

令和元年5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19504

研究課題名(和文)炎症性中枢神経疾患の病態に基づいた脳脊髄液中診断・予後推測因子の確立

研究課題名(英文) Establishment of diagnosis and prognostic factors in cerebrospinal fluid based on the condition of inflammatory central nervous disease

研究代表者

西山 修平(Nishiyama, Shuhei)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60636017

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(MS)や視神経脊髄炎スペクトラム病(NMOSD)など炎症性中枢神経疾患では診断や予後予測に苦慮する。NMOSDでは近年仮足障害によるアストロサイト障害が明らかとなった。脳脊髄液中の仮足関連蛋白を測定し、診断や予後予測因子となるかを検討した。様々な炎症性中枢神経疾患の脳脊髄液を解析し、脳脊髄液中CRMP5とARPC4が抗AQP4抗体陽性NMOSDで有意に上昇し、アストロサイト足突起破壊を反映していると考えられた。特にCRMP5が上昇している群では比較的予後が良く、NMOSDにおける予後良好因子と考えられた。今後アストロサイト足突起をターゲットとした治療戦略の開発が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性硬化症や視神経脊髄炎といった炎症性中枢神経疾患の多くは原因不明で、時に診断や治療に苦慮する。このうちアクアポリン4抗体陽性視神経脊髄炎の脳脊髄液では、アストロサイト足突起に存在する蛋白が上昇しており、このうち脳脊髄液中CRMP5が上昇している患者さんではより予後が良い結果が出た。今後アストロサイト足突起をターゲットとした治療戦略の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory central nervous system (CNS) diseases such as multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD) have occasionally difficulty in diagnosis and prognosis. In NMOSD, Aquaporin-4 (AQP4) autoimmune-mediated astrocyte functional change by pseudopodial movement disorder has been clarified recently. We measured pseudopodium-related and cell destruction related proteins in cerebrospinal fluid (CSF) based on the pathological condition of inflammatory CNS disease, and examined whether it could be diagnostic and prognostic biomarkers. CSF samples of various inflammatory CNS diseases were analyzed, and CRMP5 and ARPC4 in CSF were significantly elevated in NMOSD with AQP4-IgG, reflecting astrocyte foot process damages. Especially in the group with CSF-CRMP5 elevation, the prognosis is relatively good. It is considered to be one of the good prognostic factors in NMOSD. A therapeutic strategy targeting the astrocytic foot process can be expected in the future.

研究分野：神経免疫学

キーワード：視神経脊髄炎 バイオマーカー アストロサイト 脳脊髄液

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

視神経脊髄炎スペクトラム病 (Neuromyelitis optica spectrum disorder: NMOSD) は視神経と脊髄を病変の主座とする炎症性疾患である。2004年、当科と Mayo Clinic との共同研究により、NMOSD 患者血清中から特異的自己抗体 (NMO-IgG) が発見され、翌年にはその対応抗原がアクアポリン 4 (AQP4) であると報告された (Lennon V, et al. 2004, 2005)。アクアポリン 4 は中枢神経内のアストロサイト足突起に非常に多く発現する 6 回膜貫通が蛋白である。我々の先行研究では NMOSD 病変の病理学的検討において AQP4 や Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) の染色性が低下・消失し、病変部の血管周囲でアストロサイト傷害を来していることを報告した (Misu T, et al. 2013)。また、我々は世界に先駆け NMOSD 患者の再発急性期に採取された脳脊髄液中で GFAP が著明高値となることを報告した (Takano R, et al 2010、図 1)。近年 NMO-IgG 検査では陰性にもかかわらず、NMO の診断基準を満たす症例があり、その一部では抗 MOG 抗体が陽性となることも報告した (Sato DK, et al. 2013)。Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) はオリゴデンドロサイト表面に存在する蛋白で、抗 MOG 抗体自体は多発性硬化症など他の疾患でも陽性となることが有る (Mader S. 2011)。抗 MOG 抗体陽性 NMOSD では GFAP が必ずしも高値にならない例があり、アストロサイトを介さない細胞傷害を来していると考えられる。しかし、その病因や病態形成については未だ確立したものが無い。

