

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

軸索傷害型ギラン・バレー症候群の抗神経毒素療法

の開発に関する研究

平成 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 吉良 潤一

平成 19 年 (2007) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
軸索傷害型ギラン・バレー症候群の抗神経毒素療法の開発に関する研究	----- 1
吉良潤一	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 11
III. 研究成果の刊行物・別冊	----- 13

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書
軸索傷害型ギラン・バレー症候群の抗神経毒素療法の開発に関する研究

主任研究者 吉良 潤一 九州大学医学研究院・神経内科・教授

研究要旨

ギラン・バレー症候群 (GBS) は末梢神経を侵す脱髄性疾患であるが、我が国では *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) 感染後に起こる軸索傷害型 GBS の比率が高く、重篤な後遺症を残す例もある。近年、私どもの研究グループでは、*C. jejuni* より産生されるストレス蛋白の一つである DNA-binding protein from starved cells (C-Dps 蛋白) を初めてクローニングした。本研究では GBS 病態に対する C-Dps 蛋白の関与・意義を検討することを第一の目的としている。これまでの検討では、1) 本蛋白に対する抗体は、*C. jejuni* 感染後 GBS 患者においては 62.5% の陽性率で認められるが、呼吸器感染後 GBS 患者や他の炎症性神経疾患では認められず、また、*C. jejuni* 腸炎患者においては約 10% の陽性率であり、*C. jejuni* 感染後 GBS で有意に陽性率が高い。2) C-Dps 蛋白はラット神経系に対し、中枢神経系では神経細胞の胞体、末梢神経では髄鞘に結合する。3) C-Dps 蛋白は各種糖蛋白の中では sulfatide と結合する。4) NGF によりニューロンに分化誘導した PC12 細胞株に対し、膜傷害を誘導するが、シュワン細胞株である S16 に対しては細胞傷害活性を持たない。5) C-Dps 蛋白をラット坐骨神経に注入することにより、伝導ブロックが誘導される。6) C-Dps 蛋白注入坐骨神経においては、C-Dps 蛋白はミエリン鞘の最外層、並びにランビエ絞輪部に沈着し、ランビエ絞輪部における Na チャネルの発現の低下を誘導する。これらの結果は、C-Dps 蛋白が sulfatide を介して神経細胞に結合し、直接的に神経細胞を傷害しうることを示しており、*C. jejuni* 感染後 GBS の病態への C-Dps 蛋白の関与が示唆された。

本年度は、C-Dps 蛋白の神経内注入による形態的変化の検討、並びに C-Dps 蛋白を様々な経路から投与し、その効果を検討した。C-Dps 蛋白注入による形態変化の検討では、軸索変性や paranodal demyelination などの変化を認め、これらの変化は電顕でも確認された。C-Dps 蛋白を経静脈的、あるいは経動脈的に投与した場合、坐骨神経や馬尾神経への明らかな C-Dps 蛋白の沈着は認められなかったが、ラット髄腔内投与を行った場合、馬尾神経の髄鞘の最外層、並びにランビエ絞輪部への C-Dps 蛋白の沈着が認められた。通常ランビエ絞輪部に高密度に発現する Na チャネルは、C-Dps 蛋白によりその染色性が低下し、局在変化が認められた。このような変化は末梢神経に伝導障害を誘導するため、軸索傷害型 GBS では C-Dps 蛋白による軸索傷害機序が関与する可能性が示唆される。今回、血管内への C-Dps 蛋白の投与では末梢神経への特異的な沈着は認められなかったが、今後 C-Dps 蛋白の血中での形態や動態を検討し、軸索傷害型 GBS の動物モデルを作製し、末梢神経障害メカニズムの解明を行っていく。

分担研究者

鍋倉淳一 岡崎国立共同研究機構生理学研究所・発達生理学研究系・生体恒常機能発達機構部門・教授

水之江義充 九州大学大学院医学研究院・細菌学・助教授

平田和穂 九州大学大学院医学研究院・形態解析学・講師

三野原元澄 九州大学病院・神経内科学・共同研究員

A. 研究目的

近年、我々の研究グループでは *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) の産生する DNA-binding protein from starved cells (C-Dps 蛋白) を初めてクローニングした。Dps 蛋白は、大腸菌などの微生物の産生するストレス蛋白の一つであり、微生物が酸化的ストレスや飢餓ストレスに曝された時に多量に産生される。

ギラン・バレー症候群 (GBS) は末梢神経の脱髄性疾患では最も頻度の高い神経難病である。なかでも、我が国や中国では *C. jejuni* 感染後に起こる軸索傷害型 GBS の頻度が高く、重篤な後遺症を残すことが知られている。本症の軸索傷害は、*C. jejuni* の lipopolysaccharide (LPS) との交差反応性により抗 GM1 抗体が誘導され軸索を傷害するという立場での研究が主流であるが、抗 GM1 抗体は、*C. jejuni* 感染後 GBS 患者全例で認められるわけではなく、また、抗 GM1 抗体は末梢神経障害のない患者でも認められる。また、抗 GM1 抗体は *In vitro* において、伝導ブロックを誘導しないことが報告されている。

これらのことは、*C. jejuni* 感染後 GBS の病態形成が抗 GM1 抗体のみで説明することが不可能であることを示しており、軸索傷害機序には他の因子の関与が考えられる。

我々はこれまでに C-Dps 蛋白と GBS 病態との関連を検討し、以下の結果を報告してきた。1) 本蛋白に対する抗体は、*C. jejuni* 感染後 GBS 患者においては 62.5% の陽性率で認められるが、呼吸器感染後 GBS 患者や他の炎症性神経疾患では認められず、また、*C. jejuni* 腸炎患者においては約 10% の陽性率であり、*C. jejuni* 感染後 GBS で有意に陽性率が高い。2) C-Dps 蛋白はラット神経系に対し、中枢神経系では神経細胞の胞体、末梢神経では髄鞘に結合する。3) C-Dps 蛋白は各種糖蛋白の中では sulfatide と結合する。4) NGF によりニューロンに分化誘導した PC12 細胞株に対し、膜傷害を誘導するが、シュワン細胞株である S16 に対しては細胞傷害活性を持たない。5) C-Dps 蛋白をラット坐骨神経に注入することにより、伝導ブロックが誘導される。6) C-Dps 蛋白注入坐骨神経においては、C-Dps 蛋白はミエリン鞘の最外層、並びにランビエ絞輪部に沈着し、ランビエ絞輪部における Na チャネルの発現の低下を誘導する。これらの結果は、C-Dps 蛋白が sulfatide を介して神経細胞に結合し、直接的に神経細胞を傷害しうることを示しており、*C. jejuni* 感染後 GBS の病態への C-Dps 蛋白の関与が示唆された。

本年度は、C-Dps 蛋白の神経内注入による形態的变化の検討、並びに C-Dps 蛋白を様々な経路から投与しその効果を検討した。

B. 研究方法

1) C-Dps 蛋白注入による末梢神経の形態変化 :

7~8 週齢のメスの Lewis rat を深麻酔下で台座に固定し、背側より両側の坐骨神経を露出した。坐骨神経へ C-Dps 蛋白を 30 μ l (0.5mg/ml) 注入し、創部を閉じ、4 時間後に 4% グルタルアルデヒド in 0.1% phosphate buffer で灌流固定し坐骨神経を摘出した。コントロールとして同量の PBS または熱処理した (100 度、30 分) C-Dps 蛋白の注入を行った。オスミウム固定後、一部は解きほぐし標本作製、また、一部はエポキシ包埋を行い、顕微鏡用の切片を作製し観察した。

