

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462317

研究課題名(和文) 神経バイオマーカーpNF-Hの異常値メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) The mechanisms of elevated blood pNF-H, as a biomarker for neural disorders

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)・病院(併任研究所)・病院長

研究者番号：20172174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経組織の損傷程度を評価する指標として利用可能なバイオマーカーの候補である血中リン酸化ニューロフィラメント(pNF-H)について基礎的な検討を行った。後根神経節培養実験からはpNF-Hは神経の挫滅損傷により多く放出されることが示唆された。またラット・ヒトでの脳脊髄液・血液の同時採取による評価から、脳脊髄液中の濃度は血中よりも5-10倍の濃度を示すものの、その比率は病態によって大きく変動することが示された。このことは外傷以外の慢性疾患で血中pNF-H値を評価する際には脳脊髄液から血中へのpNF-Hの移行を促進する炎症の有無に留意する必要があることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the basic mechanisms of dynamics of serum phospho-neurofilament H subunit (pNF-H), a possible biomarker for evaluating damage to central nervous system. The dorsal ganglion culture experiment revealed that pNF-H seems to be released from contused axons. The simultaneous sampling from blood and cerebrospinal fluid showed that the level of pNF-H is 5 to 10 times higher in cerebrospinal fluid, but the ratio varies depending on the pathological conditions. These results indicate that in the evaluation of serum pNF-H level, clinicians should be aware that it may reflect the type of damage to nervous tissue and also coexisting inflammation which facilitates transfer of pNF-H into peripheral blood.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：バイオマーカー 脊髄損傷 細胞培養

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経疾患治療における予後予測

脊髄損傷や脳卒中、あるいは変性疾患など中枢神経疾患への治療法開発が検討され、その一部はすでに前臨床段階に達しており、今後様々な臨床試験が実施されることが予想される。こうした臨床試験では適切な対象群の選別が必要であり、治療法の開発とともに初期評価方法の確立が重要な課題となっている。脊髄損傷を例にとると、受傷後1ヶ月以内の治療介入効果は、その期間に生じる神経機能の自然回復の影響を強く受ける。介入前に個々の症例の重症度(予後)を正確に評価することが臨床試験を効率よく進めるうえで求められているが、現時点で神経学的所見や画像検査では十分な識別ができていない。

(2) バイオマーカーpNF-Hの有用性

血液や脳脊髄液中に含まれるタンパク質(バイオマーカー)解析による病態把握は糖尿病におけるHbA1cや癌の腫瘍マーカーのように広く医療に取り入れられているが、これまで中枢神経疾患の評価に利用可能なバイオマーカーはごくわずかであった。pNF-H(リン酸化ニューロフィラメントNF-H)は2005年にShawらによって提唱された血中で測定可能なバイオマーカーである。神経の軸索に発現するpNF-Hが血中で高値を示すことは、外傷などによって中枢神経細胞が破壊され、軸索内に発現するpNF-Hが周辺組織、あるいは血中に漏出していると考えられている。申請者はこれまで血中pNF-Hの高値が脊髄損傷の重症度と相関することをラット脊髄損傷モデル(上野ら2011年)およびヒト脊髄損傷(早川ら2012年)にて報告し、このバイオマーカーが臨床現場での病態評価に有用であることが示されている。

(3) バイオマーカーpNF-Hの課題

血中pNF-H値が脊髄外傷において重症

例ほど高値を示すことが明らかになった一方で、pNF-Hが血中に移行するメカニズムのさらなる解明が求められている。申請者のこれまでの報告からヒト脊髄損傷においてpNF-Hは受傷後24時間で血中で検出されるようになり、その後時間とともに増加していく傾向を示すことがわかっている。その後、血中pNF-H値は数か月にわたって高値を維持することになるが、そのメカニズムは不明である。今後、このバイオマーカーが慢性期疾患に対しても利用できるかを検討する上で、慢性的なpNF-H値の上昇が生じるメカニズムを解明することは値を解釈する上で必須の課題である。

こうした背景をもとに、申請者はpNF-Hが血中に移行するメカニズムを明らかにするという着想に至った。本研究は新たな中枢神経障害のバイオマーカーとして期待されるpNF-Hの動態を明らかにすることで、その血中値に対する臨床的な意味づけを可能にすることである。

2. 研究の目的

(1) pNF-Hが神経細胞から細胞外へ放出されるメカニズム解明

pNF-Hは神経軸索を構成する細胞内蛋白で、通常細胞外には放出されない。したがって、pNF-H値の上昇は損傷を受けた軸索の遺残が変性していく(ワーラー変性)を起こす過程で細胞外にでる可能性が考えられる。もう一つの可能性として軸索の近位断端に細胞体から輸送されるpNF-Hが蓄積した結果、細胞外に放出される可能性も考えられる。

