



Title	Twitcher mouse の脱髄におけるTNF α の関与に関する研究
Author(s)	下野, 九理子
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43158
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	下 野 九 理 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 4 2 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 5 月 14 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Twitcher mouse の脱髄における $\text{TNF}\alpha$ の関与に関する研究 (Role of tumor necrosis factor α ($\text{TNF}\alpha$) in the demyelination in twitcher mouse)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡田伸太郎 (副査) 教 授 吉峰 俊樹 教 授 佐古田三郎

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

twitcher マウス (twi/twi) はリソゾーム酵素ガラクトセレブロシダーゼの欠損によっておこる、遺伝性脱髄疾患であるクラッペ病のモデルマウスである。twi/twi では生後25日頃に小脳症状で発症し、進行性の経過をたどり、生後45日前後で死亡する。近年 twi/twi において脱髄が oligodendrocyte (OLs) のアポトーシスによるものであることが報告された。

Tumor necrosis factor α ($\text{TNF}\alpha$) は *in vitro* において OLs のアポトーシスを誘導することが知られ、*in vivo* においても、多発性硬化症 (MS) の脱髄巣において $\text{TNF}\alpha$ が発現していることが報告されており、病態との関係が示唆されている。さらに MS のモデルマウスである experimental allergic encephalomyelitis (EAE) において種々の抗 $\text{TNF}\alpha$ 療法が試みられている。

今回 twi/twi の脳において $\text{TNF}\alpha$ の発現を免疫組織学的手法により検討し、さらに臨床症状の進行に伴う $\text{TNF}\alpha$ の変化について検討を行い、OLs のアポトーシスと脱髄における $\text{TNF}\alpha$ 発現の関連性について検討した。

【方法】

日齢20、30、40の twitcher mouse (twi/twi) と正常同胞 (+/+) を用いて凍結切片を作成し、 $\text{TNF}\alpha$ -PE を用いて反応させた後、蛍光抗体法にて陽性細胞を観察した。RCA-1 との免疫二重染色には $\text{TNF}\alpha$ 免疫染色後に RCA-1 と反応させた後、avidin-FITC で発色させ、観察した。

日齢40の twi/twi、+/+ のパラフィン切片を用いて、LFB-PAS-Hematoxylin 染色と抗 MBP 抗体を用いて MBP 免疫染色を行い、脱髄を観察した。また TUNEL 染色を行いアポトーシス細胞を検出した。

Light Cycler PCR and detection system を用いて定量的に PCR を行った。日齢20、30、40の twi/twi、+/+ の凍結検体から RNA を抽出した後、cDNA を合成し、 $\text{TNF}\alpha$ と内因性コントロールとして Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) を PCR にて増幅した。それぞれの PCR 産物を精製後、pGEM ベクターに ligation し、シーケンスにより確認し、対数表示の標準曲線を作成した。検体は同様にして $\text{TNF}\alpha$ と G3PDH の PCR 増幅を行い、対数線上のサイクル数をプロットし、標準曲線に対比させて cDNA コピー数を算出した。

【結果】

1) 免疫染色

すべての正常マウスおよび日齢20の twi/twi の脳では TNF α 陽性細胞は脳、小脳ともに出現していなかったが、日齢30、40の twi/twi では大脳白質、脳幹、小脳白質において発現しており、特に小脳白質、中脳上部の第5神経核において最も強く発現していた。これらの部位では、TUNEL 陽性細胞が多く、また MBP 免疫染色、LFB-PAS 染色にて脱髄が著しい部位に一致していた。免疫二重染色では TNF α 陽性細胞は RCA-1 染色においても染色されており、この細胞がミクログリア/マクロファージであることが確認された。

2) TNF α の mRNA 定量と加齢に伴う変化

TNF α の mRNA 量はすべての正常マウスおよび twi/twi の20日の小脳、大脳ともに有意な上昇は認めなかった。twi/twi の日齢30、40の小脳においては日齢に伴って有意に上昇し、日齢40では正常の約40倍にも達していた。一方 twi/twi の大脳においては日齢30ではあまり増加せず、日齢40において小脳の約15倍の上昇を示した。

【総括】

今回の研究により twi/twi において TNF α が最も顕著な症状の一つである小脳症状に一致して小脳、脳幹に強く発現していることが明らかとなった。神経病理学的にも TNF α の強発現している部位は TUNEL 陽性細胞が多く、著しい脱髄を認めた。従って twi/twi において1) マクロファージの浸潤や、ミクログリアの活性化、2) これらの炎症性細胞からの TNF α 産生、3) TNF α を含むサイトカインに誘因される OLs のアポトーシスが脱髄の一つの要因であると考えられた。

近年 EAE において TNF α の産生を抑制するホスホジエステラーゼ阻害剤によって組織への炎症細胞浸潤が抑制されたと報告され、さらに種々の抗 TNF α 療法が試みられている。

これらのことから twi/twi においても抗 TNF α 療法の可能性が示唆され、本研究に引き続いて、ホスホジエステラーゼ阻害剤による抗 TNF α 療法を試みる予定である。クラッペ病を含む遺伝性進行性脱髄疾患以外にも、有効な治療手段を持たない脱髄性疾患があり、今後 twi/twi の病態解明と治療への試みを通じてこれらの治療法の確立が期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究はクラッペ病のモデルマウスである twitcher マウスにおける TNF α の発現とその量的変化、局在と臨床症状との関連性について免疫組織学的手法・分子生物学的手法を用いて検討したものである。小脳症状の発現する時期と一致して小脳に優位に TNF α がマクロファージ/ミクログリアに発現していることが明らかとなり、症状の進行に伴って増加していた。また TNF α の増加の著しい部位においてオリゴデンドロサイトのアポトーシスが顕著であり、強い脱髄を来していた。遺伝性脱髄疾患の脱髄に免疫学的機序、特に TNF α の関与についての詳しい報告は今までになく、現在有効な治療法のない遺伝性脱髄疾患において抗 TNF α 療法の可能性を示唆する重要な所見であり、学位の授与に値すると考えられる。