



Title	パーキンソン病モデルマウスにおける抗RGMa抗体の治療効果についての検討
Author(s)	小田, 若菜
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76290
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （小 田 若 菜）	
論文題名	パーキンソン病モデルマウスにおける抗RGMa抗体の治療効果についての検討
論文内容の要旨	
<p>【目的】</p> <p>パーキンソン病（PD）は、安静時振戦や筋強剛、動作緩慢、姿勢反射障害といった運動障害を4大症状とする進行性の神経変性疾患である。中脳黒質にあるドーパミン神経細胞の変性、脱落によるドーパミンの減少が原因であると知られている。現在使用されているPDの治療薬は、ドーパミンの補充など対症療法が中心であり、進行性の神経細胞の変性を改善する有効な治療薬は存在しない。今回着目したRepulsive guidance molecule-a（RGMa）は、胎生期において網膜や海馬の神経細胞の軸索誘導に関与するタンパク質であるが、神経細胞死や生体内での免疫応答に関与することが知られている。また近年、RGMのサブタイプの一つであるRGMaがPDやアルツハイマー病、脊髄損傷、多発性硬化症など多くの中枢神経疾患において増加していることが報告されている。さらに、脊髄損傷後に損傷部においてRGMaの発現増加がみられ、RGMaの効果を中和する抗RGMa抗体を損傷部に局所的に投与したところ、有意な運動機能改善と皮質脊髄路の再生が認められたことも報告されている。</p> <p>さらに、PDなどの神経変性疾患においてミクログリアをはじめとした活性化グリア細胞が神経炎症をひきおこし、神経変性に関与する可能性が示され、神経変性疾患の発症機序におけるミクログリアの機能が注目されている。PD患者の剖検例においても、黒質へのミクログリアの異常な集積とその活性化が報告されている。</p> <p>本研究の目的は、PDモデルマウスにおける抗RGMa抗体の治療効果を明らかにすること、さらにRGMaがPD病態を形成するプロセスにミクログリアによる神経炎症が関与していることを明らかにすることとした。</p> <p>【方法】</p> <p>①PDモデルマウスにおけるRGMaの発現解析 MPTP投与によるPDモデルマウスを作製し、黒質緻密部を摘出後、リアルタイムPCR法によりRGMaとその受容体（neogenin）の発現を定量した。また免疫組織化学染色によりRGMaの局在を確認した。</p> <p>②抗RGMa抗体のドーパミン神経変性抑制作用の検討 MPTP投与PDモデルマウスに、浸透圧ポンプを用いて抗RGMa抗体を14日間持続的に脳室内に投与した。また、ヒト化抗RGMa抗体をMPTP最終投与の0、3、7、10、14日後にマウスの尾静脈より経静脈的に投与した。それぞれのマウスの脳切片を用いて、抗TH抗体と抗Iba1抗体による免疫組織化学染色を行い、抗体投与後の黒質緻密部におけるドーパミン神経細胞（TH陽性神経細胞）とミクログリア（Iba1陽性細胞）の数を経時的に計測した。</p> <p>③RGMa過剰発現による黒質線条体路への影響の検討 ドーパミン神経特異的にRGMaを発現させるアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）を用いてマウスの黒質のドーパミン神経にRGMaを過剰発現させた。黒質緻密部におけるドーパミン神経の変性と炎症応答について免疫組織化学染色を用いて検討した。またAAV注入から12週後までグリッド試験とステッピング試験を用いて黒質線条体路の障害による運動機能への影響を評価した。</p> <p>④RGMaによる黒質緻密部のドーパミン神経変性とミクログリアの活性化の関与についての検討 AAVを用いて黒質のドーパミン神経特異的にRGMaを過剰発現させたマウスに、AAV投与2週後から21日間連続でミクログリア活性阻害剤であるミノサイクリンを腹腔内に投与した。AAV投与後から12週後まで、前述の2つの行動試験に加えてポール試験を用いてRGMaの過剰発現によって誘導されるPD様の運動障害への影響を検討した。さらに、ミノサイクリン投与による黒質緻密部のドーパミン神経の変性とミクログリアの集積への影響についても免疫組織化学染色を用いて検討した。</p> <p>⑤RGMaによって活性化されたミクログリアと神経炎症についての検討 黒質で発現が亢進したRGMaがミクログリアの活性化とそれに伴う炎症応答を誘導すると仮定し、ミクログリアの</p>	

