Laboratories, Inc., California, USA) を用いて 25 V, 1.0 A, 30 分間で転写した。3 %スキムミルク加 Tween 20 加トリス緩衝生理食塩水 (tris-buffered saline-Tween 20 : TBS-T) に浸漬し, 室温で 1 時間ブロッキングを実施した。一次抗体に抗 HA 抗体 (Anti-HA High Affinity Rat monoclonal antibody, Roche, 希釈倍率 1 : 1000) および抗 SOD1 抗体 (Cu/Zn SOD polyclonal antibody, Enzo Life Sciences Inc., New York, USA, 希釈倍率 1 : 500) を用いて 4 °C で一晩インキュベートした。TBS-T バッファーで洗浄後, 二次抗体に HRP 結合抗ラット IgG 抗体 (Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rat IgG, Jackson Immuno Reserch Laboratories inc., Pennsylvania, USA, 希釈倍率 1 : 1000) および HRP 結合抗ウサギ IgG 抗体 (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG, Jackson Immuno Reserch Laboratories inc., 希釈倍率 1 : 2000) を用いて室温で 60 分間インキュベートした。TBS-T で洗浄後, 化学発光検出試薬 (Chemi-Lumi One Super, ナカライテスク) により転写蛋白を検出し, 化学発光画像解析装置 (ImageQuant LAS 500, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) を用いて撮影した。

免疫組織化学

DM 群および対照群の第 9 - 12 胸髄分節の脊髄を中性緩衝 10 %ホルマリン液により固定した後, パラフィン包埋した。脊髄組織を横断面方向に 2 μ m で薄切し, 46 °C の恒温槽で一晩乾燥させ, 連続切片を作製した。脱パラフィン後, 流水で水洗し, 抗 SOD1 抗体で染色する切片については 10 mM クエン酸ナトリウムバッファー (Target Retrieval solution, citrate pH 6.0, Dako) に浸漬し, 121 °C, 15 分間オートクレーブ処理による抗原賦活化を実施した。その後, 切片を 0.3 %過酸化水素加メタノール溶液中で 20 分間反応させ, 内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを

実施した。流水および Tween 20 加リン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline-Tween 20 : PBS-T）で洗浄後、10 %正常ヤギ血清加 PBS-T により室温で 30 分間ブロッキング処理を行った。一次抗体は抗ユビキチン抗体（Polyclonal Rabbit anti-Ubiquitin, Dako, Glostrup, Denmark）を希釈倍率 1 : 1000, 抗 SOD1 抗体を 1 : 200 の濃度で 10 %正常ヤギ血清加 PBS-T により希釈し、4 °C で一晩反応させた。PBS-T で洗浄後、二次抗体として HRP 標識抗ラビットポリマー抗体（ImmPRESS REAGENT Anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories Inc., California, USA）を室温で 30 分間反応させた。PBS-T で洗浄後、3, 3'-ジアミノベンジジン試薬（DAB Substrate Kit, Vector Laboratories Inc.）を用いて発色させた。対比染色はヘマトキシリン（Mayer's hemalum solution, EMD Millipore Corporation, Billerica, USA）によって行った。

ユビキチン陽性面積の測定

作製したスライドを顕微鏡に接続したデジタルカメラ（Leica Application Suite 3.4, Leica, Germany）にて 200 倍の倍率で撮影した。画像解析ソフト（Image J ver. 1.52a, National Institutes of Health, USA）にて撮影した RGB 画像のカラーチャンネルを分割し、青色チャンネルの画像を用いて陽性領域のみが選択されるように閾値を 80 から 120 の範囲に設定し、ユビキチン陽性面積を測定した。灰白質および白質からそれぞれランダムに 3 箇所ずつ測定し、撮影範囲との比率を平均して算出した。

免疫細胞化学

24 穴細胞培養用プレートの 13 mm 径丸カバーガラス上で培養した細胞を 4 %パラホルムアルデヒド加 PBS で 10 分間固定した。細胞を PBS で洗浄した後、0.25 %

Triton X-100 加 PBS により細胞膜透過処理を 10 分間行った。PBS で洗浄後、10 % 正常ヤギ血清加 PBS で室温 30 分間反応させた後、一次抗体である抗 FLAG 抗体 (Monoclonal ANTI-FLAG M2 antibody, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を希釈倍率 1 : 500 で加えて室温にて 60 分間反応させた。細胞を PBS で洗浄した後、二次抗体として抗マウス IgG 抗体 (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Invitrogen Corp., CA, USA) を希釈倍率 1 : 1000 で用い、室温暗所で 60 分間反応させた。PBS で洗浄後、4', 6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩 (DAPI, 同仁化学研究所, Kumamoto, Japan) を希釈倍率 1 : 1000 で用いて核染色を行った。細胞は共焦点レーザースキャン顕微鏡 (LSM 700, Carl Zeiss, Overkochen, Germany) を用いて観察し、凝集体の形成率を算出した。

統計解析

2 群間の比較には Mann-Whitney の *U* 検定を行なった。凝集体形成率に関しては miRNA 無添加群を対照群とした Dunnet の検定を行なった。解析は統計ソフトウェア (JMP ver.13.2.0, SAS Institute, North Carolina, USA) を用いて行い、*P* 値 0.05 以下を統計学的な有意差ありと判断した。

結果

供試動物

各実験に用いた動物を表 2-1 に示した。脊髄 miRNA のマイクロアレイ解析に用いた犬種は DM 群が全て PWC (DM 1 - 4), 対照群がビーグル 2 頭, ラブラドル・レトリバー 1 頭, ミニチュア・ダックスフンド 1 頭 (Control 1 - 4) であった。年齢は DM 群が中央値 163 ヶ月齢 (範囲 : 148 - 196 ヶ月齢), 対照群が 130 ヶ月齢 (範囲 : 114 - 144 ヶ月齢) であった。性別は DM 群が雄 3 頭, 雌 1 頭, 対照群が雄 2 頭, 雌 2 頭であった。

脊髄の免疫組織化学に用いた犬種は DM 群が全て PWC (DM 5 - 8), 対照群がビーグル 3 頭, ラブラドル・レトリバー 1 頭 (Control 3, 5 - 7) であった。年齢は DM 群が中央値 170 ヶ月齢 (範囲 : 162 - 178 ヶ月齢), 対照群が 109 ヶ月齢 (範囲 : 90 - 144 ヶ月齢) であった。性別は DM 群, 対照群とも雌雄各 2 頭ずつであった。Control 3 は脊髄のマイクロアレイおよび免疫組織化学の両方の実験に用いた。

マイクロアレイによる DM の脊髄 miRNA 発現プロファイル解析

DM 群における脊髄 miRNA の RT-qPCR マイクロアレイにより測定した 277 種類の miRNA のうち, 症例の半数以上で非特異反応または検出限界以下となった 40 種類の miRNA を除いた 237 種類の miRNA において相対定量値を算出した。FC の変動率および Mann-Whitney の *U* 検定より DM において発現上昇した miRNA を 3 種類, 発現低下した miRNA を 18 種類検出した (図 2-1 および表 2-2)。

遺伝子オントロロジー解析

DM 群において発現変動を認めた miRNA の機能を評価するために, まず,

TargetScan データベース検索を行い、発現上昇 miRNA のターゲットとして 345 種類、発現低下 miRNA のターゲットとして 1,094 種類の mRNA をそれぞれ選出した。続いて、DAVID データベースを用いた GO 解析により、それぞれ 309 種類および 967 種類の GO term を検出した。さらに、Enrichment score から第 12 胸髄分節の脊髄で発現上昇した miRNA の影響下にある GO クラスターを 7 種類、脊髄で発現低下した miRNA の影響下にある GO クラスターを 22 種類検出した（表 2-3 および表 2-4）。DM の脊髄において発現上昇した miRNA の影響下にある GO term として、RNA 発現、テロメアの制御、蛋白の輸送、miRNA による翻訳制御、ユビキチン化および薬剤に対する生体反応などに関連するクラスターの出現頻度が有意に増加していることが明らかとなった。また、DM の脊髄において発現低下した miRNA の影響下にある GO term としては、組織分化、遺伝子発現制御、細胞分裂、蛋白質の輸送や修飾などに関連するクラスターの出現頻度が有意に増加していることが明らかとなった。

