

氏 名 にしやま しゅうへい 西山 修平

学位の種類 博士 (医学)

学位授与年月日 平成 23 年 3 月 25 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 1 項

研究科専攻 東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻

学位論文題目 視神経脊髄炎における抗アクアポリン 4 抗体介在性  
アストロサイトパチーの検証

論文審査委員 主査 教授 小林 俊光

教授 森 悦朗

教授 石井 直人

## 論文内容要旨

【背景】視神経脊髄炎 Neuromyelitis Optica (NMO)は重度の視神経炎と横断性脊髄炎を特徴とする炎症性中枢神経疾患である。長年多発性硬化症 Multiple Sclerosis (MS)と比較され、その異同が議論されてきた。しかし視神経脊髄炎に対する疾患特異的抗体が近年発見され、その対応抗原がアストロサイトの足突起に主に発現する蛋白アクアポリン 4(AQP4)であると判明した。一方病理学的検討において、NMO 病変では本来 AQP4 の豊富な脊髄灰白質や白質血管周囲で補体や免疫グロブリンが沈着し、AQP4 やアストロサイトのマーカーである GFAP の染色性が低下・消失しており、血管周囲に補体介在性の AQP4 やアストロサイトの傷害を生じることが示された。これらにより NMO は MS のような一次性脱髄を特徴とする疾患とは全く異なるものである事が示唆された。しかし抗 AQP4 抗体による病原性については、補体依存性細胞傷害を証明した論文は幾つか存在するがヒトアストロサイトに対して抗体依存性に生じる病原性を示した論文はまだない。

【目的】NMO 患者血清抽出 IgG によるヒトアストロサイト一次培養細胞への影響を経時的、免疫組織学的に検討する。

【方法】抗 AQP4 抗体陽性の NMO 患者 3 名、コントロールとして MS 患者 3 名、健常者 3 名の血清から IgG を抽出し、精製した。ヒトアストロサイト一次培養細胞に 5% IgG を加え 30 分間培養した。細胞に結合していない IgG を除去し、ウサギ血清由来の補体 20%を加えた。正常対照として 56℃、30 分にて加熱非動化した補体を用いた。抗体存在下・抗体および補体存在下における形態変化を蛍光顕微鏡にて経時的に観察し、AQP4 等の蛋白の発現変化を免疫組織化学的に検討した。細胞傷害性については Propidium iodide による細胞傷害アッセイ系および LDH アッセイ系を用いた。

【結果】NMO 患者血清抽出 IgG のみでもアストロサイト膜上 AQP4 のクラスター化及びエンドサイトーシスを誘導した。これと同時にアストロサイトの細胞接着能が低下し、アストロサイト足突起の縮小を認めた。これらの変化は NMO 患者血清抽出 IgG を加えて 15 分後から始まるが、培養液から NMO 患者抽出 IgG を除去すると細胞形態及び膜上 AQP4 発現の回復を認めた。NMO 患者血清抽出 IgG を加えた後に非動化处理を行っていない補体を加えると、細胞体や核は直ちに膨化

し、1 時間後にはほとんどの細胞が風船のように膨化、時間と共に培養液中の細胞残骸が増加した。破裂してしまう細胞も観察された。まだ接着して残っている細胞もほとんどが Propidium iodide 陽性であり(84.8±4.8%)、これは NMO 患者血清抽出 IgG のみの群や、補体のみの群、抗体を加えていない細胞群と比べ有意に増加していた。培養液中 LDH もこれと同様に NMO 患者血清抽出 IgG 及び補体を加えた群では、他の群と比べ有意に増加していた。コントロールとして用いた MS 患者や健常者では上記の変化は認められなかった。

【結論】これらの結果により、NMO 患者血清抽出 IgG は抗体単独でもアストロサイト膜上に AQP4 クラスターを形成し可逆的変化を起こすことが示された。さらに補体を加えることにより、アストロサイトは膨化して不可逆的に破壊されることが示された。

## 審査結果の要旨

博士論文題名.....視神経脊髄炎における抗アクアポリン4抗体介在性アストロサイトパチーの検証.....