2) C-Dps 蛋白の血管内投与 ;

静脈内投与、動脈内投与を行った。それぞれの投与では、血液神経関門 (BNB; blood-nerve barrier) を開く目的にて、LPS (Lipopolysaccharide; Sigma L6511) の腹腔内投与 (3mg/kg) を行った。静脈内投与の場合、LPS の腹腔内投与後 20 時間で C-Dps 蛋白を尾静脈より注入した (1mg)。コントロールとして同量の BSA の投与を行った。また、permeability の評価のため LPS 腹腔内投与 23 時間後に evans blue-labelled albumin を尾静脈より注入した。それぞれのラットは、LPS 投与後より 24 時間目に 2%PFA により灌流固定を行い坐骨神経、馬尾神経、脊髄、大脳を摘出し、免疫染色を行い評価した。動脈内投与の場合も、LPS 投与後 20 時間で C-Dps の動脈内投与を行った。ラットを深麻酔下で左頸動脈を露出し、遠位側と近位側の 2 カ所を軽く結紮し、

その中間点に切れ目を入れ、中枢側に向けて Intramedic polyethylene Tubing (Becton Dickinson) を挿入しチュービングを行った。C-Dps 蛋白の注入 (1mg) 4 時間後に灌流固定を行い評価した。摘出した各組織より凍結切片を作製、末梢神経に関しては解きほぐし標本作製し免疫染色を行った。摘出した坐骨神経を 2%PFA in PBS で後固定 (4°C、30 分) し、コラゲナーゼ type4 in PBS (1mg/ml、室温、20 分) で処理し、洗浄後解きほぐし標本作製した。一次抗体として抗 C-Dps モノクローナル抗体 (25G)、抗 Na チャンネル抗体 (Sigma) を用いた。二次抗体として Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG antibody、Alexa Fluor 594 anti-rabbit IgG antibody を使用し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

3) C-Dps 蛋白の髄空内投与 ;

髄腔内投与では、浸透圧ポンプ (alzet mini-osmotic pump; model 2002) を用いた。深麻酔下でラットの背部より棘突起を露出し、下部胸椎の高さで棘突起の一部を破壊し Intramedic polyethylene Tubing を髄腔内に尾側に向け挿入した。チューブの反対側には浸透圧ポンプを接続しており、皮下にポンプを固定した。C-Dps 蛋白量は 12 μ g/day の持続投与とし、コントロールとして同量の BSA の投与を行った。髄腔内投与開始から 4 日目に、LPS を腹腔内投与し、更に 24 時間後に 2%PFA にて灌流固定を行い評価した。

(倫理面への配慮)

実験に使用するラットなどの動物は、苦痛の軽減・排除の方法として十分な麻酔をした

うえで処置を行った。この実験は、九州大学医学部動物実験倫理委員会の審査を受け、「九州大学医学部における動物実験に関する指針」、「動物保護及び保管に関する法律」（法律第 105 号）及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」（総理府告示第 6 号）の規制に基づいて行った。

C. 研究結果

1) C-Dps 蛋白注入による末梢神経の形態変化：

C-Dps 蛋白のラット坐骨神経への注入により、ランビエ後輪部の Na チャンネルの染色性が低下することは前年度報告した。本年度はオスミウム固定を行い、解きほぐし標本、光顕、電顕にて評価を行った。解きほぐし標本においては、**C-Dps 蛋白注入坐骨神経**において、軸索変性、並びに **paranodal demyelination** が多く確認された（図 1）。これらの異常所見を持つ神経線維の割合は、**C-Dps 蛋白注入神経**では **6.0%**、コントロール群では **0.7%**と有意差を認めた ($p=0.0457$)。また、エポン包埋切片では、**C-Dps 蛋白注入神経**の約 **83.3%**に軸索変性や **vesiculation** が観察され、コントロール (**20.0%**) に比べ有意に高率であった ($p=0.0350$)（図 2）。さらに電顕においても **paranodal demyelination** が認められた（図 3）。

2) C-Dps 蛋白の血管内投与：

これまでの検討は、ラット坐骨神経内に直接的に C-Dps 蛋白を注入し、その効果を検討してきたが、全身性投与による効果は不明である。今回、神経内注入以外の方法で C-Dps 蛋白の *in vivo* での効果を検討し

た。C-Dps 蛋白の神経系へのアプローチに BNB の破綻は不可欠と考え、LPS の腹腔内投与を行った。実際に LPS を腹腔内に投与後 24 時間では、evans blue の末梢神経への取り込みの上昇が観察された。このため、静脈内投与、並びに動脈内投与では LPS 投与後 24 時間を目指して C-Dps 蛋白の投与を行った。しかしながら、静脈内投与、並びに動脈内投与では、末梢神経や中枢神経に C-Dps 蛋白の明らかな沈着は認められなかった。

3) C-Dps 蛋白の髄腔内投与：

C-Dps 蛋白の髄腔内投与では、凍結切片や解きほぐし標本で共に馬尾神経への C-Dps 蛋白の沈着が認められた。この沈着はラット坐骨神経に C-Dps 蛋白を注入したときと同様に、ミエリンの最外層、並びに nodal gap で認められた。解きほぐし標本によるランビエ絞輪に局在する Na チャンネルの評価では、C-Dps を髄腔内投与したラットの馬尾神経において、C-Dps の沈着部位で Na チャンネルの染色性が低下していた。コントロールの標本においては、Na チャンネルはランビエ絞輪の軸索上に高密度に発現していた。このような変化は、C-Dps 蛋白を坐骨神経に直接的に注入した場合と同様の変化であった。

D. 考察

前年度、私どもは C-Dps 蛋白をラット坐骨神経内に直接注入することにより、ランビエ後輪部での Na チャンネルの集簇の低下、paranode での Caspr の染色性の低下を報告してきた。今年度、さらに詳細に病理学的検

討を行った結果、軸索変性や paranodal demyelination が観察された。Caspr は paranode において、ミエリンループと軸索との接着に関与する。C-Dps 蛋白注入による Na チャンネル、並びに Caspr の染色性の低下は、今回観察された paranodal demyelination を反映しているものと考えられる。C. jejuni 感染後 GBS の末梢神経における Na チャンネルの病理学的評価は過去に報告はないが、電気生理学的検討により Na チャンネル異常が早期変化の一つとして報告されていることから、本蛋白が軸索傷害型 GBS における軸索傷害機序に関与する可能性が考えられる。C-Dps 蛋白は sulfatide と結合しうる。Sulfatide は laminin と結合することで、髄鞘と基底膜との間でアンカーとしての機能も有する。髄鞘と基底膜との相互作用の欠落は、Na チャンネルの発現低下や伝導障害を来すことが報告されており、C-Dps 蛋白が sulfatide を介して形態変化を誘導しているのかもしれない。

さらに今年度は、C-Dps 蛋白の投与経路の検討を行った。静脈内や動脈内への投与では神経系への C-Dps 蛋白の選択的沈着は認められなかったが、一方で髄空内投与を行った場合は、神経内注入と同様に馬尾神経への C-Dps 蛋白の沈着とランビエ後輪部での Na チャンネルの染色性の低下が認められた。今後さらに C-Dps 蛋白の血中での形態や動態を検討し、本蛋白がどのように末梢神経に到達するかを検討し、軸索傷害型 GBS の新規動物モデルの作製を行っていきたい。

