

E. 結論

MSとNHDではオートファジーの観点から、脱髄の分子メカニズムが大きく異なることがわかった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Choi SS, Lee HJ, Lim I, Satoh J, Kim SU. Human astrocytes: Secretome profiles of cytokines and chemokines. PLoS One 9(4): e92325, 2014.
2. Satoh J, Kino Y, Kawana N, Yamamoto Y, Ishida T, Saito Y, Arima K. TMEM106B expression is reduced in Alzheimer's disease brains. Alzheimer's Research and Therapy 6(2): e17, 2014.
3. Satoh J, Motohashi N, Kino Y, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Arai N, Nakamagoe K, Tamaoka A, Saito Y, Arima K. LC3, an autophagosome marker, is expressed on oligodendrocytes in Nasu-Hakola disease brains. Orphanet Journal of Rare Diseases 9: e68, 2014.
4. Kawana N, Yamamoto Y, Kino Y, Satoh J. Molecular network of NLRP3 inflammasome activation-responsive genes in a human monocyte cell line. Austin Journal of Clinical Immunology 1(4): e1071, 2014.
5. Ohtani R, Shibuya K, Satoh J, Kuwabara S. A piece of X-ray revealed Nasu-Hakola disease. Internal Medicine 53(20): 2407, 2014.
6. Satoh J. Molecular network of ChIP-Seq-based NF- κ B p65 target genes involves diverse immune functions relevant to the immunopathogenesis of multiple sclerosis. Multiple Sclerosis and Related Disorders 3(1): 94-106, 2014.
7. Satoh J, Yamamoto Y, Kitano S, Takitani M, Asahina N, Kino Y. Molecular network analysis suggests a logical hypothesis for the pathological role of C9orf72 in amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia. Journal of Central Nervous System Disease 6: 69-78, 2014.
8. Satoh J, Kino Y, Yamamoto Y, Kawana N, Ishida T, Saito Y, Arima K. PLD3 is accumulated on neuritic plaques in Alzheimer's disease brains. Alzheimer's Research and Therapy 6: e70, 2014.
9. Satoh J, Asahina N, Kitano S, Kino Y. A comprehensive profile of ChIP-Seq-based PU.1/Spi1 target genes in microglia. Gene Regulation and Systems Biology 8: 127-139, 2014.
10. Satoh J, Yamamoto Y, Asahina N, Kitano S, Kino Y. RNA-Seq data mining: Downregulation of NeuroD6 serves as a possible biomarker for Alzheimer's disease brains. Disease Markers 2014: ID123156, 2014.

11. 佐藤準一. 神経症候群(第2版)III. 那須ハコラ病. 日本臨牀 新領域別症候群シリーズ 28: 694-697, 2014.

2. 学会発表

国際学会

1. Satoh J, Kino Y: Molecular network of ChIP-Seq-based EBNA1-target cellular genes supports biological implications of EBV persistence in multiple sclerosis. 66th Annual Meeting of American Academy of Neurology. Philadelphia, USA, 2014. 5.1.

国内学会

1. 佐藤準一、川名夏生、山本洋司、紀嘉浩. 次世代シーケンサーChIP-SeqデータによるゲノムワイドNF-kappaB p65 標的遺伝子群の解析. 第55回日本神経学会総会 福岡、2014. 5.24.
2. 佐藤準一、紀嘉浩、川名夏生、山本洋司、石田剛、齊藤祐子、有馬邦正. Alzheimer病脳のIba1陽性microgliaはTREM2を発現しない. 第55回日本神経病理学会総会. 東京、2014. 6.26.
3. 佐藤 準一. 脳の病気の遺伝子を調べてみよう. 文部科学省・研究成果の社会還元・普及事業. ひらめきときめきサイエンス. ようこそ大学の研究室へ. 東京、2014. 7.27.
4. 檜垣小百合、村松昌、松田明生、松本健治、佐藤準一、道川誠、新飯田俊平. アルツハイマー病モデルマウス脳におけるmiR-200ファミリーの機能解析. 第6回日本RNAi研究会. 広島、2014. 8.28.
5. 佐藤準一. MSのバイオマーカー抗KIR4.1抗体. 第26回日本神経免疫学会学術集会. シンポジウムIII. Autoimmune channelopathies -update-. 金沢、2014. 9.5.
6. 佐藤準一、川名夏生、山本洋司、朝比奈直弘、北野翔大、紀嘉浩. MS活動性脳病巣におけるNLRP3 inflammasomeの発現. 第26回日本神経免疫学会学術集会. 金沢、2014. 9.5.
7. 佐藤準一、山本洋司、川名夏生、朝比奈直弘、北野翔大、紀嘉浩. アルツハイマー病脳におけるTMEM106Bの発現低下. 第37回日本神経科学大会. Neuro2014. 横浜、2014. 9.13.
8. Jun-ichi Satoh, Yoshihiro Kino. Remarkable differences in NRSF/REST target genes between human ESC and ESC-derived neurons. 生命医薬情報学連合大会. 仙台、2014. 10.2.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 なし

