

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850193

研究課題名(和文)リン酸化ニューロフィラメント重鎖血中濃度を用いた脊髄損傷の新規診断・治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel diagnostics and treatment for spinal cord injury using blood concentration of phosphorylated neurofilament heavy chain

研究代表者

藤原 玲奈 (Fujiwara, Reina)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：60456176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：犬の脊髄損傷症例において血中pNF-H濃度は発症から約1週間で上昇し、予後判定に用いるバイオマーカーとして有用であった。一方、急性期においては、GFAPが特異度の高い予後判定因子になりうる可能性を見出した。犬における血中pNF-Hの半減期は約190分であり、発症後に上昇し、血中濃度が維持されることは、中枢からの継続的な漏出を示唆すると考えられ、血中pNF-H濃度をモニタリングすることで脊髄損傷の病態を把握することで、術後管理やリハビリテーションにおける治療指針となることが期待できる。現在、犬pNF-H測定系を独自に開発しており、将来的な臨床応用を目指す。

研究成果の概要(英文)：In dogs with spinal cord injury, the blood concentration of pNF-H increased within a week after the onset and the value can be a promising biomarker to evaluate the prognosis after spinal cord injury. On the other hand, in acute phase, GFAP showed good specificity as a prognostic factor. Analysis of in vivo pNF-H kinetics revealed elimination half-life of pNF-H was estimated to 190 min. In conclusion, interventions have little influence on serum pNF-H and the time-course changes in serum pNF-H indicate the simultaneous pNF-H leakage from damaged spinal cord in the process of injury or restoration. This result suggested that evaluating blood concentration of pNF-H after spinal cord injury can offer good information to decide post-surgical care and rehabilitative therapy. We are also uniquely developing ELISA system to detect canine pNF-H in blood to use in daily clinics.

研究分野：獣医神経病学

キーワード：脊髄損傷 バイオマーカー グリア線維性産生タンパク (GFAP) ニューロフィラメント重鎖 (pNF-H)

1. 研究開始当初の背景

犬において椎間板ヘルニア等の脊髄損傷は発生率の高い神経疾患である。治療選択や予後予測には症状や神経学的機能検査所見に基づく重症度分類、MRIなどの画像所見が有用とされているが、客観性が高く、Grade5の症例における予後予測因子としては限界がある。我々は、脊髄損傷後に血液中で検出される、リン酸化ニューロフィラメント重鎖 (pNF-H) に注目し、犬の胸腰部椎間板ヘルニア症例における血中 pNF-H 濃度を測定したところ、予後不良である症例は血中濃度が長期間高濃度を示した一方で、重症例でも濃度上昇が軽度であれば予後が良好であることを見出した。しかし、高濃度帯については、検出限界を超えた症例も含まれ、予後予測因子として利用するには、高濃度帯における血中濃度の詳細を明らかにし、予後不良となるカットオフ値を設定する必要がある。また、血中濃度変化の意義を明らかにすることで、血中 pNF-H 濃度をバイオマーカーとして新たな診断・治療法の開発が期待されたが、病態との関連性を検討するためには、血中での半減期を算出する必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、犬の脊髄損傷症例における血中 pNF-H 濃度変化の詳細を明らかにするとともに、血中における pNF-H 濃度の半減期を算出し、血中濃度変化の意義を検討し、治療効果や治療方針の決定において、血中 pNF-H 濃度を指標とした、新たな診断・治療法を開発することである。

3. 研究の方法

これまで、胸腰部椎間板ヘルニアによる脊髄損傷症例から得たサンプルにおいて、高濃度帯では検出上限を超えていたため、希釈サンプルを用いて再度測定を行い、高濃度帯での血中濃度変化の詳細を明らかにした。また、急性期の pNF-H 血中濃度変化においては、予後との相関が低いことが課題にあったため、当初の研究計画に加えて、新たにグリア線維性産生タンパク (GFAP) をバイオマーカー候補として加え、GFAP についても血中濃度変化の検討を行った。血中 pNF-H 濃度の半減期は、健常犬2頭の坐骨神経を部分的に採取し、抽出したタンパクを再度血中に戻したのち、経時的に採決を行い、pNF-H 濃度を測定して算出した。また、血中濃度半減期については、ラット脊髄損傷モデルを用いて検討を行った。さらに、脊髄損傷後、リハビリテーションを行った症例における血中濃度変化を評価し、リハビリテーションの安全性評価に利用できるかを検討した。さらに、pNF-H 測定を日常的な臨床に取り組みため、独自に ELISA による犬 pNF-H 測定系の開発を行った。

