

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：82404
 研究種目：基盤研究 C
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591649
 研究課題名（和文） ヒト急性期脊髄損傷血中バイオマーカー測定と亜急性期マーカーの探索
 研究課題名（英文） The efficacy of blood biomarkers in acute or sub-acute spinal cord injury
 研究代表者
 飛松 好子 (TOBIMATSU YOSHIKO)
 国立障害者リハビリテーションセンター（研究所）・研究所 義肢装具技術研究部・部長
 研究者番号：20172174

研究成果の概要（和文）：

軸索損傷のマーカーとしての血中 pNF-H の有用性を示すため、ヒト脊髄損傷症例による臨床試験を行った。pNF-H 濃度は ELISA 法を用いて測定した。急性期における血中 pNF-H 値は脊髄損傷の重症度と相関しており、軸索損傷の程度を反映していると考えられた。特に完全損傷と不全損傷を鑑別するのに有用であった。pNF-H はヒト脊髄損傷の血中バイオマーカーとして臨床応用が非常に期待できる。

研究成果の概要（英文）：

To assess the efficacy of plasma pNF-H as a biomarker of axonal injury, we performed a pilot cross-sectional study of patients with acute cervical spinal cord injury (SCI). The pNF-H assay was carried out with a commercially available ELISA kit. Plasma pNF-H was elevated in accordance with the severity of SCI and reflected a greater magnitude of axonal damage. Therefore, pNF-H is a potential biomarker to independently distinguish AIS A patients (complete SCI) from AIS C-E patients (incomplete SCI).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：バイオマーカー、軸索損傷、ヒト脊髄損傷、ELISA

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は本邦で毎年約 5000 人の新規患者が生まれ、また四肢に運動障害の後遺症を

持った慢性期脊髄損傷患者の累計は 10 万人にもおよぶと報告されており、その治療法の開発は社会的な要請ともいえる。分子生物学

の進歩によって過去 10 年間に損傷軸索の再生誘導や失われた神経組織への細胞移植が研究開発され、その一部はすでに臨床治験を行う段階に進んでいる。しかし、新たな治療方法の臨床応用が提唱される一方、実際の臨床の場における治療効果の判定技術については議論されることが少なく、このことが脊髄損傷治療の進歩の大きな妨げとなっている。

急性期脊髄損傷に対して研究されている治療法のほとんどは損傷から 2 週間以内に施行される。この受傷から 2 週間の時期はヒト脊髄損傷もげっ歯類の動物実験モデルにおいても四肢運動機能の自然回復が見られる時期である。したがって、この期間の治療介入において四肢運動機能をその効果判定基準にする場合、自然回復による改善と治療介入によるものとを識別する必要がある。損傷程度が均一な動物実験モデルと異なり、ヒト脊髄損傷は損傷の程度・脊髄の中での部位・年齢などの多様性を背景に自然回復のばらつきも大きく、治療介入による運動機能回復を正しく判定することは容易ではない。

バイオマーカーは癌疾患の血中腫瘍マーカー値のように疾患状態の定量的計測を可能にするもので、救急疾患でも心筋梗塞での心筋 CPK 値など細胞が壊れた結果血液中に逸脱するタンパクを測定するアプローチが広く用いられている。脊髄損傷においても受傷時の瞬間的な組織破壊に引き続き、炎症反応による組織傷害が 2 週間にわたって遷延することが分かっており、こうした組織傷害の経過を神経細胞からの逸脱タンパクを体液中で測定することが可能となれば、四肢運動機能評価よりも客観的で定量的な病態把握ができると考えられる。

こうした背景のもとに申請者は平成 20-21 年度の科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究に

おいて「急性期脊髄損傷治療の効果判定を目指した血中神経損傷マーカーの有用性検討」を申請・採択され、研究を行ってきた。これまでにラット脊髄損傷モデルを用いた血液中のバイオマーカーとして複数のマーカーを組み合わせた評価が有効であることが示唆された。今回申請者はこれまでの動物実験データをもとに実際のヒト脊髄損傷症例において血液中脊髄バイオマーカーを測定し、その臨床応用の可能性を検討するという着想に至った。

また動物実験の結果から血液中のバイオマーカー測定の限界として、一時的に透過性が亢進した脳血流関門が修復される損傷後 1 週間以降になると血液中での脊髄組織由来タンパクの測定が困難になることから、脳脊髄液を用いた受傷 1-2 週後のバイオマーカー測定が必要であることが分かった。これについても既知の損傷関連タンパクをもとに動物モデルを用いた測定を行うことで、亜急性期のマーカーを確立するという着想を得た。

