

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：84432

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08087

研究課題名(和文) 精神疾患の病因解明を目指す、血中抗NMDA受容体抗体測定法の開発と測定

研究課題名(英文) Development and measurement of anti-NMDA receptor antibody assay in blood to elucidate the etiology of psychiatric disorders

研究代表者

松永 秀典 (Matsunaga, Hidenori)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪急性期・総合医療センター(臨床研究支援センター)・精神科・医師

研究者番号：70603843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗NMDA受容体抗体の検出方法であるcell-based assayに代わる、同時に多検体を測定できる測定系の開発を目指した。ウサギ網赤血球ライセート由来の蛋白合成系に膜成分を加えて受容体蛋白を合成したが、自己抗体の検出はできなかった。次に、コムギ胚芽由来の蛋白合成系を用い、複数の種類の合成反応液で受容体蛋白合成を行ったが、成功しなかった。さらに、ウサギ網赤血球系で、自己抗体のエピトープを含む細胞外部分(NR1のATD)を合成し測定を試みたが、検出困難であった。他方、NMDA受容体のNR1サブユニットを細胞表面に発現させた培養細胞を用いた測定系では、患者髄液中の抗NMDA受容体を検出できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NMDA受容体を細胞表面に発現させた培養細胞を用いる現行のcell-based assayに代わる、多検体を同時に測定できる抗NMDA受容体抗体測定系の開発を目指したが、無細胞蛋白合成系を用いて作成した受容体蛋白では、抗NMDA受容体抗体を検出することはできなかった。このことから、病原性のある抗NMDA受容体抗体の検出には受容体本来の立体構造が不可欠であり、現時点では、現行のcell based assayが妥当な測定法であることが確認された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop an assay system that can simultaneously measure multiple samples as an alternative to the cell-based assay currently used to detect anti-NMDA receptor antibodies. We synthesized the receptor protein using a protein synthesis system derived from rabbit reticulocyte lysate and membrane components, but were unable to detect autoantibodies. Next, receptor protein synthesis was performed using a wheat germ-derived protein synthesis system with multiple types of synthetic reaction solutions, but without success. Furthermore, an attempt was made to synthesize the extracellular portion (ATD) of NR1 subunit of NMDA receptor containing the epitope of the autoantibody in a rabbit reticulocyte system, but detection of autoantibodies was difficult. On the other hand, in a cell-based assay system using cultured cells in which the NR1 subunit of the NMDA receptor was expressed on the cell surface, anti-NMDA receptor antibodies in the spinal fluid of the patients were detected.

研究分野：精神神経医学

キーワード：抗NMDA受容体抗体 リガンドアッセイ ウサギ網赤血球由来蛋白合成システム コムギ胚芽由来蛋白合成システム ラジオ膜蛋白 cell based assay 自己免疫性脳炎 精神疾患

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

抗 NMDA 受容体抗体は特徴的な経過を示す自己免疫性脳炎の原因となることが 2007 年に報告されたが、統合失調症や睡眠障害の一部でもこの抗体をもつ場合があることが示されている。このため、広く精神・神経疾患の症例に対して本抗体の測定を行うことができれば、統合失調症をはじめとした精神・神経疾患の病因解明に寄与しうると考えた。研究開始当時、抗 NMDA 受容体抗体は、cell-based assay、すなわち、細胞表面に NMDA 受容体を発現させた培養細胞を抗原として用いる方法で行われており、測定には手間と時間がかかり、多くの検体を迅速に測定できるものではなかった。

一方申請者らは、RI 標識蛋白をウサギ網赤血球ライセート由来の無細胞蛋白合成系を用いて作成し抗原として用いるラジオリガンドアッセイにより、ボルナ病ウイルスに対する抗体測定を行っており、再現性、および、感度・特異性に優れた方法であることを確認している(その後、SARS-CoV-2 の nucleocapsid 蛋白に対する抗体測定にも適用し良好な結果を得た。文献 1,2)。この方法を抗 NMDA 受容体抗体の測定に応用し、多検体を同時に測定できる系を開発し、それを用いて多数の精神神経疾患の検体に対して測定を行うことを目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラジオリガンドアッセイを用いて抗 NMDA 受容体抗体を多検体同時に測定できる測定系を開発すること、および、それを用いて広く精神・神経疾患に対して本抗体を測定し、抗 NMDA 受容体抗体脳炎以外の疾患における本抗体の意義を明らかにすることである。