E. 結論

C-Dps 蛋白の神経内注入により軸索変性や

paranodal demyelination が誘導される。C-Dps 蛋白の髄腔内投与によりラット馬尾神経のランビエ絞輪部での Na チャンネルの集簇を低下させた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Su J-J, Osoegawa M, Minohara M, Tanaka M, Ishizu T, Mihara F, Taniwaki T, Kira J. Upregulation of vascular growth factors in multiple sclerosis: correlation with MRI findings. J Neurol Sci 243: 21-30, 2006.
- 2) Mei F-J, Osoegawa M, Ochi H, Minohara M, Shi N, Murai H, Ishizu T, Taniwaki T, Kira J. Long-term favorable response to interferon beta-1b is linked to cytokine deviation toward the Th2 and Tc2 sides in Japanese patients with multiple sclerosis. J Nerol Sci 246: 71-77, 2006.
- 3) Yokomine K, Nakatsura T, Minohara M, Kira J, Kubo T, Sasaki Y, Nishimura Y. Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice. Biochem Biophys Res Comm 343:269-278. 2006.
- 4) Ishizu T, Minohara M, Ichiyama T, Kira R, Tanaka M, Osoegawa M, Hara T, Furukawa S, Kira J. CSF cytokine and chemokine profiles in acute

- disseminated encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 175: 52-58, 2006.
- 5) Minohara M, Matsuoka T, Li W, Osoegawa M, Ishizu T, Ohyagi Y, Kira J. Upregulation of myeloperoxidase in patients with opticospinal multiple sclerosis: positive correlation with disease severity. *J Neuroimmunol* 178: 156-160, 2006.
 - 6) Sun X, Minohara M, Kikuchi S, Ishizu T, Tanaka M, Piao H, Osoegawa M, Ohyagi Y, Shimokawa H, Kira J. The selective Rho-kinase inhibitor Fasudil is protective and therapeutic in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 180: 126-134, 2006.
 - 7) Li W, Minohara M, Su JJ, Matsuoka T, Osoegawa M, Ishizu T, Kira J. Helicobacter pylori infection is a potential protective factor against conventional multiple sclerosis in the Japanese population. *J Neuroimmunol* 187: 227-231, 2007.
 - 8) Pineda AAM, Ogata K, Osoegawa M, Murai H, Shigeto H, Tobimatsu S, Kira J. A distinct subgroup of chronic inflammatory demyelinating disease with CNS demyelination and a favorable response to immunotherapy. *J Neurol Sci* 255: 1-6, 2007.
 - 9) Matsuoka T, Matsushita T, Kawano Y, Osoegawa M, Ochi H, Ishizu T, Minohara M, Kikuchi H, Mihara F, Ohyagi Y, Kira J. Heterogeneity of aquaporin-4 autoimmunity and spinal cord lesions in Japanese. *Brain* (in press).
 - 10) Balsalobre C, Silván JM, Berglund S, Mizunoe Y, Uhlin BE, and Wai SN. Release of the type I secreted α -haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 59: 99-112, 2006.
 - 11) Kanamaru S, Kurazono H, Mizunoe Y, Terai A, Monden K, Kumon H, Ogawa O, Yamamoto S. Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis. *Int J Antimicrob Agent Suppl* 1: s21-25, 2006.
 - 12) Sugimoto S, Yoshida H, Mizunoe Y, Tsuruno K, Nakayama J, Sonomoto K. Structural and functional conversion of molecular chaperone ClpB from the gram-positive halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* mediated by ATP and stress. *J Bacteriol* 188: 8070-8078, 2006.
 - 13) Nakamura T, Jeromin A, Smith G, Kurushima H, Koga H, Nakapeppu Y, Wakabayashi S, Nabekura J. Novel role of neuronal Ca²⁺ sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. *J Cell Biol* 172: 1081-1091, 2006.
 - 14) Mizoguchi T, Kitamura A, Wake H, Ishibashi H, Watanabe M, Nishimaki T, Nabekura J. BDNF Occludes GABA_B Receptor-mediated Inhibition of GABA Release in Rat Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *Eur J Neurosci* 24: 35-44, 2006.
 - 15) Wake H, Watanabe M, Moorhouse AJ, Kanematsu T, Horibe S, Matsukawa N, Asai K, Ojika K, Hirata M, Nabekura J. Early Changes In KCC2 Phosphorylation In Response To Neuronal Stress Results In Functional Downregulation. *J Neurosci*

27: 1642-1650, 2007.

- 16) Ishibashi H, Jang LS, Nabekura J. High potassium-induced facilitation of glycine release from presynaptic terminals on mechanically dissociated rat spinal dorsal horn neurons in the absence of extracellular calcium. *Neurosci* (in press).
- 17) Tan H, He J, Wang S, Hirata K, Yang Z, Kuraoka A, Kawabuchi M. Age-related NADPH-diaphorase positive bodies in the lumbosacral spinal cord of aged rats. *Arch Histol Cytol* 69: 297-310, 2006.

2. 学会発表

- 1) 朴華、三野原元澄、石津尚明、小副川学、村井弘之、水之江義充、吉良潤一；*Campylobacter jejuni* 由来 Dps 蛋白による Na チャネルの障害：第 18 回 日本神経免疫学会・学術集会（名古屋）2006, 3 月
- 2) 三野原元澄、李巍、松岡健、石津尚明、小副川学、村井弘之、吉良潤一；日本人多発性硬化症における血清 myeloperoxidase 値の上昇：第 18 回 日本神経免疫学会・学術集会（名古屋）2006, 3 月
- 3) 孫曉嘉、三野原元澄、菊池仁志、田中正人、石津尚明、下川宏明、吉良潤一；Rho kinase 阻害剤による実験的自己免疫性脳脊髄炎の再発抑制：第 18 回 日本神経免疫学会・学術集会（名古屋）2006, 3 月
- 4) Arnold Pineda、三野原元澄、孫曉嘉、石津尚明、下川宏明、吉良潤一；実験的自己免疫性神経炎に対する Rho kinase inhibitor の作用：第 18 回 日本神経免疫学会・学術集会（名古屋）2006, 3 月
- 5) 三野原元澄、孫曉嘉、石津尚明、吉良潤一；実験的自己免疫性脳脊髄炎の Rho-kinase 阻害薬による治療効果の病理学的検討：第 47 回 日本神経学会総会（名古屋）2006. 5 月
- 6) 李巍、三野原元澄、松岡健、小副川学、吉良潤一；日本人多発性硬化症における血清 myeloperoxidase (MPO) 上昇の意義：第 47 回 日本神経学会総会（名古屋）2006. 5 月
- 7) Pineda Arnold、三野原元澄、石津尚明、吉良潤一；実験的自己免疫性神経炎における、Rho-kinase 阻害薬の治療的効果の検討：第 47 回 日本神経学会総会（名古屋）2006. 5 月
- 8) 朴華、三野原元澄、水之江義充、吉良潤一；*Campylobacter jejuni* 由来 Dps 蛋白末梢神経内注入による Na チャネル発現の低下：第 47 回 日本神経学会総会（名古屋）2006. 5 月
- 9) 河野祐治、小副川学、李巍、三野原元澄、吉良潤一；日本人多発性硬化症における抗アクアポリン 4 抗体の意義：第 47 回 日本神経学会総会（名古屋）2006. 5 月
- 10) Nishimaki T, Jang IS, Nabekura J；外側上オリーブ核に入力する抑制性シナプス前終末における代謝型グルタミン酸受容体の発達変化：第 83 回 日本生理学会大会（前橋）2006. 3 月
- 11) Nishimaki T, Jang IS, Nabekura J；Developmental decrease of presynaptic GABAB receptor function in rat LSO neurons：第 29 回 日本神経科会（京都）2006. 7 月

