

氏名(本(国)籍)	中 田 浩 平(岡山県)		
主指導教員氏名	岐阜大学 准教授 神志那 弘 明		
学位の種類	博士(獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第547号		
学位授与年月日	令和元年9月20日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学位論文題目	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		
審査委員	主査	岩手大学	教授 山本欣郎
	副査	帯広畜産大学	教授 山岸則夫
	副査	岩手大学	教授 宇塚雄次
	副査	東京農工大学	准教授 清水美希
	副査	岐阜大学	准教授 神志那弘明

#### 学位論文の内容の要旨

イヌのスーパーオキシドジスムターゼ1(SOD1)関連変性性脊髄症(DM)は高齢で発症する慢性進行性の致死性神経変性疾患である。日本国内ではペンブロック・ウェルシュ・コーギー(PWC)での発症が多く、SOD1遺伝子を変異型ホモ接合体で有することから、変異型SOD1蛋白がDMの病態に深く関与すると考えられている。変異型SOD1蛋白は酵素活性を有しており、DM症例の脊髄神経細胞内にSOD1蛋白の凝集体を形成することからSOD1蛋白のGain of toxic function diseaseであると考えられている。しかし、SOD1遺伝子の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から、遺伝子検査だけではDMを診断することはできない。現在、DMの確定診断は病理組織学的検査によってなされており、生前診断法は確立していない。また、DM未発症のSOD1遺伝子変異型ホモ接合体やヘテロ接合体の個体でも脊髄の変性が起こることが示されており、DMの発症にはSOD1遺伝子以外の要因の関与も示唆されているが、そのメカニズムは明らかになっていない。本研究では、生体内に広く分布し、生体内環境を反映して発現プロファイルが変動することが知られるマイクロRNA(miRNA)に着目し、DMの生前診断バイオマーカーの開発と病態解明を行なった。

第1章では、DMの生前診断バイオマーカーの開発を行なった。まず、DM症例4頭、野生型コントロール4頭のPWCから血漿miRNAを抽出し、マイクロアレイ解析およびパスウェイ解析により診断バイオマーカー候補miRNAを選出した。続いて選出したmiRNAの血漿中相対発現量をDM症例18頭、健常コントロール46頭および疾患コントロール5頭のPWCで測定し、受信者動作特性(ROC)曲線解析および多変量解析により各miRNAのDMに対する診断精度を評価した。また、各miRNAの発現量とSOD1遺伝子型およびDMの臨床ステージとの相関を解析した。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。臨床例における診断バイオマーカー候補 miRNA の測定により、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ことを明らかにした。特に miR-26b は単独での診断特異度が最も高く、DM の臨床ステージと正の相関を持ち、SOD1 遺伝子の発現との関与が示唆されたことから、診断バイオマーカーとしての有用性が高いと考えられた。これらの miRNA の測定を従来の DM の診断方法と組み合わせることにより、DM の生前診断の精度の向上が期待される。

第 2 章では miRNA が関連する DM の病態メカニズムの解明を行なった。まず、DM 症例 4 頭、野生型コントロール 4 頭の脊髄 miRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を実施した。続いて、発現変動を認めた miRNA 群の機能を遺伝子オントロジー (GO) 解析により推定した。予測した機能に関して、イヌ SOD1 遺伝子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、DM 症例の脊髄における免疫組織化学によりユビキチン蛋白と SOD1 蛋白との関連を評価した。そして、DM 症例で発現上昇を認めた miRNA とイヌ SOD1 遺伝子を共導入した培養細胞により SOD1 蛋白の凝集体形成に与える影響を評価した。マイクロアレイ解析により DM 症例の脊髄において 3 種類の発現上昇 miRNA および 18 種類の発現低下 miRNA を検出した。GO 解析により予測された miRNA 群の機能から、SOD1 蛋白のユビキチン化に着目した。遺伝子導入培養細胞においてイヌの変異型 SOD1 蛋白はポリユビキチン化を受け、プロテアソームにより処理されることが明らかになった。しかし、DM 症例の脊髄においてはユビキチン化が亢進しているにも関わらず、神経細胞内の SOD1 蛋白の凝集体にユビキチン化は認められなかった。一方、miRNA とイヌ SOD1 遺伝子導入培養細胞において DM 症例で発現上昇を認めた miR-23a, miR-142 および miR-221 は SOD1 蛋白の凝集体形成を促進した。したがって、miRNA の発現上昇が 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と考えられた。

本研究では、血漿 miRNA が DM の診断バイオマーカーとして有用であることを示し、慢性進行性の DM に対して生前診断となるバイオマーカーの開発は DM の早期治療の開始に重要であると考えられる。また、miRNA によるイヌ SOD1 蛋白の凝集体形成促進作用は、DM の病態メカニズムにおいて重要な現象であると考えられ、新規治療戦略の標的となることが期待される。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究はイヌのスーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) 関連変性性脊髄症 (DM) の診断バイオマーカーの開発と病態メカニズムの解明を目的とし、血漿および脊髄のマイクロ RNA (miRNA) のプロファイル解析、パスウェイ解析、遺伝子オントロジー (GO) 解析、in vitro モデルを用いた遺伝子導入実験、および摘出脊髄の免疫組織化学を行った。

