

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19518

研究課題名(和文) 多発性硬化症の神経障害における病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenesis and development of new therapy for neurological disorder in multiple sclerosis

研究代表者

高橋 慶太 (TAKAHASHI, KEITA)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：20773740

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)：神経機能分子LOTUSの免疫系における機能と神経系における動態を明らかにした。免疫系においては、LOTUSが結合するリンパ球上の未知の分子Xがサイトカインの分泌に係わることで多発性硬化症の病態に関与していることを明らかにし、神経系では多発性硬化症の神経炎症惹起によるLOTUSの発現変動をmRNAレベルで明らかにし、炎症が神経変性を引き起こす機序の一端を突き止めた。さらに、プロテオミクス解析を行い未知の分子Xの候補を同定した。これらの結果は免疫系と神経系の両面から統合した治療を行うための治療ターゲットを提示することにつながり、これまでにない新たな治療法開発につながる大きな成果である。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the function of LOTUS, which is the functional molecule associated with neuron, in the immune system and its dynamics in the nervous system. In the immune system, we clarified that unknown molecule X expressed on lymphocytes, which is the receptor bound to LOTUS, is involved in the pathogenesis of multiple sclerosis through the secretion of cytokines. On the other hands, in the nervous system, we revealed the fluctuation of LOTUS expression by inflammation at the mRNA level, leading to mechanism of inflammation causing neurodegeneration in multiple sclerosis. Furthermore, proteomics analysis was performed to identify candidates for unknown molecule X. These results lead to the presentation of new therapeutic targets for integrated treatment in both the immune system and the nervous system and lead to the development of new therapies that have never been thought before.

研究分野：神経免疫、神経変性

キーワード：LOTUS Nogo Nogo受容体 多発性硬化症 神経変性

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症は再発と寛解を繰り返しながら神経障害が進行する原因不明の神経難病であり、若年者に発症する世界的に患者数の多い難病であることから、その克服が強く切望されている。しかし、その病態は十分に解明されていない為、障害された神経機能を改善させる根本的な治療法の開発には至っていない。現在の治療法は神経障害の悪化を防ぐ為の病勢抑制のみであり、その効果も不十分であることから、神経障害に至る病態解明と治療法開発が難病の克服にとって大きな課題となっている。多発性硬化症は自己免疫性の脱髄性疾患と考えられていたが、近年の病理学的解析により、発症初期から軸索変性が生じていることが明らかにされた。そして軸索変性の進行が神経障害の重症度と一致することから、軸索変性が多発性硬化症における神経障害の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられている。従って、軸索変性に至る機序を解明し、その病態を抑制することが神経障害を改善させる治療法を開発する上で極めて重要である。

これまで軸索変性に至る病態は解明されていなかったが、近年、軸索伸長阻害分子として知られる Nogo がその受容体である Nogo 受容体を活性化し、軸索変性を引き起こすことが明らかにされた (Petras et al. Brain 2012)。我々はこの Nogo と Nogo 受容体の結合を完全に阻害し、軸索再生を促進させる神経機能分子 LOTUS を見出し (Sato et al. Science 2011) (図 1)、多発性硬化症の病態との関連について解析を行ってきた。そして、多発性硬化症患者の脳脊髄液中から LOTUS を検出する手法を確立し、その変動を解析したところ、LOTUS 濃度が病勢の悪化に一致して著明に低下することを見出した。さらに、臨床経過に基づく解析とモデルマウス (実験的自己免疫性脳脊髄炎マウス: EAE マウス) を用いた実験を行い、疾患活動性の悪化時に、軸索変性を抑制する LOTUS の発現が低下することにより軸索変性の進行が促進されることを明らかにした (Takahashi et al. JAMA Neurol 2015)。軸索変性に対して保護的に作用する内在性分子の発現変動はこれまでに報告がなく、多発性硬化症の神経障害における病態解明において極めて重要な発見である。さらには、神経障害の進行を抑制し神経機能を改善させる治療法の開発につながる大きな可能性を秘めていることから、本研究において、LOTUS を応用した病態解明を推進し、新規治療法の開発へ展開する。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、LOTUS による神経機能障害の改善効果を検討するために、LOTUS 遺伝子欠損 (LOTUS-KO) マウスと LOTUS 過剰発現 (LOTUS-TG) マウスを作成し、これ

らのマウスに EAE を誘導してその臨床症状の比較を行い免疫応答の変化を見出している。LOTUS と結合するリンパ球上の分子を探索し、機能解析を行い多発性硬化症の重要な病態である中枢神経内の炎症増悪の機序を明らかにし、さらに、その分子を制御することによって、中枢神経内の炎症抑制を目的とする新たな治療法を検討する。

これと併せて、我々はこれまでに LOTUS の発現低下が軸索変性の進行に関与することを明らかにしていることから、本研究では LOTUS と軸索変性に係る分子との関連を解析し、多発性硬化症の神経障害にとって最も重要な病態形成因子である軸索変性の病態を分子レベルで明らかにする。さらに、我々はこれまでに軸索損傷モデル動物を用いた研究により、LOTUS が軸索再生を促進させ、神経機能回復に寄与することを確認しており、LOTUS は軸索変性の抑制だけではなく、軸索再生の促進においても効果を発揮すると考えられる。そこで、本研究では病態の解明に留まらず、LOTUS を用いた軸索変性の抑制・軸索再生の促進を目的とした治療法への応用を検討する。