本研究の成果は脊髄損傷の血液・脳脊髄液中のバイオマーカーの確立を通じ、臨床で行われる脊髄損傷治療開発の効率向上につながると期待される。

2. 研究の目的

動物実験にて測定可能であった脊髄損傷急性期血中バイオマーカー (pNF-H、MBP、S100B) がヒト脊髄損傷症例において重症度を反映する指標となりうるか、臨床血液サンプルを用いて検証する。また、各バイオマーカーの時間的変化を測定し動物脊髄損傷モデルとの差異を明らかにする。本研究期間内で収集可能な脊髄損傷症例数には限りがあると予想されるため、重症度の異なる少数の症例から詳細なデータ収集を行い、上記の点

について検討する。この基礎データは本研究の次の段階、つまり多数症例による脊髄損傷の臨床像とバイオマーカー値のデータベース構築、の土台となるものである。

3. 研究の方法

(1) 急性期脊髄損傷患者の血液サンプルと臨床データの収集

研究主任が在籍する国立障害者リハビリテーションセンター病院では救急搬送される新規発症脊髄損傷症例の取り扱いがないため、患者サンプルの収集は関連の医療施設の協力を得て行った。既に年間約 40 症例の脊髄損傷取り扱い件数の実績を持つ、東京都立墨東病院救命救急センターとの協力体制が確立していたため、血液サンプルの採取を開始できる状態になっていた。

血液サンプルの研究利用に際しては患者本人の同意が必要になるため、研究期間内で収集可能なサンプル数は 20 症例分程度と予想し、研究目標である各種バイオマーカーの値と臨床的重症度の相関を検証するために下記に示すごとく重症度の異なるサンプルが集まるよう留意した。重症度は ASIA impairment scale (AIS)による grading に基づいて評価を行った。

採血のタイミングは動物実験でのデータをもとに受傷当日から受傷後 1 週間までの[6 時間、12 時間、18 時間、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間、144 時間]の 8 ポイントで行った。ただし、実際の採血施行の可否は担当医の判断で行った。

調査の対象となった症例の臨床データは匿名化した状態で担当医より収集し、凍結血清サンプルと共に、国立障害者リハビリテーションセンター研究所にてその解析を行った。

(2) ヒト脊髄損傷臨床サンプルにおけるバ

イオマーカー測定の実施

初年度から行った臨床血液サンプルの解析を目的のバイオマーカー[pNF-H、GFAP、MBP、S100B]について ELISA 法により解析した。

各症例ごとの臨床的重症度（麻痺の程度）に応じて各マーカーの 1)ピーク値、2)ピーク値を示したタイミング、を集計する。そして、それらと重症度との間に相関関係が見出せるかを解析した。

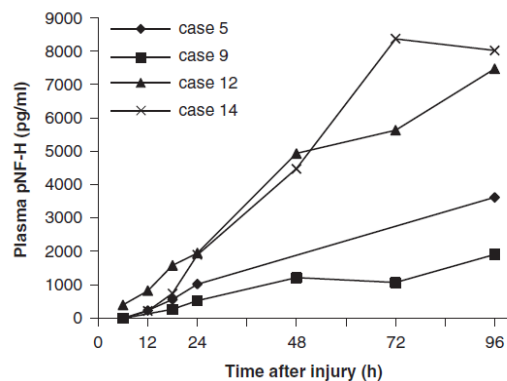
4. 研究成果

(1) 血中バイオマーカーとしての pNF-H

先述したように、ヒト脊髄損傷 14 例による臨床試験を行った。最終的な臨床的重症度は、AIS A 4 人、C 5 人、D 4 人、E 1 人であった。

血中 pNF-H は 14 例中 11 例で、受傷後 96 時間以内に検出された。最も重症度の高い AIS A の 4 例に関しては、遅くとも受傷後 12 時間より pNF-H が検出され、96 時間まで pNF-H 値が単調上昇を示した（図 1）。以上より、脊髄損傷後 96 時間以内の急性期において、血中の pNF-H が測定可能である事が示された。