3. 研究の方法

測定法：

NMDA 受容体を構成する 3 種のサブユニット (NR1、NR2A、NR2B) をコードするプラスミドを作成する。次に、ウサギ網赤血球ライセート由来の蛋白合成系 (TNT Quick Coupled transcription/translation system, Promega; 以下、「網赤キット」と略す) とそれに適合した膜成分 (Canine Pancreatic Microsomal Membrane, Promega) を用いて膜上に RI で標識した受容体蛋白を合成する。これを抗原として 96 well プレート上で患者血清と反応させ、抗原抗体複合物を Protein G Sepharose で沈降させて、RI 活性を測定する (ラジオリガンドアッセイ)。

患者検体は、大阪急性期・総合医療センターで同意のもとに採血し保存している血清、および、分担研究者である新潟大学田中恵子先生より供与された抗 NMDA 受容体抗体陽性血清 20 検体 (陰性対照も含めると 35 検体) を用いた。

4. 研究成果

(1) 当初予定していたラジオリガンドアッセイ

NMDA 受容体の各サブユニット (NR1、NR2A、NR2B) をコードするプラスミドと膜成分を網赤キットに加えて RI 標識蛋白の合成を試みたところ、合成液のカラム抽出において、蛋白質が溶出される分画に十分な RI 活性を認め、RI 標識メチオニンが合成蛋白に十分に取り込まれていることが示された (図 1)。SDS PAGE による電気泳動では、それぞれのサブユニットの分子量に該当する位置にバンドを認めたものの、我々が通常行っているボルナ病ウイルスの蛋白と比べると薄いバンドであった (図 2)。

この抗原を用いて NMDA 受容体抗体陽性検体を含む患者血清と、陽性コントロールのポリクローナル抗体の抗体測定を行ったところ、陽性コントロールのみ非常に高い値を示したが、患者血清はすべて低値であり、NMDA 受容体脳炎患者の血清を他と区別することができなかった (図 3)。患者髄液でも抗体測定を試みたが、抗体陽性検体と陰性検体で同等の値を示した (図 4)。

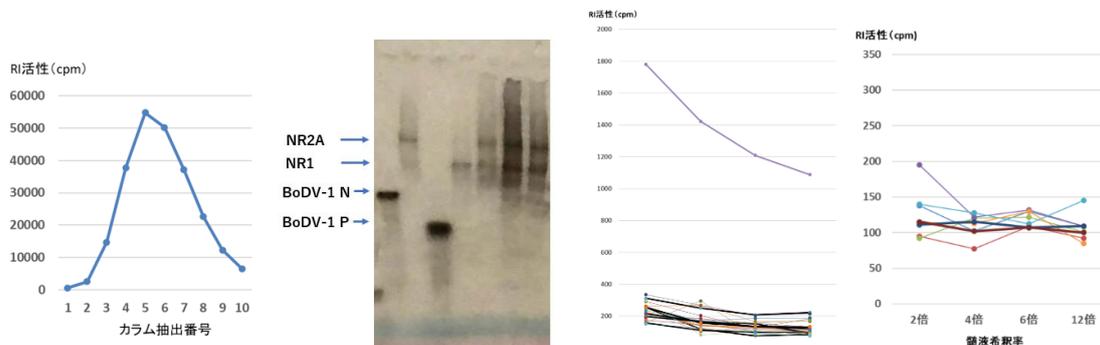


図1. 蛋白合成液のカラム抽出
蛋白質が溶出される分画に十分な RI 活性を認め、RI 標識メチオニンが合成蛋白に十分に取り込まれていることが示された

図2. 合成蛋白の電気泳動による確認
NMDA受容体のサブユニット (NR1、NR2A) の分子量に該当する位置にバンドを認めたが、ボルナ病ウイルス (BoDV-1) の N、P 蛋白より薄かった。

図3. 洗い操作の条件検討のグラフ
陽性コントロールのポリクローナル抗体のみ高値を示し、患者血清では陽性の7検体 (黒の太線) を陰性検体から区別できなかった。

図4. 髄液中の抗体測定
抗 NMDA 受容体抗体陽性が判明している 2 検体 (太線) も高値とならなかった。

(2) コムギ胚芽由来蛋白合成系による抗体測定を試み

当初予定していた網赤キットで作成した抗原がうまく機能しなかったことから、代わりに、コムギ胚芽由来の蛋白合成系を使用することにした。脂質膜上に膜蛋白質を作成するキット (ProteoLiposome Plus Expression Kit, Cell Free Science) で合成したところ、電気泳動で NR1 は本来よりやや小さい位置にバンドができた (図 5)。新潟大より供与された抗 NMDA 受容体抗体陽性血清 20 例と陰性血清 15 例について抗体測定を行ったところ、両者間で差を認めず、バックグラウンドが非常に高かった。

