

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500455

研究課題名(和文) 抗グルタミン酸受容体抗体が関与する脳炎発症機序の解明

研究課題名(英文) Pathomechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis

研究代表者

田中 恵子 (TANAKA, Keiko)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：30217020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：近年、抗NMDA型グルタミン酸受容体抗体を生じ、記憶・意識障害などを呈する急性脳炎が明らかになった。本研究では、抗NMDAR抗体の病態への関わりを解明することを目的とし、抗NMDAR抗体の検出を行い、1)本疾患の発生頻度と臨床的特徴、2)患者抗体の長期増強誘導抑制、3)抗体の培養海馬細胞表面NMDAR結合様式や細胞内炎症関連の遺伝子発現の増強、4)マウス脳室内に持続投与した患者抗体が、空間認知機能低下を生じること、神経組織には炎症性組織破壊を認めなかったことを明らかにした。以上より、抗体はNMDARの機能を阻害するものの、神経組織が保持されているため良好な長期予後を裏付ける結果と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The roles of anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antibodies from patients with NMDAR encephalitis on their neurological symptom were examined. The major symptom of NMDAR encephalitis is known as amnesia together with convulsions and other psychiatric symptoms. To reproduce these symptoms, we examined behavior of mice exposed chronically to the cerebrospinal fluid (CSF) from patients and found that mice injected with the CSF exhibited learning impairment. However, their brain tissues did not exhibit inflammatory cell infiltration, neuronal loss, or glial proliferation, and there was no increase in inflammatory cytokines. Thus, for the first time, we showed that the CSF from NMDAR encephalitis patients disturbed the memory function directly in mice. These effects were considered to be functional and without neuronal tissue destruction, which is compatible with the favorable outcome of this disease.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：グルタミン酸受容体 NMDA受容体 辺縁系脳炎 長期増強誘導 海馬細胞 記憶力障害

## 1. 研究開始当初の背景

神経細胞の樹状突起上に存在する AMPA 受容体や NMDA 受容体などのイオンチャネル型グルタミン酸受容体は、記憶・学習のメカニズムに深く関わるシナプス可塑性に重要な蛋白であり、統合失調症やてんかん性疾患との関わりについて注目されていた。2007年、米国ペンシルベニア大 Dr. Dalmau らは、記憶力障害、痙攣、意識障害を主徴とし、卵巣奇形腫を伴う自己免疫性急性脳炎患者に、NMDA 型受容体に対する自己抗体が存在すること（抗 NMDAR 脳炎）、抗体除去療法が有効であることを明らかにした。本邦からも若年女性の報告が相次ぎ、比較的頻度の高い疾患であることが明らかになったが、多様な臨床像を呈する例、異なる腫瘍が検出される例もあり、早期治療を目指して広く抗体診断を行う必要が生じた。しかしながら、自己抗体と NMDAR 機能障害との関連については不明であった。

## 2. 研究の目的

- (1) 抗 NMDAR 抗体の特異的検出系を確立したことから、本邦諸施設から送付された検体について抗体検査を行い、抗体陽性例、陰性例の臨床的特徴、合併腫瘍、経過、治療反応性を詳細に解析し、本疾患の全体像を明らかにする。
- (2) 臨床経過と抗体価の推移を調べ、抗体の病勢への関与を明らかにする。
- (3) 培養海馬細胞、齧歯類の海馬を含む脳スライス標本を用いる vitro の系で、抗体の本症病態への関与を明らかにする。
- (4) マウスの脳内に患者検体を持続投与し、その行動解析、脳組織の形態学的・免疫学的動態をしらべ、本抗体の中樞神経病変形成への関わりを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗 NMDAR 抗体の検出

NMDAR のサブユニットである、NR1 および NR2 cDNA を組み込んだプラスミドを、培養

HEK 293 細胞に発現させて抗原とし、患者検体を反応させ、蛍光色素をラベルした二次抗体を加えて、発色パターンから抗体の有無を判定する。

(2) 経時的に抗体価を測定し、病勢の推移と比較検討する。

(3) 神経細胞または NMDAR NR1 および NR2 subunit を共発現させた細胞の培養系に、あらかじめ蛍光色素でラベルした二次抗体を結合させた患者検体を添加し、蛍光顕微鏡下でのタイムラプス画像を作成し、抗体の結合による経時的な細胞膜および細胞体の形態変化を観察する。

(4) 齧歯類の海馬を含む脳スライスを灌流液中に静置し、微小電極を用いてニューロンの基本的シナプス伝達およびシナプス可塑性への影響を調べる。具体的には CA1 領域にテタヌス刺激を加えることで誘導できる記憶形成のモデルである長期増強に対して、患者由来抗体の影響を電気生理学的に解析する。

(5) 齧歯類の脳内に患者由来抗体を持続投与し、動物の行動解析および組織学的・免疫学的検討を行う。

## 4. 研究成果

(1) 全国諸施設から抗体検査のために送付された検体 2076 例中、抗 NMDAR 抗体陽性例は 276 例であり、80% 以上は精神症状で発症し、けいれん、意識障害、自律神経症状、不随意運動を呈する若年女性であったが、悪性緊張病、鬱病、てんかん重積などを主徴とする非典型例の存在も明らかになった。