第 1 章では、DM 症例の血漿 miRNA のプロファイル解析を行ない、DM 症例において発現変動を認めた miRNA を示した。臨床例を用いて診断バイオマーカー候補 miRNA の診断精度を評価した結果、miR-26b, miR-98, miR-200c, miR-374a および miR-454 の 5 種類の miRNA が DM の診断に有用であった。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示し、SOD1 遺伝子の発現との関与が示唆されたことから、診断バイオマーカーとしての有用性が高いことを明らかにした。

第 2 章では、DM 症例の摘出脊髄における miRNA のプロファイル解析を行い、発現変動を認めた miRNA 群の機能を GO 解析により推定した。その結果、蛋白のユビキチン化に着目した。続いて、イヌ SOD1 遺伝子を導入した DM の in vitro モデルを用いて SOD1 蛋白がポリユビキチン化され、プロテアソーム処理を受けることを示した。しかし、DM 症例の脊髄の

免疫組織化学では、脊髄においては SOD1 蛋白がユビキチンと共局在しないことが示された。一方、DM 症例で発現上昇を認めた miR-23a, miR-142 および miR-221 とイヌ SOD1 遺伝子を培養細胞に共導入すると、SOD1 蛋白の凝集体形成が亢進した。これらの結果から、DM 症例では miRNA の発現上昇が SOD1 蛋白のポリ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と考えられた。この新たな病態メカニズムは DM の発症を誘発する可能性があり、DM の病態に重要な役割を果たすと考えられた。

本研究は DM の診断バイオマーカーを開発し、SOD1 蛋白の凝集体形成に関わる新たな病態メカニズムを明らかにした。今後 DM の治療法を開発する上で、生前診断法の確立と凝集体形成メカニズムの解明は重要であると判断される。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Plasma microRNA miR-26b as a potential diagnostic biomarker of degenerative myelopathy in Pembroke Welsh Corgis  
著 者 名 : Nakata, K., Heishima, K., Sakai, H., Yamato, O., Furusawa, Y., Nishida, H., Maeda, S. and Kamishina, H.  
学術雑誌名 : BMC Veterinary Research  
巻・号・頁・発行年 : 15 (1), 2019

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Vertebral replacement for the treatment of vertebral osteosarcoma in a cat  
著 者 名 : Nakata, K., Miura, H., Sakai, H., Mori, T., Shibata, S., Nishida, H., Maeda, S. and Kamishina, H.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 79 (6) : 999-1002, 2017
- 2) 題 目 : Fluorescein sodium-guided resection of intracranial lesions in 22 dogs  
著 者 名 : Nakano, Y., Nakata, K., Shibata, S., Heishima, Y., Nishida, H., Sakai, H., Yano, H. and Kamishina, H.  
学術雑誌名 : Veterinary Surgery  
巻・号・頁・発行年 : 47 (2) : 302-309, 2018
- 3) 題 目 : Activation of the unfolded protein response in canine degenerative myelopathy  
著 者 名 : Yokota, S., Kobatake, Y., Noda, Y., Nakata, K., Yamato, O., Hara, H., Sakai, H., Nishida, H., Maeda, S. and Kamishina, H.  
学術雑誌名 : Neuroscience Letters  
巻・号・頁・発行年 : 687 : 216-222, 2018
- 4) 題 目 : A novel patient-specific drill guide template for stabilization of thoracolumbar vertebrae of dogs: cadaveric study and clinical

cases

著者名 : Fujioka, T., Nakata, K., Nishida, H., Sugawara, T., Konno, N.,  
Maeda, S. and Kamishina, H.

学術雑誌名 : Veterinary Surgery

巻・号・頁・発行年 : 48 (3) : 336-342, 2019

5) 題 目 : Clinical application of 3D printing technology to the surgical  
treatment of atlantoaxial subluxation in small breed dogs

著者名 : Kamishina, H., Sugawara, T., Nakata, K., Nishida, H., Yada, N.,  
Fujioka, T., Nagata, Y., Doi, A., Konno, N., Uchida, F. and  
Maeda, S.

学術雑誌名 : PLoS One

巻・号・頁・発行年 : 14 (5), 2019

6) 題 目 : Identification of reference genes for microRNAs of extracellular  
vesicles isolated from plasma samples of healthy dogs by  
ultracentrifugation, precipitation, and membrane affinity  
chromatography methods

著者名 : Narita, M., Nishida, H., Asahina, R., Nakata, K., Yano, H.,  
Ueda, T., Inden, M., Akiyoshi, H., Maeda, S. and Kamishina, H.

学術雑誌名 : American Journal of Veterinary Research

巻・号・頁・発行年 : 80 (5) : 449-454, 2019