

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591238

研究課題名(和文)抗NMDAR脳炎における病的自己抗原提示細胞の検索研究

研究課題名(英文) Analysis of the pathogenic antigen -appearing cells in the patients with anti NMDAR encephalitis

研究代表者

池田 修一 (IKEDA, Shu-ichi)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：60135134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：正常卵巣におけるNMDAR抗原の発現を検索するため、ウシの卵巣と未受精卵を検索した。免疫組織化学的に原始卵胞の細胞質と未受精卵の細胞膜にNR2B抗原の発現が認められた。次に凍結卵巣と未受