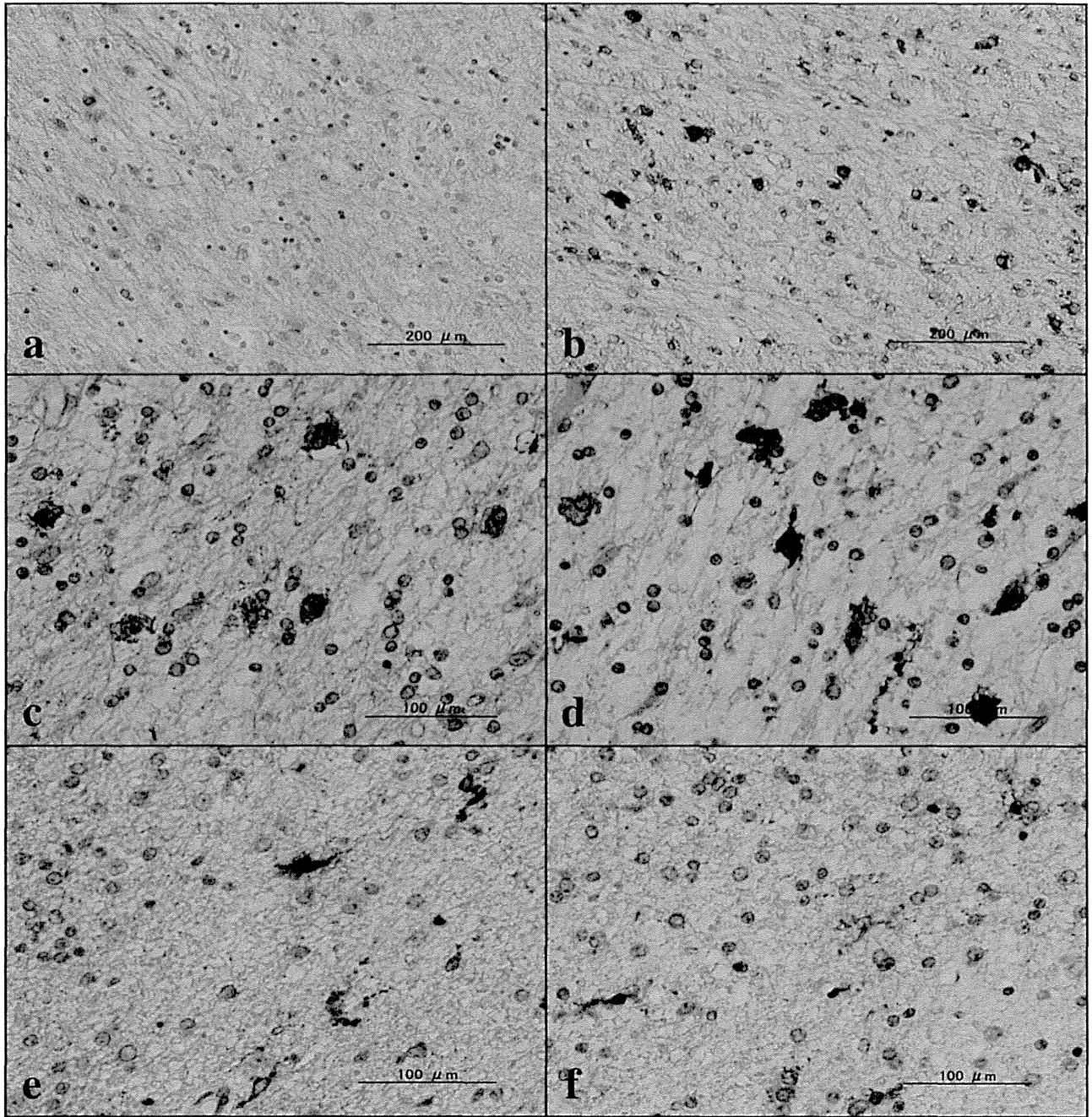


図 1. MS 脱髄巣辺縁部マクロファージ・ミクログリアにおける LC3 の高発現.

The expression of **(a)** NLRP3, **(b)** ASC, **(c)** CASP1, and **(d)** IL-1B was studied in the serial sections of chronic active lesions of MS by immunohistochemistry. Reactive astrocytes (AS) intensely expressed all three components and IL-1B with the location of the cytoplasm.

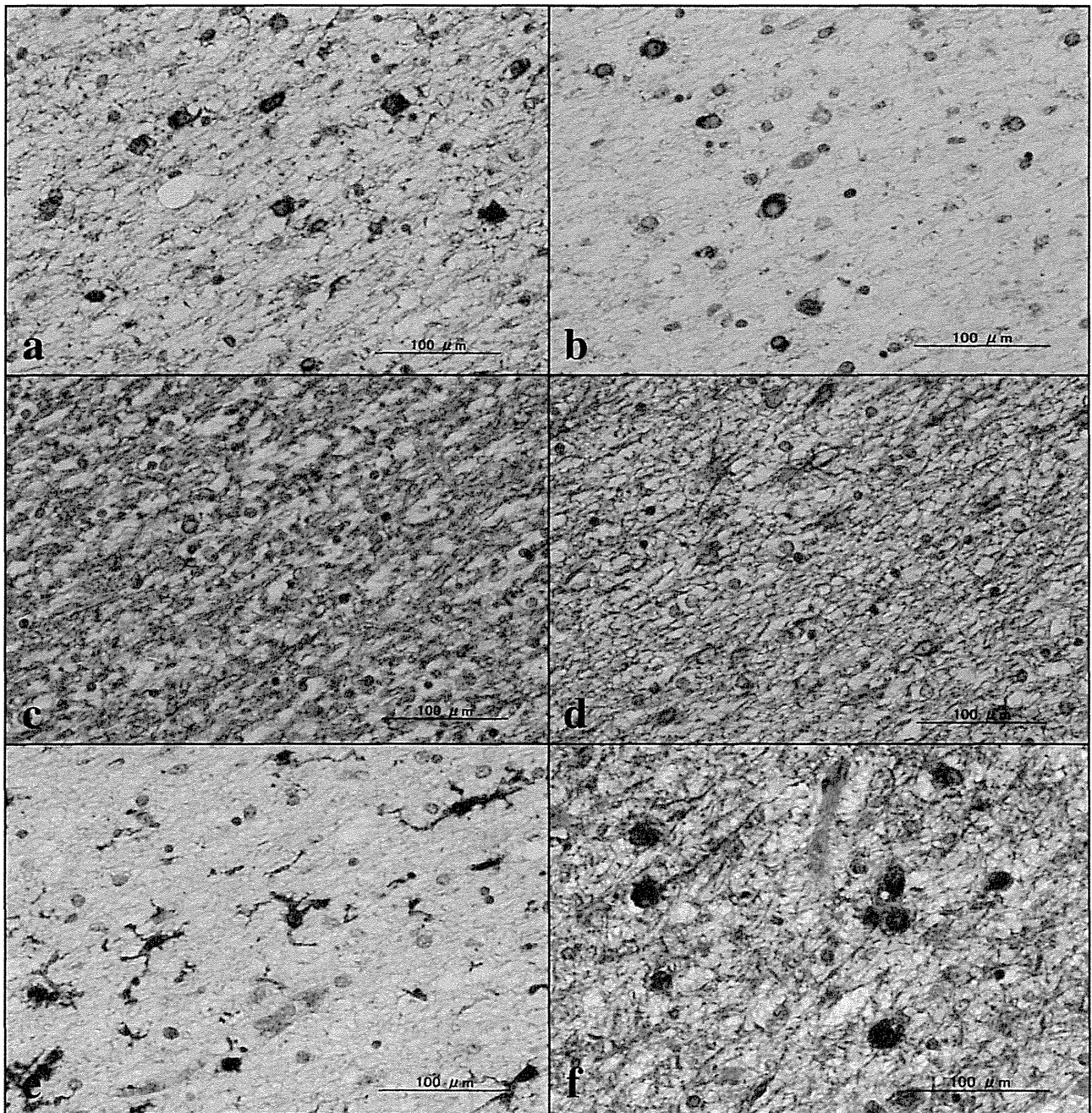


図 2. NHD 脱髄巣残存オリゴデンドロサイトにおける LC3 の高発現.

The serial brain sections of NHD cases were processed for immunohistochemistry. The panels (a-f) represent the identical field of the frontal white matter labeled with (a) LC3, (b) Nogo-A, (c) MBP, (d) GFAP, (e) Iba1, and (f) CNPase (原図 red) and LC3 (原図 brown) (Sato et al. Orphanet J Rare Dis 9: e68, 2014).

MRI を用いた視神経脊髄炎関連疾患と多発性硬化症に関する研究

研究分担者 佐藤典子 国立精神・神経医療研究センター病院放射線診療部 部長

研究要旨

近年、視神経脊髄炎を呈する患者の一部からアクアポリン4を抗原とする NMO-IgG が発見され、視神経脊髄炎関連疾患 (NMO) と多発性硬化症 (MS) が異なる疾患であることが明らかとなり、2疾患の鑑別は重要とされている。今回 MR 技法を用い、NMO と MS における特異的脳形態変化の差異を検討した。抗アクアポリン4抗体陽性の NMO 患者 21 名と再発寛解型多発性硬化症患者 (RRMS) 32 名の 3 次元 T1 強調画像や拡散強調画像の MR 画像を解析したところ、びまん性の局所脳皮質容量低下や白室領域の異方性の低下が認められた。NMO と比較し RRMS では、両側視床における局所脳皮質容量低下や白室領域の異方性の低下が認められた。これは RRMS でより強い脱髄性変化が生じており、これによる間接的効果が視床領域に影響を及ぼしたことが推測された。この2疾患の鑑別において、視床の変化に注目することは非常に有益であることが示唆された。

