

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461292

研究課題名(和文) B7-2 KO NODマウスによる脱髄に付随する軸索障害機序の解明

研究課題名(英文) The mechanism of axonal degeneration caused by demyelination in B7-2 KO NOD mouse

研究代表者

川頭 祐一 (KAWAGASHIRA, Yuichi)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40569779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症性脱髄性多発根神経炎(CIDP)では、軸索障害の合併が難治例や長期予後不良例の特徴として知られており、軸索障害の発現が臨床上の重大な問題になっている。CIDPの動物モデルとして、自然発症の慢性自己免疫性神経炎を特徴とするnon-obese diabetic (NOD) マウスが知られている。細胞性免疫の脱髄をきたす点に着目し、脱髄からどのように軸索障害をきたすのかを確認した。生後20週齢頃より軽度の炎症細胞浸潤が散見され、高度の炎症細胞浸潤と付随する活動性の脱髄所見を呈した。その後は細胞浸潤が減退するものの二次性の軸索変性から線維脱落が顕在化した。

研究成果の概要(英文)：In chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP), development of axonal degeneration is known as a characteristic of refractory to immune therapy and long-term poor prognosis. An animal model of CIDP, non-obese diabetic (NOD) mouse characterized by spontaneous chronic autoimmune neuropathy is known and we confirmed the histopathological findings of NOD mouse. Mild inflammatory cell infiltration was observed from around 20 weeks of age in NOD mouse, and exhibited highly inflammatory cell infiltration with active demyelination. After the infiltration of inflammatory cells declined, secondary axonal degeneration was observed.

研究分野：神経内科学

キーワード：免疫介在性ニューロパチー 動物モデル(animal model) B7-2ノックアウト non-obesity diabetic

## 1. 研究開始当初の背景

CIDP に対して有効性が確立されている標準的治療は、副腎皮質ステロイド、IVIg、血液浄化療法の3つである。CIDP では脱髄に付随する軸索障害の合併が、IVIg をはじめとした免疫治療に対する反応性不良の要因であると指摘されているが (Iijima M, et al. *Neurology*. 2005;64:1471-5) 脱髄から軸索障害に至る病態機序は解明されていない。また IVIg は軸索、とくにランビエ絞輪部に特異的に分布するナトリウムチャンネルの機能を改善する可能性が、閾値法による電気生理学的な解析から指摘されており、IVIg 非反応性による軸索障害の顕在化仮説を支持している。我々は脱髄から軸索障害をきたす機序に axon-myelin interaction の関与を推定し、これに関連する候補分子を対象にアミノ酸置換をきたす一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) 解析を治療反応性の観点から解析した。その結果、傍ランビエ絞輪部のジャクスタパラノード上に分布する TAG-1 (transient axonal glycoprotein-1) の SNPs ハプロタイプ・ディプロタイプが、IVIg 治療反応性に相関することを明らかにした (Iijima M, et al. *Neurology*. 2009;73:1348-52, Iijima M, et al. *J Peripher Nerv Syst*. 2011;Suppl 1:52-5)。

Axon-myelin interaction に関わる分子群、とくに TAG-1 は軸索障害に重要な役割をもつと推定され、CIDP の治療反応性を規定する病態を解明する上でも不可欠な要素であると考えられる。CIDP をはじめとする免疫介在性脱髄性末梢神経障害の治療反応性もしくは軸索障害性に対して、TAG-1 を含む axon-myelin interaction を構成する分子群の役割や影響を解明することは、難治性ニューロパチーの治療法開発における基盤になりうると考えられる。

## 2. 研究の目的

CIDP における生検神経では、マクロファージによる髄鞘の貪食像、onion-bulb の形成、髄鞘の菲薄化/再髄鞘化など、病変部神経における脱髄が特徴とされている。しかしながら治療反応性や予後の悪化には、軸索障害の関与が明らかになっている (Iijima M, et al. *Neurology*. 2005;64:1471-5)。

