

# 2021 年度日本獣医生命科学大学若手研究者研究支援経費 (研究成果報告書)

## 1. WOREE 症候群の病理学的特性と病態発生メカニ ズムの解明

**研究代表者** 獣医学部獣医生理学  
准教授 栃木裕貴

### 研究実績の概要

Wwox 遺伝子の変異に起因して重篤な神経症状を呈する WOREE 症候群のモデル動物として認知されている LDE ラットの中枢神経系では、ニューロンやオリゴデンドロサイトの成熟が損なわれることが示されている。さらに、ニューロン特異的な Wwox の欠損がこれらの細胞異常の原因であることが示唆されているが、そのメカニズムは不明である。本研究では、これらの細胞の成熟を促す神経伝達物質 GABA に着目し、LDE ラットにおいて GABA ニューロンの障害の程度を評価した。また、GABA ニューロンの分化を刺激する甲状腺ホルモン (TH) に着目し、その治療効果を検討した。

生後成長期の LDE ラットの脳大脳皮質において、GABA ニューロンの特異マーカー Parvalbumin (PV)、Calretinin (Cal)、Somatostatin (Sst) を用いてその分布を調査したところ、PV 陽性ニューロンのみが有意な減少を示した。この PV 陽性ニューロンの減少は、TH の投与により、正常と同等のレベルにまで改善することが示された。

ノックアウトマウスでの研究から、ニューロンにおける Wwox の欠損が表現型の主要な原因であると考えられている。本研究より得られた結果は、PV 陽性 GABA ニューロンの発生が特異的に障害されることで、二次的に他のニューロンやオリゴデンドロサイトの異常が引き起こされている可能性を示す。さらに、このことは LDE ラットでの外因性 TH による髄鞘形成が GABA ニューロンの救済を伴っていたことで裏付けられた。遺伝子治療のみが唯一の治療法として検討されている WOREE 症候群に対し、甲状腺ホルモン投与という古典的な方法の有効性が示唆された。

### 研究発表

[雑誌論文]

- 1) Md Abdullah Al Mahmud, Maki Noguchi, Ayaka Domon, Yuki Tochigi, Kentaro Katayama, Hiroetsu Suzuki. Cellular Expression and Subcellular Localization of Wwox Protein During Testicular Development and Spermatogenesis in Rats. J Histochem Cytochem. 69. 2021. 257-270. 10.1369/0022155421991629.

[学会発表]

- 1) 栃木裕貴. WOREE 症候群モデルラットの中枢神経系における病理発生メカニズムの解明. 第 68 回日本実験動物学会総会. 2021 年 5 月 18 日. オンライン開催.

- 2) 泉水優志, 池上亜実, 栃木裕貴, 片山健太郎, 鈴木浩悦. WOREE 症候群モデルラットを用いた甲状腺ホルモン投与による治療効果の検討. 第 164 回日本獣医学会学術集会. 2021 年 9 月 7 日. オンライン開催.

## 2. 犬の心臓血管外科手術における血液粘弾性検査を 使用した凝固機能の評価

**研究代表者** 獣医外科学研究室  
講師 鈴木周二

### 研究実績の概要

本研究は小動物臨床で実施される人工心肺装置を使用した心臓手術の術後管理において、従来実施されていた血小板機能検査と凝固能検査ではモニタリングが困難な病態に対して、トロンボエラストグラフィを用いた全血による血液粘弾性検査が、心臓血管外科手術の術中および術後の血液凝固の状態をモニタリングする上で重要な役割を果たすことが可能かどうかを検討した。

心臓外科手術では、人工心肺使用による血栓の防止のため、一般的に活性凝固時間 (activated clotting time : ACT) が 400 秒を超えるまで、抗凝固薬であるヘパリンを投与した状態で実施するが、術後、凝固因子の希釈や拮抗後にも残存するヘパリンの影響により、微量な出血のコントロールに苦慮することが少なくない。今回実施した血液粘弾性検査により、心臓外科手術の際多くの症例で、プロタミンによるヘパリンの拮抗が不十分なことが判明した。また凝固因子の不足やヘパリンの残存、血小板の不足など、従来の検査よりも凝固不全の原因がより詳細に判明することとなった。