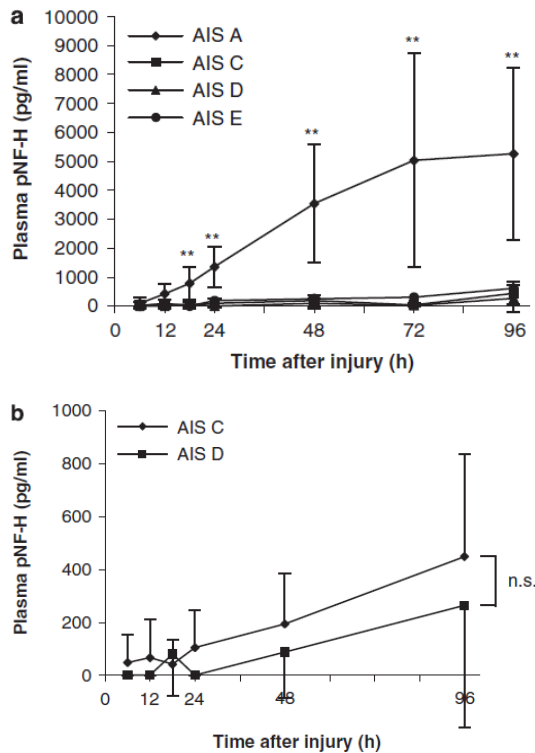
図 1



次に、AISの重症度ごとにpNF-H値の平均をとって、経過をグラフに示した(図2)。AIS Aの症例のpNF-H値が、AIS C-E症例と比べると、一貫して著しい高値を認めた。Mann-Whitney U testで検定を行ったところ、受傷後18~96時間の間で、AIS A症例とAIS C-E症例の間に、統計学的有意差を認めた(図2a)。

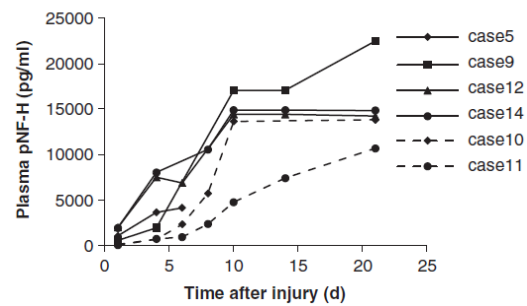
一方、AIS C症例とD症例のpNF-H値を比較しますと、平均値ではAIS C症例がやや高い傾向を示したが、統計学的有意差は認めなかった(図2b)。

図2



過去の研究により、ラット脊髄損傷モデルでは血中pNF-Hは受傷後3日でピークに達し、その後漸減することが分かっていたが、今回のヒトのデータでは、少なくとも受傷後3週の慢性期までは血中pNF-Hは減衰しないことが明らかとなった(図3)。

図3



これらの結果により、脊髄損傷後急性期における血中pNF-Hの濃度が臨床的な重症度と相関を認め、血中バイオマーカーとして有用であることが明らかとなった。

なお、以上に述べたヒト脊髄損傷急性期における重症度と末梢血pNF-H値の相関に関する研究成果については、2012年spinal cord誌にて発表した。

(2) その他の候補バイオマーカー

①S100B (アストロサイト関連マーカー)

約半数の症例で検出が可能であり、受傷後6時間でピーク値を示した(図4は典型例)。ただし、S100Bの6時間値と重症度の間には乖離が認められたため(図5)、単独でバイオマーカーとして用いるのには問題があると考えられた。

図4

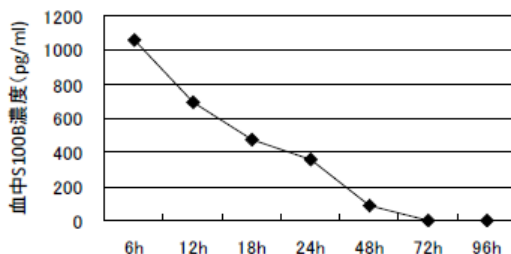
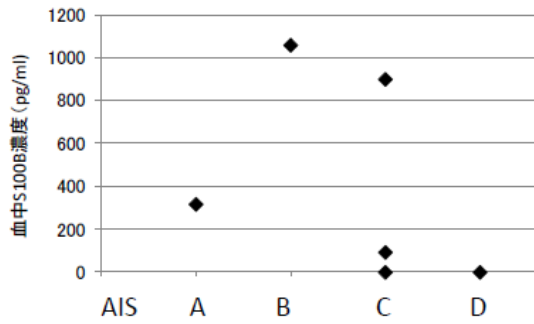


図 5



②MBP (髄鞘関連マーカー)

ラット脊髄損傷モデルでは血中で検出可能であり、受傷後1日前後でピーク値を示すことが示唆された(図6)が、ヒト脊髄損傷症例においては、受傷6時間後のみが検出可能であり、その値もきわめて低値であった(図7)。臨床で用いるのは現実的に難しいと考えられた。

図 6 (破線は検出限界値)

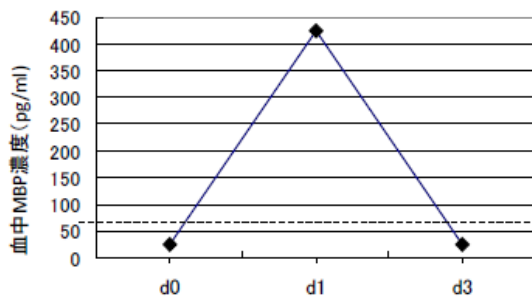
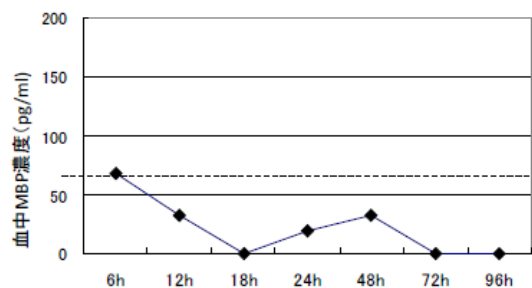


