

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24621014

研究課題名(和文) 実験的自己免疫性ナルコレプシー動物モデルの作出

研究課題名(英文) Orexin changes in experimentally immunized rats by TRIB2.

## 研究代表者

本多 和樹 (HONDA, Kazuki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・研究員

研究者番号：70173656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ナルコレプシーは免疫機序に深く関与するHLA分子のDQB1\*0602との強い関連により病態への自己免疫機序の関与が示唆されてきた。さらにナルコレプシーにおいて特徴的に減少する視床下部神経オレキシン産生細胞に高発現するTRIB2がナルコレプシーの自己抗原候補として報告された。しかしながら、TRIB2抗体がオレキシン神経細胞への障害性(原因)を持つのか、細胞成分が末梢に増大した結果であるのかは明らかになっていない。本研究は抗TRIB2自己免疫反応性ラットを作成することで、自己免疫機序によるナルコレプシーの発症を証明し、更にこの動物モデルを用いナルコレプシーの病態を探ろうとするものである。

研究成果の概要(英文)：Recent finding shows an incidence of anti-TRIB2 antibody in narcolepsy patients. We investigated pathophysiological role of TRIB2 antibody on ORX neurons by using TRIB2-immunized rats. Sera, CSF, and hypothalamic tissues were collected to investigate anti-TRIB2 titers, ORX contents, mRNA expressions, anti-TRIB2 antibodies on ORX neurons, and cell populations. TRIB2 antibody titers were increased in sera and CSF of the immunized rats compared with intact rats. Chronic TRIB2 induced decrease of ORX mRNA synthesis and release to CSF in immunized rats, but no changes were found regarding hypothalamic ORX contents, cell populations in immunized rats. Our results suggest that the activation in immune system has the effect on the function of ORX neurons. However, since no change in ORX cell population in immunized-rats with CSF TRIB2 autoantibodies, it is suggested that the other cytotoxic factor against ORX neurons is required to explain induction of narcolepsy by anti-TRIB2 antibodies.

研究分野：睡眠科学

キーワード：ナルコレプシー 自己免疫 TRIB2

### 1. 研究開始当初の背景

(1)典型的な過眠症ナルコレプシーは罹患率 1/600 人を示し、日中の強い眠気および情動脱力発作(笑う等、強い陽性感情を契機とした脱力)を主徴とする。ゲノムワイド関連解析により組織適合性抗原 HLA の DQB1\*0602 アリル・DRB1\*1301-DQB1 \*0603 ハプロタイプおよび T 細胞受容体  $\alpha$  との強い関連が報告されている。更に情動脱力発作が大量の IgG 静注により改善された症例も報告されている。さらに欧米においてインフルエンザワクチンを接種した子供が高頻度にナルコレプシーを発症することも報告されている。このようにナルコレプシーの病態における免疫機序の関与が示唆されているが詳細は不明のままである。

(2)最近になり、ナルコレプシー病態と深く関連するオレキシン神経細胞において高発現する遺伝子、TRIB2 が発見され、この TRIB2 タンパクに対する自己抗体が約 3 割のナルコレプシー患者血清中に存在することが報告された。そこで Cvetkovic-Lopes らは抗 TRIB2 抗体測定をおこない、抗 TRIB2 抗体がナルコレプシー患者群の血清中に高頻度で存在することを報告し、ナルコレプシーに關与する自己抗原候補とされた。しかしながら 1) 実際にこの自己抗体がオレキシン神経細胞への攻撃に關与しナルコレプシーの一因となるのか、または 2) オレキシン神経細胞の脱落により血中でのオレキシン神経細胞成分が増加した結果による自己免疫反応であるのかは明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では TRIB2 抗原を免疫(アジュバントと TRIB2 抗原の混合物をラットに注射し、TRIB2 への免疫反応を促す)することにより TRIB2 タンパクに対する自己免疫反応性を持つ(抗 TRIB2 抗体が血中に出現)ラットを作成する。このラットを用いて抗 TRIB2 抗体が視床下部オレキシン神経細胞に対して障害性をもつこと、およびその障害による結果として睡眠の分断化や情動脱力発作が起こりうるかどうかを検討する。このことにより自己免疫機序がナルコレプシー発症に直接關与するという仮説を検証する。

### 3. 研究の方法

ヒトナルコレプシーでの検討において抗原特異性が確認された TRIB2 タンパク C 末端の 28 アミノ酸残基とラット TRIB2 にて 100% マッチする C 末端部位 18 アミノ酸残基(DQLVPDVNMEENLDPPFN)およびその他