- 12) 水之江義充; バイオフィルム形成と阻害: 第 79 回日本細菌学会総会 (金沢) 2006. 3 月
- 13) Hirata K, Kanemaru T, Minohara M, Kira J. Expression of nestin in glial cells of the rat olfactory system after olfactory epithelium lesion. : 第 29 回 日本神経科会 (京都) 2006. 7 月
- 14) Minohara M, Piao H, Mizunoe Y, Osoegawa M, Murai H, Kira J; Effect of Dps from *Campylobacter jejuni* on nerve conduction and nodal sodium channel in vivo. 8th International Conference of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006, October
- 15) Pineda A, Minohara M, Sun X, Ishizu T, Shimokawa H, Kira J; The effect of rho-kinase inhibitor fasudil in experimental autoimmune neuritis. 8th International Conference of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006, October
- 16) Li W, Minohara M, Matsuoka T, Osoegawa M, Murai H, Kira J; Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Japanese patients with multiple sclerosis. 8th International Conference of Neuroimmunology (Nagoya, Japan) 2006, October
- 17) Nishimaki T, Jang IS, Ohno K, Nabekura J; Physiological Role of GABAB Receptor at Inhibitory synapses in Developing Rat LSO neurons. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting (Atlanta, USA) 2006, October
- 18) Wake H, Watanabe W, Nabekura J; Early Changes In KCC2 Phosphorylation In Response To Neuronal Stress Results In Functional Downregulation. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting (Atlanta, USA) 2006, October
- 19) Tan H, He J, Wang S, Hirata K, Kuraoka A, Yang Z, Kawabuchi M; Age-related spheroidal structures visualized by NADPH-diaphorase in the central nervous system of the aged rats. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting (Atlanta, USA) 2006, October
- 20) 石川秀人、高屋明子、水之江義充、高出明美、磯貝恵美子、吉田真一、山本友子; サルモネラの OMV による病原性発現調節: 第 80 回 日本細菌学会総会 (大阪) 2007. 3 月
- 21) 北川良、高屋明子、水之江義充、高出明美、磯貝恵美子、吉田真一、山本友子; 腸管出血性大腸菌毒素の分泌調節における AAA+protease の関与: 第 80 回 日本細菌学会総会 (大阪) 2007. 3 月

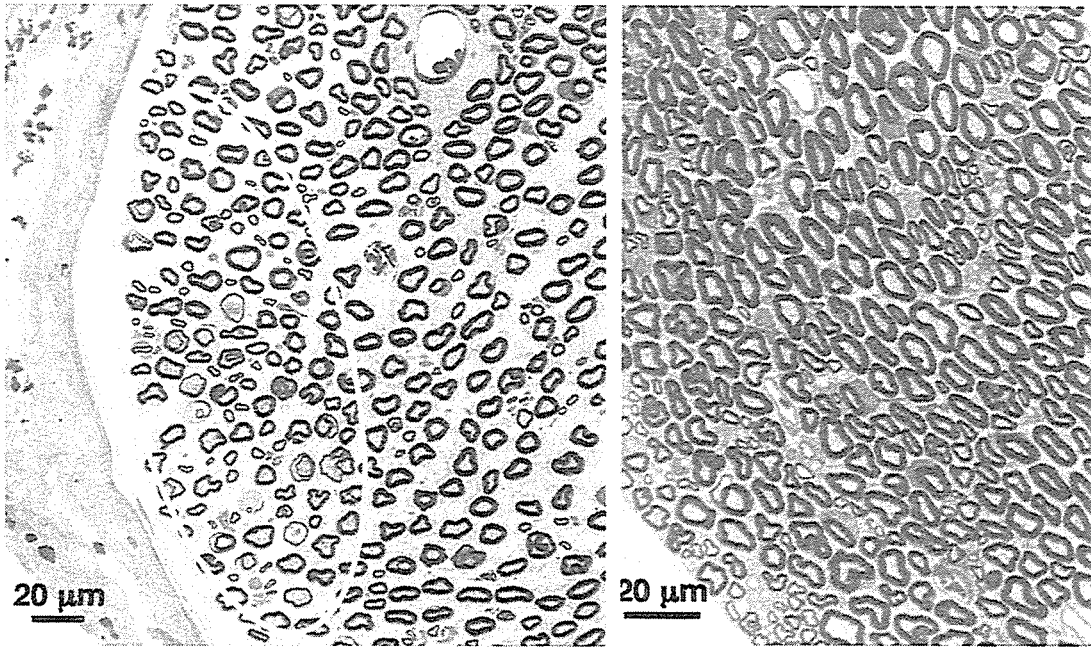
H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