4. 研究成果

犬胸腰部脊髄損傷症例から経時的に採血を行い得られたサンプルで、検出限界を超えていたサンプルについて、ELISA により希釈サンプルでの pNF-H を再度定量した結果、予後不良症例においては顕著な血中濃度上昇がみとめられた。また、pNF-H の血中濃度は、予後や症状の Grade に関係なく、発症後約1週間で上昇することが明らかとなり、高い血中濃度が保たれた症例は予後不良である傾向がみられた。また、血中濃度が 200 ng/ml 以上を認めた症例は予後不良であり、カットオフ値として利用できる可能性が考えられた (図1)。

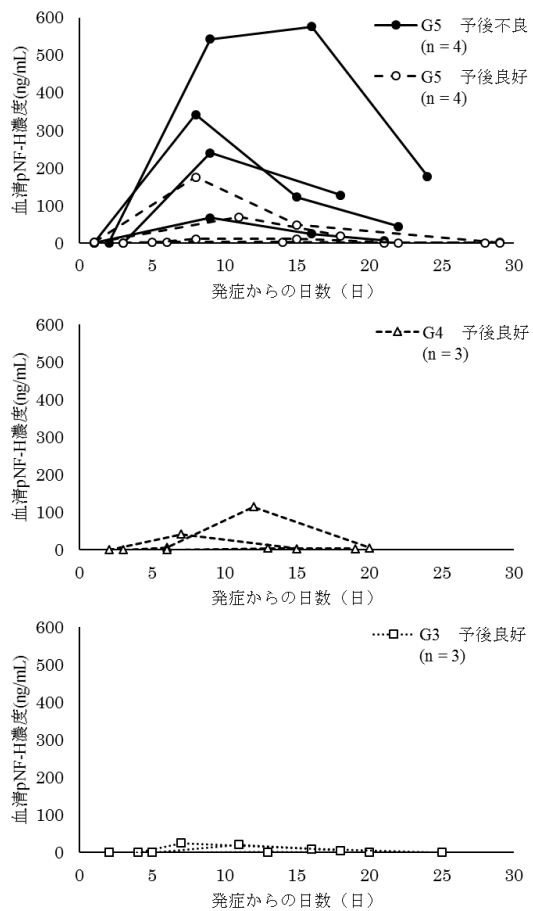


図1：発症からの日数と血清 pNF-H 濃度の経時変化を症状の Grade 別で示す。全症例で発症から1-2週間後に濃度上昇がみられ、200 ng/ml 以上の顕著な濃度上昇がみられた症例はすべて Grade5 で予後不良であり、発症から2週間後以降も高濃度に維持されていた。

一方、同一サンプルにおいて GFAP を測定したところ、pNF-H と異なり、GFAP は発症後急性期のサンプルのみで検出され、検出された症例はすべて予後不良であった (図2,3)。したがって、急性期において、GFAP は予後不良を示唆するバイオマーカーとして利用できると考えられた。過去に、GFAP の検出は胸腰部脊髄損傷後の進行性脊髄軟化症に陥る症例の判別に有用とされているが、本研究では、検出されたいずれの症例も進行性脊髄軟

化症の併発はみられなかった。

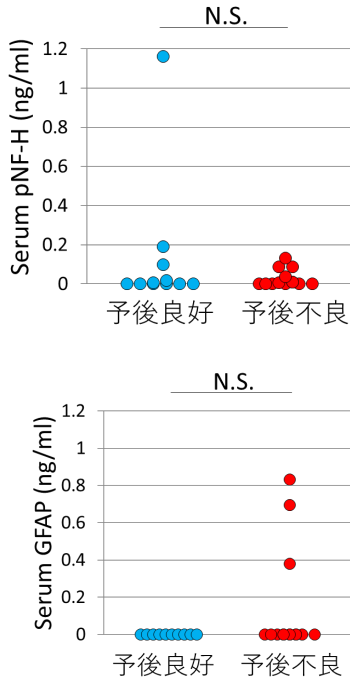


図 2：犬脊髄損傷症例の急性期における血中 pNF-H および GFAP 濃度の比較
いずれの指標も予後の両不良で有意差は認められなかったが、GFAP は予後不良症例のみで検出された。

