

183. 視神経脊髄炎におけるアストロサイト障害の解明

金森 章泰

Key words : 視神経脊髄炎, 視神経炎, アストロサイト, 軸索, アクアポリン

神戸大学 医学部附属病院 眼科学講座

緒 言

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^{1,2)}, 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. しかし, 末梢血中の抗 AQP4 抗体測定はまだ標準化されていないため, 東北大学医学部神経内科や新潟大学医学部神経内科に間接蛍光抗体法を用いての測定を依頼している現状がある.

類似疾患である多発性硬化症 (MS) はミエリンが主に障害されるのに対し, NMO ではアストロサイトがまず障害されるとされ, 現在は NMO は MS とは異なる疾患概念である認識されるようになった³⁾. アストロサイトは豊富に AQP4 を発現しており, 抗 AQP4 抗体により破壊され, さらにその周囲の神経を損傷させると考えられるが, その詳しいメカニズムは不明である. また, AQP4 はユビキタスに発現するのに対し, なぜ特定の部位の神経 (脊髄や視神経) のアストロサイトが障害されるのかも不明である. MS ではインターフェロン治療が再発予防に大きな効果を示すが, NMO ではむしろ悪化することが知られており, 両者には大きな相違点がある.

NMO の基礎研究はまさに始まったところであるが, *in vivo* 系の実験として, 抗 AQP4 抗体陽性 NMO 患者血清をマウス的大脑に直接注入した報告では著明な炎症細胞浸潤があり, アストロサイトの減少や AQP4 発現低下がみられ, 脱髄病変が生じた⁴⁾. 視神経に関しては *ex vivo* の報告しかなく, 生体内における反応と異なる点が多いと考える⁵⁾. 生体内における NMO 視神経炎に関しての研究報告はなく, 炎症や細胞レベルの障害の時間的変化を追うためには NMO における視神経炎の再現を動物モデルで行うことが必要である. また, 具体的な治療法の基礎的裏付けやタイミングの検討は生動物における研究が不可欠であるが, それらの報告は全くされていないのが現状である.

本研究では緑内障研究で得られた技術を用い, われわれは新たな *in vivo* モデルとして, 患者から採取した抗 AQP4 抗体を直接視神経に投与するモデルを作製した. また, そのモデルを用い, アストロサイト障害の病態解明や治療法につき探索した.

方 法

1. 視神経炎発症 NMO 患者ならびに特発性視神経炎患者, 正常ヒトより血清を採取し, 東北大学神経内科にて抗 AQP4 抗体の有無ならびに抗体価を測定した. それら血清をラット視神経に直接投与し, 各群で比較した.

2. 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 glial fibrillary acidic protein (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, 神経線維のマーカーとして neurofilament, 炎症細胞のマーカーとして CD11 を用いた. グルタミン酸トランスポーターである EAAT1 や EAAT2 の発現変化を時間的経過とともに検討した. 蛋白量の定量するためにウエスタンブロッティング法を行った.

3. 同時にリアルタイム PCR を用い、上記の蛋白発現を遺伝子レベルで検討した。
4. 上丘にフルオロゴールドを注入し、逆行性輸送により RGC を標識し、網膜伸展標本での RGC 数をカウントした。
5. 一群では、ヒト免疫グロブリンを静脈投与し、RGC 数および視神経線維の定量を行った。

結 果

視神経切片における免疫染色法において、AQP4 抗体陽性血清投与 7 日後、視神経内の AQP4 と GFAP の発現が減少していた⁶⁾。またヒト IgG や炎症細胞の存在を確認できたことから、患者血清が視神経内に浸潤し、炎症反応を生じたことが確認された。また、グルタミン酸トランスポーターである EAAT2 の減少が血清投与部位に見られた(図 1) が、EAAT1 は変化がなかった。また、kinesin を用いた免疫染色にて、視神経線維が消失する時点よりも早期の軸索輸送障害が確認された。投与 14 日後の視神経および網膜の切片では neurofilament が減少し、この現象はリアルタイム PCR でも確認された。

