

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861654

研究課題名(和文) 実験的視神経炎の視機能解析と病態メカニズムの解析

研究課題名(英文) Visual function and Pathogenesis of Experimental Optic Neuritis

研究代表者

松永 芳径 (Matsunaga, Yoshimichi)

東京医科大学・医学部・兼任助教

研究者番号：20421050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：1. 実験的視神経炎のOKT視力低下時には、病理学的に視神経内に細胞浸潤が無く、神経軸索の障害を認めなかった。つまり、機能的な軸索障害が生じている可能性が示唆された。2. 視神経脊髄炎(NMO)に合併する視神経炎には、Axo-Glial Junctionの障害が原因で、血清中にneurofascinが副産物として認められる可能性が示唆された。3. 抗アкваポリン(AQP)-4抗体陽性視神経炎患者の前房水中には、抗AQP-4抗体が存在し、網膜内層を直接障害している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：1. There is a possibility that functional axonal dysfunction precedes, pathological axonal damage in experimental optic neuritis. 2. Serum neurofascin may be a byproduct of axo-glial junction damage in patients with optic neuritis in neuromyelitis optica. 3. Anti-aquaporin-4 (AQP-4) antibody exists in the aqueous humor of AQP-4 positive optic neuritis patients. Therefore, there is a possibility that inner retinal layer thinning is a result of direct retinal damage.

研究分野：眼科学

キーワード：神経眼科 視神経炎 視神経脊髄炎 neurofascin axo-glial junction

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症患者の脳病理において、神経軸索を取り囲むミエリンが保たれていながら軸索損傷が存在することが報告されている。(Bistch A et al. Brain, 2000) 申請者は、当教室で作成した高率に視神経炎を発症する脱髄性視神経炎のマウスモデルである実験的自己免疫性視神経炎(EAON)(Kezuka Tet al. J Biomed Biomed, 2011)を用い、電気生理学的異常が生じる以前に、一般的な免疫担当細胞であるT細胞ではなくマイクログリアが視神経内に浸潤することを報告した。また、マウスの視神経機能を Opto-Kinetic Tracking(OKT)視力を用いて測定した結果、炎症の中心的役割を担うT細胞が浸潤する以前にOKT視力が低下し、マイクログリアの浸潤を認めることを報告した。(Matsunaga Y, et al. IOVS 2012) これらの結果をふまえ、以下の(1)~(3)の仮説を立てた。EAONにおいて(1)OKT視力が低下する時、視神経内のマイクログリアがどの程度活性化しているのか。(2)OKT視力が低下する時、マイクログリアがどのような液性因子を産生しているのか。(3)マイクログリアの活動性を選択的に抑制した場合、OKT視力は改善するのだろうか。以上の検証実験を計画した。

2. 研究の目的

- (1) 視神経炎におけるマイクログリアの病態形成およびメカニズムの解明
- (2) 抗アクアポリン-4抗体陽性視神経炎の病態形成の解明

3. 研究の方法

- (1)EAONにおけるマイクログリアおよび神経軸索障害を病理学的に経時的に評価

実験的自己免疫性視神経炎(EAON)の作成方法: C57BL6/Jマウス(8~10週)をミエリンオリゴデンドロサイトペプチド(MOG35-55)をジメチルスルホキシドとアジュバント(結核死菌と百日咳トキシン)を混和後、免疫し作成した。

マウスの視力はマウスの視運動性首振り運

動(OKT)を応用して視力を測定する Optomotry™(Cerebral Mechanics社)を用いて右眼、左眼各々のOKT視力を免疫前から、免疫した翌日より測定した。

その後、視力が低下した同日に屠殺し視神経、視交叉、視索を摘出。ホルマリンに固定。その後、パラフィンに埋包し薄切標本を作成。ニューロフィラメント抗体を用いて神経軸索を染色し、Iba-1抗体を用いてマイクログリアの染色を行い、OKT視力が低下した同時期の神経軸索の形態およびマイクログリアの観察を行った。

- (2) 視力低下時に視路内に存在する軸索障害を来す液性因子の検索

上述の作成方法でEAONを作成後、視力が低下後、採血後に屠殺。視神経、視交叉、視索を摘出し軸索障害を引き起こすTNF-Alpha, IL-1、INF-、iNOを測定するために生体試料を準備したのち、BD Bioscience Cytometric Beads Array kitを用いて測定した。