☒1

C-Dps

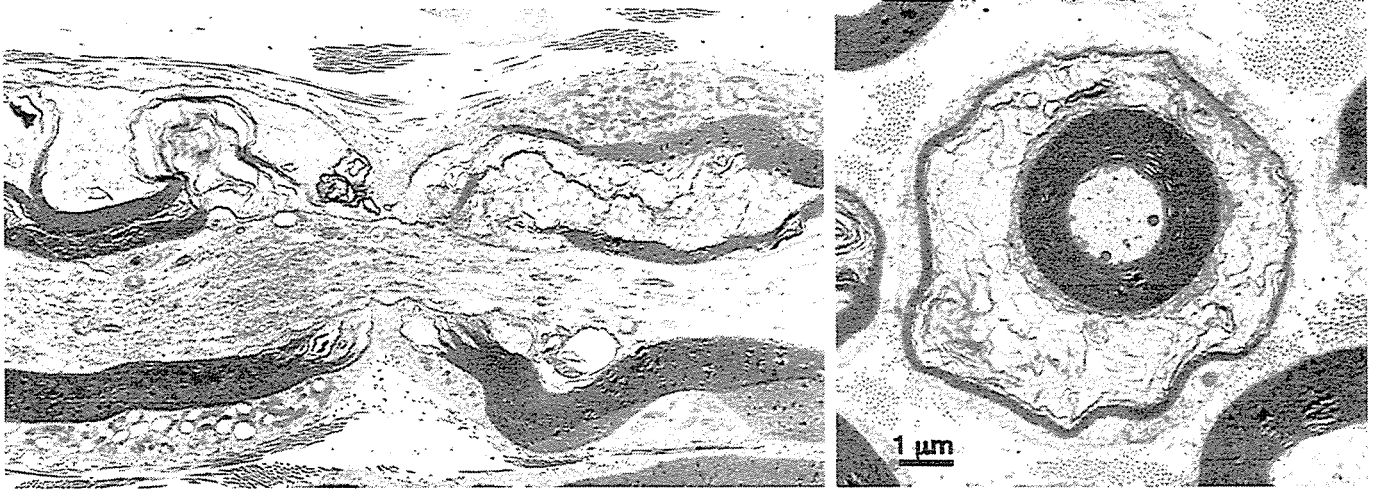
Heat-denatured C-Dps



☒2



图3



研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Su J-J, Osoegawa M, <u>Minohara M</u> , Tanaka M, Ishizu T, Mihara F, Taniwaki T, <u>Kira J</u>	Upregulation of vascular growth factors in multiple sclerosis: correlation with MRI findings.	J Neurol Sci	243	21-30	2006
Mei F-J, Osoegawa M, Ochi H, <u>Minohara M</u> , Shi N, Murai H, Ishizu T, Taniwaki T, <u>Kira J</u>	Long-term favorable response to interferon beta-1b is linked to cytokine deviation toward the Th2 and Tc2 sides in Japanese patients with multiple sclerosis.	J Neurol Sci	246	71-77	2006
Yokomine K, Nakatsura T, <u>Minohara M</u> , <u>Kira J</u> , Kubo T, Sasaki Y, <u>Nishimura Y</u>	Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice.	Biochem Biophys Res Comm	343	269-278	2006
Ishizu T, <u>Minohara M</u> , Ichiyama T, Kira R, Tanaka M, Osoegawa M, Hara T, Furukawa S, <u>Kira J</u>	CSF cytokine and chemokine profiles in acute disseminated encephalomyelitis.	J Neuroimmunol	175	52-58	2006
<u>Minohara M</u> , Matsuoka T, Li W, Osoegawa M, Ishizu T, Ohyagi Y, <u>Kira J</u>	Upregulation of myeloperoxidase in patients with opticospinal multiple sclerosis: positive correlation with disease severity.	J Neuroimmunol	178	156-160	2006
Sun X, <u>Minohara M</u> , Kikuchi S, Ishizu T, Tanaka M, Piao H, Osoegawa M, Ohyagi Y, Shimokawa H, <u>Kira J</u>	The selective Rho-kinase inhibitor Fasudil is protective and therapeutic in experimental allergic encephalomyelitis.	J Neuroimmunol	180	126-134	2006
Li W, <u>Minohara M</u> , Su JJ, Matsuoka T, Osoegawa M, Ishizu T, <u>Kira J</u>	Helicobacter pylori infection is a potential protective factor against conventional multiple sclerosis in the Japanese population.	J Neuroimmunol	187	227-231	2007
Pineda AAM, Ogata K, Osoegawa M, Murai H, Shigeto H, Tobimatsu S, <u>Kira J</u>	A distinct subgroup of chronic inflammatory demyelinating disease with CNS demyelination and a favorable response to immunotherapy.	J Neurol Sci	255	1-6	2007
Matsuoka T, Matsushita T, Kawano Y, Osoegawa M, Ochi H, Ishizu T, <u>Minohara M</u> , Kikuchi H, Mihara F, Ohyagi Y, <u>Kira J</u>	Heterogeneity of aquaporin-4 autoimmunity and spinal cord lesions in Japanese.	Brain		In press	
Balsalobre C, Silván JM, Berglund S, Mizunoe Y, Uhlin BE, and Wai SN	Release of the type I secreted α -haemolysin via outer membrane vesicles from <i>Escherichia coli</i> .	Mol Microbiol	59	99-112	2006

Kanamaru S, Kurazono H, Mizunoe Y, Terai A, Monden K, Kumon H, Ogawa O, Yamamoto S	Increased biofilm formation in <i>Escherichia coli</i> isolated from acute prostatitis.	Int J Antimicrob Agent	Suppl 1	s21-25	2006
Sugimoto S, Yoshida H, Mizunoe Y, Tsuruno K, Nakayama J, Sonomoto K	Structural and functional conversion of molecular chaperone ClpB from the gram-positive halophilic lactic acid bacterium <i>Tetragenococcus halophilus</i> mediated by ATP and stress.	J Bacteriol	188	8070-8078	2006
Nakamura T, Jeromin A, Smith G, Kurushima H, Koga H, Nakapeppu Y, Wakabayashi S, Nabekura J	Novel role of neuronal Ca ²⁺ sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons.	J Cell Biol	172	1081-1091	2006
Mizoguchi T, Kitamura A, Wake, H, Ishibashi H, Watanabe M, Nishimaki T, Nabekura J	BDNF Occludes GABA _B Receptor-mediated Inhibition of GABA Release in Rat Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons.	Eur J Neurosci	24	35-44	2006
Wake H, Watanabe M, Moorhouse AJ, Kanematsu T, Horibe S, Matsukawa N, Asai K, Ojika K, Hirata M, Nabekura J.	Early Changes In KCC2 Phosphorylation In Response To Neuronal Stress Results In Functional Downregulation.	J Neurosci	27	1642-1650	2007
Ishibashi H, Jang LS, Nabekura J	High potassium-induced facilitation of glycine release from presynaptic terminals on mechanically dissociated rat spinal dorsal horn neurons in the absence of extracellular calcium.	Neurosci		In press	
Tan H, He J, Wang S, Hirata K, Yang Z, Kuraoka A, Kawabuchi M	Age-related NADPH-diaphorase positive bodies in the lumbosacral spinal cord of aged rats.	Arch Histol Cytol	69	297-310	2006

研究成果の刊行物



ELSEVIER

Journal of the Neurological Sciences 243 (2006) 21–30

Journal of the
**Neurological
Sciences**

www.elsevier.com/locate/jns

Upregulation of vascular growth factors in multiple sclerosis: Correlation with MRI findings

Jen Jen Su^a, Manabu Osoegawa^a, Takeshi Matsuoka^a, Motozumi Minohara^a,
Masahito Tanaka^a, Takaaki Ishizu^a, Futoshi Mihara^b, Takayuki Taniwaki^a, Jun-ichi Kira^{a,*}

^a Department of Neurology, Neurological Institute, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, 812-8582, Japan

^b Department of Radiology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Received 10 June 2005; received in revised form 13 October 2005; accepted 9 November 2005

Available online 27 December 2005

Abstract

Vascular permeability changes precede the development of demyelinating lesions in multiple sclerosis (MS), and vessel wall thickening and capillary proliferation are frequently seen in autopsied MS lesions. Although vascular growth factors are critical for inducing such vascular changes, their involvement in MS has not been extensively studied. Thus, we examined the involvement of various vascular growth factors in MS according to their clinical phase and subtype. We measured serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), acidic and basic fibroblast growth factors (FGF) and platelet-derived growth factors (PDGFs)-AA, -AB and -BB in 50 patients with MS (27 opticospinal MS and 23 conventional MS patients) and 33 healthy controls using sandwich enzyme immunoassays. Correlations between growth factor changes and brain and spinal cord MRI findings were then analyzed. Serum VEGF concentrations were significantly higher in MS patients in relapse than in controls ($p=0.0495$) and in MS patients in remission ($p=0.0003$), irrespective of clinical subtype. Basic FGF was significantly increased in conventional MS patients, but not opticospinal MS patients compared with controls ($p=0.0291$), irrespective of clinical phase. VEGF at relapse showed a significant positive correlation with the length of spinal cord lesions on MRI ($r=0.506$, $p=0.0319$). The results suggest that an increase in serum VEGF concentration might be involved in MS relapse and the formation of longitudinally extensive spinal cord lesions.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: OS-MS; C-MS; VEGF; FGF; MRI; Longitudinally extensive spinal cord lesion

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Although the pathological hallmark of this disease is primarily demyelination, a wide variety of pathological changes, such as axonal degeneration, gliosis, remyelination and vascularization, have been noted. In particular, vascular permeability changes are considered crucial since they precede the development of MS lesions [1] and lesions preferentially develop perivascularly [2,3]. However, the precise mechanisms and the molecules responsible for the vascular changes observed in MS are not fully understood [3].