A. 研究目的

以前、日本の多発性硬化症では高度な視神経炎や横断性脊髄炎を繰り返す頻度が高いことが指摘されており、視神経炎や脊髄炎を繰り返す症例は多発性硬化症のうち視神経脊髄型と分類されていた。しかし近年、視神経脊髄炎を呈する患者の一部からアクアポリン4を抗原とする NMO-IgG が発見され、視神経脊髄炎関連疾患と多発性硬化症が異なる疾患であることが明らかとなった。その後の研究から視神経脊髄炎関連疾患は多発性硬化症と治療法や予後などが異なることが明らかとなった。このため視神経脊髄炎関連疾患と多発性硬化症の鑑別は非常に重要な問題である。今回我々は MR 技法を用い、当2疾患における特異的脳形態変化の差異を検討した。

B. 研究方法

当センターで診断を受けた、抗アクアポリン4抗体陽性の視神経脊髄炎関連疾患患者 21 名 (平均年齢; 52.0 ± 18.9 歳、男性:女性 = 5:16)、再発寛解型多発性硬化症患者 32 名 (平均年齢; 47.7 ± 10.1 歳、男性:女性 = 9:23)、

性別年齢をあわせた健常者 39 名 (平均年齢; 50.1 ± 8.8 歳、男性:女性 = 10:29) を対象に 3T MR system (Philips Medical Systems, Best, the Netherlands) により 3 次元 T1 強調画像や拡散強調画像を撮影し、健常群と疾患群における 3 群の差異を検討した。

(倫理面への配慮)

この研究は後ろ向き観察研究として、倫理委員会で承認されている。「疫学研究に関する倫理指針」に準拠して、研究に参加する試料提供者の人権に最大限配慮して行われた。

C. 研究結果

健常被験者と比較し視神経脊髄炎関連疾患患者や再発寛解型多発性硬化症患者ではびまん性の局所脳皮質容量低下や白室領域の異方性の低下が認められた。視神経脊髄炎関連疾患患者と比較し再発寛解型多発性硬化症患者では両側視床における局所脳皮質容量低下や白室領域の異方性の低下が認められた。

D. 考察

再発寛解型多発性硬化症患者では神経脊髄炎関連疾患患者と比較し、疾患に伴う脳形態変化がより強度であることが明らかとなった。

免疫組織化学的手法による検討より、神経脊髄炎関連疾患では皮質領域の脱髄がみられないことが報告されている。今回認められた神経脊髄炎関連疾患における皮質領域の障害は直接的な炎症反応よりも、繰り返す脊髄や視神経の炎症により間接的に変化していることが示唆された。

E. 結論

再発寛解型多発性硬化症患者や神経脊髄炎関連疾患患者に伴う局所脳形態変化を3次元 T1 強調画像や拡散強調画像により明らかとした。神経脊髄炎関連疾患と比較してより強い脱髄性変化が再発寛解型多発性硬化症で生じており、これによる間接的効果が視床領域に影響を及ぼしたことが推測された。当2疾患の鑑別において、視床の変化に注目することは非常に有益であることが示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ota M, Noda T, Sato N, Hattori K, Teraishi T, Horii H, Nagashima A, Shimoji K, Higuchi T, Kunugi H. Characteristic distributions of regional cerebral blood flow changes in major depressive disorder patients: a pseudo-continuous arterial spin labeling (pCASL) study. J Affect Disord 2014;165:59-63.

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特記すべきことなし

動物モデルを用いた MS 病態の多様性に関する基礎研究

研究分担者 大木 伸司

(独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第六部 室長

研究要旨

多発性硬化症 (MS) 患者の多くは再発寛解型 (RR) MS として発症するが、罹患期間が伸びるに連れて患者の一部は寛解を経ることなく病態が徐々に進行する二次進行型 (SP) MS に移行する。既存の RRMS 治療薬はほぼ無効であることから、異なる発症機序が予想されるが、SPMS の発症機序は不明であるため、RRMS と SPMS を明確に鑑別する客観的な方法はない。一方、RRMS を対象とした免疫修飾薬 OCH の医師主導治験による評価を行う上で、RRMS と SPMS を識別しうる客観的な基準を確立することは、OCH の治療成績向上を目指す上でも極めて重要である。これまでの実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を用いた解析から、RRMS に関連する T 細胞因子として我々が見いだした NR4A2 の欠損マウスでは、初期の EAE 病態がほぼ完全に抑制された一方で、新たな病態が遅れて出現することを見いだした。この後期 EAE 病態発症時には、あるマーカー遺伝子を発現するユニークな T 細胞が CNS に浸潤しており、この T 細胞は強い病原性を有していた。同マーカー遺伝子を標的に作製した siRNA の *in vivo* 投与により、NR4A2cKO マウスの後期 EAE 病態は有意に改善した。さらにヒト末梢血におけるマーカー遺伝子陽性 T 細胞の頻度が、SPMS 患者で有意に増加していることが明らかとなり、RRMS と SPMS の科学的な根拠に基づく鑑別法が確立できる可能性が示された。

A. 研究目的

多発性硬化症 (MS) 患者の多くは再発寛解型 (RR) MS として発症するが、発症から 5~10 年程度経過した患者の一部は二次進行型 (SP) MS に移行し、その頻度は本邦で全体の 20%、欧米では半数以上にも達する。SPMS の発症機序は不明であるが、既存の RRMS 治療薬はほぼ無効であり、異なる病因が予想される。免疫修飾薬 OCH の医師主導治験による RRMS に対する治療効果を評価していく上で、RRMS と SPMS を識別しうる客観的な基準を確立することは、OCH の治療成績向上の観点からも極めて重要である。このような背景から、今年度は MS の動物モデルを用いて RRMS と SPMS の病態の異同を、分子・細胞レベルで明らかにすることを目的として研究を進めた。

B. 研究方法

C57BL/6J (B6) マウスおよびヘルパー T 細胞特

異的 NR4A2 欠損 (NR4A2cKO) マウスに、MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを免疫して、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導した。中枢神経系 (CNS) 浸潤 T 細胞、所属リンパ節または脾臓 T 細胞のサイトカイン産生と各種遺伝子発現を、Suspension Array、Gene Chip などを用いて解析した。CNS 浸潤細胞を別のマウスに移入し、病態誘導能を評価した。カラーゲンマトリクスに封入した siRNA を、EAE マウスに静脈投与し、病態抑制効果を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、ヒトを対象とする医学系研究に対する倫理指針に基づいて作成した実験計画書をセンター内の倫理委員会提出し、その承認を受けた上で研究を行った。インフォームドコンセントを得た上で、患者あるいは健常人の末梢血を採取した。また本研究においては、あらかじめ当研究所の動物実験規定に沿って作成した実験計画書を提出し、実

験動物委員会の承認を受けた実験方法に従って、研究を進めた。

C. 研究結果

MOG ペプチドの免疫により誘導する EAE の初期病態は、ヘルパー T 細胞特異的な NR4A2 遺伝子の欠損によりほぼ完全に抑制された。このとき CNS への浸潤細胞数は有意に減少しており、また再刺激後の CNS 浸潤 T 細胞の IL-17 産生も著明に低下した。この NR4A2cKO マウスの観察をしばらく続けると、2~3 週間後に対照マウスと酷似した新たな EAE 様病態を発症することが分かった。この後期 EAE 病態発症時に CNS に浸潤した T 細胞は、IL-17 を産生せず、特定のマーカー遺伝子を発現するユニークな T 細胞であることが判明し、移入実験により極めて強い病原性を有していた。同マーカー遺伝子を標的に作製した siRNA を in vivo 投与することにより、NR4A2cKO マウスの後期 EAE 病態は有意に改善した。興味深いことに、ヒト末梢血におけるこのマーカー遺伝子発現 T 細胞の頻度を調べると、RRMS 患者における頻度は健常人と差がなく低値にとどまったが、SPMS 患者では有意に増加していることが明らかとなった。