- (3) 機能的軸索障害を来す標的蛋白の検索: Neurofascin 蛋白の同定と評価

アストロサイト・オリゴデンドロサイトと神経軸索を連結する Neurofascin 蛋白に着目し、正常マウスの視路(視神経・視交叉・視索)に存在する Neurofascin 蛋白の評価を行った。C57BL6/Jマウス(8~10週)の視神経、視交叉、視索を摘出後、パラホルムアルデヒドで固定後、OCTコンパウンドに埋包後凍結。薄切標本を作成。Neurofascin抗体(Abcam)を用いて染色。Neurofascinの長さを測定した。

- (4) 視神経疾患(ヒト)における Neurofascin 蛋白の関与の可能性の検索

自己抗体を伴う視神経疾患を中心に、標的蛋白が破壊された時に、血液中に蛋白が漏出する仮説の元、血液中の Neurofascin 蛋白を測定した。対象疾患は、甲状腺視神経症、特発性視神経炎、多発性硬化症、

NMO、慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチー (CIDP)、Fisher 症候群。これら疾患の血清中に存在する Neurofascin を ELISA キット (LSBio, Cloud-Clone Corp) を用いて測定した。

(5) 抗アクアポリン(AQP)-4 抗体陽性視神経炎における眼内における抗 AQP-4 抗体の検索

白内障手術時に得られた前房水中の抗 AQP-4 抗体の解析を行い、網膜内層厚と形態との関連を検討した。手術前日に対象患者の血液を採取し AQP-4 抗体価を測定。また、手術開始直後に前房水を採取し AQP-4 抗体価を測定した。いずれも、Cell based assay 法を用いて測定した。また、術後に光干渉断層撮影計 (NIDEK、RS-3000Advance) を用い網膜内層厚と Microcystic edema の有無について評価を行った。

4. 研究成果

(1) EAON におけるミクログリアおよび神経軸索障害を病理学的に経時的に評価

EAON において視神経炎が発症後、経時的に OKT 視力を測定していくと 5 日目に視力低下し始めた。しかし、その時点での病理標本ではミクログリアが活性化した形態は認められなかった。(樹状が棍棒状に肥大した所見等)また、軸索障害を証明するニューロフィラメント染色を行っても正常対照群と比較しても軸索障害は認められなかった。つまり、病理標本で形態学的に神経軸索を構成するニューロフィラメントが障害される以前に機能的に神経軸索障害される時期が存在することが考えられた。実験当初に立てたミクログリアが視力低下の一因である仮説とは異なる結果を得たことにより、ミクログリアを標的とした実験のデザインの変更が求められた。

(2) 視力低下時に視路内に存在する軸索障害を来す液性因子の検索

マウスの OKT 視力低下時に、視神経

内には細胞浸潤が存在しないため、神経軸索機能を障害する液性因子を検索した。ELISA を実施した結果、サイトカイン IFN- γ 、IL-6、TNF- α 、iNO は検出感度以下だった。ここで考えられたのは、生体試料があまりに微量であったために検出できなかったのか、それとも視神経内に存在しない可能性の2つが考えられた。

(3) 機能的軸索障害を来す標的蛋白の検索:Neurofascin の同定と評価

マウス視神経のアストロサイト・オリゴデンドロサイトと神経軸索を連結する Neurofascin 蛋白の同定を試みた。Neurofascin とは、神経軸索に存在するとオリゴデンドロサイトやアストロサイト等支持細胞との連結部分(Axo-Glial junction)に存在する蛋白の1種である。Neurofascin への障害が、脱髄よりも先行することを多発性硬化症患者の脳病理で報告されている。(Howel OW et al. Brain 2006) また、慢性炎症性脱髄性ポリニューロパチー (CIDP) では Neurofascin に対する自己抗体の存在の報告も存在する。そこで、マウス視神経・視交叉における neurofascin の存在をまず確認した。視神経の neurofascin の長さは $4.98 \pm 1.27 \mu\text{m}$ 、視交叉では $4.36 \pm 1.36 \mu\text{m}$ であった。正常マウスの neurofascin 蛋白の長さをふまえ、EAON において視力低下時に neurofascin の長さがどのように変化するか今後検討する。

