

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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590940
 研究課題名(和文) アクアポリン4ノックアウトマウスを用いた新規視神経脊髄炎モデルの作製とその解析
 研究課題名(英文) Establishment and analysis of novel animal models for neuromyelitis optica using aquaporin-4 knockout mice
 研究代表者
 阿部 陽一郎 (ABE YOICHIRO)
 慶應義塾大学・医学部・講師
 研究者番号：10317331

研究成果の概要(和文)：視神経脊髄炎マウスモデル作製の目的で、バキュロウイルスディスプレイ法によりマウスアクアポリン4の細胞外ドメインに対する抗体の作製を試み、高親和性の抗体2種類を得た。また、アクアポリン4発現細胞に外来遺伝子を発現させる目的で、アクアポリン4遺伝子のプロモーター解析を行い、M1アイソフォームの転写開始点上流にアストロサイトにおける発現に寄与するエンハンサーを発見し、これにPOU転写因子が関与することを示した。

研究成果の概要(英文)：To establish mouse models for neuromyelitis optica, we developed two different kinds of high affinity monoclonal antibodies against the extracellular domains of mouse aquaporin-4 using the baculovirus display method. In addition, to express exogenous gene in tissues expressing aquaporin-4, we analyzed 5' -flanking region of mouse aquaporin-4 gene. We found an astrocyte-specific enhancer, in which POU transcription factors are involved, located upstream of the transcriptional start site of M1 isoform.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経病態免疫学

1. 研究開始当初の背景

NMOは炎症性脱髄疾患で、重度の両側性の視神経炎と3椎体以上の長い脊髄中心灰白質の病変を特徴とし、日本人を含むアジア系の人種に比較的多く見られる。NMOは長くMSの一亜型であると認識されてきたが、NMOの患者血清中の自己抗体(NMO-IgG)

が水チャネルAQP4を標的としていることが明らかになって以来、MSとNMOは発症機序の異なる別の疾患であると理解されるようになった。すなわち、NMOはその機序として、何らかの理由により産生された抗AQP4抗体が原因となり、ある契機によりアストロサイトを傷害し、その結果二次的に脱

随が生じると考えられるようになってきた。

申請者らは、(1) NMO-IgG がいかにしてアストロサイトを傷害するか、更に (2) アストロサイトが傷害を受けるとなぜ脱随が生じるのか、という2点について疑問を抱き、これを解明する為に適切なモデル動物が必要と考えた。 MS のモデルとしては実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルが複数知られているが、いずれもミエリン構成タンパク質を標的としており、申請者らの疑問に答えるものではない。2009 年によくラット EAE モデルと患者血清から入手した NMO-IgG との組み合わせにより NMO 様症状を引き起こし得るという報告がなされた。しかしながら、EAE モデルをベースとしている以上、このモデルに見られるアストロサイトの傷害と脱随との間に関連があるかどうかは疑問である上、入手困難な患者血清を用いなければ作製できないモデルでは広く一般的な実験モデルにはなり得ない。このような経緯から、申請者らは EAE モデルとは異なる発想によるアストロサイトを標的とした普遍的な NMO モデルの開発の必要性を痛感した。 その為にはまず患者血清に由らない NMO-IgG と同様の性質を有した抗体の簡便な入手方法の確立が重要と考えられた。NMO-IgG の特徴は、立体構造をとった AQP4 の細胞外ドメインのみを認識し、変成した AQP4 や AQP4 の部分ペプチドは認識できないということである。しかしながら、先人の幾多の努力にも関わらず、AQP4 の細胞外ドメインを認識する抗体は当時皆無であった。これは AQP4 の一次構造が種を超えてよく保存されているため、例えそのような抗体が産生されたとしても免疫寛容により排除されてしまうからであると考えられる。しかしながら、AQP4 ノックアウト (KO) マウスは先天的に AQP4 を欠損しているため、

