

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07875

研究課題名(和文) 自己免疫性脳炎の新規治療ターゲット同定を目指した神経細胞表面抗体の分子病態解明

研究課題名(英文) Molecular approaches to identify the novel therapeutic targets for the encephalitis associated with neuronal surface antibodies

研究代表者

原 誠 (HARA, Makoto)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：10817224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：全国の医療機関との共同研究により原因の特定されない脳炎患者の髄液から新規にNMDA受容体抗体26例、LG1抗体9例、GABAB受容体抗体8例、CASPR2抗体3例、AMPA受容体抗体2例を確定診断した。NMDA受容体抗体、LG1抗体、GABAB受容体抗体がそれぞれ陽性の患者血清からIgGを精製したのち、培養神経細胞を用いて抗体群の作用を検討した結果、NMDAR受容体抗体IgG分画は細胞のG蛋白共役型受容体シグナル経路で中心的な役割を担うmGluR8を標的として、RNA発現、さらに細胞膜での発現に影響することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗神経細胞表面抗体群が神経細胞表面の抗原に結合することで引き起こされる細胞内経路への影響については一切検討されていなかった。本研究により、自己免疫性脳炎で最も頻度の多い抗NMDA受容体脳炎において、NMDA受容体抗体が細胞内シグナル伝達経路へもたらす影響及び、そのパスウェイで中心的役割を担う膜受容体の発現低下が確認された。抗体により影響される細胞内シグナル経路が特定されたことで、今後、細胞内シグナル経路を標的にした病態に選択性の高い創薬へとつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：A total of 48 patients, who were previously considered to have diseases of unknown etiology, were newly identified with encephalitis associated with antineuronal surface antibodies (NSAs) using in-house screening and confirmation assays for NSAs. NSA types detected were as follows: NMDAR in 26, LGI1 in 9, GABABR in 8, CASPR2 in 3, and AMPAR in 2 patients. An investigation of antibody effects using primary live neurons from rodents revealed that anti-NMDAR IgG affected the G protein-coupled receptor signaling pathway in the antibody-treated neurons that decreased the levels of messenger RNA and density of the neuronal surface mGluR8 clusters.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経細胞表面抗体 RNAシーケンス パスウェイ解析 培養海馬神経細胞 抗体作用

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性脳炎では *N*-methyl-d-aspartate 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) を含む脳神経細胞表面の受容体や膜蛋白に対する抗体群 (神経細胞表面抗体群) が発症や病態の進展に主要な役割を担うことが明らかにされているが、抗体を迅速に診断する方法は確立されていない。さらに、抗体の作用については抗体が標的とする蛋白の組織学的な発現の検討にとどまり、抗体の結合により発生する細胞内の変化について遺伝生物学的機構に着目した検討はなく、重要な課題として残されてきた。

2. 研究の目的

神経細胞表面抗体群の診断法は未確立であり、かつ抗体が引き起こす細胞障害の遺伝生物学的機構について、細胞内の応答経路への影響は解明されていない。そのため本研究では神経細胞表面抗体の診断法を確立し、さらに抗体群が標的とする遺伝子群を同定し、標的遺伝子の機能を解析するとともに関与する細胞内シグナル経路を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脳炎患者を対象にした神経細胞表面抗体群の新規検出法の確立と抗体精製

我々はこれまで未確立であった神経細胞表面抗体群を脳炎患者の髄液中から迅速に検出/精製し、早期診断に向けた体制づくりを構築してきた。具体的にはラット脳凍結組織を用いた免疫組織化学 (tissue-based assay: TBA) とラット初代海馬培養細胞による免疫細胞化学 (live-neuron assay) を組み合わせ、髄液または血清中の神経細胞表面抗体の網羅的なスクリーニングを実施する。さらに、スクリーニング陽性例に対して標的抗原を発現させた HEK293 細胞を用いた免疫細胞化学的手法 (cell-based assay: CBA) により抗原蛋白を同定する二段階抗体診断法 (in-house two-step assay) により標的蛋白を同定する。さらに抗体作用の解析のため、NMDAR 抗体に加え、leucine-rich glioma-inactivated 1 (LGI1) 抗体と gamma-amino butyric acid receptor type B (GABABR) 陽性の血清および対照血清から Protein A/G カラムを用いて血清中の IgG 分画を特異的に精製し滅菌濾過後に凍結保存する。

