

# セマフォリンを標的とした多発性硬化症治療と診断キットの開発

研究期間 平成18年度～平成22年度(予定)

研究体制

総括 熊ノ郷 淳[大阪大学]

※平成21年度における研究体制

## 多発性硬化症の診断と治療に大きく前進

Project  
KeyWord  
キーワード

多発性硬化症

中枢神経系の代表的な炎症性脱髄疾患である。自己免疫の関与が考えられているが、現在まで特異的な血清診断マーカーや根本的治療法は存在しない。若年期に発症し、長期にわたって再燃・寛解を繰り返しながら増悪する。

セマフォリン

神経回路の形成に関与する神経ガイダンス因子として同定されてきた分子群である。研究代表者らの研究により免疫系における役割が明らかとなり、免疫活性を有するセマフォリンは現在「免疫セマフォリン」の名称で呼ばれている。

ヘルパーT細胞

免疫系の司令塔ともいべきCD4陽性のT細胞。サイトカインの産生能の違いからTh1とTh2の二つのサブセットに分類されてきたが、最近Th17と呼ばれる新たなサブセットも見つかり、種々の免疫疾患への関与が指摘されている。

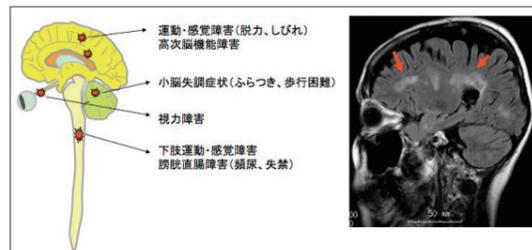
### 1 研究の背景・意義

#### 多発性硬化症の克服に向けて

多発性硬化症は中枢神経系の代表的な炎症性脱髄疾患として知られ、20代から40代に発症した後、長期に渡って再発・寛解を繰り返しながら増悪する厚生労働省特定疾患に指定される難病である。欧米で発症頻度が高く(10万人中30-100人)、わが国では頻度が比較的低い(10万人中7-10人)とされてきたが(注:統計により値は異なる)、近年増加傾向にあることが指摘されている。また働き盛りの世代に発症することから、社会的にも大きな問題となっている。

病因としては自己免疫機序、とりわけ免疫系の指令塔役であるヘルパーT細胞の異常が関与していると考えられているが、その詳細な病因は未だ不明な点が多い。診断としては、現在髄液検査でIgG indexやオリゴクローナルバンドなどが補助診断として用いられているが、髄液の採取という侵襲性から疾患特異的な臨床上有用な診断マーカーが必要とされている。治療としては、予防的治療としてインターフェロンの自己注射なども行われているが、現在までのところ根本的治療法は存在していない。

従って、臨床上有用な診断マーカーと根本的な治療法の開発が急がれている。



▲脱髄病変が大脳、小脳、脳幹、脊髄、視神経といった中枢神経系に多発し、病変部位によって図に示したような症状が出現する。

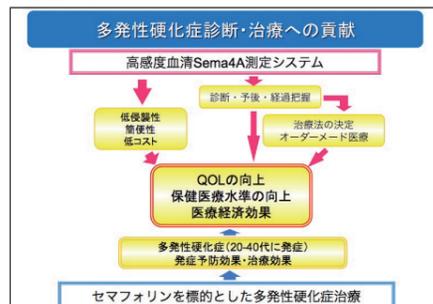
### 2 研究プロジェクトの目標

#### セマフォリンによる多発性硬化症診断・治療

本研究でターゲットとなるセマフォリン分子群は1990年代の初頭から発生過程での神経ガイダンス因子として知られてきたが、研究代表者である熊ノ郷らの研究により生体内で起こる免疫反応の様々な局面で重要な役割を果たすことが明らかにされている。現在、免疫活性を有するセマフォリンは「免疫セマフォリン:immune semaphorin」の名称でも呼ばれ、わが国発の免疫調節分子の新しいパラダイムとして、また疾患治療の創薬ターゲットとしても大きな注目を集めている。

研究代表者は多発性硬化症の患者血清でセマフォリンが高値を呈する例が存在すること、また多発性硬化症動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(通称EAE)において、セマフォリンを阻害することで発症を抑制できるとの知見を得ていた。

これらの知見に基づき、本研究では、多発性硬化症の診断および治療法を確立するため、セマフォリン分子群を標的に、1)血清セマフォリン測定システムの開発とそれを用いた多発性硬化症診断法の開発、2)セマフォリンを標的とした多発性硬化症治療法の開発を目指している。



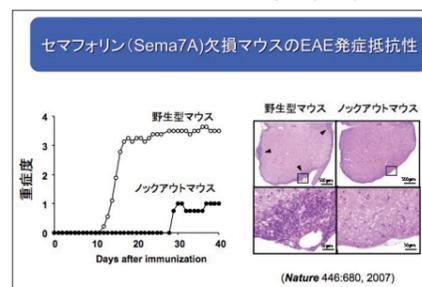
▲セマフォリン測定法及びセマフォリンを標的にした多発性硬化症診断・治療法の開発により保健医療への貢献を目指す。

