

令和 2 年 6 月 28 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09786

研究課題名(和文) イメージング質量分析法を用いた多発性硬化症の超早期バイオマーカー探索

研究課題名(英文) Detecting early-stage biomarker of multiple sclerosis using Imaging Mass Spectrometry

研究代表者

池川 雅哉 (Ikegawa, Masaya)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：60381943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多発性硬化症(Multiple Sclerosis:MS)は、自己免疫機序の関与する中枢神経系の炎症性脱髄疾患で、MSの早期バイオマーカーが切望されている。本研究は、イメージング質量分析法を用い、MSおよびMS様の神経炎症を示す自己免疫疾患モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE)マウス脳組織を対象に組織プロテオーム解析を試みた。その結果、病変に特異的なタンパク質の候補を取得し、本タンパク質を標的とした新たな治療戦略を立案し、EAEの予防・治療に貢献する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イメージング質量分析法を用い、多発性硬化症モデルマウス脳・脊髄におけるin situ 組織プロテオーム解析の結果、病気の症状の現れる直前からすでに脳内には一群の免疫細胞の浸潤が認められ、これらの細胞と局在の一致するタンパク質・ペプチドを特定し、さらに免疫組織学的に検証に成功した。本研究は、これらの候補分子の中から最もよく脳病理を反映していると考えられるタンパク質のシグナルをブロックするような薬剤をEAEに予防投与と治療投与を行い、その両方で顕著な効果を確認した。今後はヒトへの応用可能性について検討する必要性を認め、神経難病の新たな症状改善薬の開発の発端となることは社会的に意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most commonly used experimental model for the human inflammatory demyelinating disease, multiple sclerosis (MS). In this study, we applied matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass imaging mass spectrometry (IMS) for EAE mice brain and spinal cord at proteome level. By single peak analysis, we have found a few protein markers that co-localized with immune cell infiltrations in cerebellum, hippocampus as well as spinal cords of the pre-symptomatic to symptomatic EAE animals, which disappeared at the chronic phase. To functionally test this hypothesis, we blocked the protein signals with a small molecule compound, a kind of immunosuppressant, before and after the onset of EAE symptoms to estimate its efficiency by a conventional clinical scoring method and histopathology. With this strategy, we have succeeded in obtaining a novel therapeutic target of multiple sclerosis as well as biomarkers through IMS.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：多発性硬化症 イメージング質量分析 プロテオミクス 実験的自己免疫性脳脊髄炎 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経難病の多発性硬化症 (Multiple Sclerosis; MS) および その類縁疾患の視神経脊髄炎 (Neuromyelitis Optica; NMO) は、中枢神経系の炎症性自己免疫疾患で、鑑別が難しく治療方針に苦慮するのが現状である。我々は、マトリックス支援レーザー脱離型飛行時間質量分析計 (MALDI-TOF) と磁性ビーズを組み合わせたプロテオミク・パターン解析法を用いて、ヒト脳脊髄液 (Cerebrospinal fluid; CSF) を対象とした MS 関連疾患を鑑別しうる疾患バイオマーカーの抽出に成功した (Komori et al., 2012)。さらに脳画像と比肩しうるような脳・脊髄内での超早期の MS 病態を反映する分子を特定するため、新しい質量分析法である Imaging Mass Spectrometry (IMS) 法を用いて実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE) を解析してきた。

2. 研究の目的

本研究は最新の IMS 法を用いて多発性硬化症のマウスモデル EAE の脳・脊髄組織を解析することにより、超早期の多発性硬化症の脳・脊髄における分子基盤に光を当てることを目的としている。IMS 法による解析は、通常、脂質などの低分子を中心に報告がある一方、ペプチド・タンパク質レベルのイメージングは、感度などの課題によりまだまだ先行研究がなされていない。

3. 研究の方法

動物: SJL/J マウス (雌, 10 週齢) に, Proteolipid protein の 139-151 番目のアミノ酸配列に該当するペプチド (PLP139-151) を, 完全フロイントアジュバントと共に免疫し, EAE を誘導した。定法に従い, 臨床症状を 6 段階で毎日評価した。阻害剤投与群として, S100A9 阻害剤 (5 mg/kg) を 2 日に 1 回, 経口投与した。ペプチド免疫後, 9 日目 (pre EAE), 11-12 日目 (acute EAE), 21-22 日目 (chronic EAE) にマウスを解剖し, 試料を採取した。

IMS: クリオスタットで 10 μ m 厚の新鮮凍結切片を作製した。組織切片をエタノール, カルノア液で洗浄後, マトリックスとして Sinapinic acid を均一に噴霧した。測定には質量分析装置 UltrafleXtreme (Bruker Daltonics) を用いた。

