

氏名(本籍)	山崎 睦美(東京都)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第 163 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文題名	高齢動物脳の病理学的解析
論文審査委員	(主査) 斑 目 広 郎 (副査) 坂 上 元 栄 上 家 潤 一

論 文 内 容 の 要 旨

緒言

獣医療の発達により動物の高齢化が進んでいる。ヒトでは高齢化社会において、アルツハイマー病(AD)を代表とする老齢性脳疾患の制御が重要な課題となっている。伴侶動物においても、加齢に伴い様々な脳病変が生じることが知られているが、その病態や発生機序について詳細は不明である。また、高齢なイヌとネコでみられる認知機能不全症候群は、それぞれ病理学的にみられる病変が異なる事が報告されている。このように動物の脳の高齢性病変は、種によりそれぞれに特徴的な変化が生じている可能性がある。本研究では、様々な動物種における高齢個体の脳について、比較病理学的に検索することを目的とした。

第 1 章 高齢動物の脳病変の病理学的検索

哺乳類 8 目 28 科および鳥類の各動物種の高齢と判断された年齢で斃死した症例について、哺乳類 155 例、鳥類 27 例の脳ホルマリン固定材料を対象に病理学的検索を行った。多くの症例では特定の疾患に分類される形態学的変化は認められなかったが、イヌ亜目と霊長目の動物においてヒトの AD で認められる老人斑様の好酸性均質無構造な沈着物を認める症例が存在した。AD の特徴病変であるアミロイド β (A β)沈着が高齢動物の脳にも様々な形態で生じていることが報告されている。本研究においても、高齢のイヌとリスザルに少数であるがアミロイドからなる老人斑様の構造を認めた。一方で、同じ食肉目であるネコ亜目の動物には老人斑様構造は認められなかった。また、イヌ、サル、インコで血管壁へのアミロイド沈着も認め、リスザルとインコでは脳出血が生じていた。以上の結果より動物種に特徴的な A β 沈着の様式が存在する可能性が示唆された。

特定の疾患として、フェネックで孔脳症、イエネコでタウオパチーを 1 症例ずつ認めた。孔脳症は牛や羊に発生することが多く、他の動物では稀な疾患であり、フェネックでは本研究が初の報告である。イエネコでは加齢性に、神経細胞内の 3R タウ/4R タウ型リン酸化タウの沈着と海馬における神経原線維変化を特徴とするアルツハイマー病に類似した病変が報告されている。本研究で明らかにしたイエネコのタウオパチーにも 3R タウ/4R タウ型リン酸化タウが沈着していたが、神経原線維変化は海馬だけでなく、大脳皮質、中脳の広範囲に分布していた。また、リン酸化タウの沈着は神経細胞だけでなく、ミクログリアと一部のオリゴデンドログリアにも認められた。以上の病理所見より、イエネコでは過去に報告のない非アルツハイマー型のタウオパチーと診断した。

第 2 章 高齢動物の脳の A β および高リン酸化タウ蓄積の検索

第 1 章において、動物種に特徴的な A β 沈着の様式が存在する可能性が示唆された。ヒトでは A β 沈着は AD に関連した病変と考えられている。そこで、第 1 章で検索した症例を対象に、各動物種の AD 類似の加齢性病変 (A β 沈着・リン酸化タウ蓄積・神経原線維変化) について免疫・特殊染色にて比較解析した。A β 沈着の量と沈着部位は種により異なっていた。A β 沈着は齧歯目、ウサギ目、奇蹄目、双前歯目、翼手目及びほとんどの鳥類では認められず、食肉目 (17 種 88 例)・霊長目 (8 種 18 例) で高頻度に観察された (その他 2 種 2 例)。霊長目は血管壁の A β 沈着 (CAA) を主体に認め、脳実質の沈着形態は亜目あるいは種によって異なっていた。食肉目は亜目ごとに特徴があり、イヌ亜目では、CAA 及び周囲との境界が不明瞭なび漫斑を主体に、種ごとに異なる沈着がみられる一方、ネコ亜目では 1 種 1 例を除き、び漫性の A β 沈着のみ認めた。ネコ亜目では沈着 A β は嗜銀性を示さず、Congo Red 染色陰性であり、アミロイド線維を形成していないことが示唆された。海馬における神経原線維変化はネコ亜目であるイエネコとチーターの 2 種 6 例でのみ認めた。リン酸化タウの蓄積は A β 沈着陽性であった 7 種 25 例に認めた。ネコ亜目では、イエネコ、チーター、ピューマの 3 種 21 例で高頻度にリン酸化タウの蓄積が観察された。