SOD1 蛋白のユビキチン化

イヌにおける変異型 SOD1 蛋白である E40K-SOD1 蛋白とユビキチン化の関連を評価するため、免疫沈降法およびウエスタンブロットを実施した（図 2-2）。WT-SOD1 または E40K-SOD1 のみ導入した細胞では SOD1 と結合したユビキチン蛋白は検出されなかった。また、イヌ SOD1 と Ub-HA を共導入した細胞では SOD1 と結合した単量体のユビキチン化を示すバンドが明瞭に検出された。さらにプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンの添加により、ポリユビキチン化を示すスメア状のバンドが検出された。このポリユビキチン化された SOD1 蛋白は WT-SOD1 導入細胞と比較して E40K-SOD1 導入細胞で濃いスメア状のバンドが検出された。

免疫組織化学

脊髄連続切片における免疫組織化学により，DM 群および対照群において，尾側胸髄の灰白質（図 2-3 A, B）および白質（図 2-3 C, D）において抗ユビキチン抗体陽性の顆粒状構造物が認められた。DM 群の抗ユビキチン抗体陽性の顆粒状構造物は，対照群と比較して染色性が強く，大型であった。また，灰白質の神経細胞内にユビキチンの陽性反応は認められなかった。続いて，抗ユビキチン抗体陽性の面積を測定した（図 2-3 E, F）。ユビキチン陽性面積の割合は DM 群において尾側胸髄の灰白質で $0.71 \pm 0.05 \%$ ，白質で $0.60 \pm 0.08 \%$ であった。対照群において灰白質で $0.28 \pm 0.08 \%$ ，白質で $0.26 \pm 0.07 \%$ であった。灰白質（ $P=0.03$ ），白質（ $P=0.03$ ）とも対照群と比較して DM 群で有意に高値であった。続いて，ユビキチン陽性顆粒と SOD1 蛋白との局在を評価するために脊髄連続切片による免疫組織化学を実施した（図 2-4）。DM 群におけるユビキチン陽性の顆粒状構造物は灰白質（図 2-4 A），白質（図 2-4 C）のいずれにおいても抗 SOD1 蛋白陽性反応（図 2-4 B, D）は対照群（図 2-4 F, I）と同程度であり，明らかな共局在は認められなかった。また，DM 群において認められた神経細胞体内の SOD1 蛋白の凝集体（図 2-4 B）にユビキチン陽性反応は認められなかった。

凝集体形成率

イヌ SOD1 プラスミド導入細胞における免疫細胞化学において，WT-SOD1 を導入した細胞では細胞質に均一な抗 FLAG 抗体の陽性反応を示した（図 2-5 A）のに対し，E40K-SOD1 を導入した細胞では細胞質に顆粒状の抗 FLAG 抗体の陽性反応を示し，凝集体の形成が認められた（図 2-5 B）。凝集体形成率は，WT-SOD1 導入細胞が $6.79 \pm 1.67 \%$ ，E40K-SOD1 導入細胞が $31.42 \pm 4.20 \%$ であった。続いて，DM 群の第 12 胸髄分節において発現が増加した miRNA である miR-23a

(MIMAT0006640: 5'AUCACAUUGCCAGGGAUUU), miR-142

(MIMAT0006736: 5'CCCAUAAAGUAGAAAGCACUA) および miR-221

(MIMAT0006757: 5'AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUU) を SOD1 と共導入

し、免疫細胞化学により凝集体形成率を評価した。WT-SOD1 導入細胞における凝集体形成率は miR-23a 共導入群が $6.99 \pm 1.67 \%$ ($P = 1.000$), miR-142 共導入群が $8.68 \pm 1.34 \%$ ($P = 0.472$), miR-221 共導入群が $7.63 \pm 0.57 \%$ ($P = 0.930$) であった。また、3 種類共導入群では凝集体形成率は $10.88 \pm 1.89 \%$ ($P = 0.031$) と有意に増加した。E40K-SOD1 導入細胞における凝集体形成率は miR-23a 共導入群が $40.67 \pm 1.61 \%$ ($P = 0.015$), miR-142 共導入群が $45.28 \pm 2.43 \%$ ($P < 0.001$), miR-221 共導入群が $45.29 \pm 3.39 \%$ ($P < 0.001$), 3 種類共導入群が $44.99 \pm 2.43 \%$ ($P < 0.001$) であり、いずれも有意に増加した (図 2-5 C)。

考察

miRNA は多数の遺伝子発現制御機構に影響を与え、様々な病態の発生メカニズムに関与することが報告されている。ヒトの神経変性疾患においてもアルツハイマー病（11, 34, 48）、パーキンソン病（29, 30）および ALS（8, 20, 58）の病態との関連が示唆されている。本研究は神経変性疾患のイヌの脊髄における miRNA 発現プロファイルを解析した初の報告である。DM の臨床症状が後肢の UMN 徴候から始まり前後肢の LMN 徴候へと進行すること、病理組織学的検査において脊髄の変性が頸髄と比較して尾側胸髄でより重度であることが報告されており、DM における神経変性は尾側胸髄から始まり、頭尾側方向へと進行していくことが示されている（16, 36）。そのため、本研究においては DM 群と対照群の差が最も大きくなると予想される尾側胸髄として第 12 胸髄分節における miRNA の発現プロファイルを比較した。また、臨床症状を伴わない個体であっても、変異型ホモ接合体やヘテロ接合体の PWC 脊髄では脊髄に変性変化が報告されていることから（33）、マイクロアレイにおいては G/G 個体を対照群とした。マイクロアレイ解析により、DM 症例において発現上昇を認めた miRNA を 3 種類、発現低下を認めた miRNA を 18 種類検出した。

miRNA は数十から数百の mRNA をターゲットとして転写調節に関与していると考えられていることから（22）、それぞれの miRNA の機能を個別に評価することは困難である。そこで本研究においては、DM 症例で発現変動が認められた miRNA 群の機能を推測するために *in silico* による GO 解析を行い、ターゲットクラスターをそれぞれ 7 個および 22 個選出した。発現上昇 miRNA のターゲットには蛋白発現や蛋白修飾に関するクラスターが多く見られ、蛋白の機能障害を誘導している可能性が示唆された。発現低下 miRNA のターゲットには組織分化や発生に関するクラ

スターが多く認められた。しかし、神経組織に関するクラスターは検出されず、循環器系、骨や骨格筋などのクラスターであったことから、神経原性の筋萎縮に対する代償反応や褥瘡形成に対する治癒反応の関与が考えられた。GO 解析により検出したクラスターが実際に DM 症例の脊髄でどの様に病態と関連しているかは不明である。本研究では、DM が SOD1 蛋白の gain of toxic function disease であることから、DM 発症症例においてはユビキチンの機能異常が生じている個体において変異型 SOD1 蛋白が凝集体を形成しやすくなるのではないかと考え、発現上昇した miRNA のターゲットからクラスター7 のユビキチン化に関するクラスターに着目した。ユビキチンは他の蛋白質に結合することでプロテアソーム媒介分解のタグとしてユビキチン-プロテアソーム系 (ubiquitin-proteasome system : UPS) を構成することで、タンパク質の品質管理を担っている (17, 32)。ヒトにおいてパーキンソン病、アルツハイマー病および ALS などの神経変性疾患では、UPS の機能低下が発症に関与することが示唆されている (12, 19, 25)。

そこで、E40K-SOD1 蛋白が UPS による処理を受けるかどうかを評価するために、免疫沈降法およびウエスタンブロットを実施した。WT-SOD1 および E40K-SOD1 を導入し、ラクタシスチン添加群で明瞭なスメア状のバンドが認められたことから、イヌ SOD1 蛋白は細胞内でポリユビキチン化されることが明らかとなった。ポリユビキチン鎖がプロテアソームのターゲットになることから (12)、正常な機能を持つ細胞では SOD1 蛋白はプロテアソームにより分解され、細胞内に蓄積しにくいことが示唆された。また、WT-SOD1 導入細胞と比較して、E40K-SOD1 導入細胞で濃いスメア状のバンドが検出されたことから、E40K-SOD1 は WT-SOD1 よりユビキチン化のターゲットとなるミスフォールドを起こしやすいと考えられた。ALS において、UPS はミスフォールドした変異型 SOD1 蛋白の除去機構として重要な役割を果たすことが示されている (57)。本研究の結果から、ミスフォール