Growth factors are critical for inducing tissue growth and remodeling. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces vascular proliferation as well as vascular permeability changes [4], while platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF) not only induce oligodendroglial progenitor cell growth [5] but also contribute to angiogenesis [6]. Although recent pathological studies have revealed upregulation of VEGF in MS plaques [7], the involvement of growth factors that potentially induce angiogenesis has not been extensively studied in accord with clinical phase and MRI findings.

Two subtypes of MS, distinct in the nature of their CNS pathology, exist in Asians, namely, opticospinal MS (OS-MS) and conventional MS (C-MS). Selective involvement of the optic nerves and spinal cord, and tissue necrosis and conspicuous vascular components are seen in OS-MS, while

* Corresponding author. Tel.: +81 92 642 5340; fax: +81 92 642 5352.
E-mail address: kira@neuro.med.kyushu-u.ac.jp (J. Kira).

disseminated involvement of the CNS and perivascular demyelination are seen in C-MS [8–10]. These observations prompted us to study serum levels of various growth factors, which might contribute to the vascular changes observed in MS, according to clinical phase and subtype. In addition, we analyzed the correlation between growth factor changes and brain and spinal cord MRI findings, which are distinct between the two subtypes.

2. Subjects and methods

2.1. Subjects

A total of 50 consecutive patients (9 men and 41 women) with relapsing remitting MS, diagnosed according to the criteria of McDonald et al. [11] at the Department of Neurology, Kyushu University Hospital between September 1996 and May 2004, were enrolled in the present study after informed consent was obtained. None were receiving immunomodulatory therapies (interferon beta or immunosuppressants) or high dose corticosteroids (more than 15 mg prednisolone per day) at the time of blood sampling. The mean age at examination was 41.6 ± 16.0 years (mean \pm S.D.) (range: 17 to 89) and the mean age at disease onset was

33.1 ± 16.2 years (range: 10 to 89). The age at onset and examination had a significant positive correlation ($r=0.751$, $p<0.0001$). All patients were clinically classified as OS-MS or C-MS before sandwich enzyme immunoassays were performed. Briefly, 27 patients whose clinically estimated main lesions were confined to the optic nerves and spinal cord were classified as OS-MS [12]. These patients had no clinical evidence of disease in either the cerebrum or cerebellum, but minor brainstem signs, such as transient double vision and nystagmus, were acceptable.

The remaining 23 patients had multiple involvements of the CNS, including the cerebrum, cerebellum and brainstem, and were classified as C-MS. Disability was evaluated throughout the study by one of the authors (M. Osoegawa) using Kurtzke's Expanded Disability Status Scale (EDSS) score [13], and the progression index (PI) was used for evaluating disease progression; this was calculated by dividing the EDSS score at the last examination by the disease duration [14]. The demographic features of the patients are summarized in Table 1. Sera were obtained at relapse (within 1 month after onset of acute relapse) or remission. Because of limitations of stocked serum volume, from among the 50 MS patients VEGF was measured in 43 samples while other vascular growth factors were also measured in 43. For VEGF assay, 24 serum samples from

Table 1
Clinical and MRI findings of MS patients in this study

	MS (n=50)	OS-MS (n=27)	C-MS (n=23)
Females: males**	41:9	27:0	14:9
Age at disease onset ^{a,*}	33.1 ± 16.2	37.9 ± 18.1	27.6 ± 11.7
Age at examination ^{a,*}	41.6 ± 16.0	45.8 ± 16.5	36.7 ± 14.0
Disease duration ^a	8.5 ± 9.3	7.8 ± 8.3	9.1 ± 10.5
EDSS score before peak ^b (stable, relapse)	2.7 ± 2.4	2.8 ± 2.6	2.5 ± 2.2
EDSS score at peak ^b (relapse)	4.6 ± 1.6	4.8 ± 1.7	4.3 ± 1.4
EDSS score at remission ^b (relapse)	3.3 ± 2.2	3.3 ± 2.3	3.3 ± 2.3
Progression index	0.7 ± 1.5	0.8 ± 1.9	0.6 ± 0.8
<i>Brain MRI:</i>			
9 or more T2-high lesions**	28/50 (56.0%)	9/27 (33.3%)	19/23 (82.6%)
Number of T2-high lesions**	9.4 ± 8.6	5.6 ± 5.3	13.7 ± 9.4
1 or more Gd-enhanced lesions	13/50 (26.0%)	5/27 (18.5%)	8/23 (34.8%)
Number of Gd-enhanced lesions	0.3 ± 0.7	0.2 ± 0.4	0.5 ± 0.9
Infratentorial lesion	21/50 (42.0%)	10/27 (37.0%)	11/23 (47.8%)
Juxtacortical lesion	27/50 (54.0%)	12/27 (44.4%)	15/23 (65.2%)
At least 3 periventricular lesions**	25/50 (50.0%)	8/27 (29.6%)	17/23 (73.9%)
Proportion of patients who fulfilled McDonald's MRI criteria*	25/50 (50.0%)	9/27 (33.3%)	16/23 (69.6%)
Number of black holes**	2.0 ± 3.0	0.8 ± 1.0	3.4 ± 3.8
<i>Spinal cord MRI:</i>			
Frequency of spinal cord lesions	32/48 (66.7%)	19/27 (70.4%)	13/21 (61.9%)
Frequency of Gd-enhanced lesions	6/48 (12.5%)	4/27 (14.8%)	2/21 (9.5%)
Spinal cord lesion length [#]	5.0 ± 4.9 cm	6.1 ± 5.7 cm	3.5 ± 3.2 cm
Longitudinally extensive spinal cord lesions	14/48 (29.2%)	11/27 (40.7%)	3/21 (14.3%)

^aMean \pm S.D. (years).

^bMean \pm S.D.

MS= multiple sclerosis; OS-MS= opticospinal MS; C-MS= conventional MS.

EDSS= Expanded Disability Status Scale of Kurtzke; Gd= gadolinium.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, for the comparison between OS-MS and C-MS.

[#]Mean \pm S.D. of the spinal cord lesion length was calculated using only patients with spinal cord lesions on MRI.

23 OS-MS patients, 14 sera at relapse and 10 at remission (1 patient was examined both at relapse and remission), and 19 samples from 19 C-MS patients, 9 at relapse and 10 at remission were tested. For other vascular growth factor assays, 23 serum samples from 23 OS-MS patients, 12 at relapse and 11 at remission and 20 samples from 20 C-MS patients, 9 at relapse and 11 at remission, were examined. A total of 7 MS patients (4 OS-MS and 3 C-MS) were on low dose oral prednisolone at the time of blood sampling (Table 2). Thirty-three healthy subjects (14 men and 19 women) were enrolled as controls. Their average age at sampling was 45.1±17.8 years (range: 21 to 84 years). Age at examination was not different significantly among MS patients in relapse, those in remission and controls, and among OS-MS patients, C-MS patients and controls.

2.2. Sandwich enzyme immunoassays

VEGF, acidic and basic FGFs and PDGFs-AA, -AB and -BB were measured with quantitative sandwich enzyme immunoassays according to the manufacturer’s standard protocol (R&D Systems, Minneapolis, MS, USA) by one of the authors (J. J. Su) who was unaware of the diagnoses. Serum samples were thawed from -80 °C to room temperature and assayed in duplicate for the presence of each protein in 96-well polystyrene microtiter plates coated with each capture antibody or a recombinant human PDGF-Rβ/Fc chimera. The assays used each detection antibody conjugated to horseradish peroxidase, and color was developed with tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide. The lower detection limits for each protein were as follows: 9 pg/ml for VEGF, 5.68 pg/ml for acidic FGF, 3 pg/ml for basic FGF, 2.07 pg/ml for PDGF-AA, 1.7 pg/ml for PDGF-AB and 15 pg/ml for PDGF-BB.