本研究ではヒト末梢神経組織での TAG-1 解析に加え、axon-myelin interaction に関わるランビエ絞輪部周辺のイオンチャンネルや接着分子などの発現・分布を、CIDP で解析し、分布異常の特徴を明らかにするとともに、形態学的変化との関連性、治療反応性との関連性を検証する。動物モデルに関しては、自然発症の慢性自己免疫性神経炎を特徴とする non-obese diabetic (NOD) マウスが細胞性免疫の脱髄をきたす点に着目し、脱髄からどのように軸索障害をきたすのかを解明する。今回導入する NOD マウスモデルは、細胞性免疫優位の慢性進行性モデルであり、従来急性発症の EAN モデルとは異なる機序である。これらは免疫性脱髄性末梢神経障害の病態と治療反応性 (軸索脆弱性) の解明に不可欠なツールであり、両者により異なる免疫機序に基づく脱髄性ニューロパチーの実験系が確立するとともに、ヒトでは採取が困難な生体試料の観察が容易になると期待される。

## 3. 研究の方法

### 1. ヒト末梢神経組織の分子病理解析

生検神経を用いて、ランビエ絞輪部周辺のイオンチャンネルや接着分子の発現・分布異常を検討する。具体的にはナトリウムチャンネル、neurofascin186/155、Caspr、contactin-1、TAG-1、Caspr2、カリウムチ

チャンネル、ADAM22、Necl1、Necl4をはじめとする軸索髄鞘関連分子の免疫組織染色を行い、その発現分布や発現量の変化と軸索障害のレベルを比較検討する。

## 2. 複数のマウスモデルを用いた分子病態解析

EAN 誘導とは異なる機序による免疫性ニューロパチーモデルである B7-2 ノックアウト NOD マウスを、細胞性免疫優位の慢性進行性モデルとして導入している。まだ末梢神経障害をきたす詳細な病態は明らかではないが、主要なメカニズムとして CTLA4 を介する Treg 細胞による傷害機序が候補と推定されており、標的分子に P0 への親和性が指摘されている( Soliven B. *J Peripher Nerv Syst.* 2011;16 Suppl 1:56-9 )。本研究では axon-myelin interaction や再髄鞘化に関与が推定されている分子群の発現や分布を長期にわたり形態的・免疫組織学的に評価して、軸索障害との関連性を解析する。さらに前述の TAG-1 ノックアウトマウスと NOD マウスの double knockout モデルを作成し、これを慢性進行性の脱髄性ニューロパチーの難治性モデルとして軸索障害の顕在化の有無を形態的・免疫組織学的評価、電気生理学的評価により解析する。

## 4. 研究成果

### ヒト生検神経を用いた解析

ヒト生検腓腹神経のときほぐし標本作製し、Na チャンネル、K チャンネル、TAG-1、CNTN1、Caspr、NF などの分布と発現を免疫組織学的により解析した。これらは光顕レベルの形態が保持されているにもかかわらず、node における Na チャンネル、K チャンネルの発現変化が観察され、正常例に比べて著明な低下を示した。脱髄の進行に伴って傍絞輪部にある caspr と NF155 は側方へ拡散し、ランビエ絞輪部に集積して

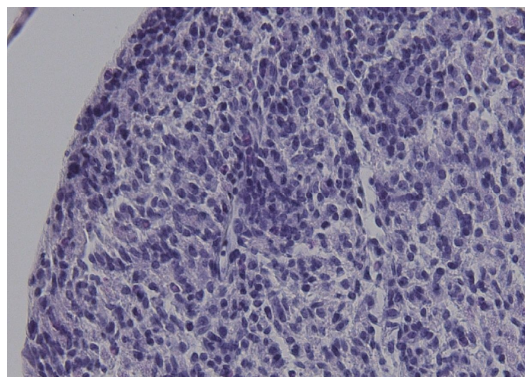
いる Na チャンネルは集積が乏しくなった。

### NOD マウスの病理解析

B7-2 KO NOD マウスは生後 20 週齢過ぎ頃よりメスの全例において自然発症する進行性の後肢優位の運動障害をきたした。初期には坐骨神経では炎症細胞浸潤と同部位の脱髄をきたし、経過とともに二次性の軸索変性所見がみられた。