ドした E40K-SOD1 蛋白の処理機構にも UPS が重要な役割を果たしていることが示された。

続いて、DM 症例の脊髄におけるユビキチン化蛋白の局在を評価するために、DM 群および対照群の脊髄に対し抗ユビキチン抗体および抗 SOD1 抗体を用いて免疫組織化学を実施した。DM 群においてユビキチン化が亢進していることが示唆されたにも関わらず、DM 群、対照群ともユビキチンと SOD1 蛋白との共局在は認められなかったことから、変異型 SOD1 蛋白は神経細胞に凝集体を形成してもユビキチン化されることはなく、UPS による処理や神経細胞外への排出などの品質管理機構による制御を受けないと考えられた。DM 症例の脊髄 miRNA マイクロアレイおよび GO 解析の結果を併せて考えると、miRNA の作用により SOD1 蛋白のユビキチン化が阻害されることが変異型 SOD1 蛋白の凝集体形成に関与していると考えられた。

DM 症例の脊髄において発現上昇を認めた miR-23a, miR-142 および miR-221 が SOD1 蛋白の凝集体形成に与える影響を、免疫細胞化学により評価した。E40K-SOD1 導入細胞では共導入により凝集体形成が亢進することが明らかとなった。GO 解析の結果から、miR-23a, miR-142 および miR-221 は蛋白のユビキチン化に影響を与えると考えられるため、DM 症例の脊髄における miR-23a, miR-142 および miR-221 がそれぞれ SOD1 蛋白のユビキチン化を阻害することにより SOD1 蛋白の凝集体形成を促進すると考えられた。これに対して、WT-SOD1 導入細胞では 3 種類の miRNA を共導入した場合のみ凝集体形成率が有意に増加した。WT-SOD1 導入細胞は凝集体形成を起こしにくいことから、miRNA のターゲットとなるユビキチン化に関する mRNA の発現量が低いことが影響していると考えられた。

ミスフォールド疾患において形成された凝集体は、細胞の正常な機能を障害し、細胞死を誘導する (12)。これまでに、DM 症例の脊髄神経細胞において変異型 SOD1 蛋白はミスフォールドし、不溶性の凝集体を形成することが示されている

(18, 41)。しかし、本研究においては、細胞モデルにおいて変異型 SOD1 蛋白がユビキチン化を受け、プロテアソームにより処理を受けているにも関わらず、DM 症例の脊髄神経細胞における変異型 SOD1 蛋白がユビキチン化されていないことが示された。そのため、DM 症例における変異型 SOD1 蛋白はミスフォールディングを起こしても UPS による蛋白の品質管理機構から逃れていることが示唆された。そして、脊髄において発現上昇した miRNA の GO 解析の結果および細胞モデルにおいて変異型 SOD1 蛋白の凝集体形成が促進されたことから、miRNA による SOD1 蛋白のユビキチン化阻害が起こり、凝集体形成が促進すると考えられた。DM の発症に関して、変異型ホモ接合体であっても DM を発症しない個体が存在することが知られている (9)。その一方で、未発症の変異型ホモ接合体個体やヘテロ接合体の個体も組織学的には脊髄の変性が起こっていることが報告されており (33)、SOD1 蛋白の凝集体形成が起こる速度と神経細胞内での SOD1 蛋白の凝集体蓄積が DM の発症に影響していると考えられる。本研究における miRNA の発現上昇とそれによる SOD1 蛋白のユビキチン化阻害は、神経細胞における SOD1 蛋白の凝集体形成を促進し、神経変性を早期に誘導することで DM の発症を早める可能性が考えられた。ミスフォールドした SOD1 蛋白のユビキチン化を阻害する miRNA の発現制御や UPS の機能強化は、SOD1 蛋白の凝集体形成を抑制させ、DM の発症や進行を妨げる治療法として期待できると考えられた。

本研究の制限事項としては、マイクロアレイに用いた症例数が少ない点が挙げられる。臨床症状を呈していない個体であっても *SOD1* 遺伝子型が A/A や A/G の場合は脊髄変性があると報告されていることから (33)、未発症 A/A 個体やヘテロ接合体の症例も合わせて評価することで、より DM の発症や病態進行と関連する miRNA が検出できた可能性が考えられる。本研究においては、DM 症例と変異型 SOD1 蛋白を保有しない G/G 個体を比較することにより、DM に起こる脊髄変性に

よって変動する miRNA を選出できると考えた。また、本研究で解析した miRNA は DM の末期病変とされる尾側胸髄のみで行っている。DM はその臨床経過から尾側胸髄から脊髄変性が始まり、頭尾側方向へ拡大していくと考えられている (16)。そのため、頸髄などほかの部位と比較することで DM の進行に関与する miRNA を検出できた可能性がある。対照群に関しては犬種を PWC に統一することができなかった。PWC の G/G 個体は 10%未満とされ (9, 60), PWC は IVDH の好発犬種であることから、神経症状を認めない G/G 型の PWC の脊髄を集めることができなかった。そのため本研究における miRNA の変動が犬種に依存するものであるかは不明である。次に、本章では全ての miRNA の機能解析は実施していない。本研究においては、DM が SOD1 蛋白のミスフォールド疾患であると考えられていることに着目し、ユビキチンの機能解析を実施したが、miRNA が複雑な遺伝子発現制御ネットワークを形成していることを考慮すると、GO 解析の他のクラスター内に DM の病態に関連するメカニズムがある可能性は否定できない。また、DM 脊髄におけるユビキチン陽性顆粒の構成成分に関しては解析を実施していない。DM におけるユビキチン陽性顆粒はオートファジーを誘導するとの報告もあり (44), SOD1 蛋白とは別に DM の病態に関連している可能性がある。本研究で示した miRNA による SOD1 蛋白の凝集体形成促進が、イヌの脊髄神経細胞でも同様に認められるかどうかは不明である。しかし、本研究の細胞モデルにおける主要な構成要素である SOD1 蛋白、ユビキチンおよび miRNA のいずれも細胞に普遍的に存在すること、進化的な保存性が高いことから、動物種や細胞種に関わらず再現できる可能性が高いと考えられた。

本研究において、DM 症例の脊髄において発現上昇している miR-23a, miR-142 および miR-221 の 3 種類の miRNA がイヌの変異型 SOD1 蛋白質のユビキチン化に影響を与えている可能性が示唆された。また、これらの miRNA は E40K 蛋白の凝

集体形成を促進することが明らかになった。この miRNA の発現異常に伴う UPS 機能障害は、DM の病態に重要な役割を果たしていると考えられる。そのため、UPS 機能の正常化は DM の新規治療法として期待できると考えられた。

図表

表 2-1. 供試動物

症例	犬種	<i>SOD1</i> 遺伝子型	性別	死亡時月齢	死因
脊髄 miRNA マイクロアレイ					
DM 1	PWC	A/A	雄	148	DM
DM 2	PWC	A/A	雄	164	DM
DM 3	PWC	A/A	雌	162	DM
DM 4	PWC	A/A	雄	196	DM
Control 1	ビーグル	G/G	雌	124	皮膚リンパ腫
Control 2	ビーグル	G/G	雄	114	安楽殺
Control 3	ラブラドル・ レトリバー	G/G	雄	144	血管肉腫
Control 4	ミニチュア・ ダックスフンド	G/G	雌	136	血管肉腫
免疫組織化学					
DM 5	PWC	A/A	雌	162	DM
DM 6	PWC	A/A	雌	178	DM
DM 7	PWC	A/A	雄	178	DM
DM 8	PWC	A/A	雌	140	DM
Control 3	ラブラドル・ レトリバー	G/G	雄	144	血管肉腫
Control 5	ビーグル	G/G	雌	96	安楽殺
Control 6	ビーグル	G/G	雌	121	安楽殺
Control 7	ビーグル	G/G	雄	90	安楽殺

