



# 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 が脳血流関門を超えられない為、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こ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 免疫ブロット解析

タンパク質の生成及び免疫ブ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  $\beta$  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  $\beta$  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 日時点でラットの網膜中の 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。免疫ブ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分かった。

#### 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  $1.5 \pm 0.29$  倍 (投与後 7 日)、 $2.1 \pm 0.69$  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る。

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分かった。

#### 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±263/mm<sup>2</sup>)はAQP4-群(1846±173/mm<sup>2</sup>)及びcontrol群(2038±248/mm<sup>2</sup>)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±211/mm<sup>2</sup>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分かった。

#### 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検討ではミューラー細胞の増加を認め、GFAP遺伝子発現量を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。