

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14353

研究課題名(和文)血液で神経障害を検出する方法の開発

研究課題名(英文)Development of blood biomarker for neuronal injury

研究代表者

竹居 光太郎(TAKEI, Kohtaro)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：40202163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症の病態を反映した有用なバイオマーカーの開発を目的とし、血液に含まれるLOTUSの検出・定量を試みた。最初に血液中に分泌されるLOTUSのC末端領域の特異的配列を解析し、切断部位の位置を同定して7種の断片を見いだした。その7種の断片ペプチドを作製してMRM法にて検出感度を測定したところ、検出感度がMRM法に適用可能な1種の断片を見いだした。一方、ELISA法に供するためのLOTUSに対する特異抗体作製に必要な抗原ペプチドを同定し、その抗原ペプチドを用いて作製したモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティング法によって血液に含まれる微量なLOTUSの検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have made an attempt to detect and examine blood levels of LOTUS. First, we analyzed specific amino acid sequences at the C-terminal of secreted LOTUS in blood and found end of the C-terminal in intermediate region between EGF domain and expected GPI binding site. We detected seven fragments of LOTUS in blood, in total. While most of the fragments were not suitable for application of MRM method due to lack of sensitivity for the MRM methodology, one fragment could be applied to the MRM method. On the other hand, we identified peptide region of LOTUS as an antigen for specific monoclonal antibody against secreted LOTUS in blood, and obtained successfully the specific monoclonal antibody. Then, western blotting using the specific monoclonal antibody revealed that small amount of secreted LOTUS in blood could be detected. We have now tried to examine and validate association of blood levels of the secreted LOTUS with disease activity in MS.

研究分野：神経科学

キーワード：バイオマーカー 神経障害 血液 LOTUS ELISA法 MRM法

## 1. 研究開始当初の背景

国の難病に指定されている自己免疫性・脱髄性神経疾患である多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) は再発を繰り返しながら神経障害が進行する原因不明の難病である。確定診断後も再発を繰り返しながら増悪するため、再発時の早期診断・早期治療が予後を大きく左右することになる。MS の再発診断は、臨床症候に加え、主として MRI 所見で判断される。しかし、常時 MRI 検査ができる施設は限られ、緊急性に検査を行うことは非常に困難である。一方、MS の再発・病勢診断において、血液・髄液ともに信頼性が確立された検査法は現存しない。病態を反映したバイオマーカーが存在しないために病勢の客観的な評価が困難で、それが起因して治療法のエビデンス確立が遅れ、治療法の開発を妨げている。このように、MS の病勢診断に有用なバイオマーカーの開発が重要な課題となっている。

LOTUS とは、申請者らが発見した神経回路形成に係る機能分子で、内在性の Nogo 受容体アンタゴニストとして機能する (Sato et al., *Science*, 2011)。Nogo 受容体とは中枢神経系のミエリン膜に存在する再生阻害因子などの受容体で、神経細胞が Nogo 受容体を介してリガンド分子を受容すると神経突起伸長が著しく阻害されることが知られている。近年になって、Nogo 受容体が MS 患者のリンパ球に高発現することや、Nogo 受容体のリガンド分子 Nogo に対するワクチン療法が MS 病態モデル動物において病態発症を抑制することなどが報告され、Nogo や Nogo 受容体が MS の発症や病態進行と関連する報告が相次いだ。そこで、申請者は LOTUS が MS の病態・病勢と機能的関連があると考え、脳脊髄液中 LOTUS 濃度について解析したところ、MS の再発症例で LOTUS 濃度の顕著な低下を見出した。更に、MS の寛解群では LOTUS 濃度の低下は見られず、脳脊髄液中の LOTUS は病勢を反映して変動すると考えられた (Takahashi et al., *JAMA Neurology*, in press)。驚くべきことに、他の多くの炎症性・脱髄性神経疾患においても同様の変動が認められ、MS のみならず、LOTUS 変動の検出は、炎症性・脱髄性神経疾患に共通する神経障害の検出に奏功すると考えられた。

## 2. 研究の目的

多発性硬化症において、病態を反映した有用なバイオマーカーは存在せず、優れたバイオマーカーの開発が重要課題となっているが、上述のように、申請者らが発見した神経

回路形成分子 LOTUS は、多発性硬化症の病勢に伴って脳脊髄液中の LOTUS 濃度が著明に変動することが判明した。そこで本研究では、血液中に含まれる微量な LOTUS の検出・定量にチャレンジし、今までにない侵襲性の少ない血液検査による診断法の開発を目指す。一方、脳脊髄液中の LOTUS 濃度の変動は、他の多くの炎症性・脱髄性神経疾患においても同様の変動が認められ、多発性硬化症のみならず、炎症性・脱髄性神経疾患に共通する神経障害の検出に奏功する。更に、LOTUS 濃度の変動をもたらす原因を解明し、炎症性・脱髄性神経疾患に共通する病態発症機構の解明も目指す。

## 3. 研究の方法

LOTUS を MS の病態を反映する血液バイオマーカーとして確立するため、特異性の高いモノクローナル抗体を作製して感受性の高い ELISA キットを開発する。これと並行して、プロテオミクスによる方法 (MRM 法) を応用して血液中の LOTUS 濃度測定手法の開発に挑戦し、本研究の目的である鋭敏な血液バイオマーカーとしての開発を目指す。更に、免疫反応に対する LOTUS 発現への影響を解析して MS などの炎症性・脱髄性神経疾患の病態との関連性を検討し、LOTUS の発現変動と MS の病態との関わりを明らかにする。この段階に到達した場合、上記の検出法を用いて約 200 検体以上の症例について、LOTUS 濃度の変動と臨床情報、特に神経障害度との関連を解析することで、血液内 LOTUS 濃度の変動とその特徴を明らかにする。