D. 考察

RR-MS 患者の末梢血 T 細胞で発現が亢進している NR4A2 は、自己反応性の Th17 細胞を制御し、MS の動物モデルである EAE の初期病態に密接に関与する因子であることが示された。T 細胞の NR4A2 発現は、RRMS に対する新しいバイオマーカーとしての活用が期待できる。一方、NR4A2cKO マウスの EAE 誘導後期の病態においては、特定のマーカー遺伝子を発現するユニークな T 細胞が CNS 中に認められ、この T 細胞は強い病原性を有していた。また同遺伝子を標的として設計した siRNA の in vivo 投与により後期の病態が有意に軽快したことから、後期 EAE 病態はこの T 細胞群に起因するものと考えられた。さらに SPMS 患者末梢血では同遺伝子陽性の T 細胞が選択的に増加して

いたことから、被験者 T 細胞の NR4A2 と新たなマーカー遺伝子の発現を精査することにより、客観的な根拠に基づいて RRMS 患者と SPMS 患者を鑑別できる可能性が示された。

E. 結論

NR4A2cKO マウスの EAE 解析から、後期 EAE 病態に関わる全く新しい T 細胞とそのマーカー遺伝子を同定し、同 T 細胞が SPMS の慢性進行性病態に関与する可能性を明らかにした。今回、MS の動物モデルを用いて二つの MS 病型を識別する新しい手がかりを得たことから、今後 OCH の投与対象である RRMS 患者と SPMS 患者を効率的に見分ける、根拠に基づいた客観的な鑑別法の確立が期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Shinji Oki; Towards understanding the role of orphan nuclear receptor NR4A2 in Th17 cell-mediated CNS autoimmunity: An experimental approach employing an animal model of multiple sclerosis. Clin. Exp. Neuroimmunol. 5, 137-148 (2014) The Japanese Society for Neuroimmunology

大木 伸司、山村 隆; 多発性硬化症の動物モデル - 横断的アプローチによる病態解明と治療標的の探索 - 日本臨床 (日本臨床社) 第 72 巻 第 11 号 1935-1940, (2014)

2. 学会発表

Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura: NR4A2 modulation during autoimmune inflammation of the central nervous system reduces pathogenic T cell responses and ameliorates clinical disease. The 12th International Congress of Neuroimmunology, Mainz Germany, Nov. 11th- 14th, 2014

Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura:
NR4A2 controls pathogenic 'switched' Th17
cells in the CNS during autoimmune
inflammation. 第43回 日本免疫学会総会・
学術集会 京都 12月10日-12日 2014年

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

発明の名称：進行型免疫性脱髄疾患治療剤
出願人：(独)国立精神・神経医療研究センタ
ー

発明者：大木 伸司、北條 浩彦、山村 隆
出願番号：特願2014-135630
出願日：平成26年7月1日

発明の名称：進行型免疫性脱髄疾患治療剤
出願人：(独)国立精神・神経医療研究センタ
ー

発明者：大木 伸司、山村 隆
出願番号：特願2015-6142
出願日：平成27年1月15日

2. 実用新案登録

とくになし

3. その他

とくになし

多発性硬化症患者群の腸内細菌叢に関する研究

研究分担者 服部 正平

東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授

研究要旨

多発性硬化症(Multiple sclerosis, MS)は慢性的な中枢神経系の脱髄疾患であり、欧米では非常に多く近年日本及びアジア諸国においても患者数が急増している。MSの原因としては遺伝的な要因と環境的な要因が知られており、T細胞に腸内細菌叢が影響を及ぼし様々な自己免疫性疾患に重要な役割をしていることが示唆されている。本研究では、環境要因としてのMS患者の腸内(糞便)細菌叢を解析し、これらMS群のデータと健常者腸内細菌叢データとの比較解析から、MS腸内細菌叢の特徴解明を行った。

A. 研究目的

本研究は、MS患者群の腸内細菌叢の菌種及び遺伝子組成を解析し、健常者群との比較によるMS腸内細菌叢の特徴及び本疾患におけるバイオマーカーあるいは発症に関わる細菌種・遺伝子・代謝系を解明し、MS発症と腸内細菌叢の関係を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

MS患者群及び成人健常者群の糞便から調製した腸内細菌叢DNAについて、次世代シーケンサー(ロシュ社454やライフテクノロジー社Ion PGM等)を用いて、16SリボソームRNA遺伝子(16S)及びメタゲノムデータを収集する。得られた16SデータのOTUクラスタリング及びデータベースへの類似度検索により、各細菌叢の菌種と菌種組成比を解明し、また、系統樹を作成する。さらに、MS群と健常者群間の上記16Sデータの比較解析により、MS群に有意に増減する菌種の特定等を行う。また、MS群と健常者群の系統樹の比較解析(UniFrac距離解析)により菌叢全体構造の両群間類似性を評価する。さらに、両群間のメタゲノムデータを比較することにより、両群間で有意に増減する遺伝子あるいは代謝系等の情報を得て、両群間の細菌叢機能の相違を評価する。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した腸内細菌叢検体については、研究代表者の機関等における生命倫理審査会の承認を得ている。

C. 研究結果

これまでに20名のMS被験者の糞便及び腸内細菌叢を採取した。これらの検体から454GSを用いて計141,549リード(7,080 ± 825リ

ード/被験者)の16Sデータを収集した。このMSデータから計6万リード(3,000リード/MS被験者)と40名の健常者から得た12万リード(3,000リード/健常者)を用いてOTU(菌種)数、UniFrac距離、菌種組成の比較解析を行った。その結果、OTU(菌種)数はMS群と健常者群間において有意な差はみられなかった。一方、UniFrac距離解析では両群の腸内細菌叢の全体構造が統計学的に有意に異なっていることを見いだした($P < 0.05$)。そこで、門、属、種レベルでの両群間に違いを生じる菌種の探索を行った。門レベルでは優占するFirmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteriaの4門の組成比は両群間に統計学的有意さはなかった。しかし、属レベルにおいてBacteroides, Faecalibacterium, Anaerostipes, Roseburiaの4属がMS群で有意に減少していた。さらに、種レベルにおいて、MS群で有意に減少している12菌種と有意に増加している10菌種を検出した。MS群で有意に減少していた12菌種の多くは減少していた4属に含まれていた。

D. 考察

炎症性腸疾患(IBD)等の疾患患者の腸内細菌叢は、健常者との比較において細菌叢構造の異常(dysbiosis)を示すことが知られている。MS群の腸内細菌叢のOTU(菌種)数は健常者群との間で有意な違いはなかったが、UniFrac距離解析は明らかな両群間の違いを示した。また、両群間で特徴的に増減する菌種を検出した。これらの結果は、MS腸内細菌叢は中程度の細菌叢の構造異常(dysbiosis)をもつことが示唆された。とくに、検出されたMS群において有意に増減していた22菌種の特徴はMS発症の機構解明に有用であると考えられる。

E. 結論

大量の 16S 配列データを用いた細菌叢解析から、MS 腸内細菌叢は健常者群との比較において、菌叢構造が有意に異なっていることを明らかにした。このことは MS 発症に腸内細菌叢の dysbiosis が関与することを強く示唆するものである。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawamoto S 他 : Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* 41: 152-65 (2014).
2. Narushima S 他: Characterization of the 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived Clostridia. *Gut Microbes* 5: 1-7 (2014).
3. Said HS 他: Dysbiosis of Salivary Microbiota in Inflammatory Bowel Disease and Its Association With Oral Immunological Biomarkers. *DNA Res.* 21: 15-25 (2014).