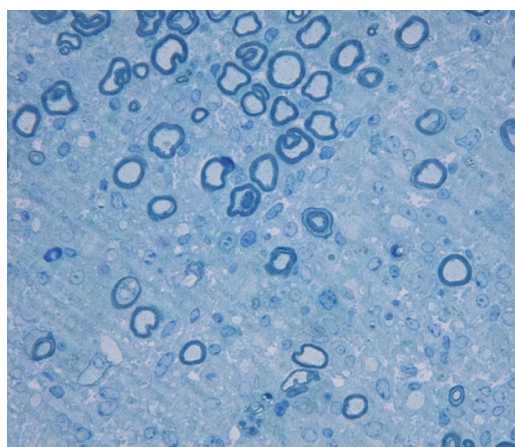
生後 20 週齢頃より軽度の炎症細胞浸潤が散見され、25 週齢くらいをピークとして高度の炎症細胞浸潤と付随する活動性の脱髄所見を呈した( 図 1、図 2 )。

図 1



坐骨神経 HE 染色。高度の細胞浸潤を神経周膜内に認める。

図 2



坐骨神経のエボン包埋トルイジンブルー染色。菲薄化した線維と軸索変性像、さらに線維脱落を認める。

30 週齡以降には細胞浸潤が減退するものの二次性の軸索変性から線維脱落が顕在化し、その後は後肢中心に高度の筋萎縮から完全麻痺の状態に陥るものの、前肢による移動や捕食は可能な状態で推移した。それぞれの病期におけるエフェクターの変化は報告されていないが、CD4, CD8 陽性の T 細胞や NK 細胞が長期にわたり出現するとともに、CD68 陽性マクロファージは病理像を反映して 25 週齡をピークに浸潤の程度は変動を示した。

#### 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 13 件 ) 査読全てあり

1. Koike H, Kadoya M, Kaida KI, Ikeda S, Kawagashira Y, Iijima M, Kato D, Ogata H, Yamasaki R, Matsukawa N, Kira JI, Katsuno M, Sobue G. Paranodal dissection in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-neurofascin-155 and anti-contactin-1 antibodies. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2017
2. Koike H, Kadoya M, Kaida KI, Ikeda S, Kawagashira Y, Iijima M, Kato D, Ogata H, Yamasaki R, Matsukawa N, Kira JI, Katsuno M, Sobue G. Paranodal dissection in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-neurofascin-155 and anti-contactin-1 antibodies. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2017 Epub ahead of print.
3. Koike H, Ikeda S, Takahashi M, Kawagashira Y, Iijima M, Misumi Y, Ando Y, Ikeda SI, Katsuno M, Sobue G. Schwann cell and endothelial cell damage in transthyretin familial amyloid polyneuropathy. Neurology. 2016 Nov 22;87(21):2220-2229.
4. Ohyama K, Koike H, Hashimoto R, Takahashi M, Kawagashira Y, Iijima M, Katsuno M, Sobue G. Intraepidermal nerve fibre density in POEMS (Crow-Fukase) syndrome and the correlation with sural nerve pathology. J Neurol Sci. 2016 Jun 15;365:207-11.
5. IgM M タンパク血症を伴うニューロパチー 川頭祐一、小池春樹 末梢神経 2016.27:74-80
6. Hashimoto R, Koike H, Takahashi M, Ohyama K, Kawagashira Y, Iijima M, Sobue G. Uncompacted Myelin Lamellae and Nodal Ion Channel Disruption in POEMS Syndrome. J Neuropathol Exp Neurol. 2015 Dec;74(12):1127-36.
7. Kawagashira Y, Koike H, Sobue G. Neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy with anti-myelin-associated glycoprotein (MAG) antibody. Nihon Rinsho. 2015 Sep;73 Suppl 7:440-5.
8. Ohyama K, Koike H, Takahashi M, Kawagashira Y, Iijima M, Watanabe H, Sobue G. Immunoglobulin G4-related pathologic features in inflammatory neuropathies. Neurology. 2015 Oct 20;85(16):1400-7.
9. Koike H, Takahashi M, Ohyama K, Hashimoto R, Kawagashira Y, Iijima M, Katsuno M, Doi H, Tanaka F, Sobue G. Clinicopathologic features of folate-deficiency neuropathy. Neurology. 2015 Mar 10;84(10):1026-33.
10. Koike H, Akiyama K, Saito T, Sobue G; Research Group for IVIg for EGPA/CSS in Japan.. Intravenous immunoglobulin

for chronic residual peripheral neuropathy in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg-Strauss syndrome): a multicenter, double-blind trial. *J Neurol.* 2015 Mar;262(3):752-9.

