

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09337

研究課題名(和文) 免疫介在性脳炎・脳症患者の血清中に存在する抗血管内皮抗体に関する研究

研究課題名(英文) The study of anti-endothelial cell autoantibodies in patients with autoimmune encephalitis

研究代表者

犬塚 貴 (Inuzuka, Takashi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：50184734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト大脳微小血管内皮細胞を抗原とする免疫沈降と質量分析により、視神経脊髄炎患者の血清中に存在する抗血管内皮抗体の認識抗原として、補体成分であるC1qを同定した。また血清抗C1q抗体価は、血液脳関門の透過性の指標となる、髄液/血清アルブミン比と正の相関を示し、抗C1q抗体が血液脳関門の破綻に關与する可能性が示唆された。一方、NMDAR脳炎11名と健常者15名において抗C1q抗体価を比較検討したところ、NMDAR脳炎の血清中で有意に抗体価の上昇を認めた。NMDAR脳炎や視神経脊髄炎では、血清中の抗C1q抗体価の上昇が、血液脳関門の破綻による病的自己抗体の中樞移行に關与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified the complement 1q (C1q) as a target antigen of the anti-endothelial cell autoantibodies in the serum samples of patients with neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) by immunoprecipitation using cultured human brain microvascular endothelial cell as the antigen source, followed by LC/MS/MS analysis. Serum anti-C1q autoantibody levels during the acute phase of NMOSD patients correlated with the CSF/serum albumin ratio, which is a marker of blood brain barrier (BBB) integrity. Then, we compared serum anti-C1q autoantibody levels between the 11 patients with NMDAR encephalitis and 15 healthy subjects. Serum anti-C1q autoantibody levels in patients with NMDAR encephalitis were significantly higher than those in healthy subject. We speculate that increased serum anti-C1q autoantibody levels are associated with BBB permeability, and contribute to pathogenic autoantibody influx into the CNS of autoimmune encephalitis.

研究分野：免疫性神経疾患

キーワード：抗血管内皮抗体 血液脳関門 自己免疫性脳炎 補体

1. 研究開始当初の背景

これまでに病原体の直接浸潤によらず急性～亜急性に経過する免疫介在性脳炎・脳症に関しいくつかの病型が報告されている。具体的には、1) 膠原病や全身性自己免疫疾患に合併する脳症：CNS ループス、神経ペーチェット病など 2) 細胞膜表面抗原に対する抗神経抗体を有する脳炎：抗 NMDAR 脳炎など、3) 狭義の急性脳症：インフルエンザ脳症を含む急性壊死性脳症、痙攣重積性脳症などが該当する。これらに共通する病態は、脳内に炎症細胞浸潤は認めず、血液脳関門の破綻による脳浮腫を認めることとされている。血液脳関門の破綻の原因としては、遺伝的素因を背景とした、高サイトカイン血症などによる大脳微小血管内皮細胞の機能障害が示唆されている。一方、最近では一部の免疫介在性脳炎・脳症において、**ephrin type B receptor 2** 抗体など、病態との関連が示唆される抗血管内皮抗体の報告もなされている^{1,2)}。近年、一部の免疫介在性脳炎患者に特異的な神経細胞膜表面抗原を認識する抗神経抗体の存在が相次いでなされてきた³⁾。また、以前より CNS ループス患者における、精神神経症状に密接に関連する抗神経抗体の存在が示唆されている⁴⁾。これらの抗神経抗体は、神経細胞に直接的な影響を及ぼす可能性が示唆されており、その中枢移行において、血液脳関門の破綻は不可欠である。我々は、これらの免疫介在性脳炎・脳症における、血液脳関門の破綻に関連する特異的な抗血管内皮抗体が存在する可能性を推測し、本研究を開始した。

2. 研究の目的

免疫介在性脳炎・脳症の患者血清中に存在する、大脳微小血管内皮細胞に対する自己抗体を検出し、その認識抗原蛋白を同定することにより、同疾患の病態において重要な役割を担うとされている血液脳関門の破綻との関連性を検討し、同疾患の病態機序の解明と診断・治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

- [1] 免疫介在性脳炎・脳症患者の血清を用いて、ヒト大脳微小血管内皮培養細胞に対して免疫染色を行い、抗血管内皮抗体を検出した。
- [2] 免疫染色で抗血管内皮抗体が陽性となった患者血清中より、免疫染色で用いたヒト大脳微小血管内皮培養細胞を抗原とする免疫沈降法とその後の SDS-PAGE により抗血管内皮抗体を検出する。得られた特異的なバンドを切り出して、その後 LC-MS/MS 解析により抗原蛋白を同定した。
- [3] 同定された抗血管内皮抗体の特異性を検討することを目的として、ELISA 法により自己免疫性脳炎・脳症患者多数例と対照患者における抗体価を測定し、比較