所属専攻・分野名.....医科学専攻・神経内科学分野.....

学籍番号.....氏名.....西山 修平.....

視神経脊髄炎 Neuromyelitis Optica (NMO)は重度の視神経炎と横断性脊髄炎を特徴とする炎症性中枢神経疾患である。長年多発性硬化症 Multiple Sclerosis (MS)と比較され、その異同が議論されてきた。しかし近年視神経脊髄炎に対する疾患特異的抗体が発見され、その対応抗原がアストロサイトの足突起に主に発現する水チャンネルであるアクアポリン4(AQP4)であると判明した。一方病理学的検討において、NMO 病変では本来 AQP4 の豊富な脊髄灰白質や白質血管周囲で補体や免疫グロブリンが沈着し、AQP4 やアストロサイトのマーカーである GFAP の染色性が低下・消失しており、血管周囲に補体介在性の AQP4 やアストロサイトの傷害を生じることが示された。したがって NMO は MS のような炎症性脱髄性疾患とは全く異なる疾患である事が示唆された。しかし抗 AQP4 抗体による病原性については、補体依存性細胞傷害を証明した研究は幾つかあるがヒトアストロサイトに対する抗体依存性の病原性を検討した論文は過去にはない。

本研究では、NMO 患者血清抽出 IgG によるヒトアストロサイト一次培養細胞への影響を経時的、免疫組織学的に検討している。

方法は以下のとおりである。抗 AQP4 抗体陽性の NMO 患者 3 名、コントロールとして MS 患者 3 名、健常者 3 名の血清から IgG を抽出し、精製した。ヒトアストロサイト一次培養細胞に 5% IgG を加え 30 分間培養した。細胞に結合していない IgG を除去し、ウサギ血清由来の補体 20%を加えた。正常対照として 56℃、30 分にて加熱非動化した補体を用いた。抗体存在下・抗体および補体存在下における形態変化を蛍光顕微鏡にて経時的に観察し、AQP4 等の蛋白の発現変化を免疫組織化学的に検討した。細胞傷害性には Propidium iodide による細胞傷害アッセイ系および LDH アッセイ系を用いた。

その結果、以下の知見が得られた。NMO 患者血清抽出 IgG のみでもアストロサイト膜上 AQP4 のクラスター化及びエンドサイトーシスを誘導した。これと同時にアストロサイトの細胞接着能が低下し、アストロサイト足突起の縮小を認めた。これらの変化は NMO 患者血清抽出 IgG を加えて 15 分後から始まるが、培養液から NMO 患者抽出 IgG を除去すると細胞形態及び膜上 AQP4 発現の回復を認めた。NMO 患者血清抽出 IgG を加えた後に非動化処理を行っていない補体を加えると、細胞体や核は直ちに膨化し、1 時間後にはほとんどの細胞が膨化し、時間の経過と共に培養液中の細胞残骸が増加した。また破裂してしまう細胞も観察された。まだ接着して残っている細胞もほとんどが Propidium iodide 陽性であり(84.8±4.8%)、これは NMO 患者血清抽出 IgG のみの群や、補体のみの群、抗体を加えていない細胞群と比べ有意に増加していた。培養液中 LDH もこれと同様に NMO 患者血清抽出 IgG 及び補体を加えた群では、他の群と比べ有意に増加していた。コントロールとして用いた MS 患者や健常者では上記の変化は認められなかった。これらの結果により、NMO 患者血清抽出 IgG は抗体単独でもアストロサイト膜上に AQP4 クラスターを形成し可逆的变化を起こすことが示された。さらに補体を加えることにより、アストロサイトは膨化して不可逆的に破壊されることが示された。

本研究は、NMO の病態における抗 AQP4 抗体の意義を示唆した重要な知見である。よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。