

# 神経障害に対する診断・治療薬の創成

横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 生体機能医科学研究室  
竹居 光太郎

## 1. 序論

外傷や炎症などによる中枢神経系における神経障害は、現在、主としてMRIなどの画像診断により判断されており、神経障害性を判断するために有用な診断マーカーは全く存在しない。例えば、自己免疫性脱髄疾患で国の難病に指定されている多発性硬化症 (MS) では、診断マーカーとして、脳脊髄液中のオリゴクローナルバンド、または血清中および髄液中のIgGの量的変化を評価するIgG インデックスを用いるが、共に特異性や病態・病勢との関連性が不明確であるために十分な診断に至らない。ところが、我々が発見した神経回路形成に寄与する機能分子Lateral olfactory tract usher substance (LOTUS)は、脳梗塞やMS患者の脳脊髄液中で病勢に応じた顕著な変動が認められた。そこで、本研究は、LOTUSの発現変動を指標とした中枢神経系の神経障害診断薬の開発を目指し、外傷性または炎症性神経障害の診断・病勢を評価する新規バイオマーカーとしてのLOTUSの有用性を検討することを目的とする。

## 2. 方法

6%ゲルを用いた SDS-PAGE と抗 LOTUS 抗体によるウエスタンブロッティング法により、ヒトの脳脊髄液から LOTUS タンパク質を検出・同定した。ウエスタンブロッティング法によって見いだされた抗 LOTUS 抗体陽性のバンドが LOTUS であることを確認するため、SDS-PAGE 後に CBB 染色し、当該バンドを採取して質量分析計にかけて解析した。

次に、分子生物学的手法を用いて培養細胞より精製した LOTUS の濃度を定量測定し、適当な濃度に希釈した検量線用サンプルを 4 種準備した。脳脊髄液検体を用いて SDS-PAGE を行う際、希釈した 4 種の検量線用サンプルも同一ゲル上に流してウエスタンブロッティングを行った。出現した抗 LOTUS 抗体陽性バンドの反応強度をイメージアナライザーで測定し、希釈した 4 種のサンプルの濃度と測定した反応強度より作成した検量線より当該バンドの LOTUS 濃度を算出した。

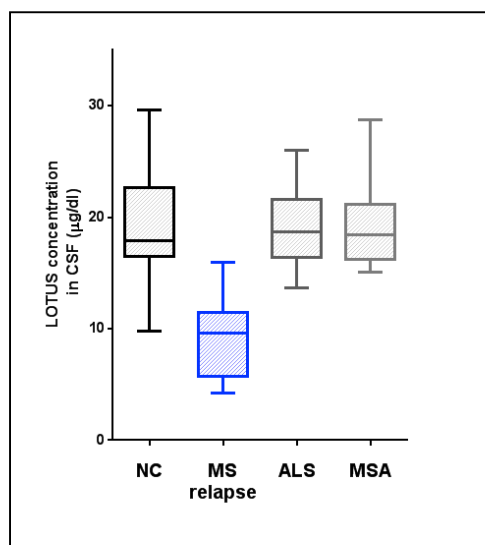
## 3. 結果

ウエスタンブロッティング法と質量分析法を用いてヒトの脳脊髄液から LOTUS を検出・同定に成功した。そして、上記の検量線を作成して脳脊髄液中の LOTUS 濃度を測定する方法を確立し、健常人 (normal control: NC)、多発性硬化症 (MS)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、多系統萎縮症 (MSA) の患者の脳脊髄液検体で LOTUS 濃度を比較した結果、多発性硬化症の患者では LOTUS 濃度が著明に低下していることが判明した (図 1)。多発性硬化症の多くは再発と寛解を繰り返す再発寛解型であり、さらに病