眼球側

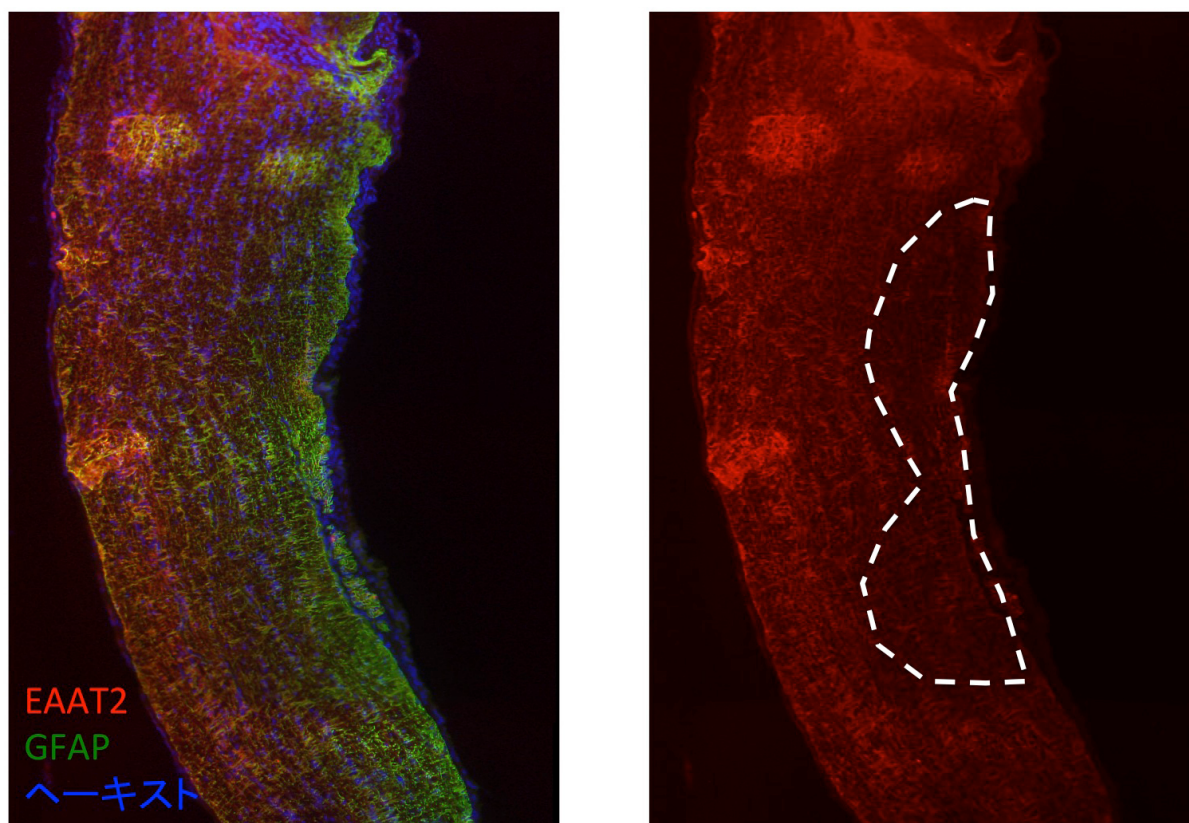


図 1. 視神経切片の免疫染色。

GFAP (緑), EAAT2 (赤), 核染色 (青)。右側の白点線で囲んだ部位が、血清注入部位で、EAAT2 の発現低下がみられる。

また、上丘のから逆行性標識した RGC を網膜伸展標本にて定量したところ、RGC の有意な減少を認めた(図 2)⁶⁾。本モデルでは患者血清投与によりラット視神経のアストロサイト障害を生じ、引き続いて RGC やその軸索が消失することが証明された。治療法の検討として、ヒト免疫グロブリンの静脈投与を一群で行ったところ、RGC 減少や神経線維の減少を抑制することが示された。