表 2-2. 脊髄のマイクロアレイにより発現変動を認めた miRNA

変動タイプ	miRNA	FC	<i>P</i> 値
Up-regulation	miR-23a	3.0256	0.0209
	miR-142	21.4607	0.0433
	miR-221	35.6635	0.0209
Down-regulation	let-7e	0.0001	0.0180
	miR-1	0.0479	0.0433
	miR-95	0.0003	0.0180
	miR-105b	0.1095	0.0209
	miR-138b	0.3541	0.0209
	miR-149	0.4292	0.0433
	miR-181b	0.0402	0.0209
	miR-1842	0.0354	0.0202
	miR-206	0.1105	0.0433
	miR-216a	0.0879	0.0209
	miR-219-3p	0.4299	0.0209
	miR-324	0.0021	0.0180
	miR-325	0.2688	0.0209
	miR-326	0.4537	0.0209
	miR-329a	0.1289	0.0202
	miR-494	0.0019	0.0139
	miR-539	0.4616	0.0209
	miR-874	0.0010	0.0180

表 2-3. DM において発現上昇した miRNA の GO 解析

Annotation Cluster	GO term category	Count of GO Term	Enrichment Score
1	poly(A) RNA binding	4	2.06
2	positive regulation of telomerase activity	29	2.03
3	RNA binding	4	1.86
4	miRNA mediated inhibition of translation	48	1.55
5	3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterase activity	6	1.39
6	ubiquitin conjugating enzyme binding	3	1.34
7	cellular response to drug	3	1.30

表 2-4. DM において発現低下した miRNA の GO 解析

Annotation Cluster	GO term category	Count of GO Term	Enrichment Score
1	negative regulation of ossification	7	3.77
2	positive regulation of RNA biosynthetic process	35	3.18
3	negative regulation of cell differentiation	4	2.85
4	skeletal muscle tissue regeneration	3	2.77
5	nucleic acid binding	3	2.54
6	regulation of response to wounding	3	2.39
7	positive regulation of developmental process	7	2.17
8	negative regulation of gene expression	17	2.13
9	regulation of cellular amide metabolic process	9	2.12
10	circulatory system development	9	2.03
11	regulation of cell proliferation	4	2.00
12	regulation of cell migration	35	1.74
13	positive regulation of muscle tissue development	53	1.58
14	skeletal system development	3	1.56
15	regulation of developmental growth	12	1.50
16	bone mineralization involved in bone maturation	8	1.45
17	protein depalmitoylation	10	1.40
18	chordate embryonic development	6	1.40
19	negative regulation of cellular component organization	3	1.37
20	positive regulation of cellular amide metabolic process	3	1.37
21	peptidyl-cysteine modification	8	1.35
22	positive regulation of epithelial cell proliferation	3	1.33

