

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790375

研究課題名（和文） アクアポリン蛋白能動免疫による視神経脊髄炎モデルの開発

研究課題名（英文） Development of mouse model of neuromyelitis optica induced by aquaporin-4 protein immunization

研究代表者

鶴沢 顕之（UZAWA AKIYUKI）

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10533317

研究成果の概要（和文）：

視神経脊髄炎の病態解明のため、aquaporin-4（AQP4）蛋白能動免疫による NMO モデルマウスの作成を行った。AQP4 蛋白投与により血清 AQP4 抗体価は上昇したが、血液脳関門の存在のため中枢神経内に到達せず、症状も呈さなかった。BBB が脆弱な仔マウスに抗 AQP4 抗体を投与すると脳室周囲の炎症細胞浸潤を認め、抗 AQP4 抗体に病原性がある可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To reveal the pathogenesis of neuromyelitis optica, we tried to develop mouse model of neuromyelitis optica induced by aquaporin-4 (AQP4) protein immunization. Although serum anti-AQP4 antibody titers were increased by the immunization with AQP4 protein, mice did not exhibit any symptoms and no inflammatory cell were observed in the central nervous system because of the presence of blood-brain barrier. When anti-AQP4 antibody was administered to the infant mice that were vulnerable BBB, inflammatory cells infiltrated in the periventricular spaces, leading that anti-AQP4 antibody itself may have pathogenicity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎（Neuromyelitis optica, NMO）は単発性ないし再発性に、視神経と脊髄を中心に中枢神経系に重度の炎症性病変を生じる疾患で、2005年にNMO-IgG（抗aquaporin-4[AQP4]抗体）がNMO患者に特異的に存在することが報告されて以降、NMOの病

態解明が飛躍的になされるようになった。これらの研究の集積により、両疾患は異なる疾患と考えられるようになったが、抗AQP4抗体が病態にどのように関わっているのかは十分に解明されておらず、NMOのモデル動物の作成が待ち望まれており、世界で競ってその開発が行なわれている。NMOのモデル動物

に関しては、ラットに Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) と同時に患者血清中の抗 AQP4 抗体を passive transfer し、病理学的に NMO と同様の病巣を認めたという報告があるものの、抗 AQP4 抗体の関与が不明であり、臨床的にも長大な脊髄病変を有していない点など、NMO モデル動物として確立したものは存在しない。NMO モデル動物が作成できれば、病態の解明、治療法の開発に極めて有用な手段となると考えられる。

2. 研究の目的

NMO の病態解明及び新規治療の開発の礎とするため、AQP4 蛋白能動免疫による NMO モデルマウスを作成し、NMO の病態解明に迫ることを目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

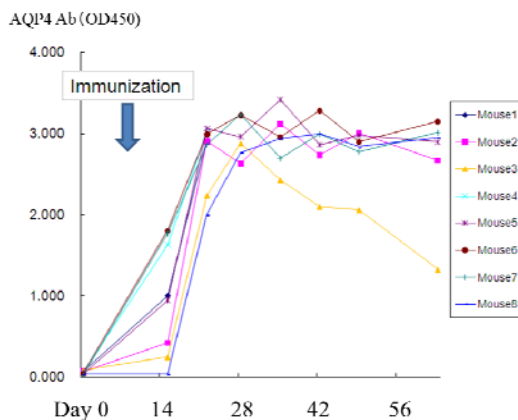
(1) rat-AQP4 全長蛋白を Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) を誘導する方法と同様な方法で C57/B6 マウスに免疫し、血清抗 AQP4 抗体価を ELISA 法で測定し、神経症状の出現及び病理所見の確認を行う。

(2) 血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) の脆弱化モデルマウスを作成し、BBB 脆弱化マウスに AQP4 蛋白を免疫する。

(3) マウスに抗 AQP 抗体と IL-6 の同時投与を行う。

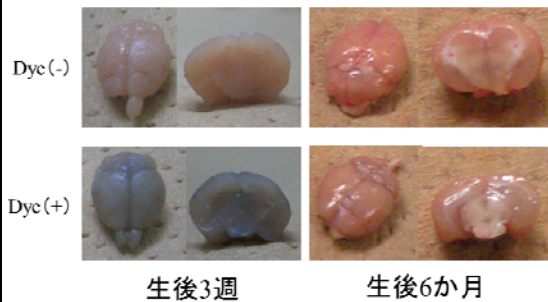
4. 研究成果

(1) マウスへ rat-AQP4 全長蛋白を能動免疫し、NMO モデルマウスの確立を試みたが、血中抗 AQP4 抗体価 (ELISA にて測定) は投与後 1 週から徐々に上昇し、約 8 週まで高値を示したが、神経症状は全く呈さなかった。病理学的にも中枢神経内に明らかな炎症性病変、脱髄性病変は認めなかった。これは、BBB の存在のため、中枢神経内に抗体が到達しないためと考えられた。