検討した。

- [4] 特異性が認められた抗血管内皮抗体のヒト大脳微小血管内皮細胞に及ぼす影響につき、検討した。

4. 研究成果

[1] ヒト大脳微小血管内皮細胞を用いた免疫染色による抗血管内皮抗体の検出

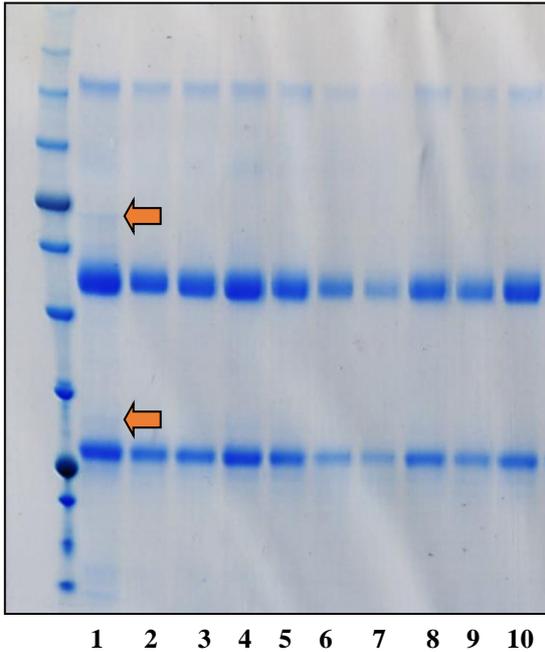
ヒト大脳微小血管内皮細胞を live cell の状態で、対象患者の血清を用いた免疫染色を行い、抗血管内皮抗体を検出した。はじめに NMDAR 脳炎 10 名の血清を用い、免疫染色を行った。その結果、1 名を除く 9 名の NMDAR 脳炎患者の血清で、健常者の血清にはみられない、ヒト大脳微小血管内皮細胞に対する染色性を認めた。核に染色性を認めた症例が 7 例、細胞質に認めた症例が 4 例、核小体に認めた症例が 2 例であった。ヒト大脳微小血管内皮細胞膜表面に明らかな染色性を認めた症例はなかった。多くの NMDAR 脳炎患者の血清中に、ヒト大脳微小血管内皮細胞に反応する抗血管内皮抗体が存在する可能性が示唆された。さらにその後、同様の方法で、その他の自己免疫性脳炎 15 名、中枢神経ループス(NPSLE) 20 名、多発性硬化症 15 名、視神経脊髄炎 (NMOSD) 15 名の血清を用い抗血管内皮抗体の検出を行った。同様に多数例の血清がヒト大脳微小血管内皮細胞に対する染色性を示したが、このうちの 2 名の NMOSD 患者において、大脳微小血管内皮細胞の膜表面を認識する抗血管内皮抗体を検出した。

[2] 免疫沈降・SDS-PAGE・質量分析による抗血管内皮抗体の認識抗原蛋白の同定

[1]の免疫染色で抗血管内皮抗体が陽性となった患者の血清を用いて、同じ培養細胞を抗原とする免疫沈降を行い、その沈降物を SDS-PAGE で解析したところ、一部の患者で、健常者およびその他疾患患者には認めないバンドを検出した。その結果、NPSLE 患者の血清を用いた免疫沈降と質量分析により Dihydropolypyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial (DLAT) と Proteasome activator complex subunit 3 (PSME3) を同定した。DLAT は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 (PDC) の中心的な触媒作用をもつ分子であり、PDC-E2 とも呼ばれている。PDC-E2 は、原発性胆汁性肝硬変で高率に陽性となる抗ミトコンドリア M2 抗体の標的抗原として知られている。一方、PSME3 はプロテアソーム活性化因子であるが、現時点においてこれらの抗原の大脳微小血管内皮細胞における役割は明らかにされていない。また、同じ手法を用い NMOSD 患者より補体成分の C1q に対する自己抗体を検出した。

図 1) 免疫沈降後の SDS-PAGE 画像 NMOSD 患者 (レーン 1) において特異的な

バンド (矢印) を認めた



[3] 抗血管内皮抗体の特異性の検討

[2]の結果、同定した抗血管内皮抗体のうち、NMOSD患者において同定した抗C1q抗体に着目して特異性の検討を行った。ELISA法を用い、15名のNMOSD患者、25名の自己免疫性脳炎患者(11名がNMDAR脳炎)、13名の多発性硬化症患者、15名の健常者の血清中の抗C1q抗体価を測定した。結果、NMOSD患者とNMDAR脳炎患者における急性期の抗C1q抗体価は、健常者と比較し有意に高値であった。また、その抗体価は、血液脳関門(BBB)の透過性の指標である髄液/血清アルブミン比(Q-alb)と正の相関関係を示したことから、NMOSDやNMDAR脳炎の急性期にみられるBBBの破綻と抗C1q抗体が、関連している可能性が示唆された。