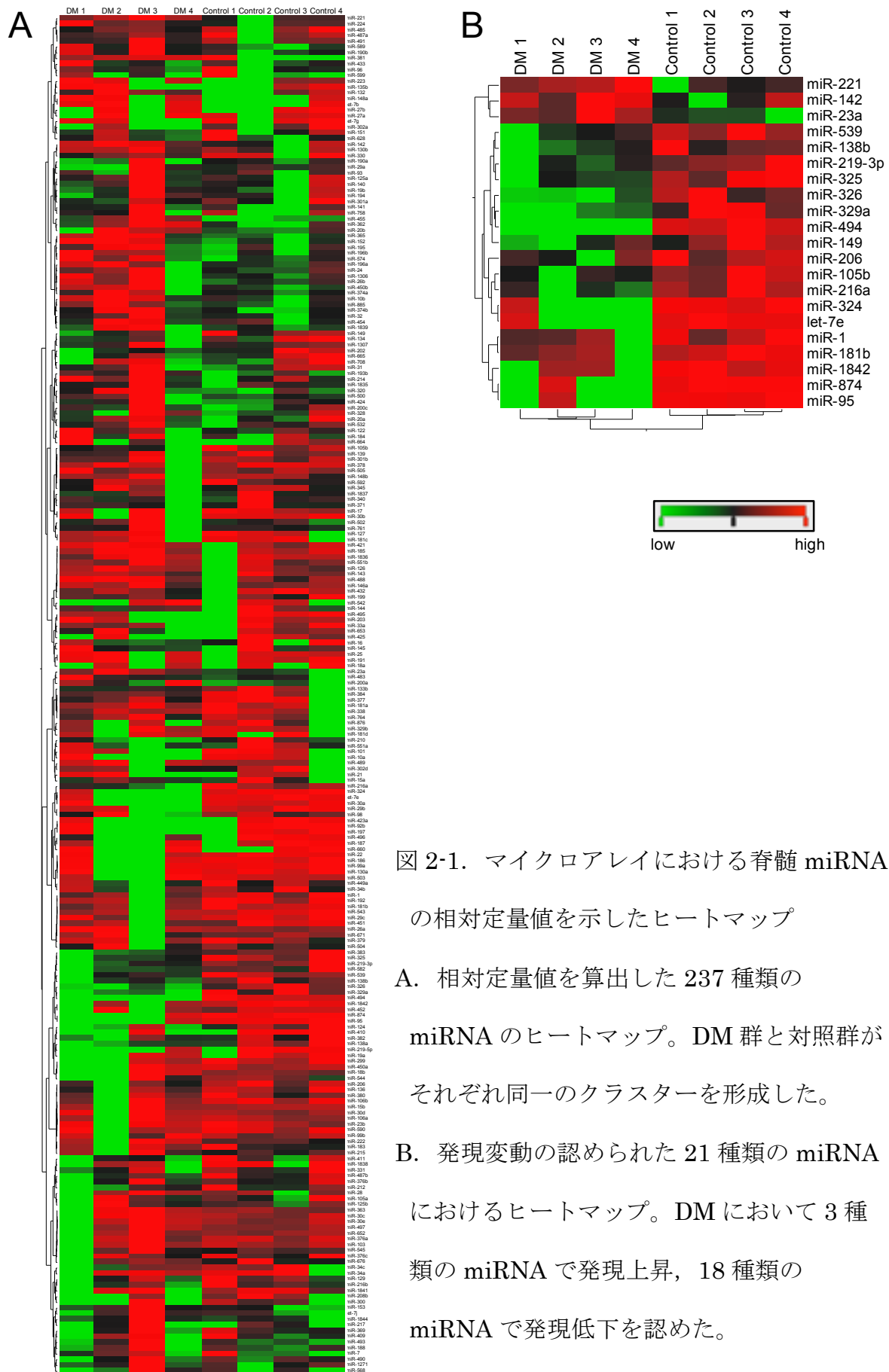


図 2-1. マイクロアレイにおける脊髄 miRNA の相対定量値を示したヒートマップ

A. 相対定量値を算出した 237 種類の miRNA のヒートマップ。DM 群と対照群がそれぞれ同一のクラスターを形成した。

B. 発現変動の認められた 21 種類の miRNA におけるヒートマップ。DM において 3 種類の miRNA で発現上昇、18 種類の miRNA で発現低下を認めた。

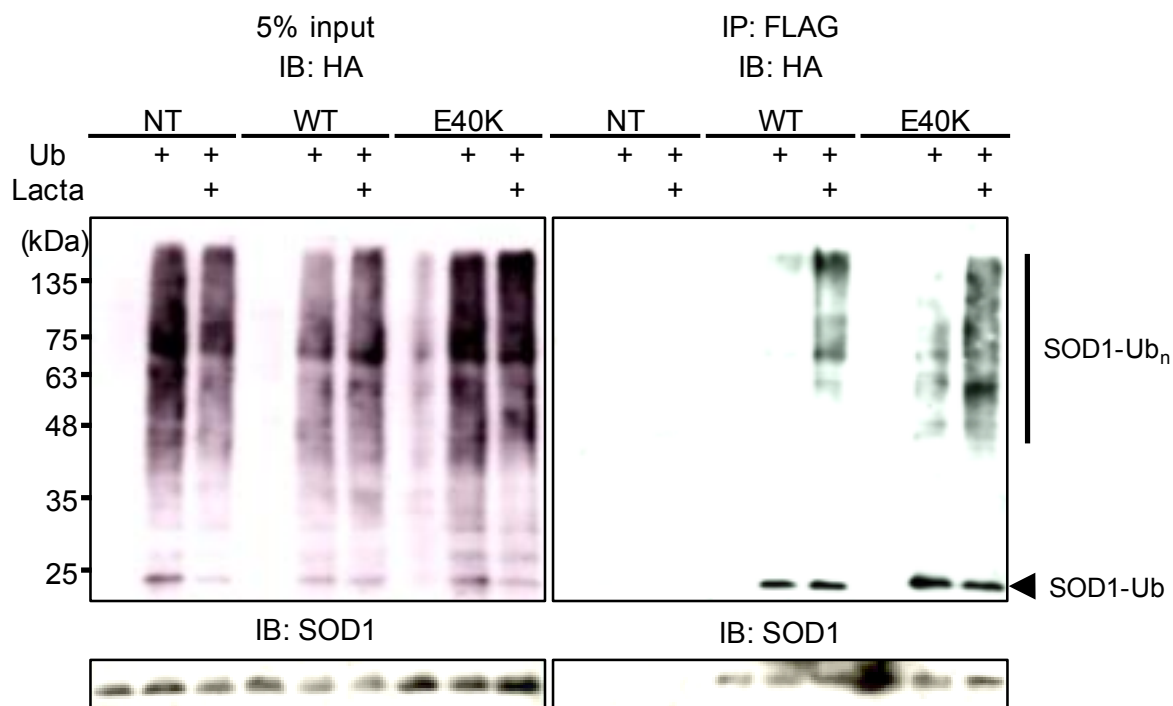


図 2-2. 免疫沈降法およびウエスタンブロットによるイヌ SOD1 蛋白のポリユビキチン化の解析

抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により，導入したイヌ SOD1 と結合したユビキチン蛋白をウエスタンブロットにより検出した。イヌ SOD1 蛋白およびユビキチンの共導入により SOD1 蛋白に結合したユビキチン蛋白が検出された。また，ラクタシスチン添加群においてポリユビキチン化を示すスメア状のバンドが認められた。このスメア状のバンドは WT 導入細胞と比較して E40K 導入細胞で明瞭であった。

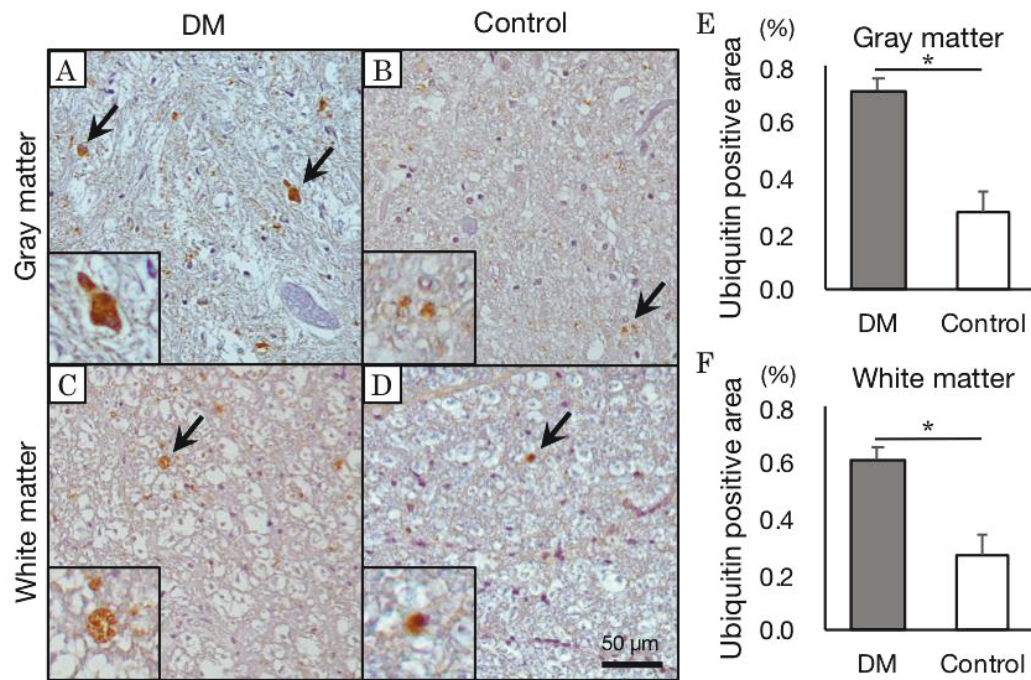


図 2-3. 尾側胸髄におけるユビキチンの免疫組織化学

DM 群 (A, C) および対照群 (B, D) における抗ユビキチン抗体による免疫組織化学。DM 群、対照群とも灰白質 (A, B) においては神経細胞内にユビキチンの陽性反応は認められず、神経網領域にユビキチン陽性の顆粒状構造物 (矢印) が認められた。白質 (C, D) においても同様のユビキチン陽性顆粒が散見された。ユビキチン陽性顆粒は、DM 群において対照群と比較して染色性が強く、大型の顆粒が認められた。Bar = 50 μm。DM 群におけるユビキチン陽性面積は灰白質 (E)、白質 (F) とも対照群と比較して有意に高値であった (Mann-Whitney の U 検定, $*P < 0.05$)。

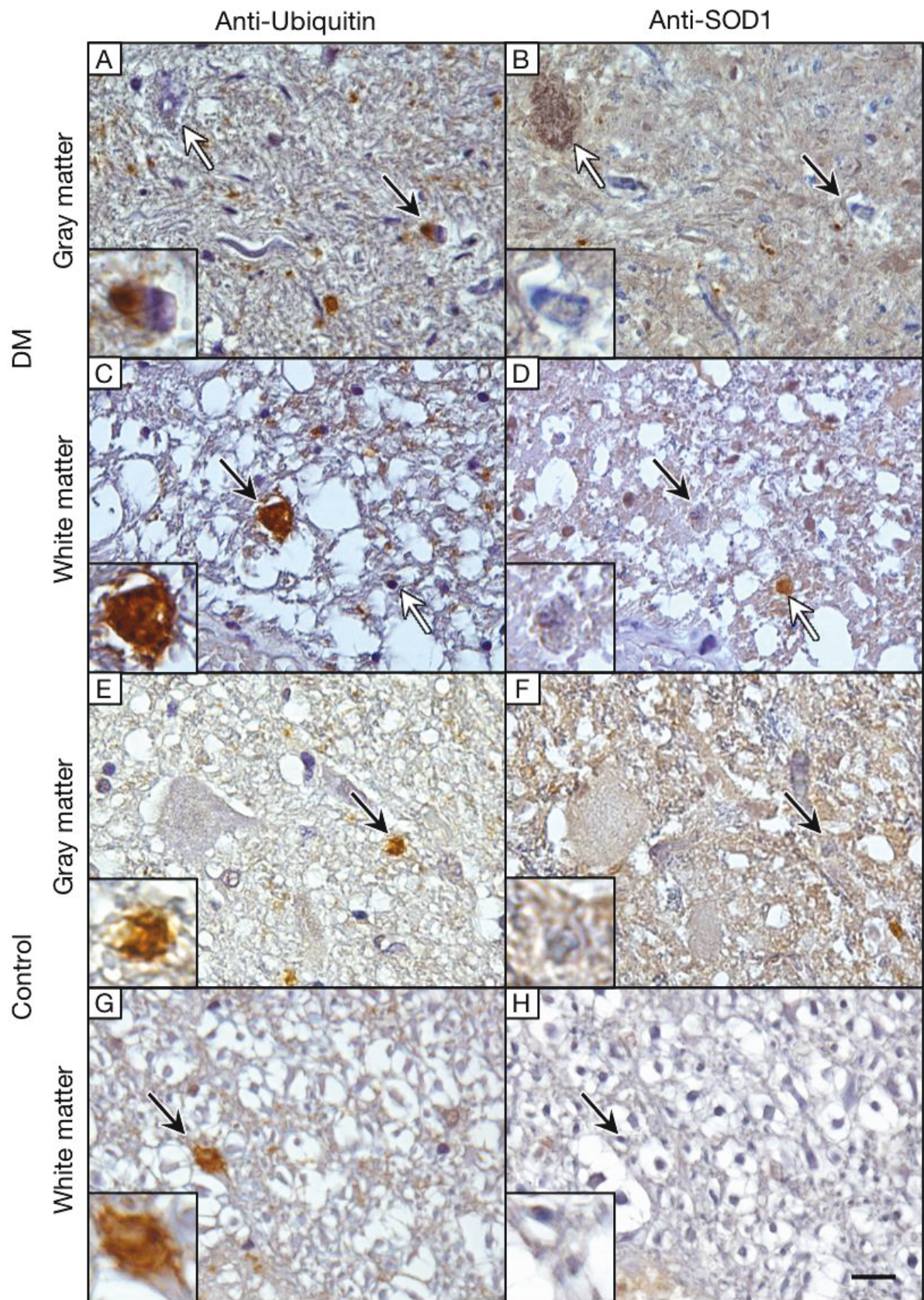


図 2-4. DM 群および対照群における尾側胸髄の連続切片によるユビキチンおよび SOD1 の免疫組織化学

抗ユビキチン抗体による免疫組織化学において DM 群および対照群の尾側胸髄の灰白質 (A, E) および白質 (C, G) で認められたユビキチン陽性顆粒において SOD1 の陽性反応は灰白質 (B, F), 白質 (D, H) とも認められなかった (黒矢印)。また, 抗 SOD 1 抗体による免疫組織化学により認められた神経細胞内の凝集体 (B) にユビキチンの陽性反応は認められなかった (白矢印)。また, 対照群の神経細胞は抗 SOD1 抗体に瀰漫性の陽性反応を認めたが (F), ユビキチンの陽性反応は認められなかった。Bar = 20 μ m。