C 末端を避け、かつコンピュータープログラムにより抗原性が高いとされた部位 2 か所を KLH キャリアーに結合させ、それぞれを抗原として免疫を行う。免疫動物として免疫反応性の高いとされる 30 種のラット strain から数種を選択し使用する。初回に 100 $\mu$ g を皮下に注射し免疫をおこない、その後 1 週間おきに 50 $\mu$ g の免疫を行っていく。対照として KLH のみを免疫した固体も用意する。それぞれの免疫後に部分採血および脳脊髄液採取を行い、ELISA による抗 TRIB2 抗体価の評価およびオレキシン濃度測定を行う。十分な抗体価の上昇が確認された直後、および 2 週~8 週後に灌流固定を行う。脳を取り出し視床下部切片作成後、抗オレキシン抗体と抗ラット IgG 抗体による 2 重染色をし、評価をする。

抗体価の上昇が確認されたラット strain と TRIB2 抗原の組み合わせを用いてラットへの免疫を行う。可能性のひとつとしてアジュバント(Tt)同時投与群も用意する。1) TRIB2-KLH 抗原免疫群、2) TRIB2-KLH 抗原+Tt 免疫群、対照として 3) KLH 抗原免疫群、4) KLH 抗原+Tt 免疫群とする。それぞれの免疫後に部分採血および脳脊髄液採取を行い、抗 TRIB2 抗体価およびオレキシン測定を行う。

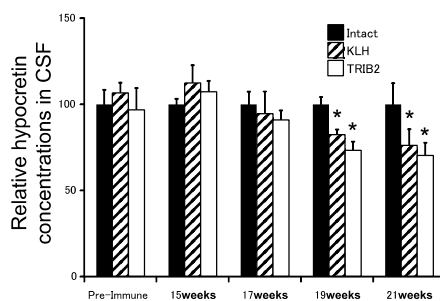
抗体価の上昇後に数例のラットに於いて Chemelli らの方法に従い(Chemelli et al, Cell 1999)行動評価を行う。赤外線カメラにより暗期開始より 4 時間後までの映像を取得し、2 人以上が映像を見ながら別個に情動脱力発作様症状(行動の途中で突然倒れる等)の回数を計測し、平均値を求める。同時に摂食、飲水、移動、毛づくろい、すり寄り、ケージのよじ登り、およびその他特徴的な行動回数の評価を行う。脳波および筋電図電極をラットの脳に埋め込み測定を行う。これにより覚醒、REM 睡眠、Non-REM 睡眠の評価をし、ナルコレプシーにおいて觀察される Non-REM 睡眠期の断片化が觀察されるか否かを検討する。

行動実験および脳波解析が完了したラットより脳脊髄液採取、心臓より直接採血をする。固定後、脳を取り出し視床下部切片を作成後、抗オレキシン抗体にて免疫染色、さらに Nissl 染色または HE 染色および抗ラット IgG 抗体による免疫染色を行う。それによりオレキシン神経細胞内での細胞核の萎縮とオレキシン神経細胞に対するリンパ球の浸潤・ラット IgG の結合を觀察する。それとは別に抗ラット IgG 抗体染色と Fluorojade-B 染色の 2 重染色を行い、ラット IgG が結合するオレキシン神経細胞の Neurodegeneration を觀察する。さらには抗 Caspase-3 抗体による染色も行い、オレキシン神経細胞に起こっているアポトーシスを同定する。

#### 4. 研究成果

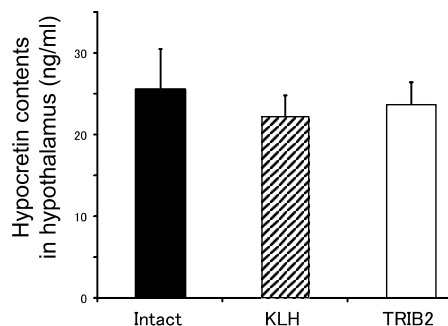
(1)TRIB2 による免疫感作により血清中の TRIB2 抗体価は上昇した。一方 KLH のみによる免疫群および対照群（生食投与群）においては抗体価の上昇が見られなかった。脳脊髄液中の抗体価については TRIB2 免疫群の 8 例中 5 例に抗体価の上昇が見られたが、脳脊髄液中の抗体価と血清中の抗体価の間に明確な相関は見られなかった。(n = 6, r = -0.339)

(2)脳脊髄液中のオレキシンレベルは週齢を合わせ対照群のオレキシン濃度の平均を 100 として比較算出した。脊髄液中のオレキシンレベルは 19 週齢、21 週齢時に於いて TRIB2 免疫群および KLH のみによる免疫群ともに週齢一致対照群より有意な減少を示した。