(2) 神経細胞表面抗体群の抗原反応シグナル経路の解明

神経細胞表面抗体群により影響を受ける遺伝子群の同定

我々は抗体作用について今までに Wistar ラット海馬錐体細胞を 18-20 日間培養した神経細胞群 (primary hippocampal neurons) を用いて、細胞膜表面に発現する標的抗原量の経時変化を蛍光免疫染色とイムノプロット法により世界に先駆けて解析してきた。本研究ではこれを応用させ、患者血清からの精製 IgG 抗体 (NMDAR IgG, LGI1 IgG, GABABR IgG および対照 IgG) と培養神経細胞 (600,000 neurons / P60, Neurobasal® + B27 medium) を 72 時間反応させたのち、神経細胞から RNA を抽出し RNA シークエンス解析により網羅的な遺伝子発現の差異を解析する。

神経細胞表面抗体群が標的とする細胞応答経路の同定

RNA シークエンスデータから抗体反応前後で発現に変動のある遺伝子群を抽出し、パスウェイ解析ツールである DAVID ならびに GSEA による in-silico の解析を行い、これまで未解明であった抗体が標的とする細胞応答経路を同定する。

(3) 標的遺伝子群の発現解析

抗体群を反応させた細胞群より RNA ならびにタンパクを抽出し、qRT-PCR ならびにイムノプロットを行い実際の発現を定量化する。その中から有望でありそうな遺伝子を選定し、細胞での蛋白発現について、免疫細胞化学ならびにイムノプロットを用いて細胞群間での差異を定量的に評価する。

4. 研究成果

(1) 脳炎患者を対象にした神経細胞表面抗体群の新規検出法の確立と臨床応用

国内の医療機関との多施設共同研究により対象期間内に原因の特定されない脳炎患者 582 例の髄液及び血清中の神経細胞表面抗体を検索し、新規に NMDA 受容体抗体 26 例、LGI1 抗体 9 例、GABAB 受容体抗体 8 例、CASPR2 抗体 3 例、AMPA 受容体抗体 2 例を確定診断した。TBA を用いた抗体スクリーニングにおいて、髄液検体と血清検体を使用した場合の抗体の検出感度は NMDA 受容体抗体では髄液でのみ抗体が陽性になる例を 26 例中 9 例に認め、一方、LGI1 抗体陽性 9 例のうち 1 例は髄液中の抗体が陰性で血清でのみ抗体陽性が確認された。血清と髄液で抗体検出に乖離を認めた例について、live-neuron assay によるスクリーニング検査では TBA が陰性であった LGI1 抗体陽性の髄液に対しても陽性を示し、ラット脳組織と培養海馬神経細胞による検出を組み合わせることで精度よく抗体群を同定できた。スクリーニング陽性でかつ既知の抗体群が陰性であった例を 5 例に認め、これらの例では未知の神経細胞表面抗体の存在が考えられた。

また抗体作用に用いた血清は、まず NMDAR 抗体陽性血清、LGI1 抗体陽性血清、GABABR 抗体陽

性血清それぞれ 3 例ずつの血清を混合せたプール血清を作製した。前述の 3 種類の陽性プール血清と対照血清について protein A/G アガロースレジンを用いたカラムクロマトグラフィーにより IgG 分画を抽出/精製した。精製 IgG 抗体は陽性プール血清と対照血清から精製した IgG の濃度が 10 mg/mL 以上となるように遠心フィルターを用いて濃縮を行い、滅菌濾過後に凍結保存した。精製後 IgG の活性評価は TBA と CBA の両方で陽性となることを確認した。

