

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461300

研究課題名(和文) イメージングマスペクトロメトリ を核とした多発性硬化症バイオマーカー探索

研究課題名(英文) Biomarker study for multiple sclerosis with 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)：神経難病の多発性硬化症 (Multiple Sclerosis; MS)は、中枢神経系の炎症性自己免疫疾患で、鑑別が難しい。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) による新しい質量分析法である Imaging Mass Spectrometry (IMS) 法を用いてマウスの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。その結果、病態に関連すると考えられるマウス脳・脊髄におけるプロテオミックパターンの描出に成功した。神経疾患のバイオマーカー解析に本方法は、有効である。

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. Here we systematically visualized the distribution of proteins and peptides from brains and spinal cords of the mice during EAE development. Using multivariate analysis, area specific proteomic pattern was extracted in wild type mice and aberrant distribution was noticed in EAE mice even from early to onset stage of the diseases. For the clarification of pathogenesis of MS, we consider proteomic IMS on brain and spinal cord sections from EAE mice is a valuable approach.

研究分野：ゲノム医科学

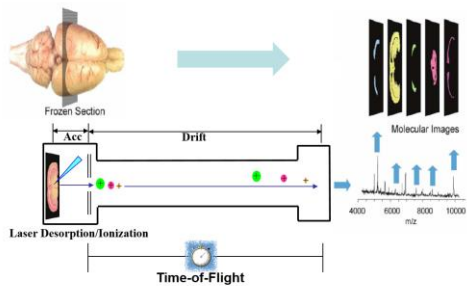
キーワード：多発性硬化症 バイオマーカー イメージング質量分析法 プロテオミクス 多変量解析

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)。

2. 研究の目的

本研究では、超早期診断に有効と考えられるタンパク質・ペプチドのバイオマーカーを探索する。そのために、脳画像と比肩するような脳・脊髄組織内での早期 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) を解析する。



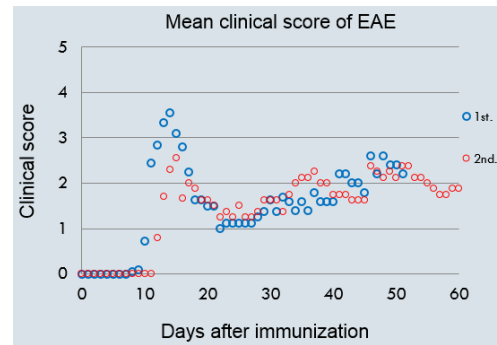
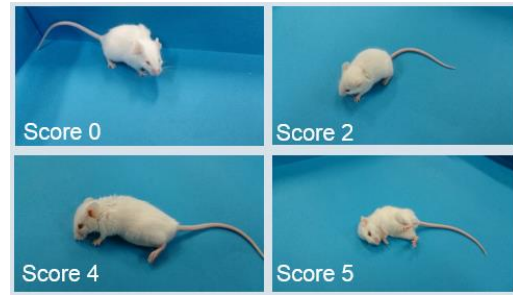
Modified from M.Stoeckli et al. Analytical BioChemistry 311 (2002)33-39

3. 研究の方法

病気の時間的空間的多発性を鑑みるとヒト多発性硬化症の臨床における最も感度や特異性の面で勝る診断手法は、MRI などの *in vivo* imaging である。近年、ヒト多発性硬化症において **Normal Appearing White Matter; NAWM** という概念が提唱され、症状や画像所見の出る前に変動する脳・脊髄の生化学的変動に関心が集まっている。われわれは、すでに本方法を用いた研究をスタートさせており、特に難易度の高いペプチド・タンパク質レベルでの **イメージングマススペクトロメトリー (Imaging Mass Spectrometry; IMS)** 法を多発性硬化症の動物モデルであるマウス EAE に応用し、脳・脊髄組織における生化学的変動を直接組織から検証を行ってきた。

SJL/J マウスに PLP を免疫すると 10~11 日目に EAE の症状が出現する。本計画では、EAE の各病期を i) 実験コントロール, ii) 症状の出る前, iii) 急性期, iv) 慢性期と定義し、それぞれのマウス脳・脊髄組織から IMS 法

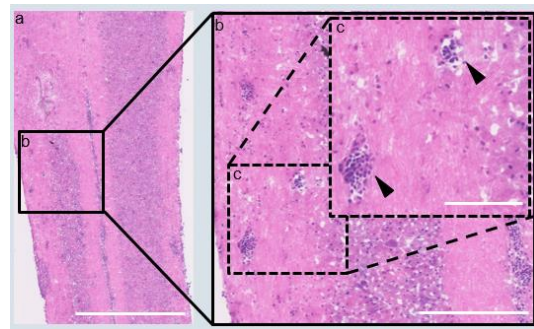
によるプロテオーム解析を行う。



マウス EAE モデルの作製. Clinical Score の推移とスコアリングの実際. Score 0~5.

