

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462715

研究課題名(和文) 視神経脊髄炎における視神経炎モデル確立とその解析

研究課題名(英文) Establishment and analyses of rodent model of optic neuritis in neuromyelitis optics

研究代表者

金森 章泰 (Kanamori, Akiyasu)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10444572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：視神経脊髄炎(NMO)視神経炎モデル動物を確立し、その治療法の検討が目的である。ラット視神経にNMO視神経炎患者血清を直接投与することで、その投与後1週後で投与部位のアクアポリン4(AQP4)とGFAPの発現低下が見られた。また、血清投与2週後で、NFの低下、また、網膜神経節細胞数の減少が見られた。これらは患者血清がラットにおいて、視神経炎の病態を発症させたことを示している。また、ヒト免疫グロブリン(hIgG)あるいは生理食塩水を尾静脈に投与し、RGCおよび視神経線維の定量を行ったところ、有意に残存していることがわかり、hIgGがNMO視神経炎に治療として有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neuromyelitis optica (NMO) is an autoimmune inflammatory, neurodestructive disease primarily targeting the optic nerve and spinal cord. We evaluated the impact of sera of seropositive patients with NMO on the rodent optic nerve and retina. Serum which obtained from patients with seropositive NMO (AQP4+), decreased the expression of AQP4+ and GFAP at the 7 days after the treatment. The gene expression of neurofilament in retina from the eye that was exposed to the AQP4+ sera at 14 days. Retrograde fluorogold-labeling on the retinal flatmount disclosed the significantly reduced number of retinal ganglion cells when the AQP4+ sera were applied. This has demonstrated that the sera from patients with seropositive NMO led to the regional astrocytic degeneration and inflammatory cell invasion in the optic nerve. The administration of human IgG reduced optic nerve degeneration in a rat model of NMO-optic neuritis.

研究分野：眼科学

キーワード：視神経炎脊髄炎 視神経炎 アクアポリン4 アストロサイト ヒト免疫グロブリン

## 1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎 (NMO) は重篤な視神経炎および脊髄炎が特徴であり、失明につながりうる重篤な視機能・運動障害を起こすことが知られている。視神経炎発症後は著明な神経線維脱落ならびにその細胞体である網膜神経節細胞の消失が起こる。近年、NMO に抗アクアポリン (AQP)4 抗体がその病態に深く関与することが報告され、NMO 診断基準の一つに末梢血中の抗 AQP4 抗体陽性が挙げられた。NMO ではアストロサイトがまず障害されることがわかっている。視神経を用いた基礎研究では培養アストロサイトを用いた *in vitro* や、器官培養による *ex vivo* を用いていた。一方、脳に直接、針を刺入し、血清を投与することで NMO 様の病態が引き起こされることはラットやマウスで確認されていた。病態のさらなる解明や治療法の検討には生体内での研究が必要であるが、NMO における視神経炎を発症する動物モデルは存在しなかった。

## 2. 研究の目的

本研究はまず、NMO 視神経炎モデル動物を確立することが目的である。そのためには視神経内の AQP4 およびアストロサイトの発現低下につづく、網膜神経節細胞の減少、視神経線維の減少を証明する必要がある。また、このモデルを用いて NMO 視神経炎の病態解明や治療法を模索することも目的とした。

## 3. 研究の方法

NMO 患者血清、特発性視神経炎患者血清および、コントロールとして正常ヒト血清を採取した。血清中の抗 AQP4 抗体の抗体価の測定は、東北大学神経内科学教室で、cell-based アッセイに基づいて行った。

ラット視神経に視神経鞘を 2mm 切開後、直接血清を投与した。また、血清を含んだスポンジを切開部に留置した。上丘から逆行性標識した網膜神経節細胞を網膜伸展標本にて

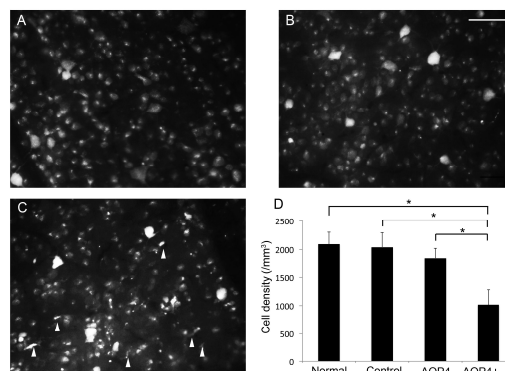
定量した。凍結保存した全眼球の凍結切片と視神経切片、もしくは網膜伸展標本において免疫染色を行った。AQP4、アストロサイトのマーカーである GFAP と、RGC のマーカーである NeuN、オリゴデントロサイトのマーカーとして myelin basic protein (GFAP)、神経線維のマーカーとして neurofilament (NF)、炎症細胞のマーカーとして CD11 を用い、それらの変化を経時的に観察した。ウエスタンブロッティングならびにリアルタイム PCR にて、上記発現につき、定量を行った。

また、ヒト免疫グロブリン (hIgG) 静脈投与 (IVIg) が NMO の急性期治療として提案されており、プレリミナリーな臨床試験ではその有効性が示されている。現在、難治性視神経炎に対し IVIg の全国的治験が行われている。大量免疫グロブリン療法の有効性を本モデルで検討した。