また、炎症性中枢神経疾患には多発性硬化症、NMOSD の他にも、Balo 病 (同心円状硬化症)、急性散在性脳脊髄炎 (ADEM)、神経ベーチェット病、神経サルコイドーシス、中枢神経ループス、腫瘍様脱髄疾患といった比較的まれな疾患も含まれる。これらは元々の疾患数が極めて少ないことから診断特異的バイオマーカーが無く、全身検索や画像検査、生検などを用い、総合的に判断せざるを得ない症例が数多く存在する。これらの疾患においてもより簡便な診断および予後予測のできるバイオマーカーの開発が強く望まれる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、脳脊髄液を用い炎症性中枢神経疾患において臨床活用できるような診断や予後予測因子となり得る、新たな疾患特異的バイオマーカーを発見することである。炎症性中枢神経疾患はそれぞれの疾患概念及びその病因メカニズムが異なるが、近年 NMOSD を中心にアストロサイトやオリゴデンドロサイトの傷害モデルが確立しつつある。その中で病理学的に推測された細胞破壊に関する蛋白、アストロサイト接着能や軸索伸長に関わる蛋白、髄鞘の再生や破壊に関わる蛋白、軸索傷害の指標となる蛋白らの脳脊髄液中の動態を研究し、炎症性中枢神経疾患全体の病態解明の基礎とすることが目標である。

### 3. 研究の方法

炎症性中枢神経疾患患者における脳脊髄液中細胞破壊関連蛋白を用いた診断・予後予測の検討

当院の協力病院・施設に協力を依頼し、MS、NMOSD、急性散在性脳脊髄炎、神経ベーチェット病、神経サルコイドーシス、神経スイート病、腫瘍様脱髄疾患、Balo 病といった稀な炎症性中枢神経疾患の脳脊髄液検体の回収を行う。これら検体を用い、LDH (LDH アイソザイムも含む) や細胞由来プロテアーゼ、DNA 結合型蛍光色素を利用したアッセイキット (CellTox™ Green Cytotoxicity Assay) を用い検討を行う。これらの値と検体採取時の臨床情報を元に、診断や予後予測となり得るマーカーとして活用できるか検討する。

#### NMOSD 患者における脳脊髄液中アストロサイト仮足関連蛋白値の検討

仮足とは、軸索先端部の成長円錐から始まる細胞質の一時的な突出であり、膜状仮足や糸状仮足といった種類がある。我々の先行研究では、NMO-IgG を正常アストロサイト一次細胞に作用させるとアストロサイト仮足が退縮し、細胞培養液中に剥離する現象が確認された。ELISA キットとして市販されている CRMP5 や Arp2/3 complex を中心に、NMOSD 患者での動態について検討を行う。

#### 炎症性中枢神経疾患患者における脳脊髄液中アストロサイト仮足関連蛋白値の検討

炎症性中枢神経疾患において、NMOSD 同様細胞伸長や接着に関連する蛋白の傷害が病態に関与している可能性がある。仮足関連蛋白である CRMP5 は糸状仮足内の伸長点に存在し、仮足の伸長と接着に関わる重要な蛋白の 1 つである。この CRMP5 に対する自己抗体 (CRMP5 抗体) は傍腫瘍症候群や急性散在性脳脊髄炎の一部で陽性となるが、CRMP5 抗体を介して仮足の運動・接着障害を来している可能性があり、NMOSD 様の視神経炎・脊髄炎を来す報告もある (Jarvis S. CNN 2012)。仮足運動に関わる蛋白は他にも Tip complex や Fascin が知られており、仮足関連蛋白の脳脊髄液中での検討を炎症性中枢神経疾患全体に広げ、特に CRMP5 や Arp2/3 complex では ELISA キットを、それ以外では Western blotting を用いて検討を行う。また、これらの値を GFAP や MBP、LDH と言った他の脳脊髄液中マーカー、臨床症状などと比較し、診断や予後予測因子としてどれだけ活用できるか検討を行う。

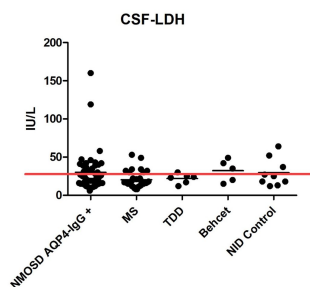
#### 炎症性中枢神経疾患患者における脳脊髄液中軸索障害関連蛋白値の検討

炎症性中枢神経疾患の中でも、MS や NMOSD においてニューロンの軸索に存在するニューロフィラメント重鎖が脳脊髄液中で上昇する例があることが知られている (Miyazawa I, et al. Neurology 2007)。ニューロフィラメント値の上昇は、ニューロン軸索の傷害を示していると考えられ、予後予測因子となる可能性がある。これ以外にもニューロンのマーカーとして NeuN, MAP2, Neuron specific enolase (NSE)などが知られているが、炎症性中枢神経疾患における脳脊髄液中のこれらの蛋白の動態については詳細な検討が未だなされていない。これらについて、ELISA キットや Western blotting を用いた検討を行う。