(2) 神経細胞表面抗体群により影響を受ける遺伝子群の同定

成熟初代海馬神経細胞に対して NMDAR IgG、LG11 IgG、GABABR IgG 抗体と対照 IgG をそれぞれ同濃度で 72 時間反応させたのち、各細胞群の RNA を抽出した。RNA の抽出には各々の群について 1,500,000 細胞を用いた。細胞群間の RNA 発現の網羅的な差異解析には RNA マイクロアレイ (アジレント社) を用いた。NMDAR IgG を反応させた群と対照 IgG 群で発現に有意な差を認められた RNA の中から、病態の関与に有望と考えられる遺伝子として mGluR8 に着目した。NMDAR IgG 反応群では RNA マイクロアレイで mGluR8 の有意な発現低下を認め、さらに qRT-PCR で定量した結果においても同様に発現低下が確認された。一方で LG11 IgG と GABABR IgG 抗体を反応させた群ではいずれも対照 IgG 群と比較して mGluR8 の RNA 発現に有意な差を認めなかった。

(3) 神経細胞表面抗体群が標的とする細胞応答経路の同定

代謝型グルタミン酸受容体である mGluR8 は G 蛋白共役型受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) の細胞応答に主要な役割を持つ受容体であることが知られており、多発性硬化症において神経細胞膜の mGluR8 の発現が低下することで細胞機能障害が惹起されることが知られている。発現に有意差のあった遺伝子群について、Metascape を用いてパスウェイ解析を施行した結果、NMDAR IgG を反応させた細胞群ではアデニル酸シクラーゼ (AC) 共役の GPCR 経路 (遺伝子群では mGluR8、HTR5A、P2RY12、HRH3) が有意に抑制されることが明らかになり、抗体が標的とする細胞応答経路として AC 共役 GPCR パスウェイへの影響が示された。一方で、LG11 IgG や GABABR IgG を反応させた群では対照 IgG と比較して AC 共役 GPCR パスウェイに関連する遺伝子群の発現に差を認めなかった。

(4) 標的遺伝子の発現解析: mGluR8 発現変化の解析

NMDAR IgG の標的遺伝子として RNA 発現の差が確認された mGluR8 について、神経細胞での発現量の変化を比較検討した。具体的には NMDAR IgG、LG11 IgG、GABABR IgG 及び対照 IgG と反応させた細胞群に対して蛍光免疫染色とイムノプロットを用いて細胞膜での発現を定量的に評価した。

蛍光顕微鏡を用いた細胞膜 mGluR8 クラスター密度の定量解析

精製 NMDAR IgG が神経細胞膜上の mGluR8 の発現に及ぼす影響について成熟培養海馬神経細胞を用いて定量的に解析した。12mm 丸カバースリップ (German type) を P35 ディッシュ上に置き、30 µg/mL の poly-D-lysine で表面をコーティングした。Neurobasal+B27 plus システム (Gibco) を用いて 21 日間培養した神経細胞に対して NMDAR IgG、または対照 IgG を 72 時間反応させたのち、丸カバースリップを取り出して市販の抗 mGluR8 抗体 (rabbit polyclonal, extracellular epitope) を一次抗体とした蛍光免疫染色を施行した。NMDAR IgG 群と対照 IgG 群について神経突起の mGluR8 クラスターをキーエンス BZ-810 で撮像し、神経突起の mGluR8 クラスターの密度を定量的に評価した。

神経細胞表面の mGluR8 クラスター密度は、対照 IgG 群と比較して NMDAR IgG と反応させた細胞群で低下を認めた一方で、PSD-95 抗体で標識したシナプスの密度は両群で差を認めなかった。本研究で用いた NMDAR IgG が mGluR8 と交差反応していた可能性について免疫沈降法を用いて確認したが、mGluR8 との交差反応を認めなかった。LG11 IgG や GABABR IgG を反応させた細胞群では mGluR8 クラスター密度、及びシナプス密度に変化を認めなかった。さらに NMDAR IgG を 72 時間反応させた後にメディウムの交換により抗体を除去し、さらに 72 時間の回復期間を設けた細胞群では細胞表面の mGluR8 発現に経時的な回復が確認された。

