The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Twitcher mouse の脱髄におけるTNFα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、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

【22】

氏　　名	下（しも）　野（の）　九理子（くりこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16420　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TNFαの関与に関する研究 （Role of tumor necrosis factor α（TNF α）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ベ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（TNF α）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TNF α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TNF α療法が試みられている。

今回twi/twiの脳においてTNF α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TNF α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TNF α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、TNF α-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TNF α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、TNF α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、シークエンスにより確認し、対数表示の標準曲線を作成した。検体は同様にしてTNF α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 TNFα陽性細胞は大脳、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 TNFα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）TNFαの mRNA 定量と加齢に伴う変化

TNFα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 TNFα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 TNFα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、マイクログリアの活性化、2）これらの炎症性細胞からの TNFα産生、3）TNFα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 TNFα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 TNFα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 TNFα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 TNFα療法を試みる予定である。クラッベ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

本研究はクラッベ病のモデルマウスである twitcher マウスにおける TNFα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 TNFαがマクロファージ/マイ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 TNFα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 TNFα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 TNFα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。