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（平成26年度）

雑誌

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1	Manabu Araki, Takako Matsuoka, Katsuichi Miyamoto, Susumu Kusunoki, Tomoko Okamoto, <u>Miho Murata</u> , <u>Sachiko Miyake</u> , Toshimasa Aranami, <u>Takashi Yamamura</u> .	Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica	Neurology	82 (15)	1302- 1306	2014
2	Masakazu Nakamura, Takako Matsuoka, Norio Chihara, <u>Sachiko Miyake</u> , <u>Wakiro Sato</u> , Manabu Araki, Tomoko Okamoto, Youwei Lin, Masafumi Ogawa, <u>Miho Murata</u> , Toshimasa Aranami, <u>Takashi Yamamura</u>	Differential effects of fingolimod on B-cell populations in multiple sclerosis.	Multiple Sclerosis J	20 (10)	1371- 1380	2014
3	Niino M, Mifune N, Kohriyama T, Mori M, Ohashi T, Kawachi I, Shimizu Y, Fukaura H, Nakashima I, Kusunoki S, Miyamoto K, Yoshida K, Kanda T, Nomura K, <u>Yamamura T</u> , Yoshii F, Kira J, Nakane S, Yokoyama K, Matsui M, Miyazaki Y, Kikuchi S	Apathy/depression, but not subjective fatigue, is related with cognitive dysfunction in patients with multiple sclerosis	BMC neurology	14	3	2014
4	Kamachi F, Harada N, Usui Y, Sakanishi T, Ishii N, Okumura K, <u>Miyake S</u> , Akiba H.	OX40 ligand regulates splenic CD8(-) dendritic cell-induced Th2 responses in vivo.	Biochem Biophys Res Commun.	444	235- 240	2014
5	<u>Wakiro Sato</u>	Chemokine receptors on T cells in multiple sclerosis.	Clinical and Experimental Neuroimmunology	5(2)	162- 174	2014
6	<u>Satoh J</u> , Motohashi N, Kino Y, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Arai N, Nakamagoe K, Tamaoka A, Saito Y, Arima K.	LC3, an autophagosome marker, is expressed on oligodendrocytes in Nasu-Hakola disease brains.	Orphanet Journal of Rare Diseases	9	e68	2014
7	Choi SS, Lee HJ, Lim I, <u>Satoh J</u> , Kim SU.	Human astrocytes: Secretome profiles of cytokines and chemokines.	PLoS One	9 (4)	e92325	2014
8	Kawana N, Yamamoto Y, Kino Y, <u>Satoh J</u> .	Molecular network of NLRP3 inflammasome activation-responsive genes in a human monocyte cell line.	Austin Journal of Clinical Immunology	1 (4)	e1071	2014
9	<u>Satoh J</u> , Kino Y, Kawana N, Yamamoto Y, Ishida T, Saito Y, Arima K.	TMEM106B expression is reduced in Alzheimer's disease brains.	Alzheimer's Research and Therapy	6 (2)	e17	2014

10	<u>Satoh J</u> , Asahina N, Kitano S, Kino Y.	A comprehensive profile of ChIP-Seq-based PU.1/Sp1 target genes in microglia.	Gene Regulation and Systems Biology	8	127-139	2014
11	Ota M, Noda T, <u>Sato N</u> , Hattori K, Teraishi T, Horii H, Nagashima A, Shimoji K, Higuchi T, Kunugi H.	Characteristic distributions of regional cerebral blood flow changes in major depressive disorder patients: a pseudo-continuous arterial spin labeling (pCASL) study	J Affect Disord.	165	59-63	2014
12	<u>Shinji Oki</u>	Towards understanding the role of orphan nuclear receptor NR4A2 in Th17 cell-mediated CNS autoimmunity: An experimental approach using an animal model of multiple sclerosis	Clin. Exp. Neuroimmunol.	5(2)	137-148	2014
13	Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, Suda W, Atarashi K, Doi Y, Tsutsui Y, Qin H, Honda K, Okada T, <u>Hattori M</u> , Fagarasan S	Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis	Immunity	41	152-165	2104
14	Narushima S, Sugiura Y, Oshima K, Atarashi K, <u>Hattori M</u> , Suematsu M, Honda K	Characterization of the 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived Clostridia	Gut Microbes	5(3)	333-339	2014
15	Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K, Kim S, Kimura R, Iraha A, Ishida H, Fujita J, Mano S, Morita H, Dohi T, Oota H, <u>Hattori M</u>	Dysbiosis of Salivary Microbiota in Inflammatory Bowel Disease and Its Association With Oral Immunological Biomarkers	DNA Research	21	15-25	2014
16	<u>佐藤和貴郎</u>	慢性炎症性脱髄性神経炎 (CIDP)におけるT細胞ケモカイン受容体の解析	Periheral Nerve	25(2)	238-242	2014
17	<u>佐藤和貴郎</u>	多発性硬化症における脳脊髄液T細胞ケモカイン受容体解析	Jpn. J. Clin. Immunol.	37(2)	83-89	2014
18	<u>佐藤和貴郎</u> 、 <u>山村隆</u>	免疫動態	Clinical Neurosciences	32	1218-1221	2014
19	<u>大木 伸司</u> 、 <u>山村 隆</u>	多発性硬化症の動物モデル - 横断的アプローチによる病態解明と治療標的の探索 -	日本臨床	72(11)	1935-1940	2014
20	<u>服部正平</u>	ヒト腸内細菌叢のMetagenomics	Bio Clinica	29(8)	728-733	2014
21	<u>服部正平</u> 、西嶋 傑	ヒト腸内細菌マイクロバイオームの特徴	G. I. Research	22(2)	128-135	2014
22	<u>服部正平</u>	ヒト常在菌叢のメタゲノム解析	医学のあゆみ	249(5)	385	2014

研究成果の刊行物・別刷

Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica

A pilot study

OPEN ▲

Manabu Araki, MD, PhD
Takako Matsuoka, MD
Katsuichi Miyamoto,
MD, PhD
Susumu Kusunoki, MD,
PhD
Tomoko Okamoto, MD,
PhD
Miho Murata, MD, PhD
Sachiko Miyake, MD,
PhD
Toshimasa Aranami, MD,
PhD
Takashi Yamamura, MD,
PhD

Correspondence to
Dr. Yamamura:
yamamura@ncnp.go.jp

ABSTRACT

Objective: To evaluate the safety and efficacy of a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, tocilizumab (TCZ), in patients with neuromyelitis optica (NMO).

Methods: Seven patients with anti-aquaporin-4 antibody (AQP4-Ab)-positive NMO or NMO spectrum disorders were recruited on the basis of their limited responsiveness to their current treatment. They were given a monthly injection of TCZ (8 mg/kg) with their current therapy for a year. We evaluated the annualized relapse rate, the Expanded Disability Status Scale score, and numerical rating scales for neurogenic pain and fatigue. Serum levels of anti-AQP4-Ab were measured with AQP4-transfected cells.

Results: Six females and one male with NMO were enrolled. After a year of TCZ treatment, the annualized relapse rate decreased from 2.9 ± 1.1 to 0.4 ± 0.8 ($p < 0.005$). The Expanded Disability Status Scale score, neuropathic pain, and general fatigue also declined significantly. The ameliorating effects on intractable pain exceeded expectations.

Conclusion: Interleukin-6 receptor blockade is a promising therapeutic option for NMO.