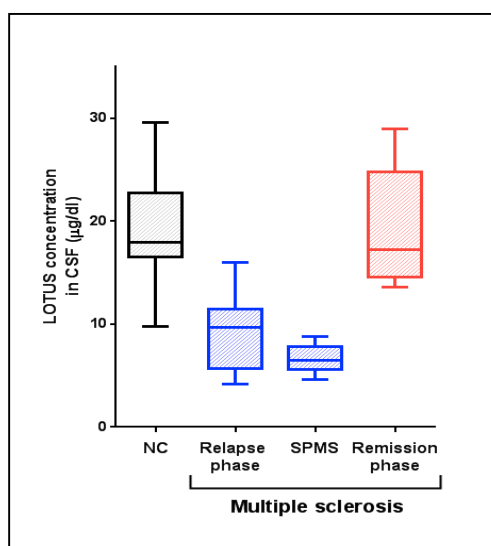
状が進むと緩徐に神経障害が進行する二次進行型の病型に移行することが知られているので、多発性硬化症の患者を再発期(relapse)、寛解期(remission)、二次進行期(SPMS)の3つの病期に分けて LOTUS 濃度の解析を行ったところ、再発期には LOTUS 濃度は著明に低下していたが、寛解期では健常人と同程度まで改善していることが明らかとなった。更に、二次進行期では明らかな再発がなくとも LOTUS 濃度の低下が認められた(図2)。一方で、LOTUS 濃度が減少した検体の中には既存の診断マーカーが陰性である症例も多数含まれたり、MRI 検査では検出されない再発が LOTUS 濃度の測定で検出可能であったりすることが示された。

以上の結果より、LOTUS 濃度が多発性硬化症の病勢に一致して変動することが示された。

(図 1)



(図 2)



#### 4. 考察と展望

本研究によって多発性硬化症の病勢に伴い LOTUS 濃度が変動することが明らかにされた。LOTUS 濃度が減少した検体の中に既存の診断マーカーが陰性である症例があったり、MRI 検査では検出されない再発が LOTUS 濃度の測定で検出可能であったりしたことから、LOTUS 濃度の脳脊髄液中での変化は、既存のマーカーを越えたバイオマーカーである上、MRI で検出できない症例を見いだす高感度のバイオマーカーであると考えられる。今後、多発性硬化症の再発や神経障害の進行を早期に診断できるバイオマーカー(診断薬)として臨床応用され、早期治療や新たな治療戦略の発展につながることを期待される。現在、ウェスタンブロッティング法ではなく、2種の抗 LOTUS 抗体によるサンドイッチ法による ELISA キットを開発中で、それによって 400-600 検体を用いた検証実験を計画している。それによって薬事申請を計画している。

また、LOTUS は、中枢神経系の再生を阻む中心分子である Nogo 受容体に対する強力な拮抗作用を有することから (Sato et al., 2011, Kurihara et al., 2012, 2014)、本研究結果は Nogo 受容体が病態に関連する多発性硬化症の病態解明へ繋がることを期待される。他方、二次進行型 (SPMS) における Nogo 受容体の作用による神経再生阻害は病態進行に深く関与すると考えられ、LOTUS が治療薬として奏功する可能性も期待される。

## 5. 発表論文、参考文献、等

### 発表論文

Takahashi, K., Kurihara, Y., Suzuki, Y., Goshima, Y., Tanaka, F., and Takei, K. Association of cerebrospinal fluid levels of lateral olfactory usher substance protein with disease activity in multiple sclerosis. *JAMA Neurology*, 72(2): 176-179 (DOI: 10.1001/jamaneurol.) (2015).

### 参考論文

- 1) Kurihara, Y., Iketani, M., Ito, H., Nishiyama, K., Sakakibara, Y., Goshima, and Y. Takei, K. LOTUS suppresses axon growth inhibition by blocking interaction between Nogo receptor-1 and all four types of its ligand. *Molecular Cellular Neuroscience*, 61 : 211- 218 (2014).
- 2) Kurihara, Y., Arie, Y., Iketani, M., Ito, H., Nishiyama, K., Sato, Y., Nakamura, F., Mizuki, N., Goshima, Y., and Takei, K. The carboxyl-terminal region of Crtac1b/LOTUS acts as a functional domain in endogenous antagonism to Nogo receptor-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418 : 390-395 (2012).
- 3) Sato, Y., Iketani, M., Kurihara, Y., Yamaguchi, M., Yamashita, N., Nakamura, F., Arie, Y., Kawasaki, T., Hirata, T., Abe, T., Kiyonari, H., Strittmatter, S.M., Goshima, Y., and Takei, K. Cartilage acidic protein-1B (LOTUS), an endogenous Nogo receptor antagonist for axon tract formation. *Science*, 333 : 769-773 (2011).

### 利益相反

本研究内容に関連し、報告者が開示すべき利益相反関係にある企業としては、コスミックコーポレーション（株）が挙げられる。