データ解析: flexImaging (Bruker Daltonics) ソフトウェアを用いた。

IHC: 新鮮凍結切片を 4% パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝生理食塩水にて後固定を行った, 0.3% 過酸化水素含有メタノールで内在性 Peroxidase を不活性化後, 10% ヤギ血清でブロッキングを行った。一次抗体として, 抗 S100A9 抗体 (abcam, ab105472), 二次抗体として, ビオチン標識抗ラット IgG 抗体を用いた。アビジン-ビオチン複合体を形成させ, 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) 法により検出を行った。

4. 研究成果

病理組織学的解析: ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色により, acute-EAE マウス脳の小脳白質, 延髄, 海馬采と視床の間の軟膜周辺において異所性細胞集塊 (浸潤細胞群) を認めた (図 1. b 矢印)。IMS によるマーカータンパク質候補探索: EAE マウス脳において, 浸潤細胞群と共局在する m/z にあたる分子 (m/z 10,163, m/z 12,971 (桃色)) を認めた。先行研究より, これらの m/z 値はそれぞれ, S100A8, S100A9 タンパク質と報告されている。

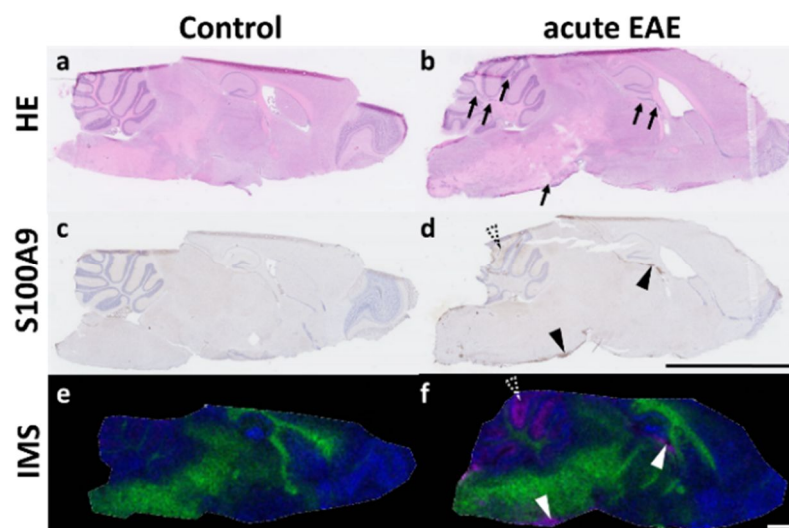


図 1. マウス脳の病理組織学的解析。左: Control, 右: acute EAE, スケールバー: 5 mm (a-d), 1 mm (e, f)

IHCによる検証: 抗 S100A9 抗体を用いた IHC の結果, S100A9 の陽性所見は, m/z 12,971 にあたる分子の局在とほぼ一致した(図 1.d, f 実線矢柱). さらに, 小脳分子層においても, S100A9 陽性領域を認めた(図 1. f 点線矢柱).

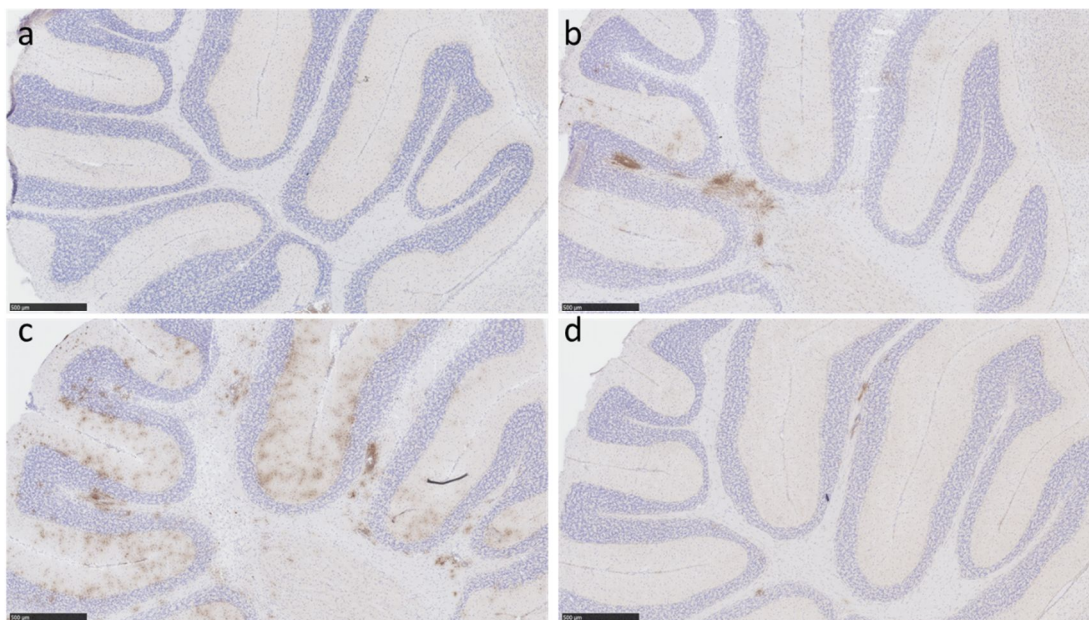


図 2. マウス脳の S100A9 の免疫組織学的解析 . a:Control, b: onset, c:acute, d:chronic EAE, スケールバー :500 μm (a-d).

以上の結果より EAE マウス脳の細胞浸潤薬にほぼ一致して認められる分子 m/z 12,971 は, S100A9 であると示唆され EAE マウス脳における新しいマーカータンパク質候補であることが明らかとなった.

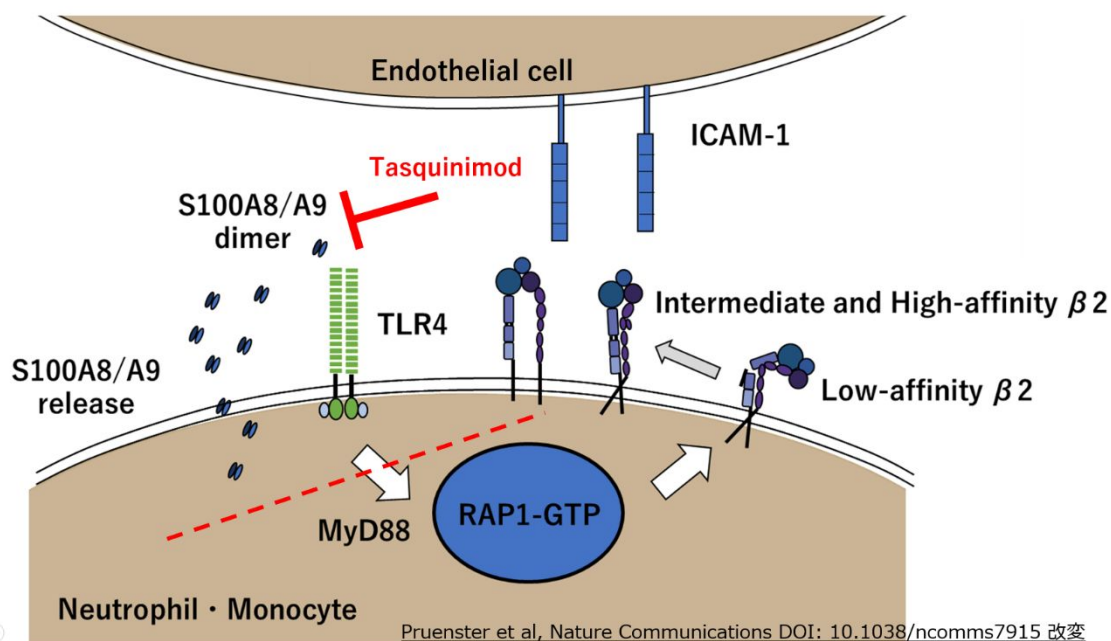


図 3 S100A9 タンパク質阻害剤の作用機序

S100A9 タンパク質の生体内での一般的な働きについては TLR4 と結合し, 図 3 のようなシグナル伝達によって細胞遊走に関わっていると考えられてきた. S100A9 阻害剤である Tasquinimod(TasQ)は, S100A9 に強力に結合し, 受容体である TLR4 との結合を阻害することによって, 本化合物は, 下流のシグナル伝達を阻害することで, CNS へ浸潤する細胞の遊走を抑制する効果が期待できると考え, 図 4 のような治療・予防戦略を立てた.

