

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670444

研究課題名(和文)多発性硬化症における新規バイオマーカーLOTUSの開発と病態の解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenesis and development of a new biomarker associated with LOTUS in multiple sclerosis

研究代表者

鈴木 ゆめ (SUZUKI, Yume)

横浜市立大学・附属病院・教授

研究者番号：70236024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：患者の脳脊髄液からLOTUS濃度を測定する手法を確立し、その濃度の変動が多発性硬化症の病勢に一致することを明らかにした。多発性硬化症の病勢診断は既存の検査では難しく、臨床応用につながる大きな成果である。また、多発性硬化症のモデルマウスを用いて髄液中のLOTUSの変動が中枢神経の発現の変動に起因していることを証明し、バイオマーカーとして重要であるその機序の一端を明らかにした。さらに、精度の高いモノクローナル抗体を用いた手法で血液検体からもLOTUSの検出に成功し、血液バイオマーカーの開発に向けた重要な基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：We established the method for measuring the LOTUS concentration in the cerebrospinal fluid from patients, and elucidated the variation was associated with disease activity in multiple sclerosis. this is an important findings because a new CSF biomarker is required for accurate diagnosis of disease activity and comprehension of pathogenesis which is difficult by conventional biomarker in CSF. Adding to these result, we elucidated that variation of down-regulation of LOTUS in central nervous system resulted in variation of LOTUS concentration in CSF. Furthermore, we detected LOTUS in the serum sample by using monoclonal antibodies, which lead to establish the important basis for the development of blood biomarkers.

研究分野：神経内科学

キーワード：LOTUS Nogo biomarker

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症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。多発性硬化症の再発診断は臨床症候に加え主に MRI 所見で判断されるが、常時 MRI 検査のできる施設は限られている。一方、多発性硬化症のバイオマーカー開発は遅れており再発・病勢診断において、血液・脳脊髄液ともに信頼性が確立された検査はない。これまで世界中で数多くの神経機能分子が脳脊髄液バイオマーカーとして研究されてきたが、実際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)。脳脊髄液中のオリゴクローナルバンド (OGB) や IgG Index は病態・病勢との関わりが確立されておらず信頼性が不十分であるにも係わらず、主要な検査項目として 1980 年頃からの現在に至るまで使われている。従って血液は言うまでもなく、中枢神経と接する脳脊髄液においても新たなバイオマーカーとなる分子の発見・開発は極めて困難であることは自明である。

従って、実際の診療で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、早期診断が難しい。また病態を反映するバイオマーカーがないため、病勢の客観的な評価が難しく、治療法のエビデンス確立や新薬開発が遅れるなど、治療分野の発展を妨げる一因となっている。従って、病態に係る再発・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る新規の機能分子で、内在性の Nogo 受容体アンタゴニストとして機能する (Sato Y. et al Science 2011)。Nogo 受容体は神経が障害された後の神経再生阻害に関与する分子として知られ、近年リンパ球にも発現することが報告された。さらに、多発性硬化症の重要な病態として軸索変性が注目されているがこれまで軸索変性に至る病態は解明されていなかった。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 (Petratos 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 が、神経免疫疾患である多発性硬化症の病態・病勢と機能的関連があると考え、病勢と脳脊髄液中の LOTUS 濃度の関連につき検討を行ってきた。

我々はこれまでにウェスタンブロット法を用いてヒトの脳脊髄液から LOTUS を検出・同定することに成功した。さらに、多発性硬化症の再発患者 30 例、健常人 10 例、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 8 例、多系統萎縮症 (MSA) 9 例で LOTUS の相対濃度を比較した。その結果、多発性硬化症の再発症例で特異的に LOTUS 濃度の顕著な低下を見出した。一方、多発性硬化症の非再発患者では

LOTUS 濃度の低下は見られず、LOTUS が病勢を反映し顕著に変動する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

多発性硬化症の病勢に一致して変動を起こす分子はこれまでに報告がなく、LOTUS の著明な変動は新規の重要な発見である。そこで本研究では LOTUS 濃度の変動と病態への関わりを明らかにし、これまでにない病態を反映する新たな脳脊髄液バイオマーカー LOTUS を確立する。

また、脳脊髄液は最終的に静脈血に合流するため血液中に微量ながらもその成分が存在する。血液中の微量タンパクの検出はかつては困難であったが、近年の分子構造解析技術による特異抗体の創出、質量分析による血液中の微量タンパク定量などの技術革新により可能となってきた。我々は血液中における LOTUS の定量に挑戦し、極めてニーズの高い、且つ今までに存在しない鋭敏な血液バイオマーカーの開発基盤を確立することで、多発性硬化症の検査・診療における飛躍的な進展を目的とする。

さらに、多発性硬化症のモデルマウスを用いた LOTUS の解析を行い、多発性硬化症の神経障害における LOTUS の役割を明らかにし、その病態解明を行う。

3. 研究の方法

これまで相対的な濃度比較を行い LOTUS 濃度の変動を解析したが、バイオマーカーとして確立するためには絶対濃度の測定が重要である。そこで濃度既知のリコンビナントタンパクを作製し、そのリコンビナントを用いてウェスタンブロット法による濃度測定法を確立した。

これらの濃度測定系を用いて、正常コントロール 27 例と疾患コントロール 32 症例、多発性硬化症 65 症例の脳脊髄液中の LOTUS 濃度について比較検討を行った。また、多発性硬化症症例を再発寛解型 (relapse remitting MS : RRMS) と二次性進行型 (secondary progressive MS : SPMS) に分け、さらに RRMS を臨床所見と造影 MRI 所見に基づいて再発群と寛解群に分けて解析を行った。分類基準を満たさない症例は解析前に除外した。