(2) 抗体価は病勢の盛んな急性期に高値であり症状の軽快とともに低下した。血清と髄液で比較すると髄液での相対的抗体価が全経過を通じて高値であった。

(3) 海馬培養細胞に患者髄液を添加し、経時的に細胞の形態変化、および NMDAR の発現パターンを観察した。対照髄液添加群に比べ、患者髄液添加群では樹状突起の伸長が促進

され、近傍の神経細胞の突起と融合する形態変化が見られた。この間、抗 NR1 抗体での免疫染色では、細胞表面の染色性が低下する一方、細胞内に点状に染色されるパターンが見られた。これは、抗 NMDAR 抗体が細胞表面の NMDAR に結合して内在化すると既報に合致する結果であった。この際、細胞内で炎症関連の 28 個の遺伝子発現に変動が見られることを microarray および real-time PCR による mRNA の発現パターンから明らかにした。

(4) マウスの海馬を含む脳スライスを還流液中に静置し、海馬 CA1 領域にテタヌス刺激を加えて長期増強を誘導し、この誘導に及ぼす患者髄液の影響を調べた。還流液中での刺激に応じて誘導される長期増強は、患者髄液を添加することで抑制された。この長期増強誘導抑制は、抗 NMDAR 抗体を NMDAR で吸収した患者髄液に置換することで誘導抑制が解除されたことから、患者の抗 NMDAR 抗体自体が長期増強誘導を抑制することが明らかになった。

(5) 患者髄液または対照髄液で満たした浸透圧ポンプ連結カニューレをマウスの側脳室内に定位脳手術下で挿入し、0.11  $\mu$ L/時の注入速度で 28 日間持続投与を行った。この間、経時的にマウスの行動解析を行った。Spontaneous locomotor activity, Open field test, Novel object recognition test では患者髄液群、対照髄液群の間に有意な差異はみられなかったが、Morris water maze test では、患者髄液群で有意に空間認知機能に低下がみられた。

(6) 行動解析終了後のマウスの脳組織では、脳室内に軽度のリンパ球浸潤が見られたものの、脳実質内には炎症性細胞浸潤は見られず、神経細胞の脱落、グリア増生は見られなかった。抗 NR1 抗体を用いた免疫染色では、患者髄液投与群では対照群に比し、NR1 蛋白の染色性が低下し、ウェスタンブロットによる定量でも患者髄液投与群での NR1 蛋白が低

下していた。

以上より、抗 NMDAR 抗体を含む患者髄液は、本症の主症状である記憶力低下に深く関わることが明らかになった。一方、抗体の結合による神経組織の形態学的変化は乏しいことから、本症の長期的な予後が良好であることの説明として、抗体は NMDAR 機能障害に関わる組織壊死を生じないことが関連すると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 66 件)

Tabata, E. Masuda, M. Eriguchi, M. Yokoyama, M. Takahashi, Y. Tanaka, K. Yukitake, M. Horikawa, E. Hara, H. Immunopathological significance of ovarian teratoma in patients with anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Eur Neurol* 査読有 2014;71:42-48 DOI:10.1159/000353982

K Fujita, K Tanaka, Y Takahashi. Neuronal Antibodies in Creutzfeldt-Jakob Disease. *JAMA Neurol* 査読有 2014, 71(4), 514-515

Sakamoto H, Hirano M, Samukawa M, Ueno S, Maekura S, Fujimura H, Kuwahara M, Hamada Y, Isono C, Tanaka K, Kusunoki S, Nakamura Y. Details of treatment-related difficulties in men with anti-N-Methyl-D-Aspartate receptor encephalitis. *Eur Neurol* 査読有 2013;69:21-26 DOI:10.1159/000342023

K Tsutsui, T Kanbayashi, K Tanaka, S Boku, W Ito, J Tokunaga, A Mori, Y Hishikawa, T Shimizu, S Nishino: Anti-NMDA-receptor antibody detected in encephalitis, schizophrenia, and narcolepsy with psychotic features. *BMC Psychiatry* 査読有 2012,12:37 doi:10.1186/1471-244X-12-37

Q Zhang, K Tanaka, P Sun, M Nakata, R Yamamoto, K Sakimura, M Matsui, N Kato: Suppression of synaptic plasticity by cerebrospinal fluid from anti-NMDA receptor encephalitis patients *Neurobiol Dis* 査読有 45 (2012) 610-615

doi:10.1016/j.nbd.2011.09.019

K Arima, A Kinoshita, H Mishima,

N Kanazawa, T Kaneko, T Mizushima, K Ichinose, H Nakamura, A Tsujino, A Kawakami, M Matsunaka, S Kasagi, S Kawano, S Kumagai, K Ohmura, T Mimori, M Hirano, S Ueno, K Tanaka, M Tanaka, I Toyoshima, H Sugino, A Yamakawa, K Tanaka, N Niikawa, F Furukawa, S Murata, K Eguchi, H Ida, K Yoshiura: Proteasome assembly defect due due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. Proc Natl Acad Sci USA. 査読有 108 (36):14914-14919, 2011

doi:10.1073/pnas.1106015108

A Nagaishi, M Takagi, A Umemura, M Tanaka, Y Kitagawa, M Matsui, M Nishizawa, K Sakimura, K Tanaka: Clinical features of neuromyelitis optica in a large Japanese cohort: comparison between phenotypes. J Neurol Neurosurg Psychiatry 査読有 2011;82:1360-1364 DOI:10.1136/jnnp-2011-300403

