

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15458

研究課題名（和文）多発性硬化症の病勢診断における血液バイオマーカーの開発

研究課題名（英文）development of biomarker for disease activity of 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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はLOTUSが血液中に存在することを明らかにし、さらに特異抗体を用いた免疫学的な手法を用いることで、血液中LOTUSの濃度を定量的に測定する方法を確立した。そして多発性硬化症の患者検体を用いて血液中LOTUSを測定したところ、病勢に一致した興味深い変動を見出し、血液中のLOTUS濃度の変動がバイオマーカーとして有用であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに世界中で数多くの神経関連分子が髄液バイオマーカーの候補対象として研究されてきたが、多発性硬化症の臨床で用いられるようになった分子は皆無である。神経機能分子LOTUSが今までに類をみない病勢・病態を反映する新規の血液・髄液バイオマーカーとして有望であることを示した我々の研究は、30年以上も変わらない多発性硬化症の診断と検査法を大きく進歩させ、多発性硬化症の診療・研究を飛躍的に進展させるものである。

また、多発性硬化症が世界的に患者数の多い難病であることを鑑みると、早期治療を可能にする本研究成果は社会への貢献も大きく、さらに本邦発の新たなバイオ産業の創造へとつながる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that LOTUS was included in the human serum though it was a very small amount. Furthermore, we developed the quantitative method of LOTUS concentration in serum by the immunological technique using specific antibody. Measuring LOTUS concentration in the serum from patients with multiple sclerosis, we found an interesting variation of LOTUS concentration leading to establish a biomarker for the patients with multiple sclerosis, that is easy to measure and useful for judgement of disease activity.

研究分野：神経免疫疾患

キーワード：LOTUS 多発性硬化症 バイオマーカー Nogo Nogo受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症は、免疫性の神経炎症と軸索変性により、多彩な神経障害を呈する進行性の神経難病である。確定診断後も再発と寛解を繰り返しながら神経障害が進行するため、再発・病勢増悪の早期診断・早期治療が予後を大きく左右する。多発性硬化症の再発診断は臨床症候に加え主に造影 MRI 所見で判断されるが、病巣検出率が 5 割程度に限られることに加え、常時 MRI 検査のできる施設は少なく、頻回の造影剤使用による蓄積性も大きな課題となっている。このような現状にも関わらず、多発性硬化症の再発・病勢診断において、血液・髄液を用いた信頼性の確立されたバイオマーカーは未だ開発されていない。従って、実際の診療において、再発の有無は臨床症候に基づく医師の判断に委ねられることが多く、正確な早期診断や早期治療が難しい。また、患者状態の客観的な評価が難しいことが、治療法のエビデンス確立や新薬開発の遅れなど、治療分野の発展を妨げる要因となっており、汎用性が高く病態を直接反映する再発・病勢診断バイオマーカーの開発が極めて重要な課題となっている。

LOTUS は、本学で発見された神経回路形成に係わる新規の機能分子であり、内在性の Nogo 受容体アンタゴニストとして機能する(Sato Y. et al. Science 2011; 図 1)。Nogo 受容体は神経再生を阻害するキー分子として知られ、近年、多発性硬化症の神経障害の病態にも密接に係わることが明らかとなっている(Petratos S. et al. Brain 2012)。そこで我々は、Nogo 受容体アンタゴニストである LOTUS も多発性硬化症の病態・病勢と機能的関連があると考え、研究をすすめてきた。その結果、髄液中 LOTUS 濃度が多発性硬化症の病勢に一致して変動することを見出し、LOTUS がこれまでにない有望な新規病勢診断バイオマーカーとなり得ることを明らかにした(Takahashi K. et al. JAMA Neurology 2015)。

髄液バイオマーカーであっても既存の検査を大きく進展させる重要な発見であるが、より低侵襲的で利便性に優れた血液バイオマーカーへの展開が可能となれば、多発性硬化症の検査・診療に革新的な進展をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

これまでに世界中で数多くの神経関連分子が髄液バイオマーカーの候補対象として研究されてきたが、多発性硬化症の臨床で用いられるようになった分子は皆無である(C. E. Teunissen et al, Lancet Neurol 2005)。多発性硬化症に特異的な検査として 1980 年代から使われている髄液中のオリゴクローナルバンドや IgG Index は病態・病勢との係わりが確立されておらず、バイオマーカーとしての信頼性が不十分であるにも係わらず、現在に至るまで検査項目として主要な位置を占めている現状がある。極めて困難な神経疾患のバイオマーカー開発において、神経機能分子 LOTUS が今までに類をみない病勢・病態を反映する新規の髄液バイオマーカーとして有望であることを示した我々の研究は、30 年以上も変わらない多発性硬化症の診断検査法を大きく進歩させるものである。そして本研究は、これまでの我々の成果を血液バイオマーカーに展開することにより、多発性硬化症の診療・研究を飛躍的に進展させることを目的とする。

3. 研究の方法

髄液は最終的に静脈に還流することから、髄液中のタンパクは微量ながら血液に含まれるはずであり、髄液バイオマーカーから血液バイオマーカーへの展開が可能と考えられることから、特異抗体、質量分析による血液中の微量タンパク定量などの技術を用いて血液中 LOTUS の検出を試みた。

