

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860715

研究課題名(和文)プリオン病においてNMDA型グルタミン酸受容体抗体が病態に果たす役割の解明

研究課題名(英文)The roles of antibodies against NMDA-type glutamate receptors for the pathogenesis of prion disease

研究代表者

藤田 浩司(FUJITA, Koji)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：80601765

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)：本研究は、プリオン病においてN-methyl-D-aspartate(NMDA)型グルタミン酸受容体の機能障害が生じ、その病態に自己抗体が関連するとの仮説を検証することを目的とした。既に報告した抗NMDA型グルタミン酸受容体自己抗体に関連して、(1)ペプチド・アレイによるエピトープの同定、(2)中枢神経系において抗体産生に関わる細胞等の検索、(3)抗体を含む検体と培養細胞を用いたグルタミン酸受容体機能・発現の解析を試みた。これらにより、プリオン病における神経障害機序の一端を解明し、診断・治療に寄与することを目指した。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to test the hypothesis that autoantibodies against NMDA-type glutamate receptors are associated with dysfunction of the receptors in prion disease. I planned to (1) detect the epitope of the antibodies using peptide arrays, (2) evaluate the cells that are associated with the antibody production, and (3) assess the effect of antibodies on NMDA-type glutamate receptors, to clarify the pathomechanisms of neurodegeneration and to contribute to diagnosis and treatment of prion disease.

研究分野：神経内科学

キーワード：プリオン病 抗体 グルタミン酸受容体

1. 研究開始当初の背景

クロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease: CJD) を主病型とするプリオン病は、伝達性の病原体プリオンが病態の中心をなすが、炎症や免疫反応は伴わないとされてきた。しかし申請者はプリオン病の研究を行う中でその免疫機序に注目するようになった。まず診断に関する研究で、拡散テンソル MRI が細胞体や軸索の変化を鋭敏に検出し (Fujita K, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008)、MR スペクトロスコピーが脳内免疫担当細胞とされるミクログリアなどの増加を反映し病変進展の評価に優れることを報告した (Fujita K, et al. J Neurol, 2011)。さらに、拡散強調 MRI 標準化が CJD 診断に有効なことを示した (Fujita K, et al. BMJ Open, 2012)。博士課程では抗プリオン抗体 single chain Fv を作製し、PrP との反応性 (ELISA など)、プリオン感染細胞での抗プリオン効果 (Western blot) を確認し、抗体導入ミクログリアを用いてプリオン病モデルマウスにおける治療効果を示した (Fujita K, et al. Cell Mol Neurobiol, 2011)。

次に、CJD と自己免疫性辺縁系脳炎の臨床像がしばしば類似することから、両者に共通する病態が存在すると推論した。抗グルタミン酸受容体 2 (GluR 2 = NR2B = GluN2B) 抗体陽性脳炎や抗 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体脳炎では統合失調症様の精神症状が特徴だが、CJD においても同様の精神症状が見られる。申請者はその知見を踏まえ「CJD において NMDA 型グルタミン酸受容体の機能障害が生じ、その病態に自己抗体が関連する」との仮説を立て、研究を進めた。まず CJD 症例の髄液において、Western blot で抗 GluN2B IgG 抗体、cell-based assay で抗 NMDA 受容体抗体を検出した (Fujita K, et al. J Neurol, 2012)。次にラット脳を用いた免疫組織化学で CJD 患者血清・髄液の反応性の一部が GluN2B 発現と共局在することを示した。さらに、GluN2B の N 末端、C 末端の合成ペプチドを用いた ELISA で、それらに対する抗体が CJD 患者の血清・髄液で有意に高値であった (図; Fujita K, et al. J Neuroimmunol, 2012)。また、GluN1 合成ペプチドに対する抗体も上昇していた (未発表)。一方、CJD 髄液中のサイトカインのうち interleukin (IL)-1 receptor antagonist、IL-12(p70)、IL-17、platelet-derived growth factor BB が有意に高値であった (申請時未発表 Fujita K, et al. J Neuroinflammation, 2013)。IL-17 上昇は CJD の中枢神経系に T 細胞ないしそれに準じる免疫細胞が存在することを示唆しており興味深い。

以上のように、CJD 患者の血清・髄液における抗 NMDA 型グルタミン酸受容体自己抗体を報告し、それに関連する髄液サイトカインの所見を得た。しかし、自己抗体のエ

ピトープ (どの領域がクリティカルか)、産生機序、および病態に果たす役割は現時点では不明である。

2. 研究の目的

本研究は、プリオン病において N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体の機能障害が生じ、その病態に自己抗体が関連するとの仮説を検証することを目的とした。それにより、プリオン病における神経障害機序の一端を解明し、診断・治療に寄与することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、プリオン病において抗 NMDA 型グルタミン酸受容体抗体が病態に果たす役割を解明することを目指す。具体的には、(1) 抗体のエピトープ、(2) 中枢神経系で抗原認識・抗体産生に関わる細胞、(3) 抗体によるグルタミン酸受容体への影響、について以下の手法で明らかにする。