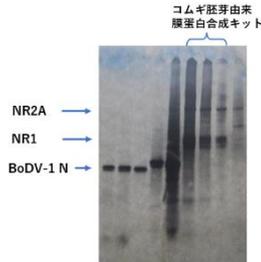


図5. 合成した蛋白の電気泳動
NR1は本来の分子量よりやや小さい位置にバンドができています

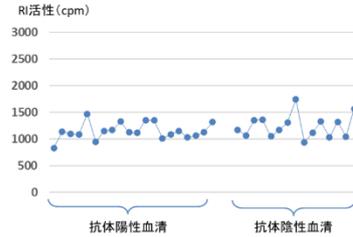


図6. 抗体陽性血清と陰性血清をまとめて測定 (コムギ胚芽由来の系で抗原を作成)
バックグラウンドのRI活性が、反応抗原量の約3割の値を示し、陽性・陰性間に差が出なかった。

上記で使用した蛋白合成キットは SS 結合を阻害する物質が入っているため本来の立体構造を再現できない可能性を考え、SS 結合を温存する蛋白合成キット (ProteoLiposome DB Expression Kit, Cell Free Science) を使用したところ、蛋白の収量がやや減少した。この抗原を使って血清中の抗体検出を試みたが、陽性検体を陰性検体から区別することはできなかった。

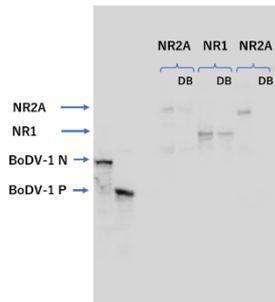


図7. SS結合を温存するキット(DB)で合成した蛋白の電気泳動
DBでは蛋白の収量が減る。
アミノ酸数は、NR2A: 1484, NR1: 938, BoDV-1 N: 372, BoDV-1 P: 202。

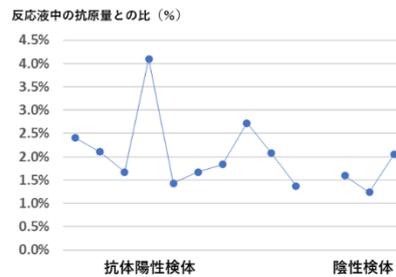


図8. SS結合を温存するキット(DB)で合成した NR1 に対する血清抗体を測定
陽性と陰性の区別がつかない。

(3) NR1 の細胞外部分の一部 (ATD) を抗原としたラジオリガンドアッセイ

さらに代替法として、病原性自己抗体のエピトープが NR1 のアミノ酸番号 369 を含む位置に存在するとの報告があること、および、これまでにラジオリガンドアッセイがうまく機能した測定系では抗原のアミノ酸数が 200~400 程度の非膜蛋白であることから、NMDA 受容体の NR1 の細胞外部分のうち amino-terminal domain (ATD; アミノ酸数が約 400 で、自己抗体のエピトープが含まれる) のみを網赤キットで合成し、ラジオリガンドアッセイを行うことにした。

エピトープを壊しうる領域 (アミノ酸番号 1 から 367, 371, 373 まで)、および、エピトープ全体を含む領域 (同 1 から 383 まで) の蛋白をコードするプラスミドを作成し、合成した蛋白を電気泳動したところ、薄いながらも単一のバンドを認めた (図 9)。これを用いて、患者血清の抗体測定を行ったが、エピトープを含む蛋白に対する抗体をとらえることはできなかった。

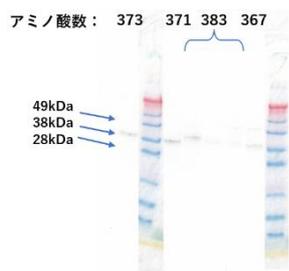


図9. NR1の細胞外部分の蛋白の電気泳動

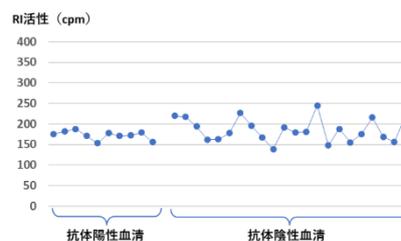


図10. NR1の細胞外部分の一部 (アミノ酸番号 1~383) に対する抗体測定
抗体陽性検体と陰性検体の区別ができない。

(4) NMDA 受容体を細胞表面に発現する培養細胞を用いた抗体測定

一方、現行の抗体測定法の cell-based assay を分担研究者である大阪医科薬科大学福森亮雄教授のもとで行ったところ、NMDA 受容体脳炎患者の髄液で抗体を明確にとらえることができた。