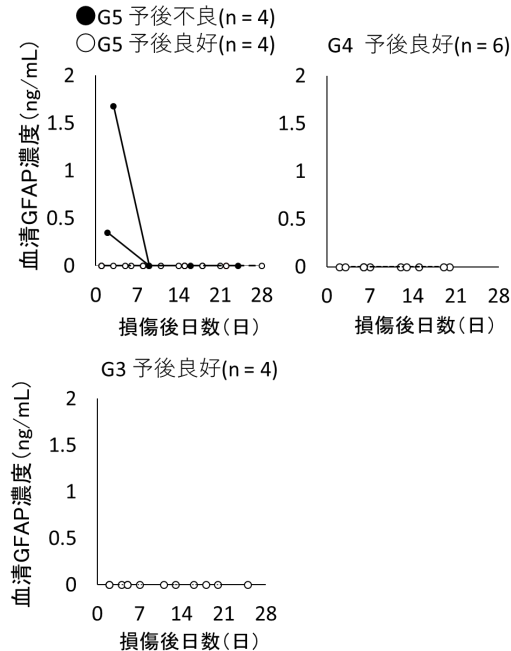


図 3：血中 GFAP 濃度の経時的変化
血中 GFAP は予後不良症例の急性期でのみ検出可能であった。

さらに、胸腰部椎間板ヘルニアの他、頸部椎間板ヘルニア症例についても、経時的な採決を行い、血中 pNF-H 濃度を測定した。頸部椎間板ヘルニアでは、胸腰部と比較し、pNF-H 血中濃度の上昇は軽度である症例が多く、頸

部脊髄損傷後の機能回復評価での予後判定因子としての有用性は不明であったが、発症後 1 か月を経過したのちも血中濃度が軽度上昇する例も見られ、血中 pNF-H 濃度変化は、発症部位毎に異なる理解が必要であると考えられた (図 4)。しかし、血中濃度上昇が、頸部椎体の不安定性や、神経学的症状の悪化を示唆しているかは不明であり、今後の検討が必要である。

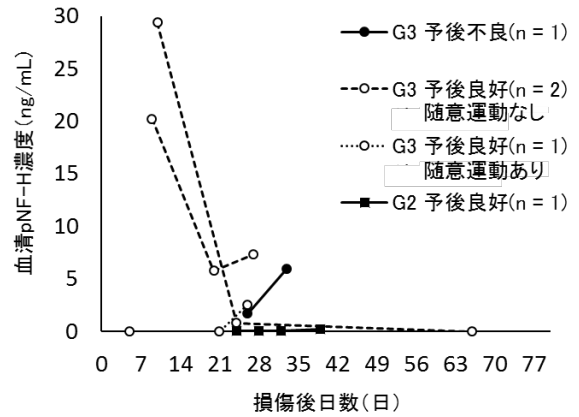


図 4：頸部椎間板ヘルニア症例における血中 pNF-H 濃度の変化
胸腰部と同様に、発症後 1-2 週で血中濃度がピークを示したが、予後との相関は明らでなかった。

次に、犬の坐骨神経を 10 mm 部分切除したのち、血中 pNF-H が検出されないと予想される、4 か月後に抽出したタンパク (pNF-H として約 0.025 μ g 含有) を、自己の血中に投与し、投与後、0, 5, 15, 30 分後および 1, 2, 4, 8, 16 時間後に採血を行って、血中 pNF-H 濃度の変化から 消失半減期を算出した結果、190 分と予想より短く (図 5)、脊髄損傷症例において血中濃度が維持、あるいは上昇することは、中枢からの抹消への経時的な漏出を示唆すると考えられた。