以上の結果より、AD 類似の加齢性病変には動物種差が存在することが明らかとなった。特にイエネコとチーターでは A β 沈着、リン酸化タウ蓄積、神経原線維変化と全ての AD 類似の加齢性病変が認められ、ヒトの AD 類似の病態の存在が示唆された。

第 3 章 動物の A β アミノ酸配列及びアミロイド線維形成性の解析

第 2 章で、ネコ亜目の A β 沈着はアミロイド線維を形成していないことが示唆された。アミロイド線維の形成には A β の二次構造を決定するアミノ酸配列が重要であることが報告されている。そのためネコ亜目の A β のアミノ酸配列が他種と異なることが考えられる。そこで本章では、ネコ亜目を含む様々な動物種のアミロイド前駆蛋白 (APP) 遺伝子の A β コード領域の配列と各 A β のアミロイド線維形成性を明らかにすることを目的とした。A β 領域の遺伝子配列は種間の保存性が高く、多くの動物種でヒトと共通であったが、ネコ亜目でのみヒトと一部異なっていた。ヒトとネコ亜目では APP 遺伝子にコー

ドされている A β の 7 残基目のアミノ酸が異なっており、ヒト A β は Asp、ネコ亜目 A β は Glu であった。ヒト A β とネコ亜目 A β の合成ペプチドを作成し、*in vitro* でアミロイド線維形成性を用いて比較したところ、ネコ亜目の A β はヒト A β と比較して有意に低い線維形成性を示した。また、形成された線維の超微形態も異なっており、ヒト A β は幅約 12nm の長く伸長した線維が絡み合った凝集物を多数形成するのに対し、ネコ亜目 A β は幅約 19nm の短い線維が散見され、凝集物の形成は僅かであった。これらの結果から、7 残基目のアミノ酸が Glu であることにより、ネコ亜目の A β のアミロイド線維形成性は著しく低いことが示された。

イエネコの A β 沈着部位を免疫走査型電子顕微鏡で観察したところ、粗で短い線維が独立して存在していた。一方、ヒトと同じ A β 配列を有するイヌでは、伸長した A β 線維が凝集して周囲へ広がる様に沈着していた。*in vitro* で示された A β の凝集性の違いが沈着形態の違いに影響していると考えられる。

第 4 章 ネコ科動物におけるタウのリン酸化関連因子の検索

A β 沈着形態及び A β アミノ酸配列はネコ亜目で共通するにもかかわらず、神経原線維変化はネコ科のイエネコとチーターにのみ認められた。これらの動物ではリン酸化タウの蓄積も高頻度に生じているが、同じネコ科に属するライオンやトラではリン酸化タウの蓄積はみられなかった。神経原線維変化は微小管結合タンパク質であるタウがリン酸化をうけ微小管から遊離することが起点となって生じることが報告されており、ネコ亜目間ではリン酸化タウが蓄積する過程に種差が考えられる。そこでネコ科を対象に、リン酸化および微小管結合に影響する発現アイソフォームおよびタウのリン酸化酵素である GSK3 β の発現を比較解析した。リン酸化タウの蓄積と神経原線維変化がみられた高齢のイエネコと病変のないイエネコ、A β 沈着がみられた高齢のライオンと病変のないライオンの脳から抽出した総タンパク質を、タウのアイソフォーム 3R タウと 4R タウに対する抗体を用いたウェスタンブロットで解析した。その結果、イエネコと高齢のライオンで 3R と 4R タウに相当するサイズにシグナルを検出した。イエネコでは 4R より 3R タウのシグナルが高く、ライオンではその逆であった。3R は 4R タウより微小管結合から遊離しやすい性質をもつことが報告されている。そのことから、ライオンと比較し、イエネコでは微小管から遊離したリン酸化タウが細胞内に多量に存在し、神経原線維変化へ至ることが考察された。タウのリン酸化酵素である GSK3 β の発現を免疫染色で観察したところ、イエネコ、チーター、ピューマの海馬においてび漫性に神経細胞に発現しており、一部の神経細胞にリン酸化タウとの共局在が確認された。しかし、ウェスタンブロットで活性化型 GSK3 β を検出したところ、リン酸化タウの蓄積の程度と相関した差は認められなかったことから、タウのリン酸化への関与は明らかにされなかった。

考察

様々な種の高齢動物の脳を解析し、A β 沈着は食肉目と霊長目で高頻度にみられ、その沈着形態や分布には種によって異なることを示した。特にネコ亜目ではアミロイド線維を伴わない A β 沈着が生じ、