イムノプロットを用いた細胞膜 mGluR 密度の定量解析

細胞膜表面に発現する mGluR8 密度をイムノプロット法で定量解析した。培養神経細胞の全膜分画に加え、次の方法で細胞表面分画を選択的に回収し mGluR8 発現を定量評価した。NMDAR IgG、GABABR IgG、LG11 IgG または対照 IgG に反応させた細胞群の細胞表面分画を EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo) を使用してビオチン化し、RIPA バッファーで細胞を溶解したのち、NeutrAvidin Agarose Resin (Thermo) を用いて表面分画を選択的に抽出した。抽出した表面分画の蛋白濃度を Bradford 法で定量し、等量の蛋白を 7.5% ポリアクリルアミドゲルに電気泳動した。ゲルを PVDF 膜に転写し、5% スキムミルクでブロッキングしたのち mGluR8、NR1、transferrin receptor (TfR) に対する市販抗体を一次抗体、HRP 標識抗マウス抗体またはウサギ抗体を二次抗体とするイムノプロット法を行い、ECL kit (Amersham) で検出した。

定量評価は検出バンドの濃度を NIH Image に搭載されているデンシトメトリーにより定量し、TfR をコントロール蛋白として mGluR8、NR1 の濃度を補正した。NMDAR IgG を反応させた細胞群

では、蛍光免疫染色と同様に mGluR8 の発現低下が確認された一方、GABABR IgG、LG11 IgG または対照 IgG と反応させた細胞群では mGluR8 の発現に差を認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mizoguchi Tomotaka, Hara Makoto, Hirose Satoshi, Nakajima Hideto	4. 巻 13
2. 論文標題 Novel qEEG Biomarker to Distinguish Anti-NMDAR Encephalitis From Other Types of Autoimmune Encephalitis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 845272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.845272. eCollection 2022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hara Makoto, Nakajima Hideto, Kamei Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Practical approach for the diagnosis of disorders associated with antibodies against neuronal surface proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurology and Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 56～62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ncn3.12462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizoguchi Tomotaka, Hara Makoto, Nakajima Hideto	4. 巻 101
2. 論文標題 Neurosyphilis presenting as autoimmune limbic encephalitis: A case report and literature review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e30062
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.0000000000030062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hara Makoto, Ishihara Masaki, Nakajima Hideto	4. 巻 50
2. 論文標題 Use of the FilmArray; Meningitis/Encephalitis panel to detect pathogenic microorganisms in cerebrospinal fluid specimens: a single-center retrospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of International Medical Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/03000605221129561	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akimoto Takayoshi, Hara Makoto, Tasaki Kenta, Kurosawa Yusuke, Nakamoto Tadaharu, Hirose Satoshi, Mizoguchi Tomotaka, Yokota Yuki, Ninomiya Satoko, Nakajima Hideto	4. 巻 101
2. 論文標題 Delayed encephalopathy after COVID-19: A case series of six patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e31029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000031029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Makoto Hara, Yuki Yokota, Satoko Ninomiya, Satoshi Kamei, Hideto Nakajima
2. 発表標題 AUTOANTIBODY SCREENING USING ASSAYS WITH RAT BRAIN TISSUE AND CULTURED NEURONS FACILITATES PROMPT INDUCTION OF IMMUNOTHERAPY FOR AUTOIMMUNE ENCEPHALITIS
3. 学会等名 第17回アジア・オセアニア神経学会議(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Makoto Hara, Yuki Yokota, Satoko Ninomiya, Satoshi Kamei, Hideto Nakajima
2. 発表標題 Autoantibody screening using an in-house tissue-based assay facilitates prompt induction of immunotherapy for autoimmune encephalitis
3. 学会等名 American Academy of Neurology Annual Meeting 2021(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hara Makoto
2. 発表標題 Analyses of immunolabeling patterns using a tissue-based assay can predict anti-NMDAR encephalitis
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中嶋 秀人 (NAKAJIMA Hideto) (20330095)	日本大学・医学部・教授 (32665)	
研究 分担者	大日方 大亮 (OBINATA Daisuke) (20624886)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	
研究 分担者	藤原 恭子 (FUJIWARA Kyoko) (40595708)	日本大学・歯学部・准教授 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------