LOTUS 濃度の解析を行った後に、カットオフ値を設定し、LOTUS 濃度とオリゴクローナルバンド・IgG Index といった既存の脳脊髄液のバイオマーカーの感度・特異度を算出し比較した。また、軽度の再発は MRI で病変を検出ができないことが多いが、我々のこれまでの検討では、MRI において検出困難な再発であっても LOTUS は鋭敏に低下する可能性があり、MRI との比較も行った。

髄液中の LOTUS 濃度の変動解析に加え、多発性硬化症のモデルマウスとして幅広く使用されている実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウスを作製し、EAE マウスの中枢神

経における LOTUS の発現変動についても解析を行った。EAE を誘導後 14 日目に神経障害が最大となることが多い為、EAE 誘導後 14 日目、28 日目、56 日目の LOTUS 発現を解析し、コントロールマウスとの比較を行った。

一方、血液検体の解析のために特異性の高い抗 LOTUS 抗体を選別し、磁気ビーズを用いて免疫沈降法を応用した濃度測定法の確立についても検討を行った。

4. 研究成果

多発性硬化症の再発群において脳脊髄液中の LOTUS 濃度が有意に低下していたのに対し、寛解群ではコントロールと同レベルであった。さらに、同一患者において再発時とその後の寛解時の LOTUS 濃度を比較したところ、再発時に低下していた LOTUS 濃度が寛解期にはコントロールと同レベルにまで改善していた。また、SPMS に移行した患者群では身体所見や造影 MRI の所見に係らず、全例で LOTUS 濃度の持続的な低下が認められた。従って、脳脊髄液中の LOTUS 濃度は病勢に一致して変動し、再発と寛解、さらには慢性期における病勢の進行を判断するための有用な診断マーカーになりうることを示された。また、多発性硬化症の既存の診断マーカーであるオリゴクローナルバンドと比較したところ、MS の急性期、慢性期ともに、LOTUS は既存の診断マーカーよりも高感度に病勢の悪化を検出できることが明らかになった。従って、脳脊髄液中の LOTUS 濃度は再発診断と長期的な病勢を評価するための新たな生化学的診断マーカーになると考えられる。

EAE マウスを用いた LOTUS 発現解析では神経障害が最大になる 14 日目で LOTUS の発現低下が見られ、28 日目には改善が認められた。また、コントロールレベルまで改善した LOTUS の発現は 56 日目においても維持されていた。これらの結果は、中枢神経の LOTUS の発現変動は髄液中の LOTUS の変動と一致しており、髄液中の LOTUS の変動は病勢の変動と一致していることを裏付けるものである。

また、Nogo 受容体からのシグナル伝達が多発性硬化症の軸索変性に係ることから、LOTUS の発現低下は多発性硬化症の病勢悪化に伴う軸索変性に大きく寄与し、特に軸索変性の著明な二次進行期においては LOTUS の持続的現象が見られていることから、LOTUS の変動が多発性硬化症の病態に強く係ることを示している。

従って、本研究の結果は多発性硬化症の病勢診断マーカーの開発基盤に留まらず、近年注目されている軸索変性の病態解明につながる大きな成果である。

これらに加え、磁気ビーズを用いる免疫沈降法を応用し、血液中の LOTUS の検出を行った。ウェスタンブロット法で検出を行い、さらに質量分析においてもその確認を行った。この手法を用いて血液中の LOTUS の変動を解析をおこなった。

同一患者において、再発期と寛解期において血液中の LOTUS 濃度の変動を解析したところ、病勢に従い変動が認められた。これらの結果は血液検査において病勢の検出を可能とすることを示唆しており、多発性硬化症の病勢診断における血液バイオマーカー開発の基盤となるものである。

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)

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 Neurol. 2015; 72(2):176-179. doi:10.1001 査読あり

[学会発表](計 3 件)

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: Association of CSF Levels of LOTUS with Disease Activity in Multiple Sclerosis 第 56 回日本神経学会学術大会 2015 年 5 月 20 日 朱鷺メッセ (新潟県新潟市)

高橋慶太、栗原 裕司、鈴木 ゆめ、田中 章景、五嶋 良郎、竹居 光太郎: 神経疾患における神経回路形成因子 LOTUS の変動、第 35 回神経組織培養研究会 2013 年 6 月 30 日 ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市)

高橋慶太、栗原 裕司、鈴木 ゆめ、田中 章景、五嶋 良郎、竹居 光太郎: LOTUS as a new biomarker for Multiple Sclerosis. Neuro2013 2013 年 6 月 20 日 国立京都国際会館(京都府京都市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 炎症及び脱髄の少なくとも一方を伴う神経疾患の検出方法

発明者: Kohtaro Takei
Keita Takahashi
Yume Suzuki
Yoshio Goshima

権利者: 公立大学法人横浜市立大学

種類: PCT

番号: JP2013/081385

出願年月日: 2013 年 11 月 21 日

国内外の別： 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 ゆめ (SUZUKI, Yume)
横浜市立大学・附属病院・教授
研究者番号：70236024

(2) 研究分担者

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

岸田 日帯 (KISHIDA, Hitaru)
横浜市立大学・市民総合医療センター・講師
研究者番号：20405004

(3) 連携研究者

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