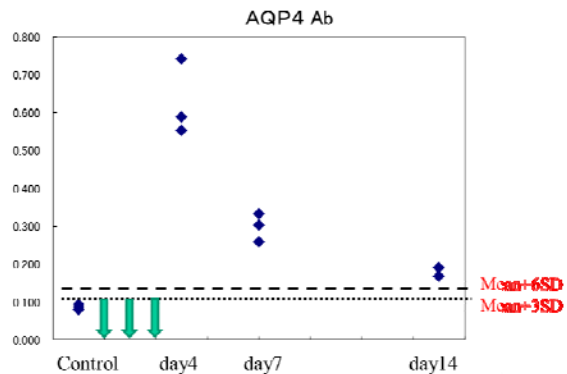


(2) Evans-Blue を用いて、BBB が脆弱である

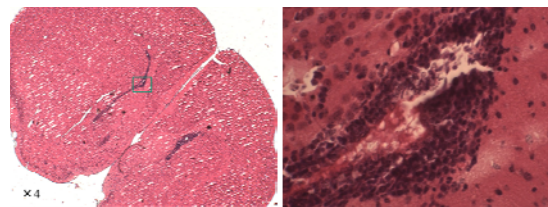
と確認した生後 3 週以内の仔マウスへ AQP4 蛋白の投与を行った。上記と同様な方法で AQP4 蛋白を免疫したが、神経症状は出現せず、血中抗 AQP4 抗体の上昇も認めなかった。



この結果は仔マウスの免疫機能が未成熟で抗体が十分に作成できないためと考えられたため、次に抗 AQP4 抗体が高値である患者血清 (50-200 μ l) を、仔マウス腹腔内に直接投与し、抗 AQP4 抗体投与後、4 週間後まで観察を行った。血中抗 AQP4 抗体価は患者血清投与後 2 週間までは有意に上昇していたが、やはり神経症状の出現は認めなかった。



抗 AQP4 抗体投与後 1 週間で脳の病理所見を観察したところ、脳室周囲にリンパ球様の細胞浸潤を認め、抗 AQP4 抗体が中枢神経の炎症に関与する可能性があることを、一部示すことができた。しかし、神経症状を呈するほどの著明な病変形成は起こさず、NMO の好発部位である脊髄にも病変を認めず、NMO モデルマウス確立までは到達しなかった。



(3) 次に、免疫機能が成熟している 12 週齢程度のマウスにおいて、BBB を脆弱化させるため、Complete Freund's adjuvant (CFA) (500-1000 μ g/匹) 及び Pertussis toxin (PT) 投与 (200ng/匹 \times 3-5 日連続投与) による BBB

脆弱化を行った。PT 投与終了後 day3 に染色液を腹腔注射したところ、軽度ではあったが、脳が染色された。このマウスに IL-6 高値、及び抗 AQP4 抗体が高値である患者血清を腹腔注したが、やはり神経症状の出現や病変形成は認めなかった。

(4) AQP4 蛋白の免疫によって抗 AQP4 抗体価の上昇を認め、BBB が未成熟な仔マウスにおいて抗 AQP4 抗体が病原性を発揮する可能性を見出した。現在その他の方法を用いて BBB を脆弱化させ、NMO モデルマウスを作成すべく、研究を継続して行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Uzawa A, Mori M, Muto M, Masuda S, Kuwabara S. When is neuromyelitis optica diagnosed after disease onset? J Neurol. (in press) 2012 査読あり
DOI 10.1007/s00415-011-6384-3
2. Uzawa A, Mori M, Takahashi Y, Ogawa Y, Uchiyama T, Kuwabara S. Anti-N-methyl D-aspartate-type glutamate receptor antibody-positive limbic encephalitis in a patient with multiple sclerosis. Clin Neurol Neurosurg. (in press) 2012 査読あり
doi:10.1016/j.clineuro.2011.10.047
3. Mori M, Kawaguchi N, Uzawa A, Nemoto Y, Masuda S, Kuwabara S. Seroconversion of anti-aquaporin-4 antibody in NMO spectrum disorder: a case report. J Neurol. (in press) 2012 査読あり
DOI 10.1007/s00415-011-6288-2
4. Uzawa A, Mori M, Sato Y, Masuda S, Kuwabara S. CSF interleukin-6 level predicts recovery from neuromyelitis optica relapse. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012;82:85-6. 査読あり
doi:10.1136/jnnp.2011.241760
5. Uzawa A, Mori M, Masuda S, Kuwabara S. Markedly elevated sICAM-1 and sVCAM-1 levels in neuromyelitis optica: correlations with blood-brain barrier breakdown. Arch Neurol. 68:913-7, 2011 査読あり
doi:10.1001/archneurol.2011.148
6. Uzawa A, Mori M, Masuda S, Aoe K, Kuwabara S. Relapse of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder Associated with Intravenous Lidocaine. Case Report Med. 2011;405837, 2011 査読あり
doi:10.1155/2011/405837
7. Uzawa A, Mori M, Ito S, Kuwabara S.