(2) 細胞外に出たpNF-Hが血中に出現するメカニズム解明

pNF-Hは分子量が200kDと大きく、そのまま脳血流関門を通過するとは考えにくい。したがって、細胞外に出たpNF-Hが貪食細胞などに取り込まれた後、血中

に放出される可能性が考えられる。一方で、pNF-H は炎症反応により脳血流関門の破綻した部位から血中に漏出するメカニズムも考えられる。

3. 研究の方法

(1) 後根神経節を用いた in vitro 神経損傷モデルと pNF-H 測定の実験

神経軸索の切断に際し、軸索の骨格タンパクである pNF-H が切れた軸索遠位部のワーラー変性に伴って漏出するのか、細胞体や近位軸索から出するのかを培養系にて検討する。

ラット胎児より採取した後根神経節を培養条件に移し、神経軸索が伸長するまで培養した後、物理的に軸索を切断する。その後、培養液中への pNF-H 放出を ELISA 法によって解析する。その後、同様の損傷モデルを作成した後、細胞を細胞体側と遠位軸索側に分割し別々に培養を継続する。この状態で細胞体側と遠位軸索側のどちらの培養液中に pNF-H が漏出するかを定量評価する

(2) マウス脊髄損傷モデルの損傷脊髄内での pNF-H の輸送経路の探索

マウスに胸髄レベルの圧挫脊髄損傷を作成し抗 pNF-H 抗体を用いて pNF-H の組織学的局在を時間の経過とともに観察する。炎症細胞やグリア細胞との関連を検討するため、抗 Iba1 抗体、抗 GFAP 抗体による免疫染色を同時に行う。

(3) ラット脊髄損傷モデルでの脳脊髄液および血中での pNF-H 存在様式の検討

ラットの後頭骨-C1 頸椎境界部より穿刺し脳脊髄液を採取する方法を確立する。その上で、脊髄圧挫損傷を加え、時間経過にそって脳脊髄液と末梢血との同時採取を行う。サンプルは ELISA 法にて解析し pNF-H 濃度を求める。

(4) 臨床検体による検討

臨床的に診断が確定している慢性神経障害性疾患として腰部脊柱管狭窄症による馬尾神経障害、頸髄への慢性圧迫による頸髄症の症例について、血液あるいは脳脊髄液を採取し、その濃度を比較するとともに病態との関連付けを行う。

4. 研究成果

1) 後根神経節を用いた in vitro 神経損傷モデルと pNF-H 測定の実験

in vitro で解析する為にラット後根神経節を培養ディスク上で3週間培養し、十分に神経軸索が伸びたところで物理的に軸索を損傷するモデルを作成した。その結果、培養液中に翌日から pNF-H が ELISA 法で検出されるようになり、損傷に応じて pNF-H が細胞外に移行することが確認された。一方、個体レベルの神経損傷では数日間にわたって血中で pNF-H が検出されるのに比べ今回の培養系で検出される期間は1日のみであった。

また、pNF-H が損傷を受けた軸索の細胞体側と遠位側のどちらから出ているかを検討する為に、軸索損傷後に培養ディスクを二つに分けて培養する方法を採択した。培養自体は可能であったが、いずれの側からも pNF-H が検出されないことも多く、切断部の遠位と近位のどちらか一方から pNF-H が放出されているか確定的な実証は得られなかった。

一方、損傷を加える際の方法に、鋭利なメスで切断する方法と培養ディスクごと鈍的な鋏で切断する方法で比較を行った。その結果、比較的鈍的な損傷の方が培養液中で高い濃度の pNF-H が検出されることを観察した。この知見は軸索の挫滅損傷と pNF-H 上昇との関係性を示唆するものであった。

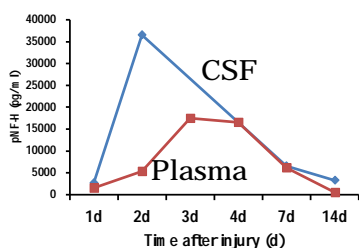
(2) マウス脊髄損傷モデルの損傷脊髄内

での pNF-H の輸送経路の探索

マウス脊髄損傷モデルを作成し、損傷部の pNF-H の局在を免疫染色によって観察した。pNF-H は正常部分の軸索内にみられるほか、損傷部周辺では凝集塊となって検出された。一部の pNF-H 陽性の凝集塊は貪食マクロファージのマーカーである Iba1 と共局在を示していたことから、神経細胞から出た pNF-H が貪食細胞によって取り込まれている可能性が示唆された。

(3) マウス脊髄損傷モデルの損傷脊髄内での pNF-H の輸送経路の探索

ラット脊髄損傷モデルではこれまでの報告と同様に血中の pNF-H は脊髄損傷後3日目をピークとして以後減少し、陰性化する傾向が観察された。下図は脳脊髄液との同時計測を実施した結果である。