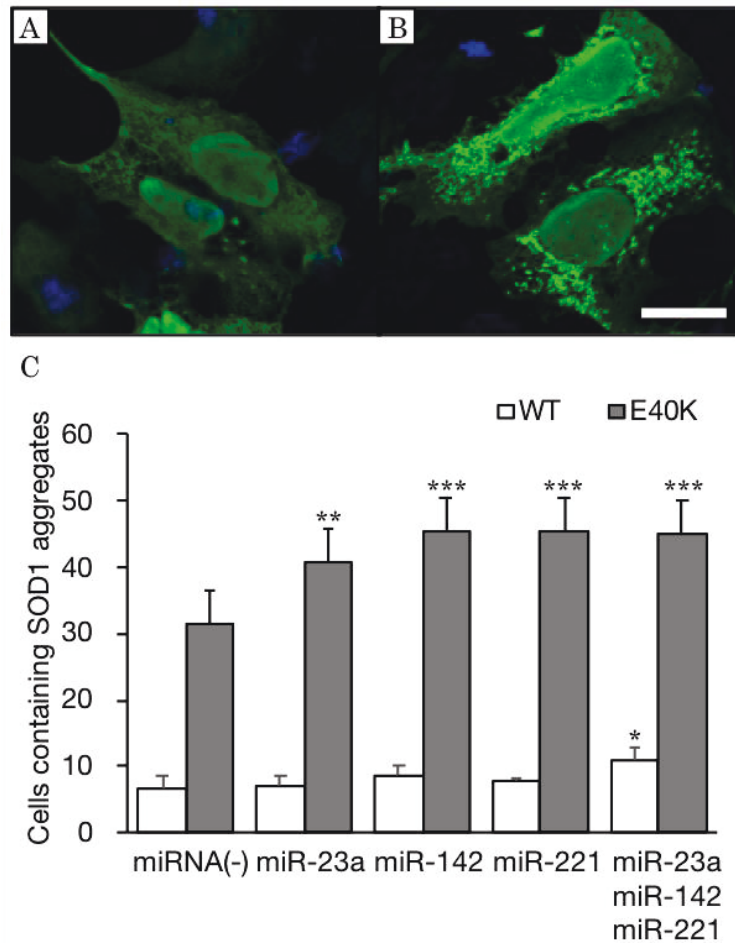


図 2-5. 免疫細胞化学による SOD1 蛋白の凝集体形成率の算出

イヌ SOD1 プラスミド導入 HEK293A 細胞における抗 FLAG 抗体による免疫細胞化学により，WT-SOD1 導入細胞（A）では細胞質内に瀰漫性の SOD1 蛋白の発現を認めた。E40K-SOD1 導入細胞では明瞭な凝集体の形成が認められた（B）。WT-SOD1 プラスミド導入細胞における凝集体の形成は miRNA 共導入未実施群と比較して miR-23a，miR-142 および miR-221 の 3 種類共導入群で有意に増加した。E40K-SOD1 導入細胞では miRNA 共導入未実施群と比較して miR-23a，miR-142，miR-221 それぞれの共導入群および 3 種類共導入群のいずれにおいても有意に増加した（C）。Bar = 20 μ m（Dunnett の検定，* P < 0.05，** P < 0.01，*** P < 0.005）

結論

イヌの DM は脊髄に発生する致死性かつ慢性進行性の神経変性疾患である。DM 症例には *SOD1* 遺伝子のミスセンス変異が認められ、脊髄神経細胞に SOD1 蛋白の凝集体が蓄積し、このことが脊髄の変性に関与していると考えられている。変異型 SOD1 蛋白は酵素活性を有していることから、DM は変異型 SOD1 蛋白による Gain of toxic function disease であると考えられている。しかし、*SOD1* 遺伝子が変異型ホモ接合体であっても DM を発症しない個体がいることが知られており、DM の確定診断は死後の病理組織学的検査によってのみ行われ、生前診断法は確立されていない。また、*SOD1* 遺伝子変異以外の要因も関与していることが示唆されているが、DM の病態発生メカニズムは明らかになっておらず、現在までに有効な治療法は確立されていない。

本博士論文の第 1 章では、DM の診断バイオマーカーを開発することを目的に研究を行なった。まず、DM 症例の血漿 miRNA のマイクロアレイ解析により、診断バイオマーカー候補 miRNA として、11 種類の発現上昇 miRNA および 7 種類の発現低下 miRNA を選出した。続いて 69 頭の PWC の血漿 miRNA の測定により DM の診断精度を評価することで、miR-26b, miR-98, miR-200c, miR-374a および miR-454 の 5 種類の miRNA が DM の診断に有用である可能性を示した。特に miR-26b は単独での診断特異度が高く、DM の臨床ステージと正の相関を有し、パスウェイ解析において *SOD1* 遺伝子の発現との関与が示唆されたことから、従来の DM の診断方法と組み合わせることにより生前診断の精度の向上が期待できると考えられた。特に、除外診断が成立しない症例において DM の併発可能性の評価や、高次画像診断が実施できない一次診療施設における有用性が期待される。また、同一個体の miRNA を継時的に測定し、DM の臨床ステージや未発症 A/A 個体の DM

発症の有無を評価することにより，DM の病態進行バイオマーカーや発症前診断バイオマーカーとして利用できる可能性がある。そして，miR-26b をはじめとする miRNA の機能を解析することにより，DM の病態メカニズムの解明に寄与できると考えられた。

第 2 章では miRNA が関連する DM の病態メカニズムを解明することを目的に研究を行なった。まず，DM 症例の脊髄 miRNA のマイクロアレイ解析を行い，3 種類の発現上昇 miRNA および 18 種類の発現低下 miRNA を選出した。続いて，miRNA の機能予測を遺伝子オントロジー解析によって行い，DM が SOD1 蛋白の gain of toxic function disease であることに着目し，miRNA を介したユビキチン化異常が DM の発症に関与していると仮説を立てた。イヌ SOD1 遺伝子の導入細胞における免疫沈降法およびウエスタンブロットにより，ミスフォールドしたイヌ SOD1 蛋白はポリユビキチン化されることによりプロテアソームで処理され，変異型 SOD1 蛋白は野生型 SOD1 蛋白よりユビキチン化を受けやすいことを明らかにした。また，DM 症例の脊髄における免疫組織化学により，蛋白のユビキチン化が亢進しているにも関わらず，ユビキチンと SOD1 蛋白との共局在が認められないことを明らかにし，DM 症例では SOD1 蛋白のユビキチン化機能が低下していることを示した。そして，DM 症例の脊髄で発現上昇を認めた miR-23a，miR-142 および miR-221 とイヌ SOD1 プラスミドを共導入した細胞の免疫細胞化学により，変異型 SOD1 蛋白の凝集体形成が促進されることを明らかにした。以上の結果より，DM 症例においては miRNA の発現上昇により SOD1 蛋白のユビキチン化に異常を引き起こし，SOD1 蛋白の凝集体形成を誘導する可能性がある。このメカニズムは DM の病態に重要な役割を果たすと考えられた。ALS においてはユビキチン化されたヒトの変異型 SOD1 蛋白の蓄積が病態に関与することが示唆されているが，DM におけるイヌの変異型 SOD1 蛋白はユビキチン化されず凝集体を形成することから，