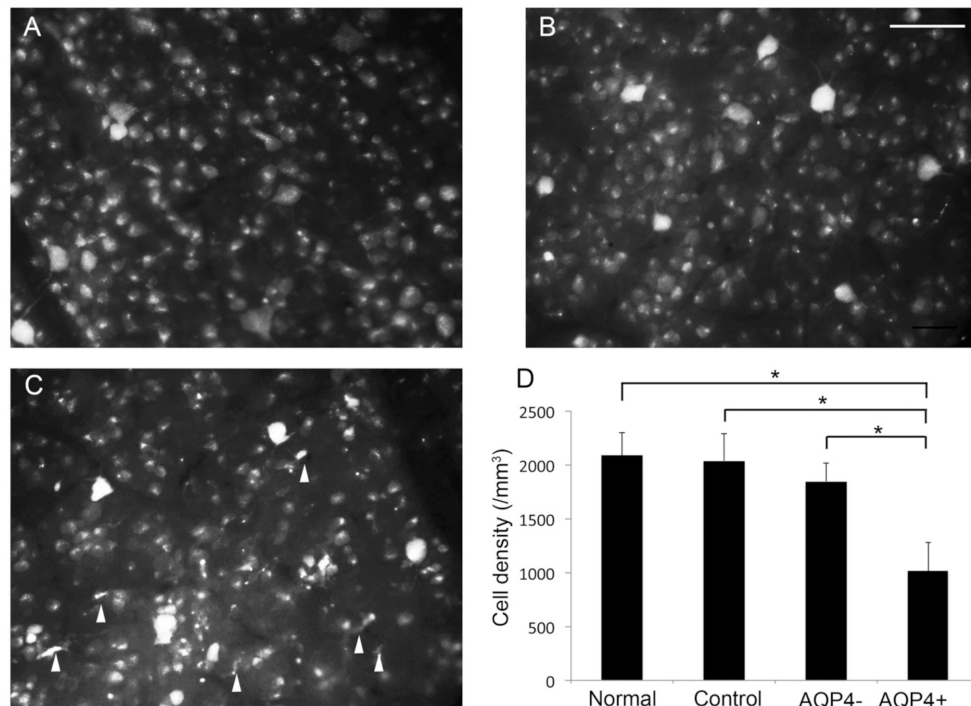


図2. 網膜伸展標本における RGC 定量.

正常ヒト血清 (A), AQP4 抗体陰性血清 (B), AQP4 抗体陽性血清 (C)を投与した網膜伸展標本における RGC 写真. 白矢頭はマイクログリアを示す. Scale bar: 50 μ m. AQP4 抗体陽性群では RGC 密度が有意に低下していた (un-paired t-test, $P=0.002$) (D).

考 察

本研究により作製した NMO 視神経炎ラットモデルでは、まずアストロサイト障害が生じ、その後軸索障害、最終的には軸索の消失およびその細胞体である RGC の減少という、NMO 視神経炎で示唆される経時的変化を追うことができた。本動物モデルは今後も病態解析に有用であると思われる。現在までに明らかにされている NMO によるアストロサイト障害メカニズムに関する報告は少ないが、培養大脳アストロサイトにおいて、抗 AQP4 抗体によって EAAT2 の発現が低下しグルタミン酸の取り込み能が低下するという機能的障害が報告されているが、EAAT2 は関与しないという別の報告もある。本研究では AQP 抗体陽性血清を注入した領域において、EAAT2 の発現低下がみられ、アストロサイト障害に EAAT2 が関与していることが *in vivo* で示唆された。また、ヒト免疫グロブリン投与による保護効果を認めたことから、治療法の検討についても本モデルは有益であると考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、神戸大学大学院医学研究科外科系講座眼科学の延吉 章、松本佳子、中村 誠、根木 昭および東北大学大学院医学系研究科神経内科学分野の中島一郎、高橋利幸である。本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Lennon, V. A., Wingerchuk, D. M., Kryzer, T. J., Pittock, S. J., Lucchinetti, C. F., Fujihara, K., Nakashima, I. & Weinshenker, B. G. : A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*, **364** : 2106-2112, 2004.
- 2) Lennon, V. A., Kryzer, T. J., Pittock, S. J., Verkman, A. S. & Hinson, S. R. : IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J. Exp. Med.*, **202** : 473-477, 2005.

- 3) Misu, T., Fujihara, K., Kakita, A., Konno, H., Nakamura, M., Watanabe, S., Takahashi, T., Nakashima, I., Takahashi, H. & Itoyama, Y. : Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain*, **130** : 1224-1234, 2007.
- 4) Saadoun, S., Waters, P., Bell, B. A., Vincent, A., Verkman, A. S. & Papadopoulos, M. C. : Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain*, **133** : 349-361, 2010.
- 5) Marignier, R., Nicolle, A., Watrin, C., Touret, M., Cavagna, S., Varrin-Doyer, M., Cavillon, G., Rogemond, V., Confavreux, C., Honnorat, J. & Giraudon, P. : Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G *via* astrocyte injury. *Brain*, **133** : 2578-2591, 2010.
- 6) Matsumoto, Y., Kanamori, A., Nakamura, M., Takahashi, T., Nakashima, I. & Negi, A. : Sera from patients with seropositive neuromyelitis optica spectral disorders caused the degeneration of rodent optic nerve. *Exp. Eye Res.*, **119** : 61-69, 2014.