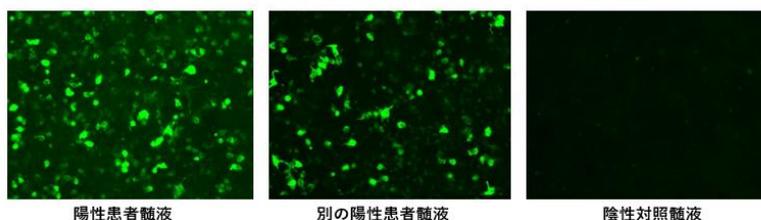


図11. Cell-based assayによる抗NMDA受容体抗体の検出

(5) 付加的実験：抗ドパミン D2 受容体抗体をラジオリガンドアッセイで測定

分子量が大きく四量体を形成する膜蛋白である NMDA 受容体に関しては適切な抗原を作成できなかったが、分子量が小さく多量体を形成しないドパミン D2 受容体ではどうか検討してみた。網赤キットに膜成分とプラスミドを加えて受容体蛋白を合成し、精神疾患 96 検体について測定したところ、RI 活性がやや高い検体が散見された。これらの中には、膠原病に精神症状が併発した症例、難治性精神症状をもつ症例、悪性症候群を併発した症例が含まれていた。

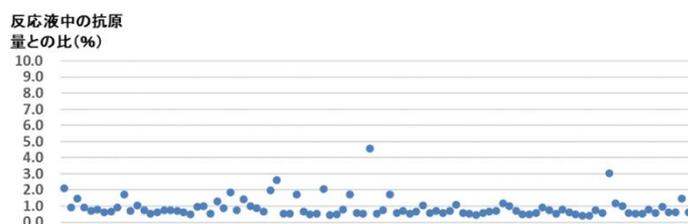


図12. 精神疾患96例におけるドパミンD2受容体に対する抗体

5. 考察と結論

抗NMDA受容体抗体を多検体同時に測定できる測定法は確立できなかった。この理由として、分子量が大きい4つのサブユニットから成る膜蛋白であるという、NMDA受容体の複雑な構造が関連していると考えられた。他方では、cell-based assay で我々も病原性のある自己抗体を検出した。このことから、複雑な構造をもつ膜蛋白では、無細胞蛋白合成系で立体構造を再現することは難しく、やはり細胞による受容体の合成が必要と考えられた。結果的に、本研究は現行の cell-based assay の妥当性を確認することとなった。

分子量が小さい膜蛋白に対する抗体測定の予備的検討として行ったドパミン D2 受容体抗体の測定では、値は低いものの明らかに高値を示す検体が散見された。ただし、この方法と結果の妥当性についてはさらなる検討が必要である。

文献

1. Matsunaga H, Makino A, Kato Y, Murakami T, Yamaguchi Y, Kumanogoh A, Oba Y, Fujimi S, Honda T, Tomonaga K. Radioligand Assay-Based Detection of Antibodies against SARS-CoV-2 in Hospital Workers Treating Patients with Severe COVID-19 in Japan. *Viruses*. 2021 Feb 23;13(2):347. doi: 10.3390/v13020347.
2. Matsunaga H, Takeuchi H, Oba Y, Fujimi S, Honda T, Tomonaga K. Waning of Anti-SARS-CoV-2 Spike Antibody Levels 100 to 200 Days after the Second Dose of the BNT162b2 Vaccine. *Vaccines (Basel)*. 2022 Jan 24;10(2):177. doi: 10.3390/vaccines10020177.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsunaga Hidenori, Takeuchi Hidefumi, Oba Yuichiro, Fujimi Satoshi, Honda Tomoyuki, Tomonaga Keizo	4. 巻 10
2. 論文標題 Waning of Anti-SARS-CoV-2 Spike Antibody Levels 100 to 200 Days after the Second Dose of the BNT162b2 Vaccine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 177 ~ 177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/vaccines10020177	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 Matsunaga Hidenori, Makino Akiko, Kato Yasuhiro, Murakami Teruaki, Yamaguchi Yuta, Kumanogoh Atsushi, Oba Yuichiro, Fujimi Satoshi, Honda Tomoyuki, Tomonaga Keizo	4. 巻 13
2. 論文標題 Radioligand Assay-Based Detection of Antibodies against SARS-CoV-2 in Hospital Workers Treating Patients with Severe COVID-19 in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 347 ~ 347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v13020347	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ここにあげた2編の論文は本研究の内容とは異なりますが、本研究で使用したラジオリガンドアッセイがうまく機能した研究の報告です。本研究期間中に行いました。

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	福森 亮雄 (Fukumori Akio) (00788185)	大阪医科薬科大学・薬学部・教授 (34401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	多田 敬典 (Tada Hirobumi) (20464993)	至学館大学・健康科学部・教授 (33909)	
研究分担者	田中 恵子 (Tanaka Keiko) (30217020)	新潟大学・脳研究所・非常勤講師 (13101)	

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