

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592593

研究課題名(和文) 1-syntrophin欠損マウスを用いた視神経脊髄炎の病態解析

研究課題名(英文) Determination of disease causing mechanisms of neuromyelitis optica by analyzing alpha1-syntrophin deficient mice

研究代表者

亀谷 修平 (KAMEYA, SHUHEI)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30302269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：視神経脊髄炎の病態解明のため、1-syntrophin欠損マウスの解析を行った。野生型および1-syntrophin欠損マウスから視神経を摘出し、形態学的に明らかな差異は見られなかった。抗AQP4抗体、抗Neurofilament抗体、抗MBP抗体による染色で野生型と欠損マウスで染色に差異を認めなかった。野生型と欠損マウスにEAONの惹起を試みた。これまでの報告に準じた方法で臨床的なEAE発症マウスが得られなかった。感作14日後に視神経を摘出し病理学的解析を行ったが、摘出後の視神経に炎症所見は認めず、また野生型と欠損マウスで差異を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study was to analyse the mechanisms causing neuromyelitis optica (NMO). We used alpha1-syntrophin deficient mice to analyse the disease, since alpha1-syntrophin directly interact to aquaporin-4 (AQP4) which is important for the ethiology of NMO. We have performed histological analysis of optic nerve of wild type and alpha1-syntrophin deficient mice. There was no histological difference in optic nerve of these mice. We have performed immunohistological analysis of optic nerve of these mice. We used anti-AQP4, anti-Neurofilament, and anti-MBP antibodies. There were no difference of immunostaining by those antibodies in these mice. We tried to cause experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) to these mice. We performed the procedure to cause EAE to these mice as previously reported, however we could not obtain mice with EAE. We examined optic nerve of these mice 14 days after immunization, however there were no pathophysiological differences between these mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：neuromyelitis optica alpha1-syntrophin

1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎 (Neuromyelitis optica: NMO) は視神経と脊髄を病変の主座とする急性の炎症性疾患である。再発性で、重症の視神経炎と横断性脊髄炎を特徴とする疾患であり、以前から多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) との疾患概念の異同が議論されてきた。最近、中枢神経における水チャネルである aquaporin-4 (AQP4) に対する自己抗体が NMO に特異的に検出されることが報告され (Lennon et al. J Exp. Med. 2005)、MS との病態の相違が明瞭になってきている。NMO の病巣においては AQP4 に対する自己抗体によって AQP4 を標的とするアストロサイトの障害が、脱髓に先行して生じている可能性が高いと推察されていて、抗 AQP4 抗体が病態に直接関与することが示唆されている。ミエリンを標的とする疾患である MS と NMO は全く異なり、NMO は脱髓に先行して AQP4 が標的となりアストロサイトが障害される病理学的特徴をもつ疾患である可能性が提唱されている。

一方 1-syntrophin はジストロフィン複合体である dystrophin-glycoprotein complex (DGC) の構成成分であり、これまでに骨格筋、脳、網膜、視神経を含む部位での局在が確認されている。1-syntrophin はこの DGC において AQP4 と直接結合して AQP4 を DGC の存在する細胞膜周囲に局在させていることが証明されている。ジーンターゲティングの手法により作成された 1-syntrophin 欠損マウスの研究で骨格筋と小脳の細胞膜からの AQP4 の脱落と、網膜のアストロサイトと Muller 細胞の足突起からの AQP4 の脱落が別々のグループにより報告されおり (Yokota et al. Proc. Japan. Acad. 2000, Puwarawuttipanit et al. Neuroscience. 2006)、これらのデータは AQP4 の正常な局在および機能における 1-syntrophin の重要性を示唆している。

2. 研究の目的

今回我々は、以前我々が作成し、現在は共同研究を行う国立精神神経センター・神経研究所にて保有する 1-syntrophin 欠損マウスに EAE を惹起させ、このマウスの視神経について解析を行うことを目的とした。これまでに EAE を惹起させることにより視神経炎を同時に引き起こす事ができることが知られているが、AQP4 との関係については我々の知る限りまだほとんど報告されていない。我々は野生型マウスと 1-syntrophin 欠損マウスに同じ方法で EAE を惹起させることにより詳細に視神経炎と AQP4 の関係について解析する。

3. 研究の方法

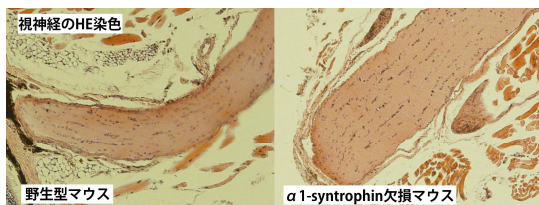
野生型と 1-syntrophin 欠損マウスに対しミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白の合成ペプチドを使用して実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) を惹起させる。野生型と 1-syntrophin 欠損マウスでの severity の比較検討を EAE 臨床症状評価を用いて行う。EAE を惹起させたマウスにおける視神経の観察に主眼をおき、これについて詳細な解析を行う。これに関しては以下の方法を用いる。これらは小動物用手持ち式眼底カメラを用いた眼底検査、RT-PCR 法による AQP4 の mRNA の発現解析、病理組織科学的検査、AQP4、1-syntrophin をはじめとした種々のターゲットに対する抗体を用いた免疫組織科学的解析、電子顕微鏡による組織科学的解析である。