2.3. Magnetic resonance imaging

All MR studies were performed using 1.5 T units, Magnetom Vision and Symphony (Siemens Medical Sys-

tems, Erlangen, Germany) within one month from blood sampling [12]. Typical imaging parameters for brain MRI were: axial T2-weighted turbo spin-echo imaging using TR/TE=2800/90 ms, flip angle=180°; axial turbo-FLAIR imaging using TI/TR/TE=2200/9000/110 ms, flip angle=180°; and sagittal and axial precontrast and axial and coronal postcontrast T1-weighted spin-echo imaging using TR/TE range=400–460/12–17 ms, flip angle range=80–90°. One excitation, a matrix of 256 × 256, a slice thickness of 5 mm, and a slice gap of 2.5 mm were used for all brain studies. Gadopentetate dimeglumine at 0.1 mmol/kg body weight was administered intravenously for contrast-enhanced studies. The typical imaging parameters of the spinal cord were as follows: sagittal T2-weighted turbo spin-echo imaging using TR/TE range=2500–2800/90–116 ms, flip angle=180°, number of excitations=3–4; sagittal T1-weighted spin-echo imaging using TR/TE range=400–440/11–12 ms, flip angle range=90–170°, number of excitations=2–3; axial T2-weighted turbo spin-echo imaging using TR/TE range=3200–5360/99–116 ms, flip angle=180°, number of excitations=3–4; axial T1-weighted spin-echo imaging using TR/TE range=400–440/12 ms, flip angle range=90–170°, number of excitations=2. For sagittal imaging, a matrix of 256 × 256 or 512 × 512, a slice thickness of 4 mm and a slice gap of 0.4 mm were used, and for axial imaging, a matrix of 256 × 256 or 512 × 512, a slice thickness of 5 mm, and a slice gap range of 1.5–5 mm were used. Brain and spinal cord MRI were evaluated independently by two of the authors (F. Mihara and M. Tanaka) who were unaware of the diagnoses. Spinal cord lesions longer than three vertebral lengths were considered longitudinally extensive. Brain MRI lesions were evaluated according to McDonald’s MRI criteria for MS [11]. The interval between blood sampling and MRI scanning was less than one month in all cases examined.

2.4. Statistical analysis

The Mann–Whitney *U* test was used for statistical analyses of age at onset, age at blood sampling, disease

Table 2
Clinical data on steroid use of MS patient at the time of blood sampling in this study

	VEGF assay	Other vascular growth factor assay
<i>At relapse</i>		
No corticosteroid	14 OS-MS 9 C-MS	11 OS-MS 9 C-MS
Low dose corticoid		1 OS-MS (1:5 mg/day)
<i>At remission</i>		
No corticosteroid	8 OS-MS 7 C-MS	8 OS-MS 10 C-MS
Low dose corticoid	2 OS-MS (1:5 mg every other day) (1:15 mg/day)	3 OS-MS (1:10 mg/day) (1:7.5 mg/day)
	3 C-MS (1:15/5 mg alternatively) (1:5 mg every other day) (1:5 mg/day)	1 C-MS (1:5 mg every other day) (1:5 mg/day)

Number of patients is shown.

duration, EDSS score, PI and length of spinal cord lesions on MRI. Statistical analyses of growth factor levels were initially performed using the Kruskal–Wallis *H* test for MS patients in relapse, those in remission, and controls, and for OS-MS patients, C-MS patients, and controls. When statistical significance was found, the Mann–Whitney *U* test was used to determine the statistical differences between each subgroup; uncorrelated *p* values were corrected by multiplying by the number of comparisons (Bonferroni–Dunn’s correction). Spearman’s rank correlation test was used to determine correlations between each vascular growth factor, and between clinical parameters and each vascular growth factor. The Chi-square test with Yates’ correction or Fisher’s exact probability test when the criteria were fulfilled, were used for statistical analyses of the frequency of brain and spinal cord MRI lesions. In all assays, *p* < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Clinical and neuroimaging findings

The proportion of females with OS-MS was significantly higher than those with C-MS (*p* = 0.0003) (Table 1). Ages at disease onset and examination were also significantly higher in OS-MS than C-MS (*p* = 0.0149 and *p* = 0.0438, respectively). EDSS score at peak and PI were higher in OS-MS than C-MS, although the disease duration was shorter in the former than the latter, but none of these differences reached

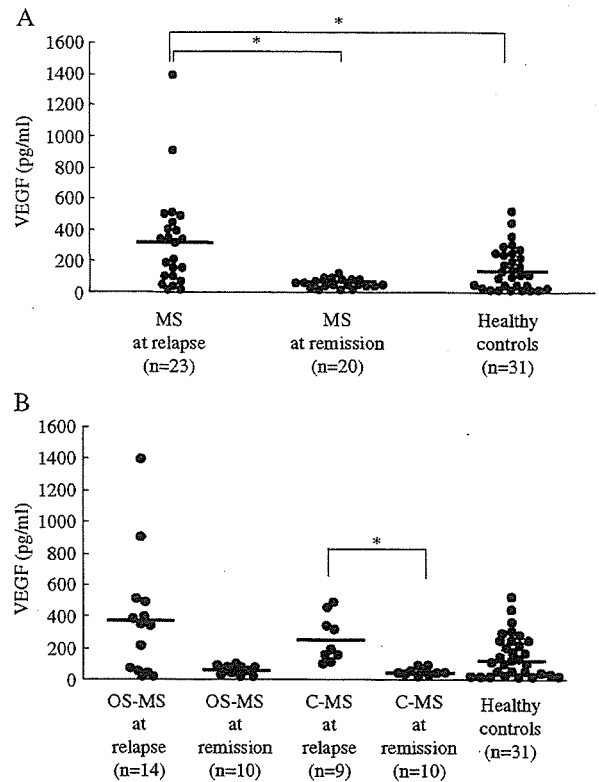


Fig. 2. (A) VEGF concentration in sera of MS patients analyzed separately according to their clinical phase. Bars indicate the mean of each group. **p* < 0.05. (B) VEGF concentration in sera from MS patients analyzed separately according to their clinical subtype and clinical phase. Bars indicate the mean of each group. **p* < 0.05.