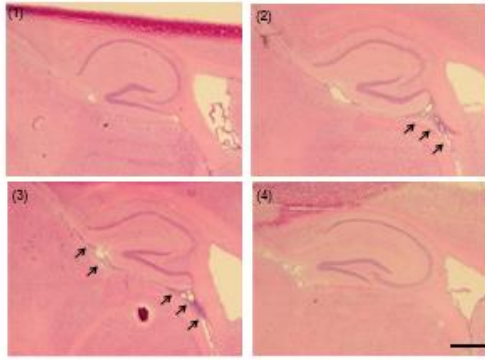
4. 研究成果

このモデルの急性期のマウス脊髄の HE 染色を示した。病巣脊髄中に、異所性の免疫系の浸潤細胞の集塊と背景の組織構築の破壊が見受けられる。

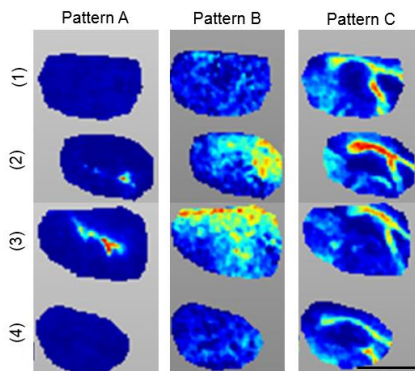


マウス EAE モデルの脊髄: 免疫系細胞の浸潤が明らかである

本手法の原理は、図のとおりで、薄切凍結組織切片を用いて MALDI 型質量分析器によって検出可能な分子局在を組織上で直接可視化する手法である。本モデルにおいて、EAE 急性期の脱髄のおきている箇所や回復期に再生のおきている箇所に特異的なピーク (イオン種) をタンパク質・ペプチドレベルで特定できるかを検討した。その結果、神経症状の現れる前のステージの段階から、脊髄および脳周辺の神経組織とは異なる細胞浸潤の認められることが明らかとなった。



マウス EAE の神経学的ステージと脳組織における細胞の浸潤 (1) 実験コントロール, (2) 症状の出る前, (3) 急性期, (4) 慢性期。図は、海馬周辺を示した。(2)の症状の出る前から細胞浸潤の顕著であることがわかった



マウス EAE 脳海馬周辺領域の IMS 法を用いたクラスタリングの結果。Pattern A は、発症前から脳プロテオームの変化する様をとらえている。(1) 実験コントロール, (2) 症状の出る前, (3) 急性期, (4) 慢性期。

この細胞集塊の存在する部位のスペクトラムの変化を多変量解析をしてクラスタリングの手法を用いて可視化した。Pattern A のように、EAE の急性期症状の直前のマウス脳・脊髄においても細胞浸潤が認められ、それと一致するプロテオミック・マーカーの存在が示唆された (Yamashita et al., HUPO, 2016)。

上記手法により疾患早期より変動するペプチド・タンパク質のシングルピークの特性を試みる。また、新しい IMS の手法として組織上でトリプシン処理を行い、網羅的タンパク質同定を LC-MS/MS と同時に行う方法にて一挙に数百のタンパク質の同定を行うことも可能である。上記の方法を組み合わせることにより候補タンパク質の特定を行い、すでに報告のある神経細胞特異的抗体の GFAP, MBP, Iba-1 などカウンター染色として用いながら、IMS 法で得られた候補タンパク質の情報を抗体レベルの観察と比較検討を加えることにより再現性・信頼性の高いマーカー分子の検出を行う。

また、将来的には、このマウスの脳・脊髄全体から CD4 陽性 T 細胞群を抗体を用いて精製し、回収した細胞のライセートから定量的プロテオーム解析を行う。この定量的解析手法は、Isotope-coded Protein Labelling 法を用い、ゲルおよび LC-MS/MS 法を組み合わせることでタンパク質の一斉特定を定量的に行う。

候補タンパク質の特定ができ、まずは市販の抗体を用いた免疫組織化学を行うと同時に、臨床への出口戦略としてモノクローナル抗体を作製し、ELISA などの検出系の作製や中和抗体として EAE における検証実験を行う。

研究分担および研究協力者の協力を得て患者 CSF や血液などの臨床検体における候補タンパク質の特定を行う。

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 4 件)

1. Ikegawa, M., Miyasaka, T., Kakuda, N., Ihara. Imaging Mass Spectrometry for the research of Alzheimer's Disease. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* v. 64(1); 17-20, (2016). 査読有
2. Altered T cell phenotypes associated with clinical relapse of multiple sclerosis patients receiving fingolimod therapy Fujii C., Kondo T., Ochi H., and Mizuno T. *Scientific Rep.* 2016 6:35314. 査読有
3. Autoantibodies to neural antigens in CNS demyelinating disorders. Watanabe M. and Kondo T. *Curr Neurobio* 2016 7(1) 7-10. 査読有
4. An Adult Case of anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) antibody-associated multiphasic acute disseminated encephalomyelitis at 33-year intervals. Numa S., Kasai T., Kondo T., Kushimura Y., Kimura A., Takahashi H., Morita K., Tanaka A., Noto Y., Ohara T., Nakagawa M., Mizuno T. *Internal Medicine* 55:699-702, 2016. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

1. Imaging Mass Spectrometry (IMS) for the proteomic Studies of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)

mouse. Yamashita H., Kondo T.,
Ikegawa M. et al., HUPO2016 Taipei,
Taiwan. (2016.9.19)

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

近藤 誉之 (KONDO, Takayuki)
関西医科大学総合医療センター・教授
研究者番号：50322756