(1) CJD 症例の血清および髄液中に存在する抗 NMDA 型グルタミン酸受容体抗体のエピトープを、ペプチド・アレイを用いて同定する。

(2) CJD と対照疾患の剖検脳を用いて、申請者らが検出した自己抗体やサイトカインの産生に関連する免疫細胞等を神経病理学的に評価する。

(3) CJD と対照疾患の血清、IgG 分画、髄液を神経細胞に添加し、パッチクランプ法と免疫細胞化学で解析する。

(1) CJD における抗 NMDA 型グルタミン酸受容体抗体が認識するエピトープの同定

【目的】GluN2B の N 末端 (369-382)、C 末端 (1153-1166) の合成ペプチドと反応する抗体価は、CJD 血清・髄液で有意に高値である (Fujita K, et al. J Neuroimmunol, 2012)。また、GluN1 に関しても同様の結果である (予備データ)。しかし、GluN2B、GluN1 のどの領域がクリティカルな認識部位かは不明である。そこで両分子の全領域におけるエピトープ解析を行う。

【方法】GluN2B (または GluN1) の全長シークエンスから、N 末端から C 末端へ 1 つずつアミノ酸残基をずらしたペプチドライブラリーを作製し、セルロースメンブレイン上にスポットした後、血清・髄液とインキュベートしシグナル解析する (SPOT 法; Reineke U, et al. J Immunol Methods, 2002)。対照には健常者 (血清)、非炎症性の神経疾患患者 (血清・髄液) の検体を用いる。エピトープ候補が挙げれば、配列をランダムにしたペプチドを合成し、反応性が無いことを確認する。

(2) CJD 剖検脳における免疫関連因子の神経病理学的解析

【目的】CJD における自己抗体が (a) 中枢神経系において産生され、(b) 中枢神経系で作

用するとの仮説に関して神経病理学的に評価する。

【方法】神経変性疾患・プリオン病に関する病理 (Fujita K, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2011; Iwasaki Y, et al. Acta Neuropathol, 2006) に加え、以下を半定量的に評価する。中枢神経系内の抗体産生が推測されるため、B 細胞 (CD20) や形質細胞 (CD138) を確認する。IL-17 を含む髄液中サイトカインの上昇 (予備データ) を踏まえ、T 細胞 (CD3, CD4, CD8) Granzyme B、IL-17 発現を解析する。IL-17 の発現を認める場合、発現細胞を併せて検討する。抗体に関連して、IgG および補体の沈着を検索する。さらに、GluN1、GluN2B サブユニットの発現を評価する。対照には、神経疾患を伴わない症例および脳炎症例の剖検脳を用いる。

(3) CJD の血清・髄液による NMDA 型グルタミン酸受容体機能の変化

【目的】CJD 患者由来の IgG が培養細胞の NMDA 型グルタミン酸受容体に与える影響を評価する。

【方法】検体は CJD 患者および対照疾患患者の血清、IgG 分画、髄液を用いる。

(a) 海馬神経細胞に検体を添加し培養した後、パッチクランプ法 (whole-cell 記録) により自発的な興奮性シナプス後電位 (excitatory postsynaptic potential: EPSP) を記録する。次に、NMDA 型受容体拮抗薬、AMPA 型受容体拮抗薬、または両者の使用によって受容体特異的な EPSP の変化を特定し、CJD 患者由来 IgG による変化を確認する (Hughes EG, et al. J Neurosci, 2010)。
(b) 神経細胞に検体を添加し培養した後、免疫細胞化学および Western blot 法によって NMDA 型グルタミン酸受容体の発現量を評価する。このとき、GluN1、GluN2B サブユニットに加えて、AMPA 型グルタミン酸受容体、 γ -aminobutyric acid (GABA) 受容体、postsynaptic density の発現も同時に評価する。

4. 研究成果

本研究は、プリオン病において N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体の機能障害が生じ、その病態に自己抗体が関連するとの仮説を検証することを目的とした。既に報告した抗 NMDA 型グルタミン酸受容体自己抗体に関連して、(1) ペプチド・アレイによるエピトープの同定、(2) 中枢神経系において抗体産生に関わる細胞等の検索、(3) 抗体を含む検体と培養細胞を用いてのグルタミン酸受容体機能・発現の解析を試みた。付随する研究において、プリオン病の中枢神経系における炎症機転として interleukin-17 等の上昇を確認した。これらにより、プリオン病における神経障害機序の一端を解明し、診断・治療に寄与することを目指した。

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)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Fujita K, Matsui N, Takahashi Y, Iwasaki Y, Yoshida M, Yuasa T, Izumi Y, Kaji R. Increased interleukin-17 in the cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a case-control study of rapidly progressive dementia. J Neuroinflammation 2013; 10: 135 (査読あり)

2. Fujita K, Tanaka K, Takahashi Y. Neuronal antibodies in Creutzfeldt-Jakob disease. JAMA Neurol 2014; 71: 514 (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 藤田浩司、湯浅龍彦、高橋幸利、田中恵子、渡邊修、松井尚子、和泉唯信、梶籠兒. 抗神経抗体陽性の Creutzfeldt-Jakob 病と免疫関連脳炎の鑑別. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会、2013.11.27-29、海峡メッセ (山口県下関市).

2. 藤田浩司、湯浅龍彦、高橋幸利、岩崎靖、吉田眞理、松井尚子、和泉唯信、梶籠兒. プリオン病における NMDA 型グルタミン酸受容体抗体のエピトープ分布. 第 18 回日本神経感染症学会総会学術集会、2013.10.11-12、フェニックス・シーガイア・リゾート (宮崎県宮崎市).

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田浩司 (FUJITA, Koji)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号：80601765

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：