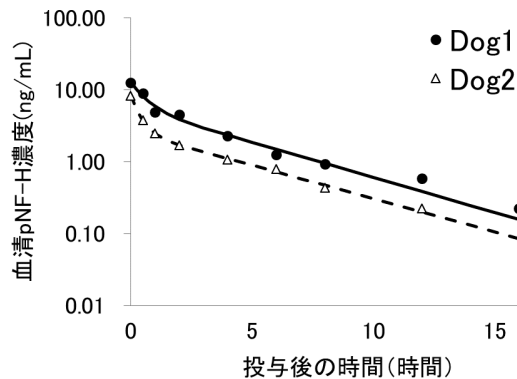


図 5：健常ビーグル犬における血中 pNF-H 濃度変化
血中 pNF-H の消失半減期は約 190 分と算出された。

したがって、術後管理やリハビリテーションにおいても、経時的に pNF-H を測定するこ

とで、再発や合併症の有無を判断しうる材料となることが期待できた。

実際に、脊髄損傷に対して外科手術後に積極的リハビリテーションを行った5症例に対し、経時的にpNF-Hを測定したが、リハビリテーション期間中に血中pNF-Hの上昇あるいは検出をみとめた症例は存在しなかった。

以上のことから、本研究により、犬の脊髄損傷に対するバイオマーカーとして、急性期はGFAP、亜急性期から慢性期にかけての時期はpNF-Hを定量することで、予後予測や脊髄損傷の程度をモニタリングできると考えられた。

そこで、さらに犬のNF-Hに対する特異的ペプチド抗体をウサギおよびニワトリで作製し、ポリクローナルウサギおよびニワトリ抗犬NF-H抗体を作製した。免疫組織学的検討から、これらの抗体は、犬のNF-Hを認識可能であり(図6)、現在、ELISA測定系に関する条件検討を行っており、今後、早期の臨床導入を目指す。

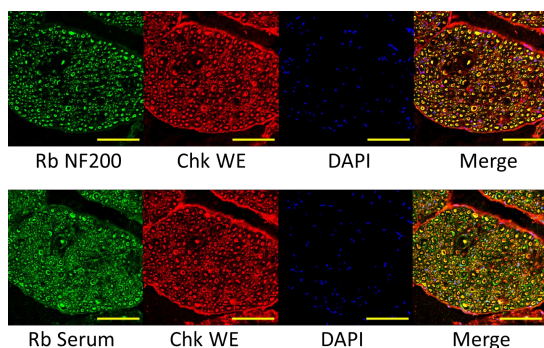


図6：ポリクローナルウサギ(Rb Serum)およびニワトリ抗犬NF-Hペプチド抗体(Chk WE)による、犬の背根の染色像

市販のウサギ抗pNF-H抗体(Rb NF200)と比較し、感度・特異度ともに良好な抗体の作製が可能であった

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

1. 「犬の胸腰部椎間板ヘルニア症例におけるリン酸化ニューロフィラメント重鎖およびグリア線維性タンパクの血中濃度変化と診断的意義」藤田直己、藤原玲奈、三ヶ島史人、西田英高、早川健太郎、飯塚智也、田中宏、中山正成、諸角元二、本阿彌宗紀、望月学、緒方徹、西村亮平、獣医神経病学会、2016年7月、奈良
2. “Assessment of serum phosphorylated neurofilament subunit NF-H and glial fibrillary acidic protein as biomarkers for evaluating the severity of spinal cord injury after thoracolumbar intervertebral

disc herniation in dogs” Fujita N, Fujiwara R, Mikashima F, Ryu YJ, Onishi Y, Yamazoe H, Morozumi M, Nishida H, Tanaka H, Nakayama M, Hayakawa K, Ogata T, Nishimura R. American College of Veterinary Surgeons Surgery Summit. Oct 2015. Nashville, TN, USA.

3. “In vivo kinetics of phosphorylated neurofilaments heavy chain in dogs and clinical implication” Fujita N, Mikashima F, Iizuka T, Fujiwara R, Ogata T, Nishimura R. Asian Meeting of Veterinary Surgery, Dec. 2014. Osaka

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/geka/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原玲奈 (FUJIWARA, Reina)

東京大学、農学生命科学研究科、特任助教

研究者番号：60456176