

平成 21 年 4 月 5 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890004

研究課題名（和文）：多発性硬化症の病態における神経栄養因子の関与の解明

研究課題名（英文）：Neurotrophic factors in the pathogenesis of multiple sclerosis

研究代表者：新野 正明 (NIINO MASAOKI)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00443961

研究成果の概要：今回の研究では、多発性硬化症（MS）における神経栄養因子の関与に関して検討した。はじめに、BDNF 遺伝子の exon5 に存在する G196A 多型を 216 名の MS 患者と 186 名の健常者と比較したが、2 群間で genotype や allele frequency に差は認めなかった。一方、血清中の BDNF 濃度を、多発性硬化症患者の再発期・寛解期、対照健常者の 3 群と比較検討したが、有意な差は認めなかった。MS の再発予防としてインターフェロンベータ製剤が使用されるが、in vitro の実験などからこの薬剤が神経栄養因子に影響を与えることが示唆されており、今回 MS 患者においてインターフェロンベータ使用群と非使用群において血清中の BDNF 濃度を比較検討したが、2 群間で差を認めなかった。MS の進行の程度の指標である Multiple Sclerosis Severity Scale (MSSS) と血清 BDNF 濃度との相関も認めなかった。今回の検討では、BDNF と MS の有意な関連を示唆するデータは得られなかったが、これまでの研究から神経栄養因子は MS の病態に深く関わっていることが示唆されており、他の神経栄養因子を含め今後も研究を継続する予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,330,000	0	1,330,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：①脳・神経 ②遺伝子 ③免疫学

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) は中枢神経系の代表的な炎症性脱髄疾患であ

り、若年成人（特に女性）に多く発症し、再発と寛解を繰り返しながら次第に二次進行型に移行していきることが多い。MSにおける病変

の主体は脱髄と言われているが、近年、その永続的な症状の原因は軸索や神経細胞の障害によると考えられるようになってきた。現在のところ、その障害のメカニズムは全く不明であるが、神経保護作用並びに神経再生作用がその障害を考える上で重要な鍵となっている。その神経保護ないし再生に大きな影響を与えるとされているのが神経栄養因子である。

神経栄養因子は、細胞外因子を代表する蛋白質群であり、中枢神経系における神経細胞の発達、分化、生存、可塑性などにおいて重要な役割を果たしている。神経栄養因子は数十種類以上の物質が知られているが、その一員である脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor ; BDNF) , 神経成長因子 (nerve growth factor ; NGF) , neurotrophin 3 , neurotrophin 4/5 など は NGF-related neurotrophins として分類される。最近、BDNF は MS の病変における免疫細胞や astrocyte でも発現していることが明らかになった。また、最近の研究から MS の再発予防として使われているインターフェロンベータ (IFN) が NGF の産生を強力に推進することが明らかになった。また、日本では使用できないが欧米で再発予防として使用されている glatiramer acetate が、T細胞からの BDNF 産生を促進することも明らかになってきた。このようなことから、神経栄養因子が MS における軸索や神経細胞の障害において重要な働きをしており、治療ターゲットとして有用である可能性が考えられている。

ところで、研究代表者はこれまで主に MS の遺伝的背景および免疫学的背景に関する研究を行ってきた。MS は、複数の遺伝的要因と後天的要因の相互作用によって発症にいたる多因子疾患であると考えられているが、遺伝的要因に関しては、これまで HLA 領域との連鎖を証明したのみで、この他にも複数の遺伝的因子が MS の発症に寄与すると考えられている。また、遺伝子多型は人種差が大きいことから、いくつかの因子に関しては人種独自の感受性遺伝子の可能性がある。そこで、MS に関係すると思われる遺伝子を中心に、特に日本人における疾患感受性遺伝子を検討する多型解析を行ってきた。また、免疫学的背景に関しては、MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis ; EAE) を用いて新規治療薬の検討、すなわち核内受容体の一つである PPAR- γ 受容体刺激薬に対する治療効果を検討した。また、McGill 大学留学中には、最近アメリカの FDA に認可された MS の再発予防薬 natalizumab に関する免疫細胞への影響の検討や、MS における B 細胞からのサイトカイン産生に関する検討を行ってきた。

今回これまでに培ってきた遺伝学のおよ

び免疫学的手技を用いて、神経栄養因子の MS への影響に関して、生化学的側面、免疫学的側面、そして臨床学的側面から検討することにより、その総合的な影響を解析することを目的とする。

2. 研究の目的

MS における神経栄養因子である BDNF の血中濃度測定し病型、病期 (再発・寛解) , 薬剤 (主に IFN) 使用有無、MS の重症度の指標である Expanded Disability Status Scale of Kurtzke (EDSS) や進行の程度の指標である Multiple Sclerosis Severity Index (MSSS) との相関を検討する。また、MS における BDNF の exon5 をはじめとする神経栄養因子の遺伝子多型を解析し、疾患感受性遺伝子としての可能性を追求し、それらの血中における値との相関についても検討を行い、これらの日本人 MS への影響を総合的に検討する。