ALS と DM では異なる病態メカニズムが存在する可能性を示している。ALS と DM の変異型 SOD1 蛋白におけるミスフォールド様式，ユビキチン化メカニズム，UPS 機能などを比較することにより，DM だけでなく ALS においても病態の解明や新規治療法の開発に役立つことが期待される。

本研究における血漿 miRNA および脊髄 miRNA のマイクロアレイ結果は，今後イヌにおける miRNA の基礎データとして有用である。血漿 miRNA の解析は生前診断法が確立していない DM において診断精度を向上させることにより，DM の発症初期からの治療介入に役立てることが可能になると期待される。また，脊髄 miRNA による SOD1 蛋白の凝集体形成効果は DM の病態発生メカニズムに深く関与している可能性が示された。このことから，miRNA による治療や UPS 機能強化などが DM の新規治療戦略の標的となることが期待される。本研究は，イヌの神経変性疾患である DM において診断法の確立および病態解明において miRNA の解析が有用であることを明らかにした。

謝辞

本論文の作成にあたり，終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました岐阜大学応用生物科学部准教授 神志那弘明先生，教授 前田貞俊先生に深く感謝を申し上げます。

本論文の草稿をご校閲くださいました岩手大学農学部教授 山本欣郎先生，帯広畜産大学畜産学部教授 山岸則夫先生，岩手大学農学部教授 宇塚雄次先生，東京農工大学農学部准教授 清水美希先生に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたりご指導を賜りました，岐阜大学連合創薬医療情報研究科助教 平島一輝先生，岐阜大学応用生物科学部助教 小畠結先生，岐阜大学応用生物科学部准教授 酒井洋樹先生，鹿児島大学共同獣医学部教授 大和修先生，鹿児島大学共同獣医学部附属動物病院特任助教 古澤悠先生，大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 准教授 西田英高先生，岐阜大学応用生物科学部助教 川部美史先生，岐阜大学応用生物科学部助教 岩田宗峻先生に深く感謝いたします。

DM 症例の採血および献体にご協力いただいた飼い主の皆様，臨床獣医師の皆様，そして DM 犬および健常犬に深謝致します。

最後になりましたが，日頃より研究に際して多大なご協力をくださいました岐阜大学獣医臨床放射線学研究室の学生の皆様および技術補佐員の皆様に心より御礼申し上げます。

文献

- 1) Arshad, A. R., Sulaiman, S. A., Saperi, A. A., Jamal, R., Mohamed Ibrahim, N. and Abdul Murad, N. A. (2017). Micrnas and target genes as biomarkers for the Diagnosis of Early Onset of Parkinson Disease. *Front Mol Neurosci.* 10, 352.
- 2) Averill, D. R. (1973). Degenerative myelopathy in the aging German Shepherd dog: clinical and pathologic findings. *J Am Vet Med Assoc.* 162, 1045-1051.
- 3) Awano, T., Johnson, G. S., Wade, C. M., Katz, M. L., Johnson, G. C., Taylor, J. F., Perloski, M., Biagi, T., Baranowska, I., Long, S., March, P. A., Olby, N. J., Shelton, G. D., Khan, S., O'Brien, D. P., Lindblad-Toh, K. and Coates, J. R. (2009). Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 2794-2799.
- 4) Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116, 281-297.
- 5) Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B. and Cohen, S. M. (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell.* 113, 25-36.
- 6) Brites, D. and Fernandes, A. (2015). Neuroinflammation and depression: microglia activation, extracellular microvesicles and microrna dysregulation. *Front Cell Neurosci.* 9, 476.
- 7) Bruijn, L. I., Houseweart, M. K., Kato, S., Anderson, K. L., Anderson, S. D., Ohama, E., Reaume, A. G., Scott, R. W. and Cleveland, D. W. (1998). Aggregation

and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science*. 281, 1851-1854.

8) Butovsky, O., Siddiqui, S., Gabriely, G., Lanser, A. J., Dake, B., Murugaiyan, G., Doykan, C. E., Wu, P. M., Gali, R. R., Iyer, L. K., Lawson, R., Berry, J., Krichevsky, A. M., Cudkowicz, M. E. and Weiner, H. L. (2012). Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *J Clin Invest*. 122, 3063-3087.

9) Chang, H. S., Kamishina, H., Mizukami, K., Momoi, Y., Katayama, M., Rahman, M. M., Uddin, M. M., Yabuki, A., Kohyama, M. and Yamato, O. (2013). 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. *J Vet Med Sci*. 75, 795-798.

10) Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F. and Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 303, 83-86.

11) Cheng, L., Quek, C. Y., Sun, X., Bellingham, S. A. and Hill, A. F. (2013). The detection of microRNA associated with Alzheimer's disease in biological fluids using next-generation sequencing technologies. *Front Genet*. 4, 150.

12) Ciechanover, A. and Kwon, Y. T. (2015). Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp Mol Med*. 47, e147.

13) Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C. G., Kipps, T. J., Negrini, M. and Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16

induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 13944-13949.

14) Cloutier, F., Marrero, A., O'Connell, C. and Morin, P. (2015). MicroRNAs as potential circulating biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Neurosci.* 56, 102-112.

15) Coates, J. R., March, P. A., Oglesbee, M., Ruaux, C. G., Olby, N. J., Berghaus, R. D., O'Brien, D. P., Keating, J. H., Johnson, G. S. and Williams, D. A. (2007). Clinical characterization of a familial degenerative myelopathy in Pembroke Welsh Corgi dogs. *J Vet Intern Med.* 21, 1323-1331.

16) Coates, J. R. and Winger, F. A. (2010). Canine degenerative myelopathy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 40, 929-950.

17) Comyn, S. A., Chan, G. T. and Mayor, T. (2014). False start: cotranslational protein ubiquitination and cytosolic protein quality control. *J Proteomics.* 100, 92-101.

18) Crisp, M. J., Beckett, J., Coates, J. R. and Miller, T. M. (2013). Canine degenerative myelopathy: biochemical characterization of superoxide dismutase 1 in the first naturally occurring non-human amyotrophic lateral sclerosis model. *Exp Neurol.* 248, 1-9.

19) Dennissen, F. J., Kholod, N. and van Leeuwen, F. W. (2012). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: culprit, accomplice or victim? *Prog Neurobiol.* 96, 190-207.

20) Freischmidt, A., Muller, K., Zondler, L., Weydt, P., Volk, A. E., Bozic, A. L., Walter, M., Bonin, M., Mayer, B., von Arnim, C. A., Otto, M., Dieterich, C., Holzmann, K., Andersen, P. M., Ludolph, A. C., Danzer, K. M. and Weishaupt, J. H. (2014). Serum microRNAs in patients with genetic amyotrophic lateral

sclerosis and pre-manifest mutation carriers. *Brain*. 137, 2938-2950.

21) Freischmidt, A., Müller, K., Zondler, L., Weydt, P., Volk, A. E., Božič, A. L., Walter, M., Bonin, M., Mayer, B., von Arnim, C. A., Otto, M., Dieterich, C., Holzmann, K., Andersen, P. M., Ludolph, A. C., Danzer, K. M. and Weishaupt, J. H. (2014). Serum microRNAs in patients with genetic amyotrophic lateral sclerosis and pre-manifest mutation carriers. *Brain*. 137, 2938-2950.

22) Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B. and Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 19, 92-105.

23) Gaitero, L., Russell, S. J., Monteith, G. and LaMarre, J. (2016). Expression of microRNAs miR-21 and miR-181c in cerebrospinal fluid and serum in canine meningoencephalomyelitis of unknown origin. *Vet J*. 216, 122-124.

24) Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X. and et al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 264, 1772-1775.

25) Hegde, A. N. and Upadhyay, S. C. (2011). Role of ubiquitin-proteasome-mediated proteolysis in nervous system disease. *Biochim Biophys Acta*. 1809, 128-140.

26) Heishima, K., Mori, T., Ichikawa, Y., Sakai, H., Kuranaga, Y., Nakagawa, T., Tanaka, Y., Okamura, Y., Masuzawa, M., Sugito, N., Murakami, M., Yamada, N., Akao, Y. and Maruo, K. (2015). MicroRNA-214 and microRNA-126 are potential biomarkers for malignant endothelial proliferative diseases. *Int J Mol Sci*. 16, 25377-25391.

- 27) Huang da, W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 4, 44-57.
- 28) Ivansson, E. L., Megquier, K., Kozyrev, S. V., Murén, E., Körberg, I. B., Swofford, R., Koltoonian, M., Tonomura, N., Zeng, R., Kolichski, A. L., Hansen, L., Katz, M. L., Johnson, G. C., Johnson, G. S., Coates, J. R. and Lindblad-Toh, K. (2016). Variants within the SP110 nuclear body protein modify risk of canine degenerative myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113, E3091-3100.
- 29) Junn, E., Lee, K. W., Jeong, B. S., Chan, T. W., Im, J. Y. and Mouradian, M. M. (2009). Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 13052-13057.
- 30) Kabaria, S., Choi, D. C., Chaudhuri, A. D., Mouradian, M. M. and Junn, E. (2015). Inhibition of miR-34b and miR-34c enhances alpha-synuclein expression in Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 589, 319-325.
- 31) Kato, S., Nakashima, K., Horiuchi, S., Nagai, R., Cleveland, D. W., Liu, J., Hirano, A., Takikawa, M., Kato, M., Nakano, I., Sakoda, S., Asayama, K. and Ohama, E. (2001). Formation of advanced glycation end-product-modified superoxide dismutase-1 (SOD1) is one of the mechanisms responsible for inclusions common to familial amyotrophic lateral sclerosis patients with SOD1 gene mutation, and transgenic mice expressing human SOD1 gene mutation. *Neuropathology.* 21, 67-81.
- 32) Kleiger, G. and Mayor, T. (2014). Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system. *Trends Cell Biol.* 24, 352-359.
- 33) Kobatake, Y., Sakai, H., Tsukui, T., Yamato, O., Kohyama, M., Sasaki, J.,

- Kato, S., Urushitani, M., Maeda, S. and Kamishina, H. (2017). Localization of a mutant SOD1 protein in E40K-heterozygous dogs: Implications for non-cell-autonomous pathogenesis of degenerative myelopathy. *J Neurol Sci.* 372, 369-378.
- 34) Kumar, P., Dezso, Z., MacKenzie, C., Oestreicher, J., AgoulNIK, S., Byrne, M., Bernier, F., Yanagimachi, M., Aoshima, K. and Oda, Y. (2013). Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS One.* 8, e69807.
- 35) Lovett, M. C., Coates, J. R., Shu, Y., Oglesbee, M. J., Fenner, W. and Moore, S. A. (2014). Quantitative assessment of hsp70, IL-1 β and TNF- α in the spinal cord of dogs with E40K SOD1-associated degenerative myelopathy. *Vet J.* 200, 312-317.
- 36) March, P. A., Coates, J. R., Abyad, R. J., Williams, D. A., O'Brien, D. P., Olby, N. J., Keating, J. H. and Oglesbee, M. (2009). Degenerative myelopathy in 18 Pembroke Welsh Corgi dogs. *Vet Pathol.* 46, 241-250.
- 37) Mestdagh, P., Van Vlierberghe, P., De Weer, A., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F. and Vandesompele, J. (2009). A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 10, R64.
- 38) Miller, A. D., Barber, R., Porter, B. F., Peters, R. M., Kent, M., Platt, S. R. and Schatzberg, S. J. (2009). Degenerative myelopathy in two Boxer dogs. *Vet Pathol.* 46, 684-687.
- 39) Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogossova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B. and Tewari, M. (2008).

Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 10513-10518.

40) Munch, C. and Bertolotti, A. (2010). Exposure of hydrophobic surfaces initiates aggregation of diverse ALS-causing superoxide dismutase-1 mutants. *J Mol Biol*. 399, 512-525.

41) Nakamae, S., Kobatake, Y., Suzuki, R., Tsukui, T., Kato, S., Yamato, O., Sakai, H., Urushitani, M., Maeda, S. and Kamishina, H. (2015). Accumulation and aggregate formation of mutant superoxide dismutase 1 in canine degenerative myelopathy. *Neuroscience*. 303, 229-240.

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

43) Ogawa, M., Uchida, K., Yamato, O., Inaba, M., Uddin, M. M. and Nakayama, H. (2014). Neuronal loss and decreased GLT-1 expression observed in the spinal cord of Pembroke Welsh Corgi dogs with canine degenerative myelopathy. *Vet Pathol*. 51, 591-602.

44) Ogawa, M., Uchida, K., Yamato, O., Mizukami, K., Chambers, J. K. and Nakayama, H. (2015). Expression of autophagy-related proteins in the spinal cord of Pembroke Welsh Corgi dogs with canine degenerative myelopathy. *Vet Pathol*. 52, 1099-1107.

45) Oyake, K., Kobatake, Y., Shibata, S., Sakai, H., Saito, M., Yamato, O., Kushida, K., Maeda, S. and Kamishina, H. (2016). Changes in respiratory function in Pembroke Welsh Corgi dogs with degenerative myelopathy. *J Vet Med*

Sci. 78, 1323-1327.

46) Pfahler, S., Bachmann, N., Fechler, C., Lempp, C., Baumgartner, W. and Distl, O. (2014). Degenerative myelopathy in a SOD1 compound heterozygous Bernese mountain dog. *Anim Genet.* 45, 309-310.

47) Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. F., Wilcox, H. M., Flood, D. G., Beal, M. F., Brown, R. H., Jr., Scott, R. W. and Snider, W. D. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet.* 13, 43-47.

48) Riancho, J., Vazquez-Higuera, J. L., Pozueta, A., Lage, C., Kazimierczak, M., Bravo, M., Calero, M., Gonzalez, A., Rodriguez, E., Lleo, A. and Sanchez-Juan, P. (2017). MicroRNA profile in patients with Alzheimer's disease: Analysis of miR-9-5p and miR-598 in raw and exosome enriched cerebrospinal fluid samples. *J Alzheimers Dis.* 57, 483-491.

49) Riffo-Campos, Á., Riquelme, I. and Brebi-Mieville, P. (2016). Tools for sequence-based miRNA target prediction: What to choose? *Int J Mol Sci.* 17.

50) Rinchetti, P., Rizzuti, M., Faravelli, I. and Corti, S. (2017). MicroRNA metabolism and dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol.*

51) Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X. and et al. (1993).

Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 362, 59-62.

52) Sharma, N. and Singh, A. N. (2016). Exploring biomarkers for Alzheimer's disease. *J Clin Diagn Res.* 10, KE01-06.

- 53) Sheinerman, K. S. and Umansky, S. R. (2013). Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. *Front Cell Neurosci.* 7, 150.
- 54) Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Siddique, T., Deng, H. X., Hung, W. Y., Kato, T. and Asayama, K. (1996). Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55, 481-490.
- 55) Silva, S. S., Lopes, C., Teixeira, A. L., Carneiro de Sousa, M. J. and Medeiros, R. (2015). Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci Int Genet.* 14, 1-10.
- 56) Tan, J. Y. and Marques, A. C. (2014). The miRNA-mediated cross-talk between transcripts provides a novel layer of posttranscriptional regulation. *Adv Genet.* 85, 149-199.
- 57) Urushitani, M., Kurisu, J., Tsukita, K. and Takahashi, R. (2002). Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 83, 1030-1042.
- 58) Wakabayashi, K., Mori, F., Kakita, A., Takahashi, H., Utsumi, J. and Sasaki, H. (2014). Analysis of microRNA from archived formalin-fixed paraffin-embedded specimens of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun.* 2, 173.
- 59) Wininger, F. A., Zeng, R., Johnson, G. S., Katz, M. L., Johnson, G. C., Bush, W. W., Jarboe, J. M. and Coates, J. R. (2011). Degenerative myelopathy in a

Bernese Mountain Dog with a novel SOD1 missense mutation. *J Vet Intern Med.* 25, 1166-1170.

60) Zeng, R., Coates, J. R., Johnson, G. C., Hansen, L., Awano, T., Kolicheski, A., Ivansson, E., Perloski, M., Lindblad-Toh, K., O'Brien, D. P., Guo, J., Katz, M. L. and Johnson, G. S. (2014). Breed distribution of SOD1 alleles previously associated with canine degenerative myelopathy. *J Vet Intern Med.* 28, 515-521.