



Sera from patients with seropositive neuromyelitis optica spectral disorders caused the degeneration of rodent optic nerve

Matsumoto, Yoshiko

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6672号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006672>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Sera from patients with seropositive neuromyelitis optica spectral disorders caused the degeneration of rodent optic nerve

視神経脊髄炎関連疾患の患者血清によるラット視神経障害モデル作成

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

眼科学

(指導教員：中村誠教授)

松本 佳子

【序文】

視神経脊髄炎(NMO)は視神経と脊髄が障害される自己免疫性炎症疾患であり、アストロサイトにある水チャンネルアクアポリン4 (AQP4) に対する抗体 (抗 AQP4 抗体) が関与している。

NMO 病態の解明には疾患モデル動物が不可欠である。げっ歯類への NMOIgG 静脈注射は IgG が脳血流閥門を超えないため、ミエリン塩基性タンパク (MBP) や MBP 反応性 T 細胞を併用した実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルが用いられた。しかし MBP や MBP 反応性 T 細胞はそれ自身が視神経炎を起こすことが知られている。NMOIgG を脳への直接投与したモデルでは脳病変を認め、AQP4 とグリア線維性酸性タンパク (GFAP) の減少とミエリン消失が指摘されたが、視神経病変は報告されなかった。

これまで NMO 由来視神経炎を評価するには網膜神経節細胞 (RGC) やアストロサイト培養細胞を用いた生体外モデルを用いるしかなかった。今回我々は抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者血清を視神経に直接暴露させることで、NMO 由来視神経炎様の病態を引き起させたことを報告する。

【方法】

① 患者血清の収集

特発性視神経炎患者、NMO 視神経炎患者、健常ボランティアから血清を採取した。抗 AQP4 抗体の測定は高橋らによる cell-based assay を用いて行った。

処置ラットは使用した患者血清によって 3 群

- ・抗 AQP4 抗体陽性視神経炎患者血清 (AQP4+群)
- ・抗 AQP4 抗体陰性視神経炎患者血清 (AQP4-群)
- ・健常ボランティア血清 (Control 群)

に分類した。

② 視神経への血清投与

ラットの上部結膜を切開し鈍的に視神経を露出させ、視神経鞘を長軸方向に切開 (2.5mm) した。切開創から 32G 針を用いて視神経鞘下に患者血清を 2mm 注入し、同血清を浸した Medical Quick Absorber® を鞘の切開創上に留置した。

③ 免疫化学的検討

処置後 3 日、7 日、14 日の時点でラットを 4% PFA で還流固定し、視神経と網膜の冷凍凍結切片を作成した。1 次抗体として抗ニューロン核抗体 (NeuN)、抗ニューロフィラメント抗体 (NF)、抗 GFAP 抗体、抗 MBP 抗体、抗 C5b9 抗体、抗 AQP4 抗体を用いた。

二次抗体には FITC と TRITC を用いた。また Hoechst、TRITC 標識抗ヒト IgG も用いた。NF と GFAP、AQP4 では、染色後の蛍光輝度を定量し各群で比較した。

④ 遺伝子発現

real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) を用いて視神経と網膜で各マーカータンパクの RNA 発現量を比較した。

目標遺伝子は NF、GFAP、AQP4 とし、内因コントロールには GAPDH を採用した。

⑤ 免疫プロット解析

タンパク質の生成及び免疫プロット解析に用いる試料には、視神経（5mm 長）と全網膜を用いた。一次抗体にはウサギ抗 AQP4 抗体とマウス抗 β アクチン抗体を用いた。二次抗体には対応する HRP 標識抗 IgG 抗体を用い、定量した AQP4 と β アクチンの比を、AQP4+群と Control 群で比較した。

⑥ 網膜神経節細胞数の計測

血清を投与したラットの両側の上丘にフルオロゴールドを注入し、RGC を逆行性に標識した。フルオロゴールド注入後 5 日時点での網膜中の RGC を計測し 3 群で比較した。

【結果】

① 視神経における AQP4 および GFAP の局在と減少

血清投与後 7 日および 14 日視神経における AQP4 およびアストロサイトマーカー GFAP を免疫化学的に検討し、AQP4+群および Control 群で比較した。また検討部位は血清投与部 (EA)、その眼球側 (ES)、中枢側 (BS) の 3 箇所とした。

7 日視神経の AQP4+群と Control 群を比較すると、EA では AQP4 ($P=0.016$) と GFAP ($P=0.026$) の蛍光輝度が有意に減少していた。ES、BS では有意差はなかった。14 日視神経では GFAP、AQP4 どちらでも蛍光輝度に有意差はなかった。

また RT-PCR を用いて AQP4 および GFAP の遺伝子発現について検討したが、7 日 14 日ともに AQP4+群と Control 群間に有意差はなかった。免疫プロット法での検討では、AQP4+群で AQP4 が減少傾向だったが有意差はなかった。