図 7 (破線は検出限界値)



③その他

GFAP (アストロサイト関連マーカー) は症

例によって値やピーク値のタイミングのばらつきが非常に大きく、マーカーとして機能しないと思われた。

UCHL1 (神経細胞体関連マーカー) は、市販キットにおいてそもそも信頼性のある測定条件が得られなかった。

以上より、ヒト脊髄損傷における血中バイオマーカーとしては、pNF-H が最も有用であることが示された。

(3) 考察

今回の結果から、脊髄損傷受傷後急性期における血中 pNF-H の濃度が臨床的な重症度と相関を認め、血中バイオマーカーとしては pNF-H が最も有用であることが明らかとなった。特に完全損傷と不全損傷を受傷後早期より鑑別できるため、予後予測のツールとして威力を発揮すると考えられる。

一方でヒト脊髄損傷症例において、受傷後3週を経過した慢性期でも血中 pNF-H 濃度が減衰せずに検出される事が今回示されたが、その理由については明らかにされていない。これは、血中への pNF-H 放出が、外傷による神経軸索の直接損傷というメカニズムのみでは充分説明できない事を示唆している。今後 pNF-H をバイオマーカーとして広く臨床応用していくにあたって、in vitro における神経軸索の損傷モデルを確立させるなどして pNF-H の動態メカニズムをより詳細に解明していく事が必要不可欠となると思われる。

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3件)

- ① 緒方 徹, 血中バイオマーカーによる脊髄損傷の重症度評価の試み, リハビリテーション医学, 査読有, 49, 2012, 501-503

- ② Hayakawa K., Ueno T., Ogata T., Tobimatsu Y., et al., Phosphorylated neurofilament subunit NF-H as a biomarker for evaluating the severity of spinal cord injury patients, a pilot study., Spinal Cord, 査読有, 50(7), 2012, 493-6
- ③ 早川謙太郎, 緒方徹, バイオマーカーによるヒト脊髄損傷の予後予測の試み、Bone Joint Nerve、査読無、1(3)、2011、495-500
- [学会発表] (計9件)
- ① 緒方徹、早川謙太郎ら、血中神経損傷バイオマーカーpNF-Hの臨床利用と限界、第27回日本整形外科学会基礎学術集会、2012年10月26日、名古屋
- ② Hayakawa K., Ogata T., et al., pNF-H as a biomarker for evaluating severity of acute spinal cord injury patients, Neuroscience2012, 2012年10月16日、ニューオリンズ(米国)
- ③ Hayakawa K., Ogata T., et al., pNF-H as a biomarker for evaluating severity of acute spinal cord injury patients、第8回ヨーロッパ神経科学フォーラム、2012年7月15日、バルセロナ(スペイン)
- ④ Ogata T., Hayakawa K., Tobimatsu Y., et al., Evaluation of Severity of Spinal Cord Injury by Blood Biomarkers, AOCPRM 2012, 2012年5月21日、バリ(インドネシア)
- ⑤ 早川謙太郎、緒方徹、血中バイオマーカーによる脊髄損傷の重症度評価の試み、第46回日本脊髄障害医学会、2011年11月18日、大阪
- ⑥ 緒方徹、飛松好子、赤居正美、血中バイオマーカーによる脊髄損傷の重症度評価の試み、第48回日本リハビリテーション医学会、2011年11月2日、幕張
- ⑦ 緒方徹、早川謙太郎ら、脊髄再生治療における血液バイオマーカーの意義、第26回日本整形外科学会基礎学術集会、2011年10月21日、前橋
- ⑧ 緒方徹、早川謙太郎、飛松好子ら、pNF-H as a biomarker for evaluating severity of acute spinal cord injury patients、第34回日本神経科学学会、2011年9月15日、横浜
- ⑨ 石井桂輔、緒方徹ら、血中バイオマーカーによるヒト脊髄損傷の重症度評価の試み、第25回日本整形外科学会基礎学術集会、

2010年10月15日、京都

[図書] (計0件)
[産業財産権]
○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飛松 好子 (TOBIMATSU YOSHIKO)
国立障害者リハビリテーションセンター
(研究所)・研究所 義肢装具技術研究部・
部長

研究者番号： 20172174

(2) 研究分担者

緒方 徹 (OGATA TORU)
国立障害者リハビリテーションセンター
(研究所)・研究所 運動機能系障害研究
部・部長

研究者番号： 00392192