3. 研究の方法

- (1) Poser の診断基準にて clinically definite の MS 患者を対象とした。また、性・年齢をマッチさせた健常者を対照コントロールとした。
- (2) 書面にて説明を行い、同意を得られた患者・健常者のみから採血を行った。遺伝子多型解析用に DNA を分離したり、BDNF 濃度測定のため血清の保存を行った。
- (3) MS 患者の臨床情報として性別、発症年齢、使用薬剤、重症度の評価として EDSS、進行の程度を評価するための MSSS を評価した。
- (4) 遺伝子多型としては BDNF の exon5 に存在する G196A 多型を解析した。具体的には、forward, 5' -ATC CGA GGA CAA GGT GGC-3' ; reverse, 5' -CCT CAT GGA CAT GTT TGC AG-3' のプライマーを用い、300bp の PCR 産物を制限酵素 Pml I にて 37°C, overnight インキュベーションを行い、G allele と A allele を同定した。(180bp と 120bp に切断される場合は G allele, 切断されない場合は A allele)
- (5) 血清 BDNF 濃度は、市販の ELISA キット (R&D System) を用い、プロトコールに沿って測定した。

4. 研究成果

(1) BDNF 遺伝子多型解析

遺伝子多型解析を行った MS 患者は、男性 67 名、女性 149 名の計 216 名で、発症年齢 28.1 \pm 10.7 (mean \pm SD), DNA 採血年齢 35.8 \pm 11.7 (mean \pm SD), EDSS 3.1 \pm 2.6 (mean \pm SD), MSSS 3.93 \pm 3.11

(mean±SD)であった。一方、健常コントロールは男性 53 名、女性 133 名の計 186 名で、採血年齢は 32.6±9.5 (mean±SD)であった。遺伝子多型解析の結果、genotype frequency は下の表 1 に示すように、MS・健常対照者間で有意な相違は認めなかった。allele frequency に関しては、結果を載せないが、同様に 2 群間で有意な相違は認めなかった。また、MS 患者群において、BDNF 遺伝子多型と性、発症年齢、EDSS による重症度、MSSS による進行度との関連も検討したが、特に有意な相関は認めなかった。

表 1
BDNF G196A 多型

Genotype	MS	Control
AA	9	6
AG	69	65
GG	138	115
Total	216	186

(2) 血清 BDNF 濃度

血清 BDNF 濃度を測定した MS 患者は寛解期 25 名、再発期 18 名、並びに年齢・性をマッチさせた健常者 42 名である。結果は、下の図 1 のように MS 再発期でやや低い傾向があったが、3 群間で統計学的な有意な差は認めなかった。また、MS の再発予防として使用する IFN により BDNF が影響を受けるかどうか検討した。その結果、IFN 使用群と、非使用群で血清 BDNF 濃度に差は認められなかった。(data not shown) また、MS 患者において、進行の程度 (MSSS) と血清 BDNF 濃度が相関するかどうか検討したが、図 2 に示すように有意な相関は認めなかった。

図 1
健常者、MS 再発時、寛解時の BDNF 濃度

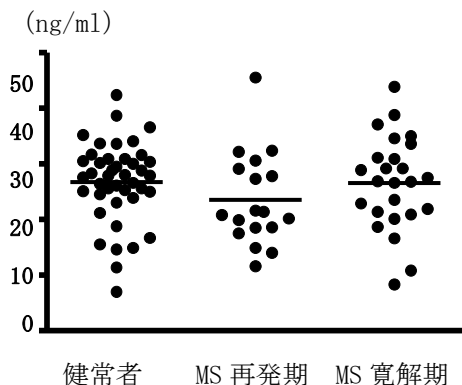
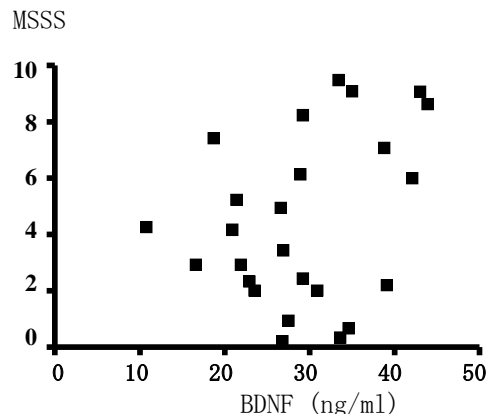


図 2
血清 BDNF 濃度と MSSS



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)

- ① Niino M, Hirotsu M, Fukazawa T, Kikuchi S, Sasaki H. Estrogens as potential therapeutic agents in multiple sclerosis. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 査読有. In press.
- ② Niino M, Fukazawa T, Kikuchi S, Sasaki H. Therapeutic potential of vitamin D for multiple sclerosis. *Curr Med Chem*. 査読有. 2008; 15: 499-505.
- ③ Niino M. Painful symptoms and quality of life in multiple sclerosis. *Neurol Asia*. 査読無. 2008; 13: 185-187.
- ④ Niino M. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists as potential therapeutic agents in multiple sclerosis. *Mini Rev Med Chem*. 査読有. 2007; 7: 1129-1135.
- ⑤ Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Sasaki H. Recent advances in genetic analysis of multiple sclerosis: genetic associations and therapeutic implications. *Expert Rev Neurother*. 査読有. 2007; 7: 1175-1188.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 新野正明, 廣谷真, 佐々木秀直. 多発性硬化症患者の B 細胞表面抗原の再発時・寛解時の比較検討. 第 21 回日本神経免疫学会学術集会, 大阪, 2009 年 3 月 13 日.
- ② 廣谷真, 新野正明, 佐々木秀直. 多発性硬化症の B 細胞における Toll-like receptor9 と免疫調節性機能に関する検討. 第 21 回日本神経免疫学会学術集会,

大阪, 2009年3月12日.

- ③ 新野正明. 多発性硬化症の病態と治療：治療法の開発をめざして「臨床からの展望」. 第49回日本神経学会総会（シンポジウム）, 横浜, 2008年5月16日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新野 正明 (NIINO MASAOKI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00443961

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし