

令和元年6月21日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09697

研究課題名(和文)免疫介在性イオンチャネル病の病態解析および新規抗原の解明

研究課題名(英文) Analysis of pathophysiology of immune-mediated ion channel disease and elucidation of novel antigens

研究代表者

渡邊 修 (WATANABE, OSAMU)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：30511802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アイザックス症候群は、いままで、系統的な研究がされていなかったが、今回、同疾患の臨床徴候とLGI1、Caspr-2などの自己抗体との関連について解析した。特に、疼痛、自律神経および中枢神経障害との関連について検討した。IS症候群の臨床症状は多岐にわたり、不均一であり、自己抗体との関連については限定的であったが、Caspr-2抗体とLGI1抗体を共に有する場合は、より重篤でモルヴァン症候群の臨床像をとることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チャネル蛋白に加え、チャネルと複合体を形成する蛋白抗原に着目した。候補遺伝子の一つずつCBAで検討するのだけではなく、一例ずつことなる複数の抗原について網羅的に解析する。この方法は効率が良いだけでなく、未知の新規抗原を同定することが出来る。一自己抗体一疾患という今までの単純なパラダイムではなく、症例毎に、自己抗体の組み合わせやその量比による症状に差異を解析することが出来る。

研究成果の概要(英文)：Voltage-gated potassium channel (VGKC) complex auto-antibodies were initially identified in Isaacs' syndrome (IS), which is characterized by muscle cramps and neuromyotonia. These antibodies were subsequently identified in patients with Morvan's syndrome (MoS). The antibodies have also been detected in a patient with limbic encephalopathy (LE) presenting with prominent amnesia and frequent seizures. Autoantibodies against the extracellular domains of VGKC complex proteins, leucine-rich glioma-inactivated 1 (LGI1), and contactin-associated protein-2 (Caspr2), occur in patients with IS, MoS, and LE. Novel information has been generated regarding autoantibody disruption of the physiological functions of target proteins. LGI1 antibodies neutralize the interaction between LGI1 and ADAM22, thereby reducing the synaptic AMPA receptors. It may be that the main action is on inhibitory neurons, explaining why the loss of AMPA receptors causes amnesia, neuronal excitability and seizures.

研究分野：神経内科学 神経免疫学

キーワード：筋けいれん ニューロミオトニア アイザックス症候群 抗VGKC複合体抗体 病態マーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の電位依存性カリウムチャネル (VGKC 抗体) に対する自己抗体は、末梢神経の興奮性亢進を引き起こし、筋けいれん、手指の開排制限を主訴とするアイザックス症候群 (IS) の原因自己抗体である。研究代表者らは、この抗 VGKC 抗体が、二価の抗体として作用し、二つの VGKC をカップリングすることで、内在化を惹起し、神経細胞表面の VGKC の総数を減じることで、総和として VGKC の機能を減じることを明らかにしてきた。また、この抗 VGKC 抗体は、末梢神経系の疾患である IS のみならず、筋けいれんに多彩な自律神経機能障害や重度の不眠、複雑な夜間行動異常、幻視、記憶力障害など中枢神経症状を特徴とするモルヴァン症候群や自己免疫性辺縁系脳炎の一部に關与する。さらに従来、デンドロトキシンを用いた RIA 法で測定していた自己抗体は、VGKC そのもののみならず、leucine rich glioma inactivated 1 protein (LGI1)、contactin-associated protein 2 (Caspr2)、および contactin 2 を標的とするポリクローナルな抗体であることが明らかになった。この結果を踏まえ、研究代表者らは、効率よく、網羅的に自己抗体を検出する方法として、ラット海馬神経細胞との反応性でスクリーニング後、live cell のまま免疫沈降を行い、主要抗原について直接バンドを切り取り質量分析で抗原を確定させる手法を確立した。また疫学的研究の結果を踏まえ、IS の診断基準を作成し、IS の難病指定に寄与したが、抗 VGKC 複合体抗体の陽性率は約 30% であり、未知の抗原に対する自己抗体の存在が示唆されている。上記の方法を後根神経節細胞に置き換えた新たな病態な一カを確立し、免疫介在性チャネル疾患の病態メカニズムを明らかにする。

2. 研究の目的

先行研究で、VGKC 複合体抗体の關連する中枢神経障害について新規標的抗原を明らかにし、また LGI-1 抗体がシナプス後膜において AMPA 型グルタミン酸受容体を減少させるメカニズムを明らかにした。本研究では、抗電位依存性カリウムチャネル (VGKC) 抗体關連神経症候群の中で病態マーカーが未だ確立していない Isaacs 症候群において、真の標的抗原に対する自己抗体を網羅的に解析する。診断、経過、予後に貢献するため、各抗原の Cell-Based ELISA assay 系を構築する。以上により新たな診断マーカーの臨床応用へと展開するための研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

¹²⁵I- α -dendrotoxin を用いた radioimmunoassay で一次スクリーニング後の検体 (血清・髄液) を用いる。既知の自己抗体については、候補標的抗原の遺伝子を導入した細胞を用いた免疫組織化学的手法で検討する。また効率を高めるためにキット化された試薬 (Biochip Mosaic 等) も併用する。網羅的自己抗原の解析および新規抗原の同定のためにラットの後根神経節細胞と検体で免疫沈降を行い、主要なバンドについてはゲルを切り出し、直接、質量分析を行う。自己抗体の定量化のため、cell-based ELISA assay の開発を試みる。症例毎の自己抗体の組み合わせおよびその量比と臨床徴候との關連性について解析を行う。複数の自己抗体を有する患者 IgG の抗原複合体への作用機序について検討する。標的抗原のリコンビナント蛋白を用いた ELISA システムの開発を試みたが、検出感度が低いため、上記を応用した方法で行う。

- (1) 96 ウェル上にて、遺伝子導入細胞を培養する。
- (2) 固定・ブロッキングの後、患者 IgG およびハウスキーピング蛋白に対する抗体 (ラットなど) と incubation する。
- (3) 二次抗体に HRP 標識抗ヒト IgG 抗体、AP 標識抗ラット IgG 抗体を加える。
- (4) 洗浄後、HRP および AP に対する蛍光基質を加え、発色させる。
- (5) 励起 540nm/蛍光 600nm および励起 360nm/蛍光 450nm の条件で測定する。
- (6) ハウスキーピング蛋白の測定結果でウェル間の蛋白量を補正し、定量を行う。

4. 研究成果

アイザックス症候群 38 例のコホートでは、男性が 25 例 (65.8%) と多く、発症年齢の中心地は 55 歳 (12 歳~85 歳) であった。対症療法として抗てんかん薬はほとんどの軽症例 (12 例 mRS<3) で使用されていた。一方、mRS が 2 より大きい群では免疫療法が効果を示していた。表に示すように、抗 VGKC 複合体抗体は 17 例 (45%) で陽性で、内訳は、CASPR2 抗体 5 例 (13%)、contactin2 抗体 5 例 (うち一例は CASPR2 抗体も陽性)、LGI1 抗体 2 例 (5%)、CASPR2 抗体と LGI 抗体共陽性が 6 例 (16%) であった。共陽性群の 6 例の特徴は、mRS が高い (3.8 ± 1.7)、胸腺腫 (4 例)、疼痛 (5 例)、自律神経障害 (6 例)、睡眠障害 (5 例) でありモルヴァン症候群が示唆された。56 例の応答者のあった WEB 調査では、疼痛は全身に広がり、失業や QOL 低下を訴えていた。

アイザックス症候群の臨床像、自己抗体、治療反応性について検討した。EMG で確定した 38 例の患者中、8 例 (21%) で腫瘍の合併を認めた。また筋けいれんなど主要症状以外に、自律神経障害、疼痛、中枢神経障害の合併が認められた。抗 VGKC 複合体抗体は、17 例 (45%) で陽性であり、そのうち 6 例 (16%) は、CASPR2 抗体および LGI1 抗体共に陽性であり、より重篤で、胸腺腫を合併し (50%)、モルヴァン症候群に傾向を呈していた。治療反応性についても単独療法で少なくとも 1 ランクの mRS の改善が認められ、対症療法と免疫療法の併用で 2 ランク程度

表 筋電図でconfirmされたアイザックス症候群38例の自己抗体と臨床像

抗体のパターン	患者数 (男女比)	臨床徴候					mRS 中央値 (SD)		P Value
		疼痛	自律神経障害	不眠/その他の睡眠障害	不安/攻撃性/うつ	その他	治療前	治療後	
自己抗体陰性 (18) or VGKC複合体抗体のみ (3)	21 (14:7)	11	11	4/0	4/2/2	胸腺腫1 前立腺1 CRPS1	2.92 (1.17)	1.25 (0.87)	0.002
特異抗体陽性	17 (11:6)	9	7	4/4	3/3/2	胸腺腫4 前立腺2 AChR-Ab 2	2.9 (1.2)	1.8 (0.68)	0.002
CASPR2 and LGI1	6 (5:1)	5	6	3/2	2/2/0	胸腺腫3 (浸潤性1 AChR-Ab1) 前立腺1 辺縁系脳炎1	3.83 (1.17)	1.67 (0.52)	0.002
CASPR2 (4) or CASPR2 and Contactin 2 (1)	5 (1:4)	1	0	0/2	0/0/1	胸腺腫1 前立腺1 AChR-Ab MG 1	2.50 (1.29)	1.75 (0.96)	0.39
Contactin 2のみ	4 (3:1)	3	1	1/0	1/1/1	None	2.25 (0.50)	1.75 (0.96)	0.39
LGI1 only	2 (2:0)	0	0	0/0	0/0/0	None	2.0	2.0	NA

の mRS の改善が認められた。疼痛の合併は 20 例 (53%) と高頻度であった。Website ベースのコホートでは、疼痛が雇用や日常生活への悪影響をもたらすことが明らかになった。しかしながら、半数例以上で自己抗体が陰性であり、早期診断のための新たな病態マーカーが求められる。これらの結果を踏まえ、神経学会などでシンポジウム発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Angela Vincent, Philippa Pettingill, Rosie Pettingill, Bethan Lang, Ron Birch, Patrick Waters, Sarosh Irani, Camilla Buckley, Osamu Watanabe, Kimiyoshi Arimura, Matthew C. Kiernan. Association of Leucine-Rich Glioma Inactivated Protein 1, Contactin-Associated Protein 2, and Contactin 2 Antibodies With Clinical Features and Patient-Reported Pain in Acquired Neuromyotonia. JAMA Neurol, 査読あり, 75巻2018 1519-1527 DOI: 10.1001/jamaneurol.2018.2681.
2. 渡邊 修. 電位依存性カリウムチャンネル (VGKC) 複合体抗体関連疾患 up to date. Brain Nerve, 査読なし, 70巻, 2018, 315-318. DOI: 10.11477/mf.1416201005
3. Misawa S, Sato Y, Sobue G, Watanabe O, et al. Safety and efficacy of thalidomide in patients with POEMS syndrome: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-control trial. Lancet Neurol. 査読あり. 15巻. 2016. 1129-1137. DOI: 10.1016/S1474-4422(16)30157-0
4. 渡邊 修. VGKC複合体抗体関連脳症とその周辺疾患. Brain Nerve. 査読なし. 68巻. 2016. 1011-1023. DOI: 10.11477/mf.1416200548
5. 渡邊 修. 自己免疫脳炎と認知症. Brain Nerve. 査読なし. 68巻. 2016. 341-350. DOI: 10.11477/mf.1416200403
6. 渡邊 修. 神経疾患治療ノート Isaacs症候群. Clinical Neuroscience. 査読なし. 34巻. 2016. 477-479.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Miwa Nomura, Mitsuyoshi Maki, Katsunori Takahata, Osamu Watanabe. A disease easily misdiagnosed as a neuroimmunological disorder: meningeal amyloidosis. 14th International Congress of Neuroimmunology (国際学会). 2018
2. 渡邊 修, 高畑克徳, 野村美和, 牧 美充, 松浦英治, 高嶋 博. 電位依存性カリウムチャンネル複合体抗体関連認知機能障害の臨床像の解析. 第60回 日本老年医学会. 2018
3. 渡邊 修. シンポジウム26 自己免疫性神経疾患と認知症 自己免疫性脳炎と認知症 VGKC複合体 (LGI-1) 抗体関連脳炎を中心に. 第36回 日本認知症学会 (招待講演). 2017
4. Osamu Watanabe. Autoimmune Neurological Disorders Anti-LGI1 antibodies in anti-VGKC complex antibodies. International Workshop on autoantibodies and autoimmunity (国際学会・招待講演). 2016
5. Osamu Watanabe, Kimiyoshi Arimura, Satoshi Nozuma, Kumiko Michizono, Eiji Matsuura, Hiroshi Takashima. A proposal: Isaacs' syndrome (acquired neuromyotonia) diagnostic criteria. 14th International Congress on Neuromuscular Diseases (国際学会). 2016
6. 渡邊 修. 神経疾患での新たなアフェレシス適応拡大 「傍腫瘍性神経症候群～イオンチャンネル抗体に焦点をあてて～」. 第37回日本アフェレシス学会 (招待講演). 2016
7. 渡邊 修. Immune mediated neuropathy Isaacs' syndrome and VGKC-complex antibody related disorders. 第46回日本臨床神経生理学学会 (招待講演). 2016.
8. 渡邊 修. 免疫性神経疾患における自己抗体: 知っておくべき直せる病態 抗VGKC抗体関連症候群. 第57回 日本神経学会. 2016

〔図書〕(計 1 件)

1. 渡邊 修. アイザックス症候群、モルヴァン症候群、抗 VGKC 複合体抗体関連辺縁系脳炎. 免疫性神経疾患 病態と治療のすべて (辻 省次, 吉良潤一編) 338-345 中山書店 2016

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~intmed3/home.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：高嶋 博

ローマ字氏名： Takashima Hiroshi

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：教授

研究者番号（8桁）：80372803

(2)研究協力者

研究協力者氏名：深田 正紀

ローマ字氏名：Fukata Masaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。