すなわち、本研究は未同定分子の制御による中枢神経内の炎症抑制と LOTUS による神経系に対する機能改善 (軸索変性の抑制・軸索再生の促進) という 2 つの治療戦略を統合し、神経系、免疫系の両面から治療効果を狙う、これまでに類を見ない治療法の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

免疫系と神経系の 2 つの側面からアプローチを行い、多発性硬化症の病態解明と新たな治療法の開発を目指す。免疫系においては、LOTUS が結合するリンパ球上の未知の分子 X と病態との関わりを明らかにする。未知の分子 X が刺激されることにより、炎症性サイトカインの産生が変動することを突き止めており、これらのサイトカインは主に多発性硬化症の免疫系における主要な病態形成因子である T helper type 1 cell (Th1)、T helper type 17 cell (Th17) から産生されている可能性があり、未知の分子 X がこれらのリンパ球サブセットに発現し直接刺激されるのか、または他の経路を通して間接的に刺激されるのかを明らかにすることは病態の解明において極めて重要である。従って、未知の分子 X により引き起こされる病態生理を明らかにするために、我々のもつリンパ球培養手法・フローサイトメトリー等の機能解析手法を用いて、まずは未知の分子 X を発現するリンパ球のサブセットを明らかにし、さらに未知の分子 X が刺激されることによる病態関連サイトカインの動態や免疫細胞動態への影響 (増殖能、遊走性、接着性、分化、反応性、膜表面タンパクの発現変化など) を解析し、中枢神経内の炎症増悪の分子病態を明らか

にする。

神経系では、我々がこれまでの研究で明らかにしたように、LOTUS の発現低下が軸索変性を促進させることから、LOTUS と軸索変性との関わりを検討し、さらに LOTUS による軸索変性の制御について in vitro, in vivo で検討する。そして、これらの結果を基盤として、免疫系と神経系の両面から統合した治療を行うことで、これまで開発が困難であった神経障害に対する治療法の開発を検討する

4 . 研究成果

LOTUS-KO と LOTUS-Tg マウスを用いて、EAE マウスを作製しその表現型を確定するとともに、EAE マウスから T 細胞を採取し LOTUS と反応させることで炎症性サイトカインの分泌を促進させることを明らかにした。さらに、LOTUS がアンタゴニズムを発揮する受容体である Nogo 受容体の KO マウスを用いて同様の実験を行ったところ、LOTUS-KO マウスと同様の結果は得られず、野生型マウスと同様の臨床経過とサイトカイン分泌パターンを呈することを明らかにした。これらの結果から、LOTUS は神経細胞だけではなく、リンパ球、特に T 細胞にも作用し炎症反応を増悪させる可能性を明らかにしたとともに、その分子メカニズムは既知の Nogo 受容体を介するシグナル伝達ではなく、未同定の受容体を介することを明らかにした。この未知の受容体を同定するため、Streptavidin-Binding Peptide (SBP) タグをつけたリコンビナントタンパクを作製し、活性化リンパ球に発現するタンパクを pull down し、クロスリンカー法を用いて固定し、質量分析を行うことで LOTUS の結合タンパクの同定を試みた。その結果、bait, pull down, negative control の 3 つをデータベース検索し、FDR<0.01, score 50 で同定タンパクを抽出したところ、139 の候補タンパクが同定された。これらの候補タンパクの解析を行い、LOTUS の未知の結合タンパクを明らかにしつつある。この発見は、神経と免疫の両側面に係わるこれまでに無い治療ターゲットを提示することになる重要な成果である。さらに、炎症により髄液中 LOTUS が減少する機序を、モデルマウスを用いた実験を行い検討した結果、炎症により mRNA、タンパクの発現が低下することを明らかにした。この成果は、軸索関連分子と炎症の関連を明らかにし、神経系と免疫系の治療法に係わる新たな治療につながる大きな成果である。

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1件)

査読あり

Takahashi, K., Takeuchi, H., Kurihara, Y., Doi, H., Kunii, M., Tanaka, K., Nakamura, H., Fukai, R., Tomita-Katsumoto, A., Tada, M., Higashiyama, Y., Joki, H., Koyano, S., Takei, K. and Tanaka, F. Cerebrospinal fluid level of Nogo receptor 1 antagonist lateral olfactory tract usher substance (LOTUS) correlates inversely with the extent of neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, Feb 17; 15 (1):46. 2018

[学会発表](計3件)

(国際学会)

Keita Takahashi, Hideyuki Takeuchi, Yuji Kurihara, Hiroshi Doi, Misako Kunii, Ken-ichi Tanaka, Mikiko Tada, Shigeru Koyano, Kohtaro Takei, Fumiaki Tanaka. Cerebrospinal fluid level of LOTUS correlates inversely with the extent of neuroinflammation. The XXIII World Congress of Neurology Conference, Kyoto. 2017.9

(国内)

高橋慶太、栗原 裕司、竹内英之、竹居光太郎、田中章景：神経機能分子 LOTUS は Nogo receptor-1 非依存的に実験的自己免疫性脳炎を増悪させる 第 29 回日本神経免疫学会学術大会、札幌、2017、.10

高橋慶太、竹内英之、栗原裕司、國井美沙子、田中健一、多田美紀子、竹居光太郎、田中章景：神経機能分子 LOTUS の髄液中濃度は中枢神経感染症の炎症病勢と逆相関する 第 22 回日本神経感染症学会総会、札幌、2017、.10

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋 慶太 (TAKAHASHI Keita)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：20773740

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
竹居光太郎 (TAKEI Kohtaro)
田中章景 (TANAKA Fumiaki)