

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861346

研究課題名(和文) 圧迫性脊髄症増悪期における脳脊髄液バイオマーカーの同定

研究課題名(英文) Analysis of cerebrospinal fluid biomarkers in acutely worsening symptoms of compression myelopathy

研究代表者

高橋 宏 (Takahashi, Hiroshi)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：80597047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：圧迫性脊髄症における脳脊髄液検体を解析した結果、軸索損傷を反映するpNF-H、Tauの発現上昇が起こっており、軸索への障害は顕著であったのに対して、髄鞘、アストロサイト、ニューロンの損傷を反映するMBP、S100b、NSEの発現上昇は起こっておらず、これら神経細胞そのものの細胞死は軽度にとどまることが示唆された。さらに、術前のpNF-Hが高値の症例では手術成績が良好であったことから、圧迫性脊髄症急性増悪期には可逆性の軸索障害が起こっている、ということが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To our knowledge, there is no report that analyzed the various biomarkers of cerebrospinal fluid (CSF) that evaluate degree of damage to axon, astrocytes, and Schwann cells. Therefore, we determined levels of biomarkers reflecting damage to these cells in the CSF of patients with worsening symptoms of cervical compression myelopathy. We collected 69 samples of CSF from patients before spinal surgery for acutely worsening compression myelopathy (AM, 20), chronic compression myelopathy (CM, 20), and lumbar canal stenosis (LCS; control group 29). As the result, significantly higher levels of pNF-H and Tau that reflect axonal damage were detected in the CSF of patients with AM compared with those in either CM or LCS group. On the other hands, the level of MBP, S100b, and NSE were not significantly different between the three groups. The present results suggest that axonal damage is remarkable compared with demyelination, astrocytic, and neuronal damage in AM.

研究分野：脊椎、脊髄外科

キーワード：biomarker compression myelopathy cerebrospinal fluid

1. 研究開始当初の背景

圧迫性脊髄症では通常、ヘルニア、骨棘、靭帯骨化などによる慢性的な脊髄圧迫により脊髄障害が緩徐に進行するが、この慢性的な圧迫によっても急性脊髄損傷の二次損傷と同様な生体反応のプロセスが起ると考えられている。実際、時に圧迫性脊髄症は軽微な外傷を契機にあるいは特に誘因無く急激な症状増悪を呈することがある、また急性増悪の頻度は約5%に上ると報告されている。しかし、基礎研究における慢性圧迫性脊髄症モデルは未だ確立されておらず、その詳細な病態に関しては不明な点が多い。

一方、中枢神経系においては、神経細胞死に伴い脳脊髄液中に炎症性サイトカイン、蛋白の発現量の増加がみられることが知られている。具体的には、炎症性サイトカインとしてIL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , 脱髄に伴うMyelin Basic Protein (MBP), 運動ニューロンとの関連が示唆されるTAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)などが報告されており、多発性硬化症 (MS)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)など他の中枢神経変性疾患においては有用性が数多く報告されている。圧迫性脊髄症についての脳脊髄液の報告は少ないが、炎症性サイトカインとしてIL-8, IL-10, TNF- α の関与が報告されている。また、急性脊髄損傷においては、近年、軸索損傷を反映するPhosphorylated neurofilament subunit UN-H (PNFH), 脊髄浮腫を反映するAquaporin-4 (AQP-4)などの蛋白の発現が損傷髄内においておけると報告されており、特に血清PNFHは脊髄損傷におけるバイオマーカーとしての役割が期待されている。

しかし、圧迫性脊髄症においては、神経学的所見の推移以外の、客観的な評価方法がないのが現状であり、何らかの特異的蛋白の発現量変化を同定することで詳細な病態の解明につながる、およびこれらの蛋白をバイオマーカーとして活用し客観的な治療効果の判定、予後予測が可能となりうると思う。そこで、過去の中枢神経変性疾患において髄液中の特異的蛋白がバイオマーカーとして有用と報告されていることから、圧迫性脊髄症急性増悪期においても髄液中に特異的な蛋白の発現が存在するのではないかという着想に至った。