活性化を組織学的に評価し、ミクログリアにおける炎症関連遺伝子などの発現量を検討した。RGMa存在下で培養したミクログリアとRGMa過剰発現マウスから単離したミクログリアにおける炎症関連遺伝子と抗炎症性遺伝子の発現量をリアルタイムPCR法を用いて定量した。またRGMaのミクログリアへの影響を明らかにするためにミクログリアの活性化について形態学的に評価した。

【結果】

- ① RGMaはMPTP投与21日後に黒質のドパミン神経に発現しており、コントロール群と比較して黒質において発現量が増加していた。受容体neogeninの発現はコントロール群と比較して変化は見られなかった。
- ② 抗RGMa抗体をMPTP投与の2日後から15日後、または9日後から21日後脳室内に持続投与すると、MPTP投与による黒質のドパミン神経細胞の減少がMPTP投与21日後で有意に抑制されていた。また、抗RGMa抗体を2日後から投与すると、MPTP投与による黒質へのミクログリアの集積は有意に抑制されていた。さらに、ヒト化抗RGMa抗体を経静脈的に投与した場合、脳室内投与と同様にドパミン神経細胞の変性阻害作用とミクログリアの集積を抑制する効果が認められた。
- ③ AAVを用いてRGMaを過剰に発現させると、AAV注入12週後で黒質のドパミン神経細胞の減少と黒質周囲へのミクログリア/マクロファージの集積が確認された。またAAV注入の5週後よりステッピング試験とグリッド試験において前肢にPD様の運動障害が認められた。
- ④ グリッド試験において、ミノサイクリンを投与することでRGMa過剰発現による運動障害が改善した。またAAV注入の5週後では、ミノサイクリン投与によって、RGMa過剰発現によるドパミン神経細胞の減少と黒質周囲へのミクログリアの集積が抑制された。
- ⑤ 培養ミクログリアにおいて、炎症関連遺伝子であるTNF α の発現が増加していた。またRGMaを過剰発現させたマウスの脳より単離したミクログリアにおいては、抗炎症性のYm1の遺伝子発現が減少していた。

RGMaの過剰発現によりミクログリアは肥大化した細胞体と短縮した突起をもつ活性化型へ変化した。ミノサイクリン投与により突起数と突起長がコントロール群と同程度まで改善した。このことから、RGMaは形態学的にも遺伝学的にもミクログリアを活性化し、炎症反応を誘導することが示唆された。

【結論】

本研究において、PDモデルマウスに抗RGMa抗体を投与することで、投与期間や投与経路に関わらず、ドパミン神経保護作用が得られた。さらに、RGMaを黒質に過剰発現させることで、RGMaがPD様の運動障害やドパミン神経変性および神経炎症を引き起こした。また、ミクログリアの活性化を抑制するとRGMaによる神経傷害が軽減したことから、RGMaによるPD病態の形成過程に活性化ミクログリアが関与していることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (小田 若菜)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 丹羽 均
	副 査	教 授 脇坂 聡
	副 査	准教授 波多 賢二
	副 査	講 師 権田 知也
論文審査の結果の要旨		
<p>本研究は、パーキンソン病モデルマウスにおける抗 RGMa 抗体の治療効果について検討したものである。</p> <p>本研究より、MPTP 投与パーキンソン病モデルマウスにおいて、抗 RGMa 抗体はドパミン神経保護作用と炎症応答の抑制作用を示した。また黒質において発現が亢進した RGMa がパーキンソン病の病態を形成し、これにはミクログリアが関与していることが明らかになった。</p> <p>このことから、パーキンソン病において、RGMa とそれに伴うミクログリアによる神経炎症が治療のターゲットとなる可能性が示された。</p> <p>よって博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p>		