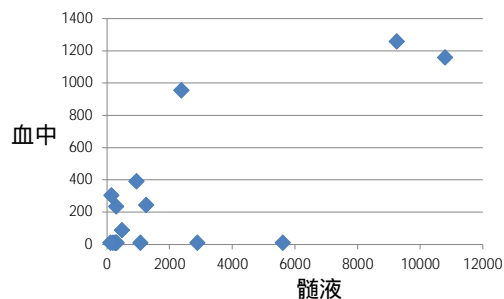


脳脊髄液 (CSF)、血液 (plasma) での pNF-H 同時計測

この結果からは外傷性神経損傷の急性期においては脳脊髄液中の pNF-H 濃度の上昇が顕著であるが、4日目以降での差はわずかになることが示された。

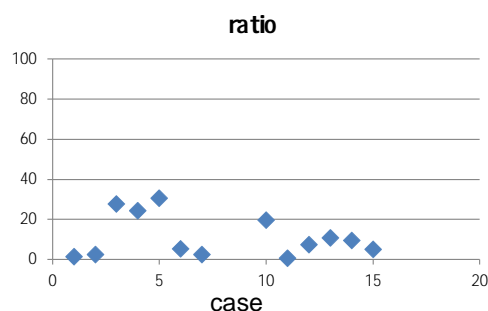
(4) 臨床検体による検討

腰部脊柱管狭窄症の臨床例で血中 pNF-H と脳脊髄液中 pNF-H を同時に計測した 16 例のデータを示す。



ヒト検体における血液・脳脊髄液での pNF-H 値の比較

傾向として脳脊髄液中の pNF-H が高い症例ほど血中 pNF-H も高値を示す傾向はみられるが、比率が一定でないことがうかがわれる。下図は脳脊髄液中の濃度が血中の何倍かを示すもので、5倍程度から30倍まで幅広く症例によって異なることが明らかとなった。



各症例の脳脊髄液中/血中 pNF-H 比

さらに、中枢神経障害である頸髄症の血中濃度測定を行ったところ、調査した 26 例中の 6 例(23%)でのみ pNF-H は検出された。また、臨床症状との対応づけでは陽性だった 6 例はいずれも検査前 3 か月以内に症状悪化の所見がみられていた。

以上の結果から、慢性疾患においては脳脊髄液中と血中では pNF-H 値に差が生じることが示された。血中での陽性所見は病態の進行、炎症といった変化が背景にあることが示唆された。

(5) まとめ

本研究により新規の神経損傷バイオマーカー pNF-H の基本特性について新たな知見

を得ることができた。

pNF-H が軸索損傷部より遠位からのみ放出される、という確証は得られず、現時点では近位、挫滅損傷部を含め広い範囲の軸索から放出されていることが示唆された。

外傷性の神経損傷において、早期では脳脊髄液中の濃度が血中に高値になるが、数日後には両者の差は少なくなり、これは脳血流閉塞の破たんにより pNF-H の血中移行効率が低い状態になっていることを示唆している。

一方で、慢性疾患の病態では脳脊髄液中と血液中の pNF-H 値の比率は状態によって大きく異なり、血中で pNF-H が陽性になる背景には炎症反応を含めた神経組織における病態の関与があると考えられる。

今後、pNF-H が末梢血で計測できる神経障害マーカーとして活用する上で、慢性の病態の場合には血中への移行を促進する病態の有無を念頭に判断する必要があることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kato S, Chikuda H, Ohya J, Hayakawa K, Takeshita K, Tanaka S, Ogata T. Phosphorylated neurofilament subunit levels in the serum of cervical compressive myelopathy patients. *J Clin Neurosci.*, 査読有, 22(10):1638-42, 2015, doi: 10.1016/j.jocn.2015.03.047.

Ohya J, Chikuda H, Kato S, Hayakawa K, Oka H, Takeshita K, Tanaka S, Ogata T. Elevated Levels of Phosphorylated Neurofilament Heavy Subunit in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Lumbar Spinal Stenosis: Preliminary Findings. *Spine J*, 査読有, 15(7):1587-92, 2015, doi: 10.1016/j.spinee.2015.03.013.

Natori A, Ogata T, Sumitani M, Kogure T,

Yamauchi T, Yamauchi H., Potential Role of pNF-H, a Biomarker of Axonal Damage in the Central Nervous System, as a Predictive Marker of Chemotherapy-Induced Cognitive Impairment. *Clin Cancer Res.*, 査読有, 21(6):1348-52, 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2775.

〔学会発表〕(計 1 件)

緒方徹、早川謙太郎、筑田博隆、田中栄、バイオマーカー-pNF-H の臨床的意義、第 28 回にポン整形外科基礎学術集会、2013 年 10 月 17 日、幕張メッセ (千葉県千葉市)

〔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 : なし

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) 病院 (併任研究所)・病院長
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) 病院 (併任研究所)・障害者健康増進・運動医科学支援センター・センター長
研究者番号 : 00392192

(3)連携研究者

該当なし