AQP4 に対する免疫寛容が成立しておらず、AQP4 に対する抗体が容易に産生され得ると考えられた。従って、細胞膜に挿入された AQP4 を AQP4 KO マウスに免疫することで、NMO-IgG と同様の特徴を有したモノクローナル抗体を効率よく作製することができると考えられる。更に一度ハイブリドーマ株を樹立してしまえば同一の抗体を半永久的に入手することができ、多くの研究者とこれを共有することができる。

AQP4 分子の性質として最も興味深いものの一つに、四量体 AQP4 が更に基盤の目のように整然と並ぶアレイ構造の形成が挙げられる。 アレイ構造の形成の意義は未だ不明であるが、AQP4 の機能発現に重要な役割を果していることは想像に難くない。AQP4 には異なるプロモーターにより発現が誘導される2つのアイソフォーム (M1 および M23) が存在する。 M1 の開始コドンが存在するエクソン(E)0 はインフレームに E1 (M23 の開始コドンが存在する) へとスプライシングされるため、M1 は M23 の N 末端に 22 残基独特の配列を有する構造になっている。各々のアイソフォームはアレイ構造の形成に対し、逆の性質を有している、即ち M23 がアレイ構造の形成を促進するのに対し、M1 はアレイ構造の形成を阻害するため、両アイソフォームの発現比率は適切なアレイ構造のサイズを決定する上で重要である。 申請者は AQP4 のアレイ構造形成の意義を *in vivo* で検証する為に、平成19年度より理化学研究所・発生再生科学総合センター・変異マウス開発ユニットと共同で、M1 のみを特異的にノックアウトしたマウス、すなわち M23 のみを発現するマウス (M1 特異的 KO マウス) 並びに、AQP4 を完全にノックアウトしたマウス (AQP4 null マウス) を作製した。即ち 2 種類の AQP4 KO マウスが直ちに使用でき

る状況にあった。

2. 研究の目的

申請者らが開発した2種類のノックアウトマウスを駆使し、以下の2点を目的とした。

(1) 従来の EAE モデルとは異なり、アストロサイトを標的とした普遍的な NMO モデルの確立を行う。

(2) これを用いて抗 AQP4 抗体産生からアストロサイトの傷害に至る過程、アストロサイトの傷害から脱髄に至る過程を行動レベル・組織レベル・分子レベルで詳細に解析する。

3. 研究の方法

(1) アクアポリン4完全ノックアウトマウスを用いた視神経脊髄炎モデル

AQP4には良いモノクローナル抗体が存在しない。これはAQP4の一次構造が種を超えてよく保存されていると予想される。これに加え、現在用いられている抗体は細胞内のC末端部分に対する抗体のみで、細胞外ドメインを認識する抗体は皆無である。従ってNMO-IgG同様、本来の立体構造を有したAQP4を認識する抗体を作製するのは困難を極める。しかしながら、AQP4 nullマウスは背景欄に記したように、立体構造を保持したAQP4の細胞外ドメインに対する抗体を作製するのに有用であると考えられる。

免疫の手法としては、東京大学浜窪隆雄教授のグループの協力を得て、バキュロウイルスディスプレイ法を用いて行った。バキュロウイルスディスプレイ法は、発芽バキュロウイルスのエンベロープに目的タンパク質を効率よく発現させた上で、このウイルスを抗原として免疫し、目的タンパク質の細胞外ドメインに対する抗体を効率よく得る技術である。発芽バキュロウイルスは、自身の膜タンパク質gp64を発現している。従って、通常野生型マウスにバキュロウイルスを免疫す

るとgp64に対する抗体が大量に産生される。従って、AQP4 KOの遺伝的背景をもつgp64トランスジェニックマウスにマウスAQP4 M23アイソフォームを発現した発芽バキュロウイルスを免疫し、マウスAQP4の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体の作製を行った。抗体のスクリーニングにはマウスAQP4を安定発現したCHO細胞によるフローサイトメトリー及びELISAにより行った。