11. Kawagashira Y, Koike H, Ohyama K, Hashimoto R, Iijima M, Adachi H, Katsuno M, Chapman M, Lunn M, Sobue G. Axonal loss influences the response to rituximab treatment in neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy with anti-myelin-associated glycoprotein antibody. *J Neurol Sci.* 2015 Jan 15;348(1-2):67-73.
12. Ohyama K, Koike H, Katsuno M, Takahashi M, Hashimoto R, Kawagashira Y, Iijima M, Adachi H, Watanabe H, Sobue G. Muscle atrophy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: a computed tomography assessment. *Eur J Neurol.* 2014 Jul;21(7):1002-10.
13. Yokoi S, Kawagashira Y, Ohyama K, Iijima M, Koike H, Watanabe H, Tatematsu A, Nakamura S, Sobue G. Mononeuritis multiplex with tumefactive cellular infiltration in a patient with reactive lymphoid hyperplasia with increased immunoglobulin G4-positive cells. *Hum Pathol.* 2014 Feb;45(2):427-30.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 小池 春樹, 池田 昇平, 川頭 祐一, 飯島 正博, 角谷 真人, 海田 賢一, 勝野 雅央, 祖父江 元 抗 neurofascin 155 抗体陽性 CIDP における傍絞輪部の超微形態学的検討 第 28 回日本神経免疫学会学術集会 2016.9.29-30 長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

2. 川頭祐一、池田昇平、高橋美江、飯島正博、小池春樹、勝野雅央、祖父江元 IgM-MGUS に伴うニューロパチーの臨床病理学的特徴 第 27 回日本末梢神経学会学術集会 2016.8.26-27 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

3. 飯島正博、池田昇平、高橋美江、川頭祐一、小池春樹、勝野雅央、祖父江元 CIDP モデルマウスの臨床病理学的特徴と免疫療法に対する有効性の検討 第 57 回日本神経学会学術大会 2016.5.18-21 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

4. 川頭祐一、池田昇平、高橋美江、飯島正博、小池春樹、勝野雅央、祖父江元 IgM-MGUS に伴うニューロパチーの臨床病理学的特徴 第 57 回日本神経学会学術大会 2016.5.18-21 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

5. 池田昇平、高橋美江、川頭祐一、飯島正博、小池春樹、勝野雅央、祖父江元 CIDP の病型別臨床病理学的特徴 第 57 回日本神経学会学術大会 2016.5.18-21 神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)

6. 川頭祐一、池田昇平、高橋美枝、飯島正博、小池春樹、祖父江元、勝野雅央 抗 MAG 抗体陽性ニューロパチーにおけるランビエ絞輪部周辺のイオンチャンネル、接着分子の分布異常 第 26 回日本末梢神経学会学術集会 2015.9.18-19 ホテルブエナビスタ (長野県松本市)

7. 川頭祐一、池田昇平、高橋美枝、飯島正博、小池春樹、祖父江元、勝野雅央 抗 MAG 抗体陽性ニューロパチーに対する Rituximab の有用性 第 27 回日本神経免疫学会 2015.9.15-16 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市)

8. 川頭祐一、池田昇平、高橋美枝、飯島正博、小池春樹、祖父江元、勝野雅央 抗 MAG 抗体陽性ニューロパチーにおけるランビエ絞輪部周辺のイオンチャンネル、接着分子

の分布異常 第 56 回日本神経学会学術大会  
2015.5.20-5.23 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

9. 川頭祐一、高橋美枝、大山健、橋本里奈、飯島正博、小池春樹、祖父江元 脱髄性ニューロパチーにおけるランビエ絞輪部周辺のチャンネル、接着分子の分布異常 第 26 回日本末梢神経学会学術集会  
2014.8.29-8.30 ホテルルビノ京都堀川(京都府京都市)

10. 川頭祐一、高橋美枝、大山健、橋本里奈、飯島正博、小池春樹、祖父江元 脱髄性ニューロパチーにおけるランビエ絞輪部周辺のチャンネル、接着分子の分布異常 第 55 回日本神経学会学術大会  
2014.5.21-24 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

川頭 祐一 (KAWAGASHIRA, Yuichi)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40569779

### (2)研究分担者

飯島 正博 (IIJIMA, Masahiro)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座講師  
研究者番号：40437041

小池 春樹 (KOIKE Haruki)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：80378174