その成果の一部を、犬でよく認められている先天性心疾患である肺動脈狭窄症の手術成績として、獣医麻酔外科学会で発表した。心拍動下で行う右室流出路再建術と血液粘弾性試験により、術後周術期の生存率において高い数値に繋がったと考えられる。さらなる改善の余地はあるが、本研究は安全に体外循環管理を実施するための礎となり、獣医心臓血管外科分野でのさらなる貢献につながると考えられる。今後、本研究結果を雑誌論文に投稿予定であり、また、僧帽弁閉鎖不全症をはじめとした、後天性心疾患においても、血液粘弾性試験の有用性を検討し、報告する予定である。

### 研究発表

[雑誌論文]

- 1) Tanaka S, Shibuya H, Suzuki S, Kanno N, Harada Y, Sato A, Soeta S, Hara Y. Long-term administration of prednisolone: Effects on the myocardial tissue of healthy beagle dogs. J Vet Med Sci. 83(1). 2021. 84-93. 10.1292/jvms.20-0401. Epub 2020 Dec 2.

- 2) Tanaka S, Suzuki S, Sato A, Teshima T, Mori A, Sako T, Tanaka A, Hara Y. Utility of a corticotropin-releasing hormone test to differentiate pituitary-dependent hyperadrenocorticism from cortisol-producing adrenal tumors in dogs. *J Vet Intern Med.* 36(1). 2021. 29-38. 10.1111/jvim.16336. Epub 2021 Dec 3.

[学会発表]

- 1) 鈴木周二. 肺動脈狭窄症に対し人工心肺装置を使用した心拍動下右室流出路再建術を実施した犬 9 例. 日本獣医麻酔外科学会. 2022.3.19. オンライン開催.
- 2) 鈴木周二. 猫のうっ血性心不全を考える ～フロセミド、ピモベンダン、+ $\alpha$ ?～. 日本獣医麻酔外科学会. 2022.3.20. オンライン開催.
- 3) 鈴木周二. 先天性心疾患の基礎 3. 日本獣医循環器学会. 2021.7.4. 東京農工大学 (オンラインハイブリッド開催).
- 4) 鈴木周二. 循環器疾患の救急医療. 日本獣医循環器学会. 2021.12.19. 東京農工大学 (オンラインハイブリッド開催).

### 3. 大腸菌における遺伝毒性物質コリバクチンの産生・分泌能の比較解析

研究代表者 獣医学部獣医学科  
准教授 吉川悠子

#### 研究実績の概要

本研究では、ヒトの大腸発がんに関与する可能性のあるコリバクチン産生大腸菌について、溶血性因子  $\alpha$ -ヘモリシンのコリバクチン自体の産生・分泌への直接的影響を測る基礎的なデータの収集を目的とした。具体的には、ヒト大腸がん組織由来株と市販の食用ウシ腸管 (いわゆるホルモン) 由来株およびウシ糞便由来株 (いずれも 4 株ずつ、計 12 株) の遺伝子型 (ST: sequence type) の決定と培養細胞への感染によって観察される宿主細胞の表現型について、その程度を評価した。大腸菌の遺伝子型の決定は MLST 法にて行い、標的とする 7 遺伝子の部分的塩基配列の比較には、データベース ([https://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele\\_st\\_search](https://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search)) を用いた。その結果、作成された系統樹において、ヒト由来株とウシ由来株は大腸菌の基準株 (JCM1649<sup>T</sup>) を挟んで大きく枝別れし、ヒト由来  $\alpha$ -ヘモリシン保有株は同一のタイプに分類された。一方、ウシ糞便由来株の 3/4 が同じタイプに分類され、また、ウシ由来株では分離源の種類や原産国の違いで分岐群が分かれることはなかった。よって、ヒトとウシでは全く異なる系統のコリバクチン産生大腸菌を腸内細菌として保有していることがわかり、ヒトの場合、コリバクチン産生大腸菌は生後まもなく、保菌者である母体や周囲の人間から腸内細菌として定着する経路が考えられた。感染宿主細胞の表現型の程度の違いにおいては、 $\alpha$ -ヘモリシンの有無による有意差は観察されず、ムチンなど腸管粘膜のバリア因子がない状態での解析では、 $\alpha$ -ヘモリシンによる菌の腸管粘膜への定着優位性を正しく