## 4. 研究成果

多発性硬化症の病勢に伴って脳脊髄液中の LOTUS 濃度が著明に変動することを見だし既に報告した (Takahashi et al., 2015)、多発性硬化症における病態を反映した感受性の高い有用なバイオマーカーは現存していないため、より感受性の高い新たなバイオマーカーの開発を目的とし、血液中に含まれる微量な LOTUS の検出・定量を試みた。

最初に、血液中に分泌される LOTUS の C 末端領域の特異的配列を解析したところ、切断部位は EGF-CA ドメインと予想 GPI 結合部位との間に位置し、様々な部位で切断された 7 種の断片を見いだした。その 7 種の断片ペプチドを作製して MRM 法にて検出感度を測定したところ、多くは MRM 法による検出感度としては不足するものであったが、1 種の断片は検出感度が高く MRM 法に適用可能なものであった。しかしながら、血液中に実際に存在する LOTUS の断片を MRM 法で測定した場合、正しく LOTUS 断片を検出しているか不明な点があり、現在検出精度の向上に向けた検討を行っている。

一方、ELISA 法に供するための LOTUS に対する特異抗体作製に必要な抗原ペプチ

ドを同定した。次に、その抗原ペプチドを用いてモノクローナル抗体の作製を試みた。既存の抗体、および新たに得られたモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティング法によって血液中に含まれる微量な LOTUS の検出に成功した。

血液は、脳脊髄液とは異なり、Crtac-1A という LOTUS (別名 Crtac-1B) のスプライシングバリエーションが多量に含まれているため、Crtac-1A と LOTUS を区別できる特異性の高い抗 LOTUS 抗体による ELISA 検出を試みると共に、LOTUS 断片を V8 プロテアーゼなどで低分子化して感度を上げた MRM 法による検出を試み、血液での検出法の確立を行う。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

- 1) Takahashi, K., Kurihara, Y., Suzuki, Y., Goshima, Y., Tanaka, F., and Takei, K. Association of cerebrospinal fluid levels of lateral olfactory usher substance protein with disease activity in multiple sclerosis. *JAMA Neurology*, 72(2): 176-179 (DOI: 10.1001/jamaneurol.) (2015) (査読有) .
- 2) Takahashi, K., Takei, K., and Tanaka, F. Association of multiple sclerosis with lateral olfactory tract usher substance (LOTUS), a possible endogenous inhibitor of axonal degeneration. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, 6 : 64-69 (2015) (査読無) .
- 3) Takahashi, K., Tanaka, F., and Takei, K. LOTUS, a possible endogenous inhibitor of axonal degeneration, as a biomarker for multiple sclerosis. *Neural Degenerative Disease Management*, 5 (6): 469-472 (doi:10.2217/nmt.15.47) (2015) (査読有) .
- 4) 高橋慶太, 田中章景, 竹居光太郎 多発性硬化症の新規病勢診断マーカー. *臨床神経科学 (Clinical Neuroscience)* 34(4):484-485, 中外医学社 (2016) (査読無) .
- 5) 高橋慶太, 田中章景, 竹居光太郎 軸索再生関連分子の多発性硬化症診断マーカーへの応用. *Brain and Nerve* 68(1): 82-89 (2016) (査読無) .

[学会発表](計 8 件)

- 1) 高橋慶太, 栗原裕司, 竹内英之, 竹居光太郎, 田中章景 (2016) 神経機能分子 LOTUS は実験的自己免疫性脳炎の免疫病態にも関与する. 第 28 回日本神経免疫学会, 長崎.
- 2) 高橋慶太, 栗原裕司, 田中章景, 竹居光太郎 (2016) 内在性 Nogo 受容体アンタゴニスト LOTUS は実験的自己免疫性脳炎の病態に関与する, 第 59 回日本神経化学学会, 福岡.
- 3) Takahashi, K., Kurihara, Y., Takeuchi, H.,

Takei, K., Tanaka, F. (2016) LOTUS protein, an endogenous Nogo receptor antagonist, is associated with induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). 第 3 回 MS Summer College, 神戸.

- 4) 高橋慶太, 栗原裕司, 田中章景, 竹居光太郎 (2016) 内在性 Nogo 受容体アンタゴニスト LOTUS は実験的自己免疫性脳炎の発症に関与する, 第 39 回日本神経科学会, 横浜.
- 5) 高橋慶太, 栗原裕司, 田中章景, 竹居光太郎 (2015) LOTUS を応用した多発性硬化症の新規治療法の検討. 第 37 回神経組織培養研究会, 鹿児島.
- 6) 高橋慶太, 栗原裕司, 鈴木ゆめ, 五嶋良郎, 竹居光太郎, 田中章景 (2015) MS および炎症を伴う中枢神経疾患と神経回路形成因子 LOTUS との関連. 第 27 回日本神経免疫学会, 岐阜.
- 7) Takahashi, K., Takei, K., Tanaka, F. (2015) Association of LOTUS, a functional molecule for axonal growth, with disease activity in Multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). 第 2 回 MS Summer College, 札幌.
- 8) Takahashi, K., Suzuki, Y., Takei, K., Tanaka, F. (2015) Association of CSF levels of LOTUS protein with disease activity in multiple sclerosis. 第 56 回日本神経学会, 新潟.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ:  
<http://yokohama-cu-mbs-lotus.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹居 光太郎 (TAKEI, Kohtaro)  
横浜市立大学・生命医科学研究科・教授  
研究者番号：40202163

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

田中 章景 (TANAKA, Fumiaki)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：30378012

(4)研究協力者

栗原 裕司 (KURIHARA, Yuji)