イエネコとチーターに AD に類似する特徴的なリン酸化タウ蓄積と神経原線維変化が生じていた。本研究でネコ亜目の A β はアミロイド線維形成性が低いことが示され、A β の性状が沈着形態の違いに影響していると考えられる。AD では A β のアミロイド化が病理発生に重要とされている。しかし、イエネコとチーターではアミロイド線維の形成が無いにもかかわらず、AD 類似の加齢性病変であるリン酸化タウ蓄積と神経原線維変化が生じており、アミロイド形成を介さない病理発生機序が示唆された。だが、イエネコと同様の A β 沈着を呈しリン酸化タウの蓄積がないライオンにおけるタウの発現アイソフォームを比較したところ、イエネコでは微小管から遊離しやすいアイソフォームのタウ (3R タウ) を多く発現していた。これより、イエネコの神経細胞内には、ライオンより遊離したリン酸化タウが多く存在し、それが神経原線維変化の形成に寄与する可能性が示唆された。以上より、本研究ではネコ亜目動物でみられる AD 類似の加齢性病変は、AD とは異なる発生機序があることを示唆した。

論文審査の結果の要旨

獣医療の発達により動物の高齢化が進んでいる。ヒトでは高齢化社会において、アルツハイマー病 (AD) を代表とする老齢性脳疾患の制御が重要な課題となっている。伴侶動物においても、加齢に伴い様々な脳病変が生じることが知られているが、その病態や発生機序について詳細は不明である。また、高齢なイヌとネコでみられる認知機能不全症候群は、それぞれ病理学的にみられる病変が異なる事が報告されている。このように動物の脳の高齢性病変は、種によりそれぞれに特徴的な変化が生じている可能性がある。本研究は様々な動物種における高齢個体の脳について、比較病理学的に検索することを目的としている。本論文は 4 章から構成されている。

第 1 章では、哺乳類 8 目 28 科および鳥類の高齢で斃死した症例について、哺乳類 155 例、鳥類 27 例の脳ホルマリン固定材料を対象に病理学的検索を行った。多くの症例では特定の疾患に分類される形態学的変化は認められなかったが、イヌ亜目と霊長目の動物においてヒトの AD で認められる老人斑様の好酸性均質無構造な沈着物を認める症例が存在した。AD の特徴病変であるアミロイド β (A β) 沈着が高齢動物の脳にも様々な形態で生じていることが報告されている。本研究においても、高齢のイヌとリスザルに少数であるがアミロイドからなる老人斑様の構造を認めた。一方で、同じ食肉目であるネコ亜目の動物には老人斑様構造は認められなかった。また、イヌ、サル、インコで血管壁へのアミロイド沈着も認め、リスザルとインコでは脳出血が生じていた。以上の結果より動物種に特徴的な A β 沈着の様式が存在する可能性が示唆された。

特定の疾患として、フェネックで孔脳症、イエネコでタウオパチーを 1 症例ずつ認めた。孔脳症は牛や羊に発生することが多く、フェネックでは本研究が初の報告である。本研究で明らかにしたイエ

ネコのタウオパチーにはリン酸化タウが神経細胞だけでなく、ミクログリアと一部のオリゴデンドログリアに沈着し、神経原線維変化は海馬だけでなく、大脳皮質、中脳の広範囲に分布していた。これらの病理所見より、イエネコでは過去に報告のない非アルツハイマー型のタウオパチーと診断した。

第2章では、第1章において動物種に特徴的なA β 沈着の様式が存在する可能性が示唆されたことから、各動物種のAD類似の加齢性病変(A β 沈着・リン酸化タウ蓄積・神経原線維変化)について免疫・特殊染色にて比較解析した。その結果、A β 沈着の量と沈着部位は種により異なっていた。A β 沈着は齧歯目、ウサギ目、奇蹄目、双前歯目、翼手目及びほとんどの鳥類では認められず、食肉目(17種88例)・霊長目(8種18例)で高頻度に観察された(その他2種2例)。霊長目は血管壁のA β 沈着(CAA)を主体に認め、脳実質の沈着形態は亜目・あるいは種によって異なっていた。食肉目は亜目ごとに特徴があり、イヌ亜目では、CAA及び周囲との境界が不明瞭なび漫斑を主体に、種ごとに異なる沈着がみられる一方、ネコ亜目では1種1例を除き、び漫性のA β 沈着のみ認めた。ネコ亜目では沈着A β は嗜銀性を示さず、コンゴレッド染色陰性であり、アミロイド線維を形成していないことが示唆された。海馬における神経原線維変化はネコ亜目であるイエネコとチーターの2種6例でのみ認めた。リン酸化タウの蓄積はA β 沈着陽性であった7種25例に認めた。ネコ亜目では、イエネコ、チーター、ピューマの3種21例で高頻度にリン酸化タウの蓄積が観察された。以上の結果より、AD類似の加齢性病変には動物種差が存在することが明らかとなった。特にイエネコとチーターではA β 沈着、リン酸化タウ蓄積、神経原線維変化と全てのAD類似の加齢性病変が認められ、ヒトのAD類似の病態の存在が示唆された。