2. 研究の目的

圧迫性脊髄症増悪期において、脊髄への障害の程度、治療に対する効果を反映するバイオマーカーに関する報告はなく、病態に関しても不明な点が多い。多発性硬化症など中枢神経変性疾患における報告では髄液中に特異的な蛋白の発現上昇がおこることが報告されており、圧迫性脊髄症増悪期においても同様な変化が生じている可能性がある。本研究の目的は、圧迫性脊髄症急性増悪期における髄液を用いてバイオマーカーとなりうる蛋白を同定することである。これにより、圧

迫性脊髄症の病態の解明、症状増悪の予後予測、および薬物治療や手術による脊髄の回復の程度につき客観的な評価が可能となる。

3. 研究の方法

本研究計画では、圧迫性脊髄症急性増悪期患者における髄液中各種蛋白の発現量を定量するために、研究材料として患者の髄液の採取が必要となる。圧迫性脊髄症患者においては、通常手術の適応となるため、手術前に脊髄造影検査が必須となる。その際、髄液採取、髄液検査は必ず施行するため、その一部を研究材料として使用する。

対象年齢は20-85歳とし、採取した髄液については、急性増悪群：直近の1カ月に日本整形外科学会頸髄症判定基準 (JOA Score) にて2点以上の悪化を認めない例、慢性悪化群：急性増悪を認めない例、対照群：腰椎疾患に対して脊髄造影検査で髄液採取を行った症例、の3群に分け、入院、脊髄造影検査の際に髄液採取を行い、検体を採取、各種蛋白の定量を行った。脊髄症群、対照群は脊髄造影検査後、通常の治療方針と同様に早期に手術を施行し、治療に関して患者に不利益とならないようにした。また、臨床評価として、髄液採取時、及び術後1年時に神経学的評価を行い、脊髄障害の程度、及び術後の改善率についても評価した。

4. 研究成果

まず、第一段階としての、脳脊髄液中pNF-Hの解析を行った。対象は51例、内訳は、直近の1カ月間に日本整形外科学会頸髄症判定基準 (JOA score) が2点以上悪化した圧迫性頸髄症急性増悪期 (AM) 8例、圧迫性頸髄症慢性悪化例 (CM) 6例、および腰部脊柱管狭窄症 (LCS) 37例であった。これらの検体に対し、enzymed-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて脳脊髄液中pNF-Hの発現量を測定した。また、頸髄症手術例14例については、術前、術後6カ月のJOA scoreおよび改善率で手術成績の検討を行った。

その結果、pNF-Hの発現量 (pg/ml) はAM群で 2127.1 ± 556.8 、CM群で 175.8 ± 67.38 、LCS群で 518.7 ± 665.7 であり、AM群ではCM群、LCS群に比し有意な上昇を認めた ($p < 0.01$)。圧迫性頸髄症例におけるJOA scoreは、AM群で術前 9.5 ± 2.51 、CM群で 10.6 ± 0.80 と両群に差は認めず、術後6カ月におけるJOA score改善率はAM群で 66.0 ± 16.9 (%)、CM群で 51.2 ± 12.5 (%)とAM群でやや高値であったが有意差はなかった ($p=0.096$)。また、脳脊髄液中pNF-HとJOA score改善率に有意な相関は認めなかった。

以上結果より、圧迫性脊髄症急性増悪期において、脳脊髄液中pNF-Hの発現が上昇することがわかった (Takahashi H et al. J Clinical Neuroscience 2014)。

これを受けて、第二段階として、軸索以外の髄鞘、アストロサイト、ニューロンといっ

た神経細胞障害の程度を見るため、各種蛋白の発現量の解析を行った。対象は 69 例、内訳は、直近の 1 カ月間に日整会頸髄症判定基準(JOA score)が 2 点以上悪化した圧迫性頸髄症急性増悪期手術例(AM)20 例、圧迫性頸髄症慢性悪化手術例(CM)20 例、および腰部脊柱管狭窄症手術例(LCS)29 例である。検討項目は、軸索損傷を反映する pNF-H、軸索の微小管を構成する Tau、神経細胞質の障害を反映する NSE、アストロサイトの損傷を反映する S100、髄鞘の障害を反映する MBP とし、得られた検体に対し ELISA、ECLIA 法を用いて脳脊髄液中の蛋白発現量を測定した。また、頸髄症手術例のうち 1 年以上経過観察が可能であった 24 例については、術前、術後 1 年の JOA score 改善率で手術成績との比較検討を行った。