以上より、抗 AQP4 抗体陽性血清は投与後 7 日の時点で視神経の AQP4 および GFAP を減少させることができた。

② AQP4+群におけるヒト IgG の局在

処置 7 日後の AQP4+群におけるヒト IgG の局在について検討した。視神経及び網膜におけるヒト IgG と、アストロサイトマーカー GFAP・オリゴデンドロサイトマーカー MBP の局在を比較したところ、ヒト IgG は GFAP の局在と一致していたが、MBP とは一致していないかった。以上より、患者血清中のヒト IgG がアストロサイトへ作用していることが分かった。

③ 抗 AQP4 抗体陽性血清投与後の視神経における炎症反応

視神経における炎症を評価するために、処置 7・14 日後の視神経を CD11 で染色し、Control 群と AQP4+群で CD11 陽性細胞の密度を比較した。

14 日後の AQP4+群 ($259 \pm 87/\text{mm}^2$) は Control 群 ($125 \pm 55/\text{mm}^2$) より CD11 陽性細胞の増加を認めた。Control 群にたいして AQP4+群は 1.5 ± 0.29 倍 (投与後 7 日)、 2.1 ± 0.69 倍 (14 日) と 優位に CD11 陽性細胞が増加していた ($P < 0.001$)。

④ 抗 AQP4 抗体陽性血清による視神経における NF の変性と減少

抗 AQP4 抗体による視神経と網膜のニューロフィラメントの変化を調べるために、NF の

免疫化学的検討と遺伝子発現の定量を行った。

投与後 7 日視神経では NF の蛍光輝度に有意差はなかったが、AQP4+群では蛍光輝度の低下がみられた。14 日視神経では ES 部 ($P=0.005$) および BS 部 ($P=0.013$) の両側で有意に NF が減少していた。RT-PCR では 7 日、14 日ともに有意差を認めなかった。これは試料である視神経が少量であることが原因だと思われた。

網膜でも RT-PCR で NF 遺伝子発現量を検証した。視神経を構成する神経線維は RGC から発生しており、軸索障害により網膜でも NF 変化が予想された。投与後 7 日では有意差はなかったが、14 日では AQP4+群にて有意に NF が減少していた ($P=0.027$)。

以上より、抗 AQP4 抗体陽性血清は投与後 14 日の時点で視神経及び網膜の NF を減少させることができた。

⑤ 抗 AQP4 抗体陽性血清による RGC 変化

フルオロゴールドを用いて RGC を標識し、網膜における RGC 密度を検討した。AQP4+群 ($1013 \pm 263/\text{mm}^2$) は AQP4-群 ($1846 \pm 173/\text{mm}^2$) 及び control 群 ($2038 \pm 248/\text{mm}^2$) より有意に RGC が減少していた ($P=0.002$)。また血清投与を行わない網膜では $2086 \pm 211/\text{mm}^2$ であり、AQP4-群と有意差はなかった。

以上より抗 AQP4 抗体陽性血清は RGC 死を引き起こすことができた。

⑥ 抗 AQP4 抗体陽性血清投与後の網膜における GFAP 発現について

網膜における GFAP の発現は、視神経損傷後のストレスマーカーであるといわれている。投与後 14 日の網膜における免疫化学的な検討ではミュラー細胞の増加を認め、GFAP 発現量を RT-PCR で検討すると、AQP4+群では Control 群と比べ優位に GFAP が増加していた。以上のデータは、網膜におけるアストロサイト損傷が軸索損傷による二次的なものであることを示唆していた。

【考察】

過去の報告では NMO 脊髄病変での AQP4 と GFAP の減少が報告されており、今回の研究の結果と矛盾しない。NMO ではアストロサイトがまず損傷され、オリゴデンドロサイトの損傷は二次的なものであると言われているが、本モデルでもヒト IgG はアストロサイトマーカー GFAP と一致していた。

以上から視神経に暴露された抗 AQP4 抗体陽性血清は、アストロサイト障害をおこし、さらには網膜神経節細胞や軸索を損傷していることが証明された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2574 号	氏名	松本 佳子
論文題目 Title of Dissertation	視神経脊髄炎関連疾患の患者血清によるラット視神経障害モデル作成 Sera from patients with seropositive neuromyelitis optica spectral disorders caused the degeneration of rodent optic nerve		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 寺島 遼 副査 Vice-examiner 寺島 俊雄 副査 Vice-examiner 飯島 一誠		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

【序文】視神経脊髄炎(NMO)は視神経と脊髄が障害される自己免疫性炎症疾患であり、アストロサイトにある水チャンネルアクアボリン4 (AQP4) に対する抗体（抗 AQP4 抗体）が関与している。NMO 病態の解明には疾患モデル動物が不可欠である。in vivo モデルは実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルなどが報告されているが、NMO による視神経変化については Ex vivo モデルでの報告しかなかった。今回我々は抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者血清を視神経に直接暴露させることで、NMO 由来視神経炎様の病態を引き起させたことを報告する。