(4) 視神経疾患における Axo-Glial junction 障害の可能性の検索

多発性硬化症 (MS) や視神経脊髄炎 (Neuromyelitis Optica: NMO) は、標的となる自己抗原であるミエリンやアストロサイトの構成する成分である Myelin Basic Protein や Glial Fibrillary Acidic Protein が髄液中や血液中に検出される。また、NMO では、SS-A 抗体や SS-B 抗体、抗核抗体等複数の自己抗体が陽性となることが知られている。Neurofascin も同様に自己抗原の標的となる可能性があり、免

疫学的異常を合併する視神経疾患において、血清中に neurofascin が存在する可能性があることから、検証した。

対象疾患: 甲状腺視神経症、特発性視神経炎、MS、NMO に合併した視神経炎、CIDP、Fisher 症候群。対象患者 14 名、正常対照群 2 名に対して neurofascin を標的に ELISA を施行。結果、NMO に合併した視神経炎患者 1 名中 1 名、CIDP 2 名 1 名で陽性となった。NMO に合併した視神経炎患者においても neurofascin が自己抗原となり障害が発生する可能性が示唆された。今後、対象患者数を増やし抗 neurofascin 抗体を直接測定し、抗体陽性視神経炎の臨床像を検討する。

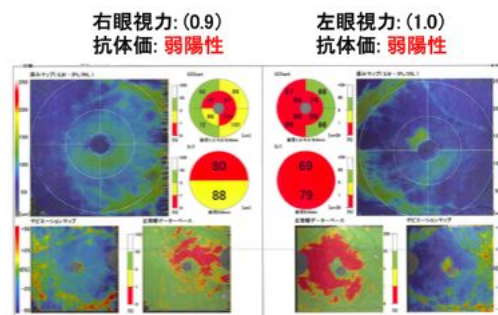
(5) 抗アクアポリン(AQP)-4 抗体陽性視神経炎の眼内における抗 AQP-4 抗体の検索

抗 AQP-4 抗体陽性視神経炎患者の網膜電図は、神経節細胞の機能障害を示す Photopic Negative Response(PhNR)の低下が抗 AQP4 抗体陰性群より顕著であることを報告した。(沼田、松永ら 第 50 回日本神経眼科学会総会 2011) この結果を踏まえ、内境界膜やミュラー細胞には AQP-4 抗原が存在することが知られているゆえに、前房中に抗 AQP-4 抗体が存在すれば網膜内層厚は菲薄し、PhNR が低下する仮説を立て検証した。(Hamann S et al. Am J Physiol Cell Physiol 1998)

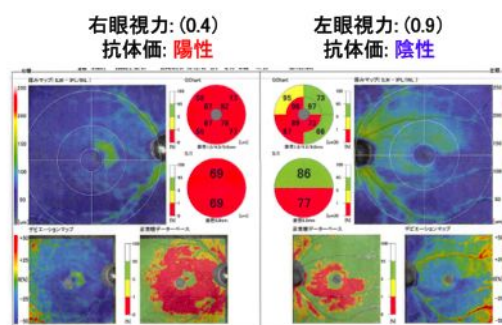
(結果 1) 症例 1 と症例 2 の前房水中の抗 AQP-4 抗体の抗体価

検体	症例1	症例2
血清	弱陽性	強陽性
前房水 (右眼/左眼)	弱陽性 / 弱陽性	陽性 / 陰性

(結果 2) 症例 1 と 2 の網膜内層厚の分布



両眼の網膜内層厚が菲薄化



網膜内層厚は右眼が著明に菲薄化

上記結果により、前房中に抗 AQP-4 抗体が存在し、抗体価が高い眼球でより強く

網膜内層厚が菲薄化していた。また、いずれの症例でも視神経萎縮に伴う網膜の変性と考えられている microcystic macula edema は認められなかった。抗 AQP-4 抗体陽性視神経炎では、視神経に存在するアスロとサイトに存在する AQP-4 のみならず網膜内に存在するミュラー細胞の AQP-4 も一次障害部位となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等
(雑誌論文) (計 0 件)
(学会発表) (計 1 件)

松永芳径、毛塚剛司、佐々一壽、松田隆作、中村瑞紀、後藤浩、田中恵 抗アクアポリン 4 抗体陽性視神経炎患者における前房水中のアクアポリン抗体の検討 第 52 回神経眼科学会, 12 月 12 日, 2014, 幕張メッセ(千葉県、千葉市) [図書] (計 0 件)
[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 芳径 (Matsunaga Yoshimichi)
東京医科大学・医学部・兼任助教
研究者番号: 20421050