〔学会発表〕(計 36 件)

K Tanaka, M Matsui, M Tanaka Autoantibodies other than anti-AQP4 antibodies in seronegative NMO patients. 6<sup>th</sup> Congress of the Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis 2013.11.7 Kyoto

K Tanaka, M Fujita, M Matsui, T Takegami: Immunological profiles of the CSF from the anti-NMDA receptor encephalitis patient. World Congress of Neurology 2013.9.26 Wien

K Tanaka, M. Fujita, Y Ishigaki, N.Kato, M Matsui, M Tanaka, T Takegami. Effects of the CSF from anti-NMDAR encephalitis patient on the cultured neurons. 65<sup>th</sup> AAN Annual Meeting San Diego 2013.3.16-23

K. Tanaka, Y. Ishigaki, T.Takegami, M.Tanaka, M.Matsui, N. Kato. "Effects of anti-NMDA receptor antibodies from the patients with NMDA receptor encephalitis on the neurons." 11<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology Boston 2012.11.6

K.Tanaka. A large Japanese cohort study for AQP4 antibody-positive cases. PACTRIMS 2012.9.14 Beijing

K Tanaka:Clinical profile of Japanese patients with anti-NMDAR encephalitis and functional analysis of the

anti-NMDAR antibodies.第53回日本神経学会学術大会 2012.5.23 東京

田中恵子, 本山りえ, 中多 充世, 田中正美, 松井 真, 加藤伸郎. てんかんを主徴とする NMDA 受容体脳炎—抗体の神経機能に及ぼす効果. 第 45 回日本てんかん学会 2011.10.6 新潟

田中恵子: 抗 NMDA 受容体抗体と神経疾患 日本神経免疫学会学術集会シンポジウム 東京 2011.9.17

田中恵子, 中多充世, 松井 真, 加藤伸郎. 抗 NMDA 受容体抗体の神経機能に及ぼす効果. 第 52 回日本神経学会学術大会 2011.5.19 名古屋

K Tanaka, M Nakata, Q Zhang, P Sun, K Sakimura, M Matsui, N Kato : Functional effects of the CSF from anti-NMDA receptor encephalitis patient on NMDAR-mediated synaptic transmission. 64<sup>th</sup> American Academy of Neurology Annual Meeting 2011.4.14 Hawaii

〔図書〕(計 12 件)

田中恵子 傍腫瘍性小脳変性症 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 神経症候群(第2版)—その他の神経疾患を含めて— II IV 自己免疫性疾患 傍腫瘍性神経症候群 2014;No.27 p.747-750

田中恵子 悪性腫瘍に伴う神経系障害 内科学第10版 矢崎義雄 総編集 朝倉書店 p.2256-2258, 2013

田中恵子 自己免疫性脳炎・脳症 免疫性神経疾患ハンドブック楠進編集、南江堂 p.306-314, 2013

田中恵子 傍腫瘍性神経症候群 今日の神経疾患治療指針 水澤英洋 鈴木則宏, 梶 龍兒, 吉良潤一, 神田 隆, 齋藤 延人 編 医学書院 2013 pp. 521-526

田中恵子 多発性硬化症 今日の治療と看護 改定第3版 永井良三/大田健 編集, 南江堂 2013 pp. 744-747

田中恵子 抗アクアポリン4抗体 アクチュアル脳・神経疾患の臨床 多発性硬化症と視神経脊髄炎 総編集 辻 省次, 専門編集 吉良潤一 中山書店 pp314-322, 2012

田中恵子 抗アクアポリン4抗体の測定法と診断的意義 多発性硬化症 (MS) と視神経脊髄炎 (NMO) の基礎と臨床 医薬ジャーナル社 藤原一男編 pp.208-215,2012

田中恵子 多発性硬化症 内科学 門脇 孝, 永井良三 編集 西村書店

p.1621-1622, 2012

田中恵子 視神経脊髄炎 内科学 門脇 孝, 永井良三 編集 西村書店

p.1622-1623, 2012

田中恵子 急性散在性脳脊髄炎 内科学 門脇 孝, 永井良三 編集 西村書店

p.1624-1625, 2012

田中恵子 傍腫瘍性神経症候群 内科学 門脇 孝, 永井良三 編集 西村書店

p.1716-1717, 2012

田中恵子:自己抗体が関連する傍腫瘍性・自己免疫性脳炎・脳症. 「小児科臨床ピクシス」 28 急性脳炎・急性脳症 総編集:五十嵐 隆, 専門編集:塩見正司 中山書店 2011 p.22-25

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

田中 恵子 (TANAKA, Keiko)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 30217020

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

加藤 伸郎 (KATO, Nobuo)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10152729