Classification of evidence: This study provides Class IV evidence that in patients with NMO, TCZ reduces relapse rate, neuropathic pain, and fatigue. *Neurology*® 2014;82:1302-1306

GLOSSARY

Ab = antibody; **AQP4** = aquaporin-4; **AZA** = azathioprine; **EDSS** = Expanded Disability Status Scale; **IL** = interleukin; **IL-6R** = interleukin-6 receptor; **NMO** = neuromyelitis optica; **PB** = plasmablasts; **PSL** = prednisolone; **TCZ** = tocilizumab.

Neuromyelitis optica (NMO) is a relatively rare autoimmune disease that predominantly affects the spinal cord and optic nerve. Anti-aquaporin-4 antibody (AQP4-Ab), which is a disease marker of NMO, has an important role in causing the destruction of astrocytes that express AQP4.¹ Empirically, the use of disease-modifying drugs for multiple sclerosis, including interferon β , is not recommended for NMO,² which is consistent with the distinct pathogenesis of NMO and multiple sclerosis. We have recently described that plasmablasts (PB), which are a subpopulation of B cells, increased in the peripheral blood of patients with NMO and that PB are a major source of anti-AQP4-Ab among peripheral blood B cells.³ In addition, we observed that exogenous interleukin (IL)-6 promotes the survival of PB and their production of anti-AQP4-Ab in vitro. Given the increased levels of IL-6 in the serum and CSF during relapses of NMO,^{1,3} we postulated that blocking IL-6 receptor (IL-6R) pathways might reduce the disease activity of NMO by inactivating the effector functions of PB. A humanized anti-IL-6R monoclonal antibody, tocilizumab (TCZ) (Actemra/RoActemra), has been approved in more than 100 countries for use in the treatment of rheumatoid arthritis.⁴ Herein, we describe our clinical study that aimed to explore the efficacy of TCZ in NMO.

Editorial, page 1294

From the Multiple Sclerosis Center (M.A., T.O., S.M., T.A., T.Y.) and Department of Neurology (T.O., M.M.), National Center Hospital, and Department of Immunology, National Institute of Neuroscience (T.M., S.M., T.A., T.Y.), National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo; Department of Neurology (K.M., S.K.), Kinki University School of Medicine, Osaka; and Department of Pediatrics (T.M.), Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Japan.

Go to Neurology.org for full disclosures. Funding information and disclosures deemed relevant by the authors, if any, are provided at the end of the article. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial No Derivative 3.0 License, which permits downloading and sharing the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially.

Table Demographics of the patients

	Patient						
	1	2	3	4	5	6	7
Age, y/sex	37/F	38/F	26/F	31/M	55/F	62/F	23/F
Age at onset, y	23	27	21	12	38	60	21
Anti-AQP4-Ab	+	+	+	+	+	+	+
Myelitis	+	+	+	+	+	+	-
Optic neuritis	+	+	+	+	+	+	+
EDSS score	3.5	6.5	3.5	6.0	6.5	6.5	3.0
Total no. of relapses	20	9	6	16	20	3	7
ARR before TCZ	3	2	2	2	3	3	5
Immunotherapies for exacerbations	IVMP, PLEX	IVMP, PLEX	IVMP, PLEX	IVMP, OBP, PLEX	IVMP, PLEX	IVMP, PLEX	IVMP, PLEX
Past immunotherapies	IFN β , IVIg	IFN β	—	IFN β , MITX	IFN β , AZA	—	AZA
Present immunotherapies	PSL, AZA	AZA	PSL	PSL, AZA	PSL, CyA	PSL, CyA	PSL, tacrolimus
Neuropathic pain (e.g., girdle pain), NRS	4	4	2	4	4	3	0
General fatigue, NRS	5	8	6	7	5	3	9
Pain and antispasticity medication	GBP, CZP, NTP, NSAID	CZP, mexiletine, NTP, tizanidine, NSAID	—	CBZ, baclofen, NSAID	CBZ	PGB	—

Abbreviations: AQP4-Ab = aquaporin-4 antibody; ARR = annualized relapse rate; AZA = azathioprine; CBZ = carbamazepine; CZP = clonazepam; CyA = cyclosporine; EDSS = Expanded Disability Status Scale; GBP = gabapentin; IFN β = interferon β ; IVIg = IV immunoglobulin; IVMP = IV methylprednisolone; MITX = mitoxantrone; NRS = numerical rating scale; NSAID = nonsteroidal anti-inflammatory drug; NTP = Neurotropin (an extract from the inflamed skin of vaccinia virus-inoculated rabbits); OBP = oral betamethasone pulse therapy; PGB = pregabalin; PLEX = plasma exchange; PSL = prednisolone; TCZ = tocilizumab.

METHODS Level of evidence. The aim of this Class IV evidence study was to evaluate the effect and safety of a monthly injection of TCZ (8 mg/kg) with their current therapy in patients with NMO. We evaluated the adverse events based on Common Terminology Criteria for Adverse Events, version 4.0.

Standard protocol approvals, registrations, and patient consents. All patients gave written informed consent before the first treatment with TCZ. The institutional ethical standards committee on human experimentation approved this clinical study. The study is registered with University Hospital Medical Information Network Clinical Trials Registry, numbers UMIN000005889 and UMIN000007866.

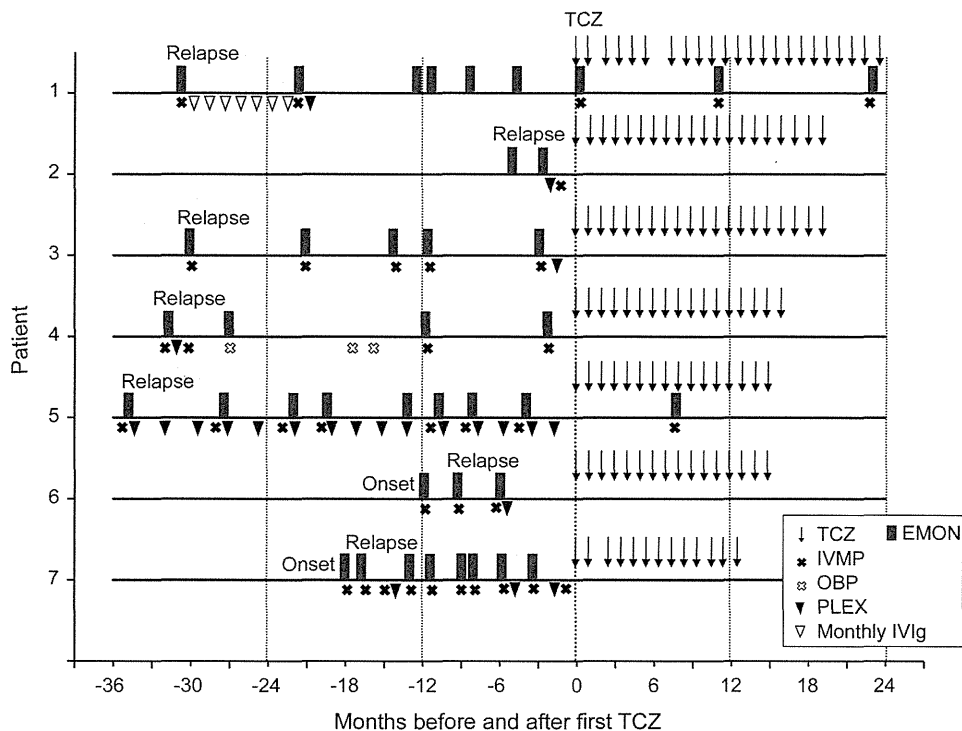
Patients and treatment. Seven patients who met the diagnostic criteria of NMO in 2006 were enrolled after providing informed consent (table). Results of chest x-rays, interferon γ release assays, and plasma 1,3- β -D-glucan measurement excluded latent tuberculosis and fungal infection. All of the patients had been treated with combinations of oral prednisolone (PSL) and immunosuppressants, including azathioprine (AZA). Nevertheless, they had at least 2 relapses during the year before enrollment (figure 1). Among their past immunomodulatory medications, interferon β had been prescribed in 4 patients before the anti-AQP4-Ab assay became available. Although symptomatic treatments had been provided, the patients experienced general fatigue and intractable pain in their trunk and limbs. There were no abnormalities in their routine laboratory blood tests. Neither pleocytosis nor increased levels of IL-6 were observed in the CSF. MRI revealed high-intensity signals in the optic nerves and longitudinally extensive lesions in the spinal cord. All patients

except one had scattered brain lesions. A monthly dose (8 mg/kg) of TCZ was added to the patients' oral corticosteroid and immunosuppressive drug regimen.