第3章では、ネコ亜目を含む様々な動物種のアミロイド前駆蛋白(APP)遺伝子のA β コード領域の配列と各A β のアミロイド線維形成性を明らかにすることを目的とした。第2章で、ネコ亜目のA β 沈着はアミロイド線維を形成していないことが示唆された。アミロイド線維の形成にはA β の二次構造を決定するアミノ酸配列が重要であることが報告されており、ネコ亜目のA β のアミノ酸配列が他種と異なることが考えられる。A β 領域の遺伝子配列を解析した結果、種間の保存性が高く、多くの動物種でヒトと共通であったが、ネコ亜目でのみヒトと一部異なっていた。ヒトとネコ亜目ではAPP遺伝子にコードされているA β の7残基目のアミノ酸が異なっており、ヒトA β はAsp、ネコ亜目A β はGluであった。ヒトA β とネコ亜目A β の合成ペプチドを作成し、*in vitro*でアミロイド線維形成性をThioflavin T assayを用いて比較したところ、ネコ亜目のA β はヒトA β と比較して優位に低い線維形成性を示した。また、形成された線維の超微形態も異なっており、ヒトA β は幅約12nmの長く伸長した線維が絡み合った凝集物を多数形成するのに対し、ネコ亜目A β は幅約19nmの短い線維が散見され、凝集物の形成は僅かであった。これらの結果から、7残基目のアミノ酸がGluであることにより、ネコ亜目のA β のアミロイド線維形成性は著しく低いことが示された。

イエネコのA β 沈着部位を免疫走査型電子顕微鏡で観察したところ、粗で短い線維が独立して存在していた。一方、ヒトと同じA β 配列を有するイヌでは、伸長したA β 線維が凝集して周囲へ広がる様に沈着していた。*in vitro*で示されたA β の凝集性の違いが沈着形態の違いに影響していると考えられる。

第4章では、ネコ亜目を対象に、タウのリン酸化および発現アイソフォームを比較解析した。A β 沈着形態及びA β アミノ酸配列はネコ亜目で共通するにもかかわらず、神経原線維変化とリン酸化タウの蓄積にはネコ亜目内でも種差が認められている。神経原線維変化は微小管結合タンパク質であるタウがリン酸化をうけ微小管から遊離することが起点となって生じることが報告されており、ネコ亜目間ではリン酸化タウが蓄積する過程に種差が考えられる。リン酸化タウの蓄積と神経原線維変化がみられた高齢のイエネコと病変のないイエネコ、A β 沈着がみられた高齢のライオンと病変のないライオンの脳の総タンパク質を、タウのアイソフォーム 3R タウと 4R タウに対するウェスタンブロットで解析した。その結果、イエネコでは 3R タウのシグナルが高く、ライオンでは 4R タウのシグナルが高かった。3R タウは 4R タウより微小管結合から遊離しやすい性質をもつことが報告されている。従って、ライオンと比較して 3R タウの割合が高いイエネコでは、微小管から遊離したリン酸化タウが細胞内に多量に存在し、神経原線維変化へ至ることが考察された。

以上、著者は様々な種の高齢動物の脳を解析し、A β 沈着は食肉目と霊長目で高頻度にみられ、その沈着形態や分布は種によって異なることを示した。特にネコ亜目ではアミロイド線維を伴わないA β 沈着が生じ、イエネコとチーターに AD に類似する特徴的なリン酸化タウ蓄積と神経原線維変化が生じることを明らかにした。さらに、ネコ亜目のA β はアミロイド線維形成性が低いことを示し、A β の性状が沈着形態の違いに影響しているとの仮説を構築した。AD ではA β のアミロイド化が病理発生に重要とされている。しかし、イエネコとチーターではアミロイド線維の形成が無いにもかかわらず、AD 類似病変であるリン酸化タウ蓄積と神経原線維変化が生じており、アミロイド形成を介さない病理発生機序が示唆された。また、ネコ亜目内で発現するタウのアイソフォームの違いを明らかにし、神経原線維変化のみられるイエネコでは 3R タウが多く発現していることを明らかにした。

本研究は比較病理学研究において、高齢動物の脳における AD 類似病変の発生機序の解明に貴重な知見を提供するものであり、博士（獣医）の学位を授与するのにふさわしい業績であると判定した。