#### 4. 研究成果

炎症性中枢神経疾患患者における脳脊髄液中細胞破壊関連蛋白を用いた診断・予後予測の検討

当院の協力病院・施設に協力を依頼し、MS、NMOSD、急性散在性脳脊髄炎、神経ベーチェット病、神経サルコイドーシス、神経スイート病、腫瘍様脱髄疾患、Balo 病といった稀な炎症性中枢神経疾患の脳脊髄液検体の回収を行った。その結果 MS では 100 例以上、NMOSD では 80 例、急性散在性脳脊髄炎は 5 例、神経ベーチェット病 5 例、神経サルコイドーシス 5 例、腫瘍様脱髄疾患 6 例、Balo 病 1 例を収集できた。脳脊髄液中細胞破壊関連蛋白として、NMOSD では髄液中 LDH も GFAP 同様に上昇していることが示された。しかし、これは特異性に欠け、血中 LDH の影響も受けやすいなど診断や予後予測バイオマーカーとしては不十分な点も多く認められた。

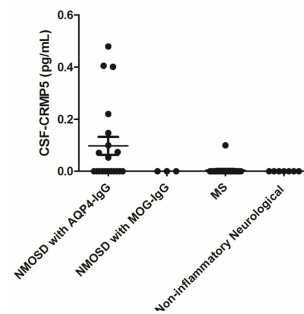


研究期間中に抗 MOG 抗体関連神経疾患がクローズアップされ、抗 MOG 抗体関連神経疾患についても検体回収を行い約 30 例の検体を収集できた。

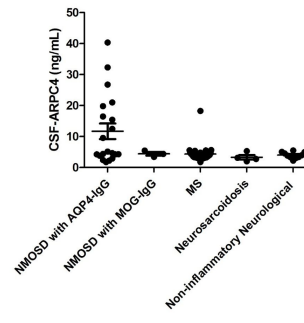
NMOSD 患者における脳脊髄液中アストロサイト仮足関連蛋白値の検討

炎症性中枢神経疾患患者における脳脊髄液中アストロサイト仮足関連蛋白値の検討

NMOSD 患者血清から抽出した IgG をアストロサイト一次培養細胞に作用させると糸状仮足や葉状仮足が破壊され、培養液中に仮足が浮遊する現象を共焦点顕微鏡タイムラプス撮影により確認した。このうち CRMP5 は成長期の神経系細胞の仮足先端部に認められる蛋白の一つで、アストロサイト一次培養細胞を用いた検討では増殖中のアストロサイトでは豊富に認められた。細胞がディッシュ上でコンフルエントになると CRMP5 の発現は低下した。Arp2/3 complex についても同様の検討を行ったが、Arp2/3 complex はより細胞骨格の基部に存在し、コンフルエントになっても変わらず存在することが分かった。



抗 AQP4 抗体陽性 NMOSD を中心に脳脊髄液中 CRMP5 や Arp2/3 complex subunit 4 (ARPC4) の測定を ELISA にて行った。CRMP5 は抗 AQP4 抗体陽性 NMOSD にて有意に上昇していた。他の炎症性中枢神経疾患ではほとんど上昇を認めなかった。脳脊髄液中 GFAP や LDH とは軽度の正の相関を認めた。CRMP5 が上昇している群では再発 1 年後の身体障害度が低く、予後良好因子と考えられた。脳脊髄液中 ARPC4 も抗 AQP4 抗体陽性 NMOSD で上昇していたが、CRMP5 と ARPC4 に相関は認めなかった。ARPC4 が上昇している群ではより予後が悪く、予後不良因子と考えられた。これらの結果をまとめ、論文投稿中である。