その結果、pNF-H 発現量(pg/ml)は AM 群 2654.8 ± 2517.2 、CM 群 198.6 ± 124.5 、LCS 群 462.9 ± 635.1 で AM 群では CM 群、LCS 群に比し有意な上昇を認めた($p < 0.01$)が Tau 発現量は各群間で有意差を認めなかった。一方 NSE 発現量(ng/ml)は AM 群 2.02 ± 0.64 、CM 群 2.04 ± 0.65 、LCS 群 2.97 ± 0.81 と LCS 群で有意に高値となった($p < 0.01$)。S100 発現量(pg/ml)は AM 群 195.7 ± 104.3 、CM 群 144.2 ± 53.0 、LCS 群 156.3 ± 35.5 と AM 群で CM 群に比しやや高値となった($p < 0.05$)が過去の報告における健常 control と同等であった。MBP は AM 群の 2 例で軽度上昇を認めただのみで他の症例では陰性であった。頸髄症手術成績では AM 群で CM 群に比し有意に高い改善率であり、pNF-H 値と改善率には正の相関を認めた ($p < 0.05$)。

以上より、圧迫性脊髄症急性増悪期の脳脊髄液検体において、軸索損傷を反映する pNF-H、Tau の発現上昇が起こっているのに対して、髄鞘、アストロサイト、ニューロンの損傷を反映する MBP、S100b、NSE の発現上昇は起こっておらず、これら神経細胞そのものの細胞死は軽度にとどまることが示唆された。さらに、術前の pNF-H が高値の症例では手術成績が良好であったことから、圧迫性脊髄症急性増悪期には可逆性の軸索障害が起こっている、ということが解明された。(Takahashi H et al. European Spine Journal 2017, in submission)

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)

高橋宏、井上雅寛. 圧迫性脊髄症急性増悪期における臨床髄液検体を用いた病態の解析. 日本脊髄障害医学会誌 29(1): 28-9. 2016.5. 査読有

Takahashi H, Koda M, Hashimoto M, Furuya T, Sakuma T, Kato K, Okawa A, Inada T, Kamiya K, Ota M, Maki S, Takahashi K, Yamazaki M, Mannoji C. Transplanted Peripheral Blood Stem Cells Mobilized by Granulocyte Colony-Stimulating Factor Promoted Hindlimb Functional Recovery After Spinal Cord Injury in Mice. Cell Transplant. 2016; 25(2): 283-92. DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/096368915X688146> 査読有

Kato K, Koda M, Takahashi H, Sakuma T, Inada T, Kamiya K, Ota M, Maki S, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M, Aramomi M, Hashimoto M, Ikeda O, Mannoji C, Furuya T. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates spinal cord injury-induced mechanical allodynia in adult rats. J Neurol Sci. 2015; 355(1-2): 79-83. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2015.05.024> 査読有

Kamiya K, Koda M, Furuya T, Kato K, Takahashi H, Sakuma T, Inada T, Ota M, Maki S, Okawa A, Ito Y, Takahashi K, Yamazaki M. Neuroprotective therapy with granulocyte colony-stimulating factor in acute spinal cord injury: a comparison with high-dose methylprednisolone as a historical control. Eur Spine J. 2015; 24(5): 963-7. DOI: 10.1007/s00586-014-3373-0 査読有

Takahashi H, Aoki Y, Nakajima A, Sonobe M, Terajima F, Saito M, Taniguchi S, Yamada M, Watanabe F, Furuya T, Koda M, Yamazaki M, Takahashi K, Nakagawa K. Phosphorylated neurofilament subunit NF-H becomes elevated in the cerebrospinal fluid of patients with acutely worsening symptoms of compression myelopathy: a pilot cross-sectional study in humans. J Clin Neurosci. 2014; 21(12): 2175-8. DOI: 10.1016/j.jocn.2014.04.021 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

Takahashi H, Aoki Y, Nakajima A, Sonobe M, Terajima F, Saito M, Inoue M, Koyama K, Yamamoto K, Nakagawa K. Reversible axonal damage is remarkable in patients with acutely worsening symptoms of compression myelopathy: analysis of human cerebrospinal fluid samples. Eurospine 2016, Berlin, Germany, 10/05-07, 2016.