## 4. 研究成果

AQP4 抗体陽性患者血清 (AQP4+) および、AQP4 抗体陰性特発性視神経炎患者血清、正常ヒト血清を用いた。AQP4+ 群では血清投与 1 週後にヒト IgG が視神経内に存在し、血清が到達していることが確認された。免疫染色において、血清投与後 1 週後、投与部位で AQP4 ( $p=0.016$ ) と GFAP ( $p=0.026$ ) の発現低下が見られた。

また、血清投与 2 週後で、免疫染色にて NF の発現の低下 ( $p=0.005$ )、また、網膜神経節細胞数の減少が見られた ( $p<0.01$ )。

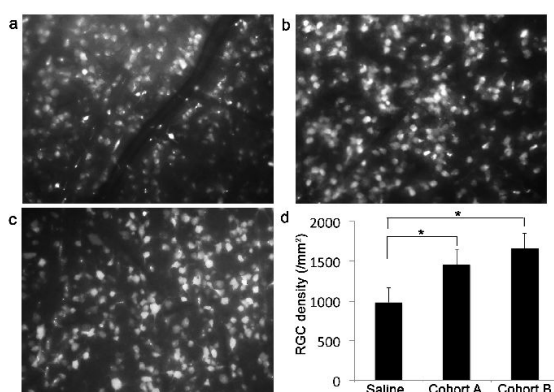


(図 RGC の定量)

視神経の PCR でも同様に NF の減少が確認できた。

CD11 陽性細胞が AQP4+血清投与群で視神経内に有意に多く見られ、HE 染色でも多くの細胞浸潤が視神経切片でみられた。これらは AQP4+患者血清がラットにおいて、投与後 1 週間でアストロサイトの障害を引き起こし、投与後 2 週後には神経線維ならびに神経細胞を障害させたことを意味し、本手法において、視神経炎の病態を発症できたことを示している。

次に、治療法の検討をおこなった。AQP4+群で、血清投与と同時かつ 1 週後 (コホート A) あるいは血清投与 7 日目かつ 10 日目に (コホート B) hIgG を尾静脈に投与し、網膜神経節細胞が有意に残存していた ( $p < 0.001$ )。および視神経線維の定量をウエスタンブロッティングで行ったところ、有意に残存していることがわかった ( $p = 0.037$ )。hIgG が NMO 視神経炎に治療として有用であることが示唆された。



(図 hIgG の保護効果)

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 3 件)

1. Rescue effects of intravenous immunoglobulin on optic nerve degeneration in rat model of neuromyelitis optica. Sho Nobuyoshi, Akiyasu Kanamori, Makoto Nakamura. Jpn J Ophthalmol. 査読有、In press.

2. Sera from patients with seropositive neuromyelitis optica spectral disorders caused the degeneration of rodent optic nerve. Yoshiko Matsumoto, Akiyasu Kanamori, Makoto Nakamura, Toshiyuki Takahashi, Ichiro Nakashima, Akira Negi. Exp Eye Res. 査読有、119:61-9, 2014  
doi: 10.1016/j.exer.2013.12.010.

3. Rat chronic glaucoma model induced by intracameral injection of microbeads suspended in sodium sulfate-sodium hyaluronate. Matsumoto Y, Akiyasu Kanamori, Makoto Nakamura, Akira Negi. Jpn J Ophthalmol. 査読有、58:290-7, 2014  
doi: 10.1007/s10384-014-0311-y

[学会発表](計 7 件)

1. Impaired axonal transport in a rodent model of optic neuritis due to NMO spectrum disorder. Yoshiko Matsumoto, Akiyasu Kanamori, Sho Nobuyoshi, Ichiro Nakashima, Makoto Nakamura, ARVO、2015年5月2日、オーランド (アメリカ)

2. 金森章泰、教育セミナー「緑内障研究に役立つ知識」視神経変性モデル、第119回日本眼科学会総会、2015年4月16日、札幌 (北海道)

3. 松本佳子、金森章泰、延吉章、中島一郎、中村誠、視神経脊髄炎関連疾患における視神経炎の軸索輸送障害、第119回日本眼科学会総会、2015年4月16日、札幌 (北海道)

4.延吉章、金森章泰、松本佳子、中村誠、視神経脊髄炎関連視神経炎ラットに対するヒト免疫グロブリンの効果、第 52 回日本神経眼科学会、2014 年 12 月 12 日、横浜（神奈川県）

5.金森章泰、シンポジウム NMO ラットモデルによる病態解析、第 52 回日本神経眼科学会、2014 年 12 月 12 日、横浜（神奈川県）

6.金森章泰、NMO の基礎的病態、近畿神経眼科セミナー、2014 年 7 月 19 日、大阪（大阪府）

7. Yoshiko Matsumoto, Akiyasu Kanamori, Makoto Nakamura, Ichiro Nakashima, Akira Negi. Impact of plasma from patients with neuromyelitis optica spectrum disorders on the optic degeneration in rats, ARVO、2013 年5月4日、シアトル（アメリカ）

〔図書〕(計 1 件)

1.金森章泰、神経眼科、モデル動物による視神経脊髄炎の研究、2014、32 (142-147)

〔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

金森 章泰 (KANAMORI, Akiyasu)

神戸大学附属病院眼科講師

研究者番号：10444572

(2)研究分担者

中島 一郎 (NAKASHIMA, Ichiro)

東北大学医学研究科神経内科学准教授

研究者番号：50333810

(3) 研究分担者

根木 昭 (NEGI, Akira)

元神戸大学医学研究科眼科学教授

研究者番号：00189359