EAE の惹起に先がけて、野生型と 1-syntrophin 欠損マウスに対し病理組織学的検査、AQP4、1-syntrophin をはじめとした種々のターゲットに対する抗体を用いた免疫組織科学的解析を行い、EAE 惹

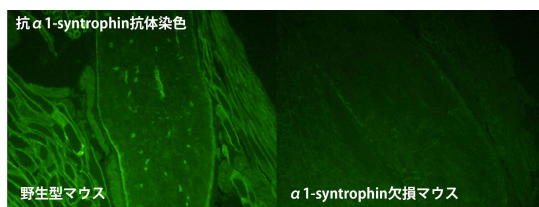
起後のマウスに対して、速やかに解析を行うための基礎を築く。

4. 研究成果

視神経脊髄炎の病態解明のため、aquaporin-4 (AQP4) と直接結合する分子である 1-syntrophin を欠損させたマウスである、1-syntrophin ノックアウトマウスの解析を行った。まずはじめに実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) を惹起させていないマウスで視神経に病理学的に異常があるかを解析した。野生型および 1-syntrophin ノックアウトマウスから視神経を摘出、パラフィン切片を作成し HE 染色を行ったが、形態学的に両者に明らかな差異は見られなかった。

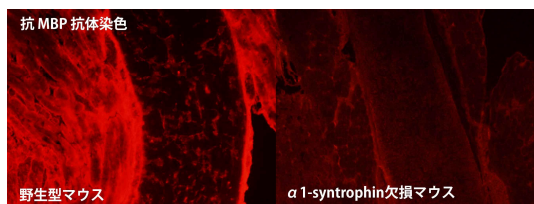
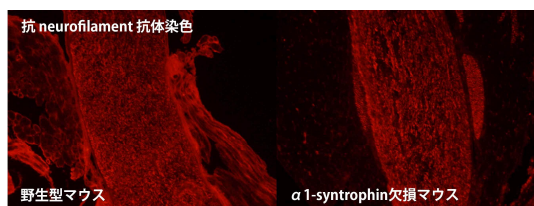
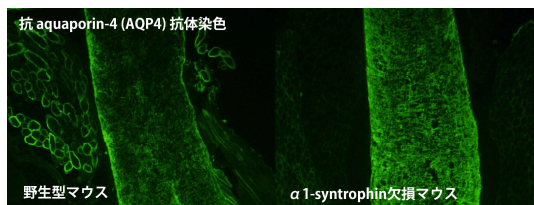


野生型および 1-syntrophin ノックアウトマウスから視神経を摘出、未固定凍結切片を作成し免疫組織学的解析を行った。抗 1-syntrophin 抗体を用いた解析では、野生型で視神経の髄鞘及び視神経内に染色を認めしたが 1-syntrophin ノックアウトマウスでは染色が完全に欠損していた。

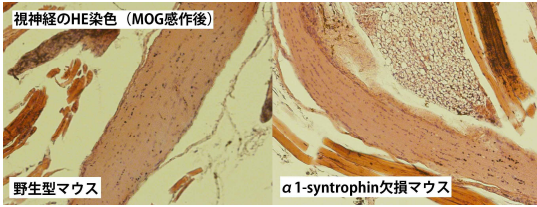


抗 AQP4 抗体を使用した免疫染色では視神経の髄鞘に染色を認め、抗 Neurofilament 抗体を使用した染色像とほぼ一致していた。抗 AQP4 抗体および抗 Neurofilament 抗体とも野生型と 1-syntrophin ノックアウトマウスで染色に差異を認めなかった。抗 MBP 抗体に

よる染色でも野生型と 1-syntrophin ノックアウトマウスで染色に差異を認めなかった。



野生型と 1-syntrophin ノックアウトマウスに EAE の惹起を試みた。惹起にはミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白 (MOG) の合成ペプチドを使用した。使用したアミノ酸配列は MOG;35-55 である。不完全フロイドアジュバンド (IFA) および加熱ヒト型結核菌は、百日咳毒素 (PTX) を使用した。週齢を一致させた野生型マウスと 1-syntrophin 欠損マウスの両群に MOG;35-55 感作で EAE を誘導した。IFA に 100 µg/ml の MOG;35-55 および 500 µg の M. tuberculosis を加え、乳化の後に尾背部皮下に感作を行った。初回感作時および 48 時間後に PTX を 100ng ずつ腹腔内投与した。これまでの報告に準じた上記方法で臨床的な EAE 発症マウスが得られなかったため、ペプチドに DMSO を加えて免疫を行った。しかし、臨床的な EAE の発症マウスは得られなかった。感作 14 日後に視神経を摘出し病理学的解析を行ったが、摘出後の視神経に炎症所見は認めず、また野生型と 1-syntrophin ノックアウトマウスで差異を認めなかった。



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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

亀谷 修平 (KAMEYA Shuhei)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30302269

(2)研究分担者

鈴木 友子 (SUZUKI yuko)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター

一・遺伝子疾患治療研究部・室長

研究者番号：00342931

山木 邦比古 (YAMAKI kunihiko)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：20125751

高橋 永幸 (TAKAHASHI hisatomo)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：