(2) アクアポリン4 M1 アイソフォーム特異的ノックアウトマウスを用いた視神経脊髄炎モデル

申請者らの作製したM1特異的KOマウスは、カセットが挿入されているとnullマウスであるが、カセットを除去するとAQP4を発現するマウスである。従って、任意の時期にカセットを除去することが可能となれば、先天的にはAQP4 nullだが、後天的にAQP4の発現を誘導できるマウスが作製できる。これはReth博士らにより開発されたMerCreMerを用いることで実現できる。MerCreMerはエストロゲン受容体(ER)のリガンド結合ドメインとCreリコンビナーゼとの融合タンパク質で、通常は細胞質に存在し、リガンドであるタモキシフェン(Tam)の投与により核内に移行し、ゲノム中に2つのloxP配列があれば組換えを起こす。即ち、アストロサイト特異的遺伝子のプロモーターでMerCreMerを発現するTgマウスを作製し、これをM1特異的KOマウスと交配することで、先天的にはAQP4 nullマウスだが、後天的にAQP4の発現を誘導できるマウスを作製する。このマウスにAQP4 M23アイソフォームを発現した発芽バキュロウイルスを免疫することで、AQP4の細胞外ドメインに対する抗体の産生を含む免疫応答を惹起させた後、Tam投与によりカセットを除去

することでAQP4の発現を誘導し、NMOを発症するか否かを上述の手法により評価する。アストロサイト特異的遺伝子のプロモーターとしてはGFAPのプロモーターを用いるのが一般的であるが、腎臓や筋肉を含むAQP4を発現する全ての組織での発現誘導が必要である可能性をも考慮し、AQP4のプロモーターの使用も検討する。

4. 研究成果

(1) アクアポリン4完全ノックアウトマウスを用いた視神経脊髄炎モデル

上述の方法に従い、マウスAQP4細胞外ドメインに対する抗体の作製を試み、9クローンのハンブリドーマを得た。2クローンを除く7クローンが補体活性化能のあるIgG2Aであり、AQP4の細胞外ドメインを認識していた。興味深いことにこのうち3クローンはM1、M23いずれのアイソフォームも認識したが、4クローンはM23のみを認識した。これら7種類の抗体はいずれも立体構造をとったAQP4のみを認識し、変性したAQP4を認識しなかったことからNMO-IgGと同様の性質を有した、マウスAQP4を認識する抗体であるということが明らかとなった。

この抗体を野生型マウスの尾静脈より投与したところ、腎臓においては投与後1週間以上にわたる持続的な抗体の結合が見られたが、中枢神経系では見られなかった。おそらく血液脳関門の存在により抗体が中枢神経系に移行できなかったと考えられる(学会発表1)。現在この点について更に検討を加えている。

なお、抗体のスクリーニングの過程で、AQP4のC末端細胞内ドメインに対するモノクローナル抗体が1クローン得られた(文献1)。本抗体はヒト、マウスいずれのAQP4も認識し、組織染色、Western blotting、免疫沈降法等広範囲な研究手法に用いることが可能な有用な抗体であった。この抗体は市販することにより多くの研究者が使用可能にする予定である。

また、本手法と同様の方法を用い、ヒトAQP4に対する高親和性かつ特異的なモノクローナル抗体を4クローン得た。この抗体は調べた限り全てのNMO-IgGのAQP4への結合を阻害することが明らかとなった。これにより新たな治療法開発の可能性が考えられた(文献2、学会発表4)。

(2) アクアポリン4M1アイソフォーム特異的ノックアウトマウスを用いた視神経脊髄炎モデル

本モデル作製のため、少なくともアストロサイトで機能するAQP4プロモーターの解析を行った。その結果、M1アイソフォームプロモーターには種を超えて保存されているPOU転写因子に対する結合コンセンサス配列が存在し、これが上流の少なくとも4つのエレメントとクラスターを形成し、アストロサイト特異的発現に重要な役割を果たしていることが明らかとなった(文献4、学会発表3、5、6)。

この解析により得られたプロモーターを用い、理化学研究所CDBと共同でMerCreMerを発現するトランスジェニックマウスの作製を試みたが、現在までに良い系統が樹立できていない。

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 4件)

- ①. Julia Ramadhanti, Ping Huang, Osamu Kusano-Arai, Hiroko Iwanari, Toshiko Sakihama, Tasturo Misu, Kazuo Fujihara, Takao Hamakubo, Masato Yasui, and Yoichiro Abe.