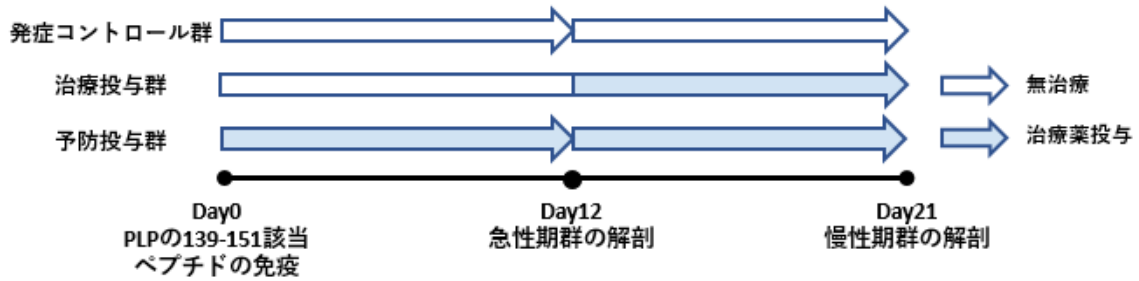


図4 S100A9 タンパク質阻害剤を用いた EAE の予防・治療戦略. 実験動物: SJL/J マウス (7 週齢, 雌) マウスのプロテオリピドプロテイン (proteolipid protein: PLP) 139-151 番目のアミノ酸配列に該当するペプチド. 投与薬剤: S100A9 阻害剤である Tasquinimod 1 日 1 回経口投与

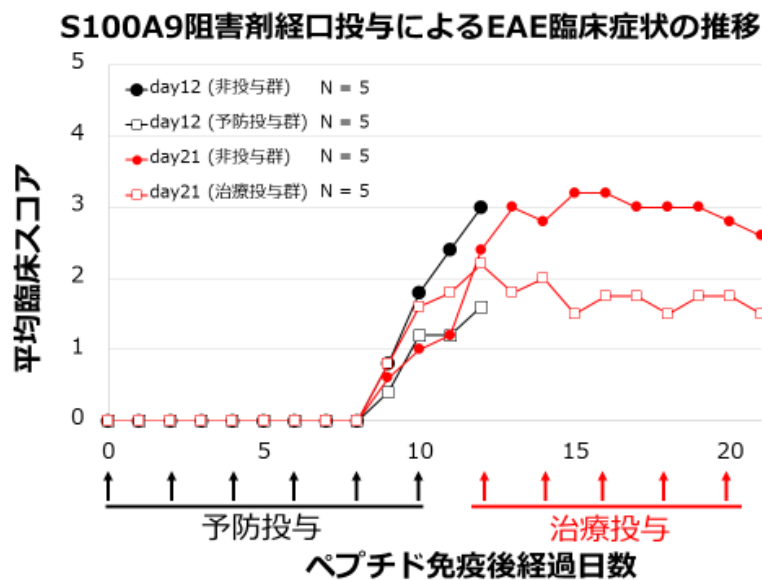


図5. EAE マウスに対する S100A9 阻害剤経口投与の効果

図4のプロトコルに従いEAEの予防および治療効果を観察したところ臨床スコアの改善と中枢神経系における浸潤細胞の減少などの良好な予防・治療効果を確認している。すなわち著名な予防効果および治療効果を認めた。本化合物は、新規MS治療薬としての可能性を有するものと考えられた。今後は、MSの治療戦略としてのS100A9阻害についての分子基盤を解明するためTasquinimodに加え、類縁構造体のLaquinimodを投与する群を設け、二種類のS100A9阻害剤の予防投与および治療投与等を行い詳細な作用機序や副作用に関する評価を行う必要が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 池川雅哉	4. 巻 34(5)
2. 論文標題 イメージング質量分析法を用いた多発性硬化症のバイオマーカー探索	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 96-100
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 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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中那美，山下浩輝，葦澤崇，田口勝敏，田中雅樹，近藤誉之，辻雄大，角田伸人，池川雅哉
2. 発表標題 イメージング質量分析法を用いた実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスモデルの脳・脊髄解析から
3. 学会等名 日本医用マス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中那美，山下浩輝，葦澤崇，田口勝敏，田中雅樹，近藤誉之，辻雄大，角田伸人，池川雅哉
2. 発表標題 MALDI - イメージング質量分析法を用いた多発性硬化症のプロテオミクスレベルのバイオマーカーと治療標的の特定
3. 学会等名 日本質量分析学会討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池川雅哉
2. 発表標題 プロテオーム解析を用いた神経免疫疾患へのアプローチ
3. 学会等名 日本神経学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Yamashita, Takashi Nirasawa, Toshiji Kudo, Katsutoshi Taguchi, Masaki Tanaka Takayuki Kondo, Nobuto Kakuda, Masaya Ikegawa
2. 発表標題 In situ characterization of infiltrated immune cells of murine EAE by MALDI imaging mass spectrometry
3. 学会等名 HUP02017 (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018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
研究分担者	近藤 誉之 (Kondo Takayuki) (50322756)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	角田 伸人 (Nobuto Kakuda) (50544615)	同志社大学・生命医科学部・助教 (34310)	