図2)NMDAR脳炎患者では優位に血清抗C1q抗体価の上昇がみられた

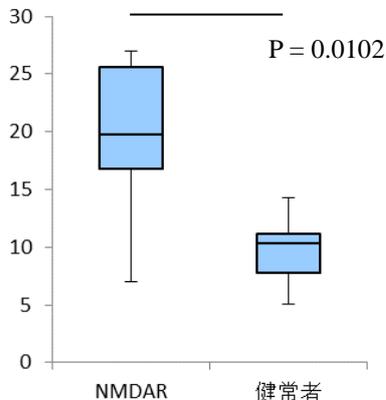
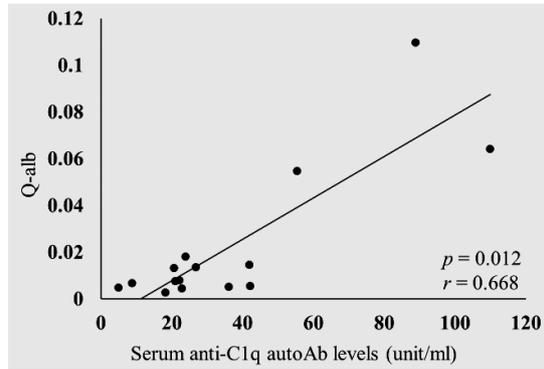


図3)血清抗C1q抗体価はQ-albと相関した(NMOSD患者データ)



[4] 抗C1q抗体が血管内皮細胞に及ぼす影響に関する検討

次に、抗C1q抗体が脳微小血管内皮細胞に及ぼす影響を検討するため、ヒト脳微小血管内皮細胞を用いて細胞接着因子であるClaudin 5の発現量の変化を検討した。細胞にC1qを加えることにより、Claudin 5の発現量の増加がみられた。一方、血清抗C1q抗体価が高値のNMOSD患者の血清を単独もしくはC1q添加後に加えることにより、ともにClaudin 5の発現量の低下がみられた。C1qは、ヒト脳微小血管内皮細胞において、wnt/beta-catenin signalを介し、claudin-5の発現に関与しているという報告があり⁵⁾、NMOSDおよびNMDAR脳炎患者の急性期血清中で上昇を認めた抗C1q抗体が、C1qと結合することにより、C1qのwnt/beta-catenin signalの活性化を阻害することにより、Claudin 5の発現量の低下と、その後の血液脳関門の破綻に関与し、抗AQP4抗体や抗NMDAR抗体などの病的抗体の中脳神経内への移行をもたらす可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

<引用文献>

1. Shirai T, et al., J Neuroinflammation 10; 2013: 128.
2. Conti F, et al., Arthritis Res Ther. 6; 2004: 366-372.
3. Dalmau J, et al. Lancet Neurol. 7; 2008: 1091-1098.
4. Kowal C, DeGiorgio LA et al. Immunity 21; 2004: 179-188.
5. Naito et al. Cell 149; 2012: 1298-1313.

[雑誌論文] (計7件)

- ① Kimura A, Yoshikura N, Hayashi Y, Inuzuka T. Cerebrospinal Fluid C-C Motif Chemokine Ligand 2 Correlates with Brain Atrophy and Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease. J Alzheimers Disease, 査読有, 61; 581-588: 2018. 10.3233/JAD-170519.
- ② Kimura A, Takemura M, Saito K, Serrero G, Yoshikura N, Hayashi Y, Inuzuka T. Increased cerebrospinal fluid progranulin

correlates with interleukin-6 in the acute phase of neuromyelitis optica spectrum disorder. Journal of Neuroimmunology, 査読有, 305; 175-181: 2017. 10.1016/j.jneuroim.2017.01.006.