炎症性中枢神経疾患患者における脳脊髄液中軸索障害関連蛋白値の検討

ニューロフィラメント重鎖 (Nf-H) についても ELISA にて検討を行い、少数例ではあるが脳脊髄液中での上昇を認めた。しかし、研究期間中に ELISA より高感度な手法として single molecule array (Simoa) 法が主流となり、脳脊髄液のみならず血中でもニューロフィラメントが上昇し、MS、NMOSD それぞれの予後不良因子となりうる報告が他の研究施設から相次いだ。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- Kaneko K, Sato DK, Nakashima I, Ogawa R, Akaishi T, Takai Y, Nishiyama S, Takahashi T, Misu T, Kuroda H, Tanaka S, Nomura K, Hashimoto Y, Callegaro D, Steinman L, Fujihara K, Aoki M. CSF cytokine profile in MOG-IgG+ neurological disease is similar to AQP4-IgG+ NMOSD but distinct from MS: a cross-sectional study and potential therapeutic implications. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry. 2018;89(9) 927-36
- Nishiyama S, Misu T, Shishido-Hara Y, Nakamichi K, Saijo M, Takai Y, Takei K, Yamamoto N, Kuroda H, Saito R, Watanabe M, Tominaga T, Nakashima I, Fujihara K,

Aoki M. Fingolimod-associated PML with mild IRIS in MS: A clinicopathologic study. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation* 2018;5(1) e415

Kaneko K, Sato DK, Nakashima I, Nishiyama S, Tanaka S, Marignier R, Hyun JW, Oliveira LM, Reindl M, Seifert-Held T, Sepulveda M, Siritho S, Waters PJ, Kurosawa K, Akaishi T, Kuroda H, Misu T, Prayoonwiwat N, Berger T, Saiz A, Kim HJ, Nomura K, Callegaro D, Fujihara K, Aoki M. Myelin injury without astrocytopathy in neuroinflammatory disorders with MOG antibodies. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2016;87(11) 1257-9.

Nishiyama S, Misu T, Nuriya M, Takano R, Takahashi T, Nakashima I, Yasui M, Itoyama Y, Aoki M, Fujihara K. Complement-dependent and -independent aquaporin 4-antibody-mediated cytotoxicity in human astrocytes: Pathogenetic implications in neuromyelitis optica. *Biochemistry and biophysics reports*. 2016(7):45-51

〔学会発表〕(計 7 件)

Shuhei Nishiyama. CSF biomarker for NMOSD. PACTRIMS 2018.

Shuhei Nishiyama, Tatsuro Misu, Ichiro Nakashima, Toshiyuki Takahashi, Kazuo Fujihara, Masashi Aoki. Cerebrospinal fluid Actin-Related Protein 2/3 Complex Subunit 4 (CSF-ARPC4) as an astrocytic foot process damage marker of AQP4-IgG-positive Neuromyelitic Optica Spectrum Disorders. PACTRIMS 2017.

Shuhei Nishiyama, Tatsuro Misu, Ichiro Nakashima, Toshiyuki Takahashi, Kazuo Fujihara, Masashi Aoki. Cerebrospinal fluid-Actin related protein 2/3 complex subunit 4 as an astrocytic foot process damage marker of aquaporin-4-IgG positive neuromyelitis optica spectrum disorders. MSParis 2017.

Cerebrospinal fluid Actin-Related Protein 2/3 Complex Subunit 4 (CSF-ARPC4) as an astrocytic foot process damage marker of AQP4-IgG-positive Neuromyelitic Optica Spectrum Disorders. World Congress of Neurology 2017.

Nishiyama S, Misu T, Shishido-Hara Y, Nakamichi K, Saijo M, Takai Y, Kuroda H, Nakashima I, Fujihara K, Aoki M. Early pathological features in Fingolimod-associated PML with mild IRIS. 日本神経学会 2017.

Shuhei Nishiyama, Tatsuro Misu, Ichiro Nakashima, Toshiyuki Takahashi, Kazuo Fujihara, Masashi Aoki. Elevated cerebrospinal fluid - CRMP5 as a biomarker of damage to astrocyte foot process and growth cone in AQP4-IgG-seropositive NMOSD. PACTRIMS 2016.

Shuhei Nishiyama, Tatsuro Misu, Ichiro Nakashima, Toshiyuki Takahashi, Kazuo Fujihara, Masashi Aoki. Elevated cerebrospinal fluid - CRMP5 as a biomarker of damage to astrocyte foot process and growth cone in AQP4-IgG-seropositive NMOSD. ECTRIMS 2016.

〔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.ms.med.tohoku.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：西山 修平

ローマ字氏名：Shuhei Nishiyama

所属研究機関名：東北大学病院

部局名：脳神経内科

職名：助教

研究者番号 (8桁)：60636017

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。