【方法】

- 患者血清の収集。NMO 関連疾患視神経炎患者、特発性視神経炎患者、健常ボランティアから血清を採取した。処置ラットは使用した患者血清によって抗 AQP4 抗体陽性視神経炎 (AQP4+) 群、抗 AQP4 抗体陰性視神経炎 (AQP4-) 群、健常 (Control) 群に分類した。
- 視神経への血清投与。ラット結膜を切開し鈎的に視神経を露出させ、視神経鞘を長軸方向に切開した。切開創から 32G 針を用いて視神経鞘下に患者血清を注入し、同血清を浸したメディカルスポンジを鞘の切開創上に留置した。
- 免疫化学的検討。血清投与後 7 日、14 日の時点でラットを還流固定し、視神経と網膜の冷凍凍結切片を作成した。1 次抗体として抗ニューロフィラメント (NF) 抗体、抗 GFAP 抗体、抗 MBP 抗体、抗 C511b4 抗体、抗 AQP4 抗体、抗ヒト IgG を用いた。NF と GFAP、AQP4 では、染色後の蛍光輝度を定量し各群で比較した。

- 遺伝子発現。real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いて視神経と網膜で各マーカータンパクの RNA 発現量を比較した。

目標遺伝子は NF、GFAP、AQP4 とし、内因コントロールには GAPDH を採用した。

- 免疫プロット解析。ウサギ抗 AQP4 抗体とマウス抗 β アクチン抗体を用い、定量した AQP4 と β アクチンの比を AQP4+群と Control 群で比較した。

- 網膜神経節細胞 (RGC) 数の計測。血清投与後ラットの両側の上丘にフルオロゴールドを注入して RGC を逆行性に標識し、網膜伸展標本中の細胞密度を計測し 3 群で比較した。

【結果】

① 視神経における AQP4 および GFAP の局在と減少。血清投与後 7 日および 14 日視神経での AQP4 と GFAP の蛍光輝度を比較した。7 日の AQP4+群では AQP4 と GFAP の蛍光輝度が Control 群を比べて減少していた。以上より、抗 AQP4 抗体陽性血清は投与後 7 日の時点で視神経の AQP4 および GFAP を減少させることができた。

② AQP4+群におけるヒト IgG の局在。血清投与後 7 日の AQP4+群におけるヒト IgG の局在について検討した。視神経と網膜をヒト IgG、および GFAP (もしくは MBP) 染色し比較すると、視神経においてヒト IgG は GFAP と共に局在であったが MBP とは局在が一致していなかった。以上より、患者血清中のヒト IgG がアストロサイトへ作用していることが分かった。

③ 抗 AQP4 抗体陽性血清投与後の視神経における炎症反応。血清投与後の視神経における炎症を評価するために、CD11b で染色し陽性細胞の密度を比較した。結果、AQP4+群では投与後 7 日、14 日どちらでも有意に CD11b 陽性細胞が増加していた ($P < 0.001$)。

④ 抗 AQP4 抗体陽性血清による視神経における NF の変性と減少。血清投与後のニューロフィラメントの変化を検討した。AQP4+群の視神経における蛍光輝度を比較すると、14 日時点で血清投与部、眼球側 ($P=0.005$) および中枢側 ($P=0.013$) で有意に蛍光輝度が減少していた。網膜での NF 発現量を RT-PCR で検討すると 14 日では AQP4+群にて有意に減少していた ($P=0.027$)。以上より、抗 AQP4 抗体陽性血清は投与後 14 日の時点で視神経及び網膜の NF を減少させることができた。

⑤ 抗 AQP4 抗体陽性血清による RGC 変化。フルオロゴールドを用いて RGC を標識し、網膜における RGC 密度を検討した。AQP4+群は AQP4-群・control 群より有意に RGC が減少 ($P=0.002$) しており、抗 AQP4 抗体陽性血清は RGC 死を引き起すことができた。

⑥ 抗 AQP4 抗体陽性血清投与後の網膜における GFAP 発現について。網膜での GFAP 発現は、視神経損傷後のストレスマーカーであるといわれている。投与後 14 日網膜を GFAP で染色するとミユラー細胞を認めた。また GFAP 遺伝発現量を RT-PCR で検討すると、AQP4+群では Control 群と比べ有意に GFAP が増加していた。

【考察】過去の報告では NMO 脊髄病変での AQP4 と GFAP の減少が報告されており、今回の研究の結果と矛盾しない。NMO ではアストロサイトがまず損傷され、オリゴデンドロサイトなどの損傷は二次的なものであると言われている。本モデルでも AQP4 と GFAP の減少の後に NF の低下を認めた。

以上から視神経に暴露された抗 AQP4 抗体陽性血清は、アストロサイト障害をおこし、さらには網膜神経節細胞や軸索を損傷していることが証明された。

本研究は、視神経脊髄炎関連疾患の患者血清によるラット視神経障害モデルを作成して、抗 AQP4 抗体陽性血清は、アストロサイト障害をおこし、さらには網膜神経節細胞や軸索を損傷していることを示し、重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって、本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。