Isolated abducens and facial nerve palsies due to a facial collicular plaque in multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 82:85-6, 2011 査読あり
doi: 10.1136/jnnp.2010.206870

8. Mori M, Hosoya M, Hiwasa T, Hayakawa S, Uzawa A, Kuwabara S. Detection of mumps virus RNA in cerebrospinal fluid of patients with neuromyelitis optica. Neurol Sci. 32:795-9, 2011. 査読あり
DOI 10.1007/s10072-011-0564-x

9. 鶴沢顕之, 森雅裕, 桑原聡. 視神経脊髄炎と多発性硬化症の免疫病態の相違. 千葉医学会雑誌. 87: 291-4, 2011 査読あり
http://mitizane.ll.chiba-u.jp/metadb/up/igakukai/87-6-291.pdf#search='視神経脊髄炎と多発性硬化症の免疫病態の相違'

10. Uzawa A, Mori M, Arai K, Sato Y, Hayakawa S, Masuda S, Taniguchi J, Kuwabara S. Cytokine and chemokine profiles in neuromyelitis optica: significance of interleukin-6. Mult Scler. 16:1443-52, 2010 査読あり
DOI: 10.1177/1352458510379247

11. Uzawa A, Mori M, Hayakawa S, Masuda S, Nomura F, Kuwabara S. Expression of chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. BMC Neurol. 10:113, 2010 査読あり
doi:10.1186/1471-2377-10-113

12. Uzawa A, Mori M, Hayakawa S, Masuda S, Kuwabara S. Different responses to interferon beta-1b treatment in patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. Eur J Neurol. 17:672-6, 2010 査読あり
doi:10.1111/j.1468-1331.2009.02897.x

[学会発表] (計 11 件)

1. 森雅裕, 鶴沢顕之, 増田冴子, 武藤真弓, 桑原聡. Peptide array法によるAQP4上のimmunogenic site同定の試み. 免疫性神経疾患に関する調査研究班班会議 (東京)、2012年1月25-26日
2. 鶴沢顕之, 森雅裕, 内山智之, 小川喜胤, 桑原聡. MSの経過中に抗GluR抗体陽性辺縁系脳炎を合併し、ステロイド治療が奏功した34歳女性例. 日本神経治療学会 (福井) 2011年11月17-18日
3. 鶴沢顕之, 森雅裕, 増田冴子, 桑原聡. NMOでの可溶性ICAM-1, VCAM-1の上昇: 血液脳関門破綻との関連. 日本神経免疫学会 (東京)、2011年9月15-17日
4. 森雅裕, 鶴沢顕之, 増田冴子, 武藤真弓. 免疫吸着療法による抗aquaporin-4抗体の除去能の検討. 日本神経免疫学会 (東

- 京)、2011年9月15-17日
5. Akiyuki Uzawa. Cytokine Profiles in Neuromyelitis Optica: Significance of Interleukin-6. Sendai NMO Conference (Sendai). July 16, 2011
 6. 鶴沢 顕之、森雅裕、増田 冴子、桑原聡。髄液サイトカインと視神経脊髄炎の予後に関する検討。日本神経学会総会 (名古屋)、2011年5月18-20日
 7. 森雅裕、鶴沢 顕之、増田 冴子、桑原聡。ペプチドを用いた抗アクアポリン4抗体の抗原認識部位の探査。日本神経学会総会 (名古屋)、2011年5月18-20日
 8. 鶴沢 顕之、森雅裕、桑原聡。視神経脊髄炎のサイトカイン・ケモカインプロファイル。免疫性神経疾患に関する調査研究班班会議 (東京)、2011年1月26-27日

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/neurol/kenkyu/achievement/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴沢 顕之 (UZAWA AKIYUKI)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10533317