また血液中 LOTUS の測定手法として簡便性と定量性に優れた WES 法の応用を検討した。WES 法

は、自動キャピラリー式電気泳動・解析装置を用いて特異抗体により目的のタンパクを検出・定量化する手法である。

4．研究成果

質量分析、免疫学的手法を用いた解析を行ったところ、血液中の微量な LOTUS を検出することに成功し、血液バイオマーカーとしての展開を下記の通り検討した。

WES 法による髄液を用いた検討を行い髄液中 LOTUS 濃度の測定系を確立した。この測定系を元に血液中 LOTUS 濃度の測定手法への展開を図り、免疫沈降法と WES 法を応用した血液中 LOTUS を定量する手法を確立した。また、特異性の高い抗 LOTUS 抗体の探索・応用も同時に行い測定の精度を向上させた。また、中枢神経に炎症をきたす疾患モデルマウスを用いて、炎症と LOTUS の発現変動についても解析を行った。

本研究で確立した手法を用いて患者検体の解析を行ったところ、多発性硬化症の病勢に一致した興味深い血液中 LOTUS 濃度の変動を見出し、バイオマーカーとしての有用性を示した。また、モデルマウスを用いた LOTUS の発現解析により、髄液中 LOTUS の炎症に伴う濃度の変動は、中枢神経系における発現の変動に起因することを明らかにし、バイオマーカーとしての分子基盤を確立した。また髄液中 LOTUS 濃度を WES 法を用いて簡便に短時間で解析する実用性の高い測定法も確立することが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Keita, Takeuchi Hideyuki, Kurihara Yuji, Doi Hiroshi, Kunii Misako, Tanaka Kenichi, Nakamura Haruko, Fukai Ryoko, Tomita-Katsumoto Atsuko, Tada Mikiko, Higashiyama Yuichi, Joki Hideto, Koyano Shigeru, Takei Kohtarō, Tanaka Fumiaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid level of Nogo receptor 1 antagonist lateral olfactory tract usher substance (LOTUS) correlates inversely with the extent of neuroinflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 1084
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-018-1084-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Keita, Tanaka Fumiaki	4. 巻 10
2. 論文標題 LOTUS as a novel biomarker of multiple sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 27 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen3.12493	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Keita, Asano Tetsuya, Higashiyama Yuichi, Koyano Shigeru, Doi Hiroshi, Takeuchi Hideyuki, Tanaka Fumiaki	4. 巻 24
2. 論文標題 Two cases of anaphylactic shock by methylprednisolone in neuromyelitis optica	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Multiple Sclerosis Journal	6. 最初と最後の頁 1514 ~ 1516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1352458518763099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Keita, Tanaka Fumiaki	4. 巻 10
2. 論文標題 LOTUS as a novel biomarker of multiple sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 27 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1111/cen3.12493	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高橋慶太, 竹内英之, 竹居光太郎, 田中章景	4. 巻 34 (5)
2. 論文標題 軸索関連分子LOTUSを応用した多発性硬化症の診断バイオマーカー	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 60-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Keita Takahashi, Haruko Nakamura, Ryoko Miyake, Toshiyuki Takahashi, Hiroshi Doi, Hideyuki Takeuchi, Fumiaki Tanaka
2. 発表標題 Anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody;positive neuromyelitis optica spectrum disorder manifested by switching to dimethyl fumarate.
3. 学会等名 第31回日本神経免疫学会総会
4. 発表年 2019年~2020年

1. 発表者名 高橋 慶太、中村 治子、三宅 綾子、高橋 利幸、土井 宏、竹内 英之、田中 章景
2. 発表標題 フマル酸ジメチルへの薬剤変更後に抗MOG抗体陽性が顕在化した視神経脊髄炎関連疾患の3症例
3. 学会等名 第37回日本神経治療学会総会
4. 発表年 2019年~2020年

1. 発表者名 Keita Takahashi, Hideyuki Takeuchi, Yuji Kurihara, Hiroshi Doi, Misako Kunii, Ken-ichi Tanaka, Mikiko Tada, Shigeru Koyano, Kohtaro Takei, Fumiaki Tanaka.
2. 発表標題 Cerebrospinal fluid level of LOTUS correlates inversely with the extent of neuroinflammation.
3. 学会等名 第59回日本神経学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keita Takahashi, Haruko Nakamura, Ryoko Miyake, Toshiyuki Takahashi, Hiroshi Doi, Hideyuki Takeuchi, Fumiaki Tanaka.
2. 発表標題 Anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-positive neuromyelitis optica spectrum disorder manifested by switching to dimethyl fumarate.
3. 学会等名 第31回日本神経免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 慶太、中村 治子、三宅 綾子、高橋 利幸、土井 宏、竹内 英之、田中 章景.
2. 発表標題 フマル酸ジメチルへの薬剤変更後に抗MOG抗体陽性が顕在化した視神経脊髄炎関連疾患の3症例.
3. 学会等名 第37回日本神経治療学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田中 章景 (TANAKA FUMIAKI)		
研究協力者	竹居 光太郎 (TAKEI KOHTAROU)		