高橋宏, 青木保親, 中島新, 園部正人, 寺島史明, 齊藤雅彦, 山田学, 小山慶太, 山本景一郎, 古矢丈雄, 國府田正雄, 中川晃一. 圧迫性脊髄症急性増悪期における神経細胞への障害様式 ~ 臨床髄液検体の解析 ~ . 第 89 回日本整形外科学会学術総会, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2016.5.12.

Takahashi H, Aoki Y, Nakajima A, Terajima F, Sonobe M, Saito M, Inoue M, Taniguchi S, Yamada M, Koyama K, Yamamoto K, Nakagawa K. Delayed surgical site infection after cervical posterior decompression and fusion in patient with atopic dermatitis, a case report. 7th annual meeting of Cervical Spine Research Society Asia Pacific Section, Seoul, Korea, 2016.4.21-23.

高橋宏, 青木保親, 中島新, 園部正人, 寺島史明, 齊藤雅彦, 山田学, 小山慶太, 山本景一郎, 古矢丈雄, 國府田正雄, 中川晃一. 脊椎変性疾患における臨床髄液検体の解析 ~ 脊髄障害, 馬尾神経根障害における神経細胞への障害様式の違いは? ~ . 第 45 回日本脊椎脊髄病学会, 幕張メッセ (千葉県・千葉市), 2016.4.14.

高橋宏, 寺島史明, 井上雅寛. 圧迫性脊髄症急性増悪期における臨床髄液検体を用いた病態の解析 第 50 回日本脊髄障害医学会, グランドプリンスホテル高輪 (東京都・港区), 2015.11.19.

高橋宏, 青木保親, 中島新, 寺島史明, 園部正人, 齊藤雅彦, 谷口慎治, 山田学, 古矢丈雄, 國府田正雄, 高橋和久, 山崎正志, 中川晃一. 圧迫性脊髄症急性増悪期における神経細胞への障害パターンは? - 臨床髄液検体の解析から - . 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集會, 富山国際会議場 (富山県・富山市), 2015.10.22.

高橋宏, 青木保親, 中島新, 寺島史明, 園部正人, 齊藤雅彦, 中川量介, 谷口慎治, 山田学, 國府田正雄, 中川晃一. 圧迫性脊髄症急性増悪期における脳脊髄液中 phosphorylated neurofilament subunit NF-H (pNF-H) の発現 - 脊髄症急性増悪の指標となりうる可能性 - . 第 88 回日本整形外科学会学術総会, 神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市), 2015.5.23.

Takahashi H, Aoki Y, Nakajima A, Sonobe M, Terajima F, Saito M, Taniguchi S, Yamada M, Nakagawa K. Phosphorylated neurofilament subunit NF-H in the cerebrospinal fluid becomes elevated in patients with acutely worsening symptoms of compression myelopathy: a pilot

cross-sectional study in humans. 30 Annual Meeting, Cervical Spine Research Society European Section, Pamplona, Spain, 2014. 6.25-27.

Takahashi H, Aoki Y, Nakajima A, Sonobe M, Terajima F, Saito M, Taniguchi S, Yamada M, Furuya T, Koda M, Yamazaki M, Takahashi K, Nakagawa K. Phosphorylated neurofilament subunit NF-H in the cerebrospinal fluid becomes elevated in patients with acutely worsening symptoms of compression myelopathy: a human pilot study. 4th Annual Meeting, Cervical Spine Research Society Asia Pacific Section, Ho Chi Minh, Viet Nam, 2014.4.4.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lab.toho-u.ac.jp/med/sakura/orthopedics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 宏 (TAKAHASHI, Hiroshi)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号: 80597047