Clinical and laboratory assessment. As clinical outcome measures, we evaluated alterations in the number of relapses, Expanded Disability Status Scale (EDSS) scores, and pain and fatigue severity scores (numerical rating scales). A relapse was defined as an objective exacerbation in neurologic findings that lasted for longer than 24 hours with an increase in the EDSS score of more than 0.5. Brain and spinal cord MRI scans were examined every 4 or 6 months. CSF examinations, sensory-evoked potentials, and visual-evoked potentials were also evaluated at the time of entry into the study and 12 months later. We measured serum anti-AQP4-Ab levels by evaluating the binding of serum immunoglobulin G to AQP4 transfectants, as previously described.⁵ All outcome measures were analyzed with nonparametric Wilcoxon rank-sum tests, with the use of 2-tailed statistical tests at a significance level of 0.05.

RESULTS After starting TCZ treatment, the total number of annual relapses in the patients significantly reduced (figures 1 and 2). Notably, 5 of the 7 patients were relapse-free after starting TCZ. The relapses observed in patients 1 and 5 were mild and their symptoms recovered after IV methylprednisolone. On average, the annualized relapse rate reduced from 2.9 ± 1.1 (range, 2–5) during the year before study to 0.4 ± 0.8 (range, 0–2) during the year after

Figure 1 Clinical course of the patients before and after tocilizumab treatment



The zero on the x-axis represents the first administration of tocilizumab (TCZ). Dark gray bars: exacerbations of myelitis or optic neuritis (EMON); downward arrow: TCZ treatment; black X: IV methylprednisolone (IVMP); white X: oral betamethasone pulse (OBP) therapy; black triangle: plasma exchange (PLEX); white triangle: IV immunoglobulin (IVIg). After receiving 12 injections, all patients continued treatment with TCZ by entering an extension study that evaluates the long-term safety and efficacy of TCZ. We showed the clinical status after completion of the 1-year study to indicate the continuation of remission.

starting TCZ (figure 2). The EDSS score decreased modestly but significantly from 5.1 ± 1.7 (range, 3.0–6.5) to 4.1 ± 1.6 (range, 2.0–6.0) at 12 months. The chronic neurogenic pain in their trunk and extremities, which is characteristic of NMO^{6,7} (table), gradually lessened after the patients started TCZ. Consequently, the numerical rating scale for pain reduced from 3.0 ± 1.5 upon study entry to 1.3 ± 1.3 after 6 months and 0.9 ± 1.2 after 12 months. General fatigue also improved from 6.1 ± 2.0 to 3.9 ± 2.1 at 6 months and 3.0 ± 1.4 at 12 months. The MRI scans, sensory- and visual-evoked potentials, and CSF observations did not show any interval changes. Serum anti-AQP4-Ab levels represented by the relative mean fluorescence intensity were significantly reduced (figure 2E).

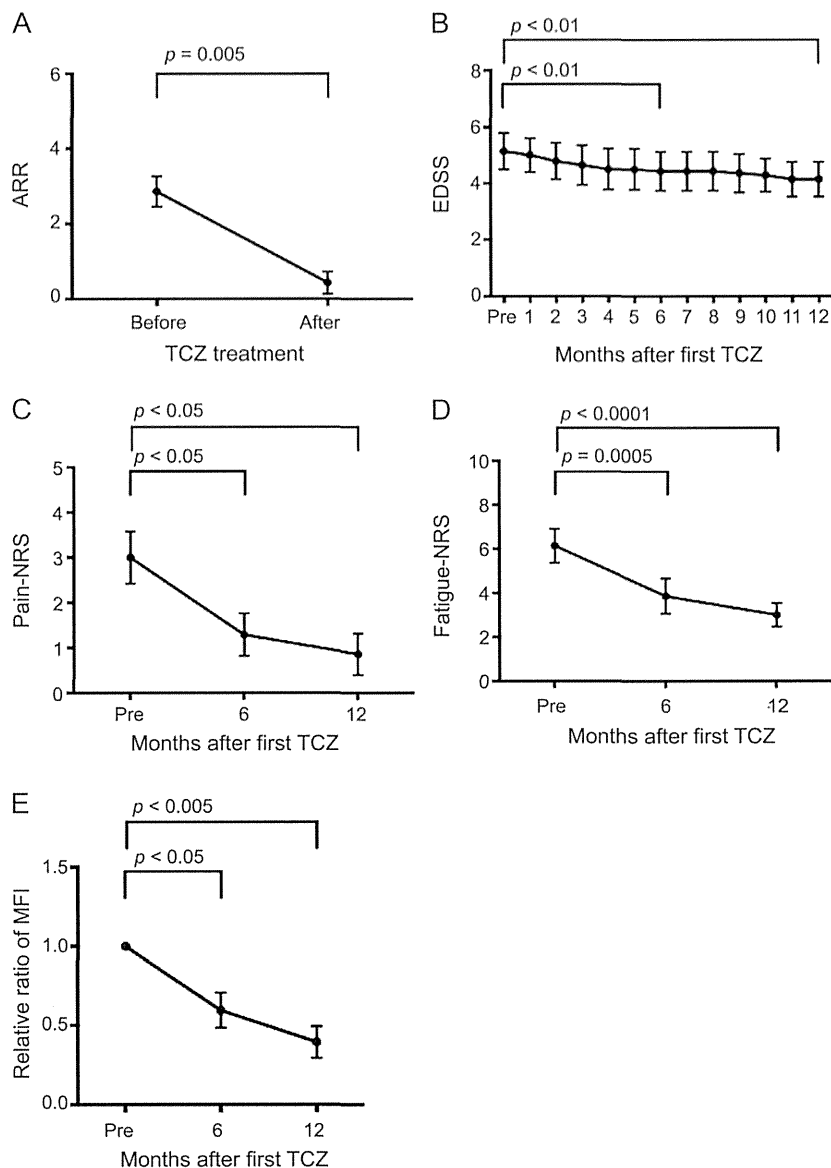
Adverse events included upper respiratory infections (patients 1 and 7), acute enterocolitis (patients 1 and 4), acute pyelonephritis (patient 1), leukocytopenia and/or lymphocytopenia (patients 1, 4, and 7), anemia (patients 3 and 7), and a slight decline in systolic blood pressure (patient 1). However, none of the events was severe. Oral PSL and AZA were tapered in

patients 1, 3, 4, and 7, resulting in a reduction of the mean doses (PSL from 19.5 ± 7.6 to 8.8 ± 5.6 mg/d [average of patients 1, 3, 4, and 7], AZA from 37.5 to 5.4 mg/d [average of patients 1 and 4]).