- ③ Kimura A, Takemura M, Kuniaki S, Yoshikura N, Hayashi Y, Harada N, Nishida H, Nakajima H, Inuzuka T. Comparison of cerebrospinal fluid profiles in Alzheimer's disease with multiple cerebral microbleeds and cerebral-amyloid angiopathy related inflammation. Journal of Neurology, 査読有, 264; 373-381: 2017. 10.1007/s00415-016-8362-2.
- ④ Kimura A, Takemura M, Kuniaki S, Yoshikura N, Hayashi Y, Inuzuka T. Association between naturally occurring anti-amyloid β autoantibodies and medial temporal lobe atrophy in Alzheimer's disease. Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry, 査読有, 88; 126-131: 2017. 10.1136/jnnp-2016-313476.
- ⑤ Hayashi Y, Iwasaki Y, Yoshikura N, Asano T, Mimuro M, Kimura A, Satoh K, Kitamoto T, Yoshida M, Inuzuka T. An autopsy-verified case of steroid-responsive encephalopathy with convulsion and a falsepositive result from the real-time quaking-induced conversion assay. Prion, 査読有, 11; 284-292: 2017. 10.1080/19336896.2017.1345416.
- ⑥ Yoshikura N, Kimura A, Hayashi Y, Inuzuka T. Anti-C1q autoantibodies in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. J Neuroimmunology, 査読有, 310; 150-157: 2017. 10.1016/j.jneuroim.2017.07.006.
- ⑦ Kimura A, Yoshikura N, Koumura A, Hayashi Y, Kobayashi I, Yano T, Inuzuka T. Identification of target antigens of naturally occurring autoantibodies in cerebrospinal fluid. J Proteomics, 査読有, 128; 450-457: 2015. 10.1016/j.jprot.2015.05.005.

[学会発表] (計 11 件)

1. 木村 曉夫, 吉倉延亮, 櫻井岳朗, 林 祐一, 犬塚 貴. 自己免疫性辺縁系脳炎における予後関連因子の検討. 第 29 回神経免疫学会学術集会. 2017 年.
2. 吉倉延亮, 木村 曉夫, 林 祐一, 横井紀彦, 深田優子, 深田正紀, 犬塚 貴. 弧発性小脳失調症に関連する神経細胞膜表面抗原を認識する自己抗体の検索. 第 29 回神経免疫学会学術集会. 2017 年.
3. Yoshikura N, Kimura A, Hayashi Y, Inuzuka T. Anti-C1q autoantibodies in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders may play a role of BBB dysruption and complement activation. XXIII World Congress of Neurology. 2017.

4. Kimura A, Yoshikura N, Hayashi Y, Inuzuka T. Association between cerebrospinal fluid cytokines and naturally occurring anti-amyloid- β autoantibodies, and brain atrophy and cognitive impairment in Alzheimer's disease. XXIII World Congress of Neurology. 2017.
5. Kimura A, Yoshikura N, Hayashi Y, Inuzuka T. Characterization of Anti-Amyloid β Autoantibodies and Cerebrospinal Fluid Markers of Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Inflammation. The 68th Annual Meeting of American Academy of Neurology. 2016.
6. 木村 曉夫, 竹村 正男, 吉倉 延亮, 林 祐一, 犬塚 貴. S/NMO における髄液プログランニューリンの検討. 第 28 回日本神経免疫学会学術集会. 2016 年.
7. 吉倉 延亮, 木村 曉夫, 安西 将大, 竹腰 顕, 山田 恵, 林 祐一, 犬塚 貴. MDA 受容体抗体陽性脳炎における多彩な自律神経症状とその対応. 第 28 回日本神経免疫学会学術集会. 2016 年.
8. 木村 曉夫, 安西将大, 瀬川 一, 竹腰 顕, 原田斉子, 吉倉延亮, 香村彰宏, 山田 恵, 林 祐一, 犬塚 貴. 自己免疫性脳炎における抗神経抗体の同定. 第 27 回日本神経免疫学会学術集会. 2015 年.
9. 吉倉延亮, 木村 曉夫, 村上宗玄, 竹腰 顕, 山田 恵, 林 祐一, 犬塚 貴. 自己免疫性神経疾患における新規抗血管内皮抗体の同定. 第 27 回日本神経免疫学会学術集会. 2015 年.
10. 吉倉延亮, 木村 曉夫, 竹腰 顕, 山田 恵, 林 祐一, 犬塚 貴. 自己免疫性神経疾患における新規抗血管内皮抗体の同定. 第 57 回日本神経学会学術大会. 2016 年.
11. 木村 曉夫, 吉倉延亮, 竹腰 顕, 山田 恵, 林 祐一, 犬塚 貴. 辺縁系脳炎における原因別臨床像の比較検討. 2015 年.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

犬塚 貴 (INUZUKA, Takashi)
岐阜大学・大学院医学系研究科・
非常勤講師
研究者番号：50184734

(2)研究分担者

木村 暁夫 (KIMURA, Akio)
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00362161

(3)研究分担者

矢野 竹男 (YANO, Takeo)
三重大学・地域イノベーション学研究科・
教授
研究者番号：00569197