### 3 研究プロジェクトの成果

#### 多発性硬化症発症へのセマフォリンの関与

セマフォリン分子群の中でクラス7型に分類されるSema7AはGPIアンカー型の膜タンパクである。細胞外領域にインテグリンと相互作用することで知られるRGDモチーフを有している。Sema7Aのリコンビナントタンパクをヒトの単球やマクロファージに添加すると、これらの細胞からの炎症性サイトカイン産生が強く誘導された。またSema7Aの活性はVLA-1と呼ばれるインテグリン分子によって担われていることも明らかになった。

Sema7A遺伝子欠損マウスを用いて、多発性硬化症動物モデルEAEで発症実験を行うと、図に示すようにSema7A遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べて著明な発症抑制を示した。中枢神経由来ペプチド特異的T細胞の移入実験を行うと、野生型マウス由来のT細胞は強い麻痺をレシピエントマウスに発症させたが、Sema7A欠損T細胞はレシピエントのマウスにそのような麻痺を誘発することが出来なかった。このことは、Sema7Aが多発性硬化症発症において臨床的重要な炎症相に関与していること、またSema7Aを阻害することで治療に繋がることを示唆している。



▲臨床重要となる多発性硬化症の炎症相に関するセマフォリンを新たに発見した。

#### 血清中セマフォリン測定システムの開発

セマフォリン測定システムを構築するにあたっては、セマフォリンを特異的に認識する抗体の樹立が重要である。しかしながら、セマフォリンは種間のアミノ酸レベルの相同性が極めて高く、異種の動物に免疫する通常の免疫方法では、セマフォリンタンパクを抗原として免疫しても異物と認識されず、特異的な抗体を樹立するのが非常に困難であることが知られていた。

そこで本研究では研究代表者が樹立したセマフォリンを欠損したセマフォリン遺伝子欠損マウスを免疫動物に用いることにより、特異性が高く、かつ反応性の高い複数のモノクローナル抗体産生ハイブリドーム株の樹立に成功した。

本研究で樹立した抗体のセマフォリン認識部位を検討した後、異なる部位を認識する抗体を組み合わせることにより、サンドウィッチELISAシステムを構築した。さらに一次抗体の固相化、二次抗体のPOD化、また標準物質の凍結乾燥により、写真のようなセマフォリン測定システムの試作品を作成した。セマフォリンが発見されて今年で約20年近く経つが、これは世界最初のセマフォリン測定システムである。現在このシステムを用いて多発性硬化症患者血清中のセマフォリンを測定している。

本研究によりキット化されたセマフォリン測定システム(世界初のセマフォリン測定キット)



▶本研究により開発された血清中セマフォリン測定システム

### 4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

#### 多発性硬化症診断法の実用化に向けて

前述のようにセマフォリンを特異的に認識する抗体の樹立は困難が予想されたが、本研究により特異性及び反応性に優れたクローンを複数樹立することができた。また異なる認識部位を有する抗体を組み合わせることで、セマフォリン測定システムも構築できた。今後、試作品作成セマフォリン測定キットの標準物質として用いるリコンビナントセマフォリン蛋白の凍結乾燥品について、乾燥後溶解液に融解しても測定可能かどうかを再確認する。また凍結融解により測定値の変動、凍結時の保存条件、保存期間の検討も行い、血清セマフォリン測定キットを完成させる。

セマフォリンの疾患特異性を検証するために、多発性硬化症患者、コントロール群として他の神経疾患患者および健康者ボランティアの協力を得て検体数を増やす。それと平行してある病型の多発性硬化症特異的にセマフォリンが高値を示すという可能性を検討するために、臨床経過による病型分類(再発寛解型、二次進行型、一次進行型)、病変分布による病型分類(通常型、視神経脊髄型)、MRI画像上の特徴、HLA型、血清・髄液検査におけるオリゴクローナルバンド、IgG index、過去2年間の再発率、採血時期と直近の再燃時期との時間差、重症度(EDSSスコア)、Th1/Th2/Th17サイトカイン/ケモカイン等のパラメーターとの相関を調べる。

各症例の詳細なデータベース化を行うとともに、統計学的解析を行い、疾患感受性・疾患特異性及び疾患活動性と血清中のセマフォリンとの相関について最終的な結論を得る。

またセマフォリンの多発性硬化症病態における病的意義については、セマフォリン高値を呈する多発性硬化症症例の末梢血リンパ球のセマフォリンの発現をFACSで検討し、血清中のセマフォリンのソースを同定する。

また写真とは示していないが、すでにEAEの系でセマフォリン阻害抗体投与実験を行い発症抑制効果を確認している。今後最良クローンについては、可変領域をハイブリドームよりクローニングしヒト型抗体の作成を行う。

#### 多発性硬化症臨床症例管理ソフトの開発



▲本研究で開発された多発性硬化症症例管理ソフト。このシステムを用いて多数のデータを管理しつつ統計学的な解析を行う。

#### 参考文献

Suzuki K. et al. Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. Nat Immunol. 9:17-23, 2008.  
Suzuki K. et al. Semaphorin 7A initiates T cell-mediated inflammatory responses through  $\alpha 1 \beta 1$  integrin. Nature 446:680-684, 2007.  
Takegahara N. et al. Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. Nat Cell Biol. 8, 615-622, 2006.