DISCUSSION Pain management is a difficult problem in patients with NMO. In fact, a retrospective study of 29 patients with NMO who experienced pain has documented that 22 of the 29 patients were taking pain medications, but none of them rated their current pain as 0 out of 10 on a 10-point scale.⁶ In the present study, the intractable pain reduced gradually after the patients started TCZ treatment. After 6 or 12 months of therapy, 3 of the 6 patients with pain were completely free of pain. These results suggested a role of IL-6 in NMO pain and the possible merits of the use of TCZ in clinical practice as a pain reliever.

The pathophysiology of neurogenic pain is now understood in the context of interactions between the immune and nervous systems,⁸ which involve proinflammatory cytokines such as IL-6 as well as immune cells, activated glia cells, and neurons. Supportive for the role of IL-6 in pain, recent work in

Figure 2 Effects of tocilizumab on clinical and immunologic parameters



(A) Annualized relapse rate (ARR) before and after tocilizumab (TCZ) treatment. (B) Expanded Disability Status Scale (EDSS) score during the 1-year study period. Pain severity (numerical rating scale [NRS]) (C) and fatigue severity (D) scores before, 6 months after, and 12 months after the start of TCZ treatment. The dots and I bars indicate means \pm SEM. We analyzed only data obtained during the first year of TCZ treatment. (E) The alterations in the serum anti-aquaporin-4 antibody (AQP4-Ab) were evaluated by the relative ratio of the mean fluorescence intensity (MFI), which was based on the MFI before TCZ treatment. Serum anti-AQP4-Ab detection assay was performed as described previously^{3,5} with minor modifications. In brief, optimally diluted serum was added to human AQP4-expressing Chinese hamster ovary (CHO) cells. CHO cell-bound anti-AQP4-Ab was detected using fluorescein isothiocyanate-anti-human immunoglobulin G antibody by flow cytometry. For comparison, the MFI of each sample was divided by the MFI of the sample before the start of TCZ treatment.

rodents showed that gp130 expressed by nociceptive neurons might have a key role in pathologic pain.⁹ Although expression of membrane-bound IL-6R is restricted to hepatocytes, neutrophils, and subsets of T cells, the gp130, ubiquitously expressed in cellular membranes, can transduce IL-6R signaling via binding to the IL-6/soluble IL-6R complex.⁴ This

indicates that IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6R could be pivotal in causing pain in NMO, although alternative possibilities cannot be excluded.

TCZ treatment recently showed efficacy for patients with aggressive NMO who were refractory to the anti-CD20 antibody rituximab.¹⁰ The efficacy of TCZ could result from its effect on IL-6-dependent inflammatory

processes, involving CD20-negative PB, pathogenic T cells, and regulatory T cells. This work, however, does not restrict the use of TCZ in serious NMO. Although the need for monitoring latent infection and adverse events is obvious, we propose that the use of TCZ may be considered at an early stage of NMO before disability or a lower quality of life becomes evident.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

T.Y., S.M., S.K., M.M., and M.A.: design and conceptualization of the study. M.A., K.M., T.O., and T.Y.: analysis and internalization of the data. T.M. and T.A.: flow cytometry analysis and anti-AQP4-Ab assay. M.A. and T.Y.: drafting and revising of the manuscript. T.Y.: supervising the entire project.

STUDY FUNDING

Supported by the Health and Labour Sciences Research Grants on Intractable Diseases (Neuroimmunological Diseases) and on Promotion of Drug Development from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

DISCLOSURE

M. Araki has received honoraria from Novartis. T. Matsuoka reports no disclosures relevant to the manuscript. K. Miyamoto has received honoraria from Novartis, Bayer, and Biogen Idec. S. Kusunoki serves as an editorial board member of *Experimental Neurology*, *Journal of Neuroimmunology*, and *Neurology & Clinical Neuroscience* (associate editor). He received honoraria from Teijin Pharma, Nihon Pharmaceuticals, Japan Blood Products Organization, Novartis Pharma, Dainippon Sumitomo Pharma, Kyowa Kirin, Asahi Kasei, Bayer, Sanofi, and GlaxoSmithKline. He is funded by research grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, and grants from the Japan Science and Technology Agency and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan. He received research support from Novartis, GlaxoSmithKline, Dainippon Sumitomo Pharma, Teijin Pharma, Astellas, Sanofi, Japan Blood Products Organization, and Nihon Pharmaceuticals. T. Okamoto reports no disclosures relevant to the manuscript. M. Murata received honoraria for consulting and/or lecturing from GlaxoSmithKline Co., Ltd., Boehringer Ingelheim Co., Ltd., Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., Novartis Pharma, and Hisamitsu Pharma. S. Miyake has received speaker honoraria from Biogen Idec, Pfizer Inc., and Novartis Pharma. T. Aranami reports no disclosures relevant to the manuscript. T. Yamamura has served on scientific advisory boards for Biogen Idec and Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.; has received research support from Ono Pharmaceutical Co., Ltd., Chugai Pharmaceutical

Co., Ltd., Teva Pharmaceutical K.K., Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, and Asahi Kasei Kuraray Medical Co., Ltd.; has received speaker honoraria from Novartis Pharma, Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., Santen Pharmaceutical Co., Ltd., Abbott Japan Co., Ltd./Eisai Co., Ltd., Biogen Idec, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Bayer Holding Ltd., and Astellas Pharma Inc. Go to Neurology.org for full disclosures.

Received September 4, 2013. Accepted in final form December 2, 2013.

REFERENCES

1. Jarius S, Wildemann B. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. *Nat Rev Neurol* 2010;6:383–392.
2. Okamoto T, Ogawa M, Lin Y, et al. Treatment of neuromyelitis optica: current debate. *Ther Adv Neurol Disord* 2008;1:5–12.
3. Chihara N, Aranami T, Sato W, et al. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:3701–3706.
4. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012;52:199–219.
5. Araki M, Aranami T, Matsuoka T, et al. Clinical improvement in a patient with neuromyelitis optica following therapy with the anti-IL-6 receptor monoclonal antibody tocilizumab. *Mod Rheumatol* 2013;23:827–831.
6. Qian P, Lancia S, Alvarez E, et al. Association of neuromyelitis optica with severe and intractable pain. *Arch Neurol* 2012;69:1482–1487.
7. Kanamori Y, Nakashima I, Takai Y, et al. Pain in neuromyelitis optica and its effect on quality of life: a cross-sectional study. *Neurology* 2011;77:652–658.
8. Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, et al. The role of glia and immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Pract* 2010;10:167–184.
9. Andratsch M, Mair N, Constantin CE, et al. A key role for gp130 expressed on peripheral sensory nerves in pathological pain. *J Neurosci* 2009;29:13473–13483.
10. Ayzenberg I, Kleiter I, Schröder A, et al. Interleukin 6 receptor blockade in patients with neuromyelitis optica nonresponsive to anti-CD20 therapy. *JAMA Neurol* 2013;70:394–397.

The Premier Event for *the* Latest Research on Concussion

Registration is now open for The Sports Concussion Conference—the premier event on sports concussion from the American Academy of Neurology—set for July 11 through 13, 2014, at the Sheraton Chicago Hotel & Towers in Chicago. You won't want to miss this one-of-a-kind opportunity to learn the very latest scientific advances in diagnosing and treating sports concussion, post-concussion syndrome, chronic neurocognitive impairment, and controversies around gender issues and second impact syndrome from the world's leading experts on sports concussion. Early registration ends June 9, 2014. Register today at AAN.com/view/ConcussionConference.