A novel monoclonal antibody against the C-terminal region of aquaporin-4.

Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother. (2013) in press

(査読有り)

- ②. Kaori Miyazaki, Yoichiro Abe, Hiroko Iwanari, Yota Suzuki, Takahiro Kikuchi, Takashi Ito, Jungo Kato, Osamu Kusano-Arai, Toshiyuki Takahashi, Shuhei Nishiyama, Hiroko Ikeshima-Kataoka,

以下8名

Establishment of monoclonal antibodies against the extracellular domain that block binding of NMO-IgG to AQP4.

J. Neuroimmunol. (2013) in press

(査読有り)

- ③. Hiroko Ikeshima-Kataoka, Yoichiro Abe,

Takaya Abe, and Masato Yasui.

Immunological function of aquaporin-4 in stab-wounded mouse brain in concert with a pro-inflammatory cytokine inducer, osteopontin.

Mol. Cell. Neurosci. (2013) **56**, 65-75

(査読有り)

- ④. Yoichiro Abe, Hiroko Ikeshima-Kataoka,
以下3名

An astrocyte-specific enhancer of aquaporin-4 gene functions through a consensus sequence of POU transcription factors in concert with multiple upstream elements.

J. Neurochem. (2012) **120**, 899-912

(査読有り)

[学会発表] (計 6件)

- ① The 86th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society

Fukuoka, March 21-23, 2013

P1-88

Abe, Y., Iwanari, H., Arai, O., Ramadhanti, J., Huang, P., Miyauchi, T., Kurihara, N., Miyazaki, K., Ikeshima-Kataoka, H., Sakihama, T., Hamakubo, T, and Yasui, M.

Development of monoclonal antibodies against the extracellular domains of mouse AQP4 and its application to elucidating the disease mechanism of neuromyelitis optica.

- ② The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan

Fukuoka, December 11-14, 2012

2P-0309

Abe, Y., Goda, W., Ramadhanti, J., Ikeshima-Kataoka, H., and Yasui, M.

Regulation and in vivo function of square array formation of aquaporin-4.

- ③ The 85th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society

Kyoto, March 14-16, 2012

P3-3-8

Abe, Y., Ikeshima-Kataoka, H., Goda, W., and Yasui, M.

Transcriptional regulation of the mouse aquaporin-4 M23 promoter in astrocytes.

- ④ The 85th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society

Kyoto, March 14-16, 2012

O3C₂-5-2

Miyazaki, K., Abe, Y., Hamakubo, T., Fujihara, K., and Yasui, M.

Development of monoclonal antibodies that block binding of NMO-IgG to AQP4.

- ⑤ The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan

Yokohama, December 13-16, 2011

3P-0225

Abe, Y., Ikeshima-Kataoka, H., Goda, W., and Yasui, M.

A consensus sequence of POU transcription factors is indispensable for transcriptional regulation of mouse aquaporin-4 gene in astrocytes.

- ⑥ The 84th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society

Yokohama, March 22-24, 2011

P2-017

Abe, Y., Ikeshima-Kataoka, H., and Yasui, M.

Identification of *cis*-element involved in transcriptional regulation of mouse aquaporin-4 gene in astrocytes.

[その他]
ホームページ等
<http://www.pharm.med.keio.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 陽一郎 (ABE YOICHIRO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：1 0 3 1 7 3 3 1

(2) 研究分担者

池島 宏子 (IKESHIMA HIROKO)
慶應義塾大学・医学部・特任講師
研究者番号：6 0 2 6 5 7 8 3