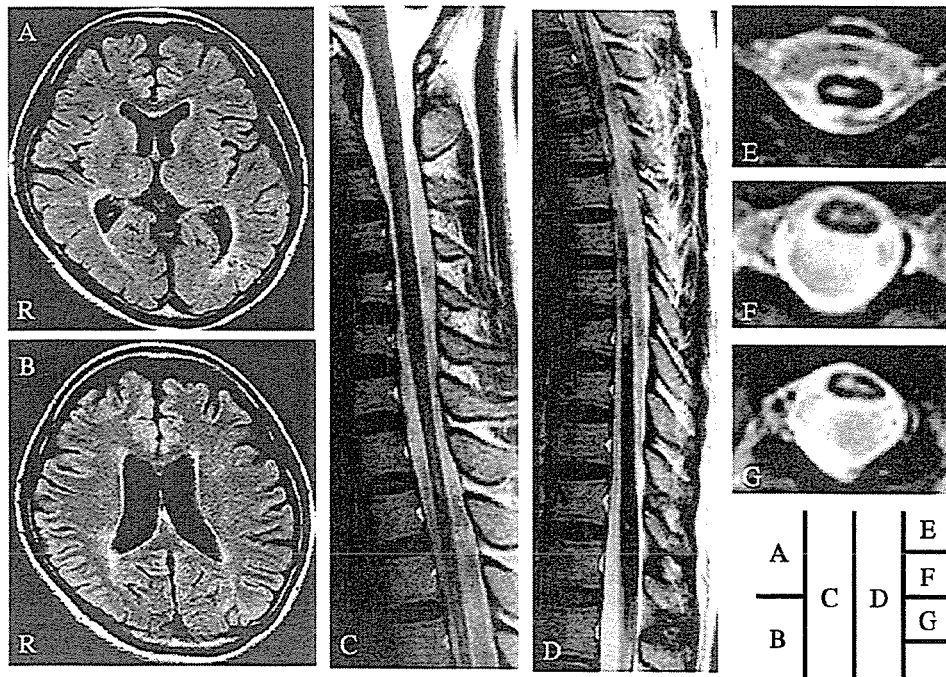


Fig. 1. Representative brain (A, B) and spinal cord MRI (C–G) of a typical OS-MS patient at relapse (disease duration: 4 years). No lesion is visible on T2-weighted axial images of the brain. Longitudinally extensive spinal cord lesion at Th2 to 7 spine levels is shown in T2-weighted sagittal (C, D) and axial (E–G) images of the spinal cord (E: Th1, F: Th3–4 and G: Th4–5 spine levels).

significance. EDSS scores at remission or convalescence did not differ significantly between the two groups.

On brain MRI, the frequency of nine or more T2-hyperintense lesions was significantly higher in C-MS than OS-MS ($p=0.0006$) (Table 1) (Fig. 1A and B). Moreover, the frequency of at least three periventricular lesions was also significantly higher in C-MS than OS-MS ($p=0.0015$). However, the frequencies of juxtacortical and infratentorial lesions and gadolinium-enhanced lesions were not significantly different between the two subgroups. Thus, the proportion of patients who fulfilled McDonald's MRI criteria was significantly higher in C-MS than OS-MS ($p=0.0098$). On brain MRI, the frequency of T1 black hole lesions was significantly lower in OS-MS than in C-MS ($p=0.0046$).

On spinal cord MRI, the frequencies of spinal cord lesions were similar between OS-MS and C-MS. The lengths of the spinal cord lesions on MRI were longer in OS-MS than C-MS, though the difference did not reach a statistical significance, and the frequency of longitudinally extensive spinal cord lesions was significantly higher in OS-MS than C-MS ($p=0.0398$) (Table 1) (Fig. 1C–G). Even when seven patients on low dose corticosteroid at the time of blood sampling (4 OS-MS and 3 C-MS) were excluded, essentially the same results were obtained in respect to comparisons between the two subtypes (data not shown).

3.2. Vascular growth factor levels

Serum VEGF concentration was significantly higher in MS patients in relapse (320.5 ± 316.1 pg/ml, mean \pm S.D.) than in controls (147.3 ± 136.4 pg/ml) ($p=0.0495$) and those in remission (48.6 ± 25.7 pg/ml) ($p=0.0003$) (Fig. 2A). Even when MS patients on the low dose corticosteroids were omitted, the difference between those in relapse and remission was still significant ($p=0.0021$) and the comparison between MS patients in relapse and controls showed a tendency ($p=0.0807$). We then compared serum VEGF levels among OS-MS at relapse, OS-MS at remission, C-MS at relapse, C-MS at remission and healthy controls; a statistically significant difference was found only between C-MS at relapse and at remission, but not in any other comparisons. The difference between OS-MS in relapse and OS-MS in remission lost statistical significance after correction by multiplying the number of comparisons (Fig. 2B). The difference between OS-MS and C-MS patients in relapse also did not reach statistical significance due to the small sample size, although the former was higher (365.0 ± 387.6 vs. 251.2 ± 148.0 pg/ml).

Basic FGF levels did not differ significantly among MS patients in relapse (5.3 ± 4.7 pg/ml), those in remission (5.4 ± 4.2 pg/ml) and controls (3.7 ± 2.5 pg/ml) (Fig. 3A).

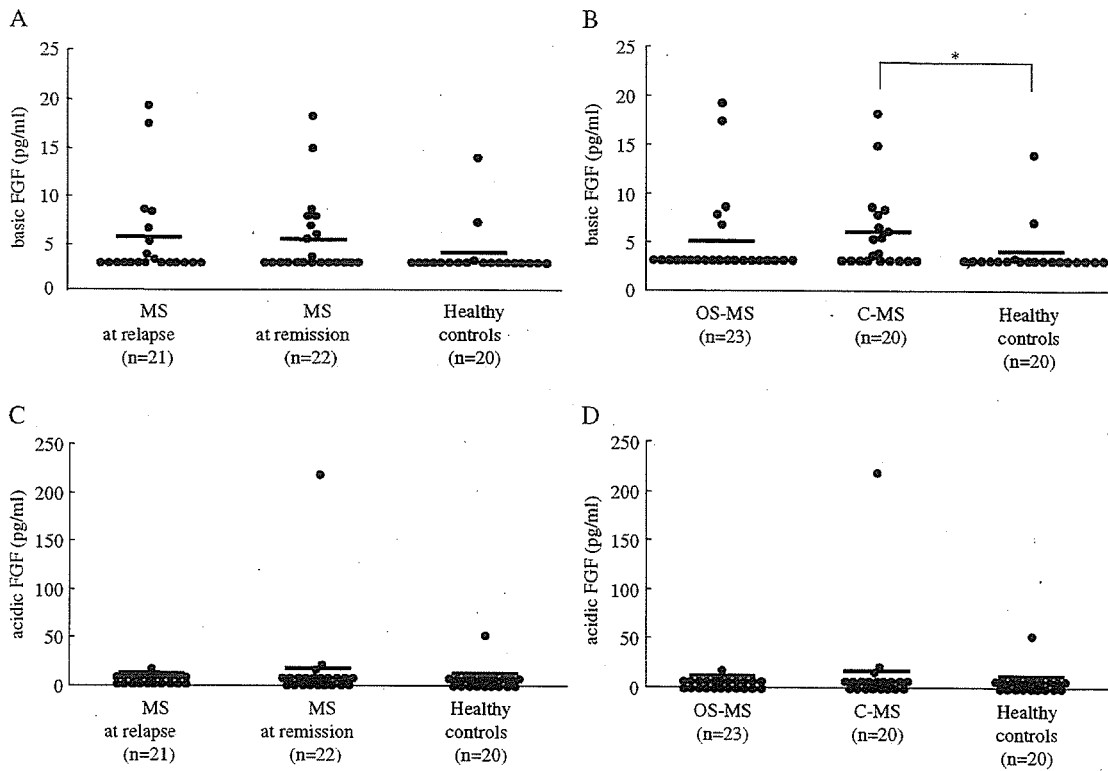


Fig. 3. (A) Basic FGF concentration in sera from MS patients analyzed separately according to their clinical phase. Bars indicate the mean of each group. (B) Basic FGF concentration in sera from MS patients analyzed separately according to their clinical subtype. Bars indicate the mean of each group. * $p < 0.05$. (C) Acidic FGF concentration in sera from MS patients analyzed separately according to their clinical phase. Bars indicate the mean of each group. (D) Acidic FGF concentration in sera from MS patients analyzed separately according to their clinical subtypes. Bars indicate the mean of each group.