評価できないことが示唆された。以上、本研究にて、コリバクチン産生菌を大腸がんのリスクマーカーとしてがんの一次予防に役立てるうえで、一助となる成果が得られた。

#### 研究発表

[雑誌論文]

- 1) Zhou, T., Hirayama, Y., Tsunematsu, Y., Suzuki, N., Tanaka, S., Uchiyama, N., Goda, Y., Yoshikawa, Y., Iwashita, Y., Sato, M., Miyoshi, N., Mutoh, M., Ishikawa, H., Sugimura, H., Wakabayashi, K. and Watanabe, K. Isolation of new colibactin metabolites from wild-type *Escherichia coli* and *in situ* trapping of a mature colibactin derivative. *J. Am. Chem. Soc.* 143. 2021. 5526-5533. 10.1021/jacs.1c01495.
- 2) Tsunematsu, Y., Hosomi, K., Kunisawa J., Sato, M., Shibuya, N., Saito, E., Murakami H., Yoshikawa, Y., Ishikawa, H., Miyoshi, N., Mutoh, M., Ishikawa, H., Sugimura, H., Miyachi, M., Wakabayashi, K. and Watanabe, K. Mother-to-infant transmission of the carcinogenic colibactin-producing bacteria. *BMC Microbiol.* 21. 2021. 235. 10.1186/s12866-021-02292-1.

### 4. RNA 分解酵素 T2 は骨格筋再生機構に関わるのか?

研究代表者 応用生命科学部動物科学科  
助教 倉岡陸季

#### 研究実績の概要

骨格筋の委縮は、加齢、神経・筋疾患、悪性腫瘍にともなって生じ、筋力低下、生活動作の制限をもたらす重大な病態である。筋再生機構の解明は、医療・獣医療に関連した必須の研究課題である。骨格筋の再生は骨格筋線維の元になる筋芽細胞の増殖、筋分化によって進行する。筋組織に浸潤した M1/M2 マクロファージはこれに大きく関与し、炎症性の M1 型は増殖に、抗炎症性の M2 型は筋分化に促進作用を有している。本研究で着目した RNA 分解酵素 T2 (RNaseT2) は、RNA 分解の触媒作用とは別に、マクロファージの性質を変化させる生理活性が近年報告された。RNaseT2 は、M1 型に対しては活性化、M2 型には抑制の働きがあると考えられる。申請者は、マウス筋傷害・再生モデルの筋組織において、免疫組織化学的に浸潤マクロファージでの RNaseT2 発現を示唆する染色像を見出し、筋再生での M1/M2 型分布に関与する可能性を考えた。そこで、同モデルの筋組織においてリコンビナント・マウス RNaseT2 の投与を実施し、定量的 PCR での発現因子の mRNA を解析した。筋傷害のみの対照群と比較して、筋傷害に RNaseT2 投与を加えた群では、M1 型マーカーとなる炎症性サイトカインの有意な増加を認めた。M2 型マーカーとなる抗炎症性サイトカインは、増加傾向はあるが有意差がみられなかった。また筋再生マーカーでは、RNaseT2 の投与条件によって有意な減少が認められた。以上の結果から、RNaseT2 の過剰発現は炎症を亢進し、筋再生を遅延させる可能性が示唆された。炎症・再生過程の

時期によって、RNaseT2 は M1/M2 マクロファージを介した異なる働きを有する可能性があり、さらに解析が必要である。筋再生の有効な治療法と関連させて、RNaseT2 をターゲットにした創薬開発の可能性も視野に検討を行う。

#### 研究発表

〔雑誌論文〕

- 1) [Kuraoka M](#), Aoki Y, Takeda S. Development of outcome measures according to dystrophic phenotypes in canine X-linked muscular dystrophy in Japan. *Exp Anim.* 70. 2021. 419-430. 10.1538/expanim.21-0072.