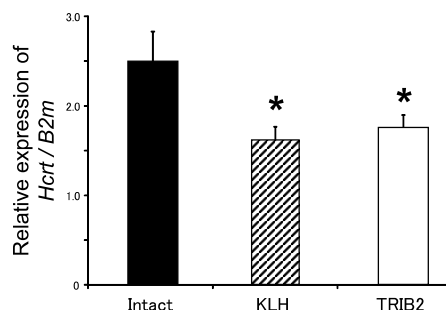


The percent ratio to the average hypocretin level in CSF of the age matched intact group was calculated. CSF hypocretin levels were significantly decreased in KLH group of 19 (mean  $\pm$  SEM, 82.4  $\pm$  20.0 %,  $p < 0.005$ )-old rats (76.1  $\pm$  9.4 %,  $p < 0.05$ ) and TRIB2 group of 19 (mean  $\pm$  SEM, 73.3  $\pm$  5.1 %,  $p < 0.005$ ) and 21week-old rats (70.3  $\pm$  7.5 %,  $p < 0.005$ ) compared with age matched intact group (19weeks; 100.0  $\pm$  4.3 %, 21weeks; 100.0  $\pm$  12.3 %). There was no significant difference between KLH and TRIB2 groups in 19 and 21 week-old rats.

(3)視床下部におけるオレキシン mRNA レベルおよびオレキシンタンパク量をオレキシン合成、貯蔵、放出の評価のために 21 週齢時に脳サンプルを採取し測定した。視床下部におけるオレキシン量は TRIB2 免疫群および KLH のみによる免疫群ともに有意な減少を示さなかった。一方、視床下部におけるオレキシン mRNA 発現量は複数の内標 mRNA を基準に比較したところ TRIB2 免疫群および KLH のみによる免疫群ともに週齢一致対照群より有意な減少を示した。しかし、オレキシン細胞近辺に存在することが報告されている MCH には変化が見られなかった。

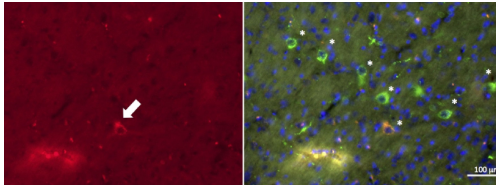


There was no significant change in hypothalamic hypocretin contents between immunized-groups and intact group.



Hypocretin mRNA expression was reduced in KLH (mean  $\pm$  SEM, 1.63  $\pm$  0.14,  $p < 0.05$ ) and TRIB2 (1.76  $\pm$  0.14,  $p < 0.01$ ) group compared with intact group (2.50  $\pm$  0.33) (Figure 3C). Pmch mRNA was not significantly changed among three groups (Intact; 2.09  $\pm$  0.25, KLH; 1.74  $\pm$  0.15, TRIB2; 2.13  $\pm$  0.15).

(4) 視床下部におけるオレキシン mRNA の減少の原因を探るために視床下部におけるオレキシン神経細胞の免疫染色を行い計数した。TRIB2 免疫群 (TRIB2; 2012  $\pm$  167) (mean  $\pm$  SEM)、KLH のみによる免疫群 (KLH; 2208  $\pm$  179)、週齢一致対照群 (2101  $\pm$  199) であり有意なオレキシン産生細胞の減少は観測されなかった。TRIB2 抗体価の上昇を示したラットのオレキシン産生細胞に TRIB2 抗体が反応しているかを確認するためラット IgG による共染色をおこなったところ少数例のオレキシン細胞に於いて IgG の反応が確認された。(次ページ図参照)



Positive signal with rat IgG in TRIB2-immunized rats of hypocretin neurons

Rat IgG binding signal against hypocretin neuron was found in TRIB2-immunized rats, suggesting that peripheral circulating autoantibodies against TRIB2 reached the central nervous systems, but had no cytotoxicity against hypocretin neurons.

## 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

TRIB2-immunization induces Hypocretin /Orexin changes. Tanaka, S., Honda, Y., Honda, M., Honda, K., Watanabe, M., Kodama, T. Neuroscience2014 Nov.15, 2014 Washington D.C., USA

TRIB2 免疫により抑制されるオレキシン神経 田中進、児玉亨、関康子、渡邊正孝、本多芳子、本多和樹 第39回日本睡眠学会 July 4, 2014 あわ銀ホール ( 徳島県徳島市 )

Orexin changes in experimentally immunized rats by TRIB2. Kodama, T., Tanaka, S., Honda, Y., Honda, K., Honda, M. 21<sup>st</sup> Congress of European Sleep Research Society Sep 7, 2012. Paris, France

免疫操作によるオレキシンの変化 児玉亨、本多芳子、本多和樹、本多真、田中進 第37回日本睡眠学会 June 29, 2012. パシフィコ横浜 ( 神奈川県横浜市 )

[ その他 ]

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/sleep/>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

本多 和樹 ( HONDA, Kazuki )

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症高次脳機能研究分野・研究員

研究者番号 : 70173656

### (2) 研究分担者

児玉 亨 ( KODAMA, Tohru )

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症高次脳機能研究分野・副参事研究員

研究者番号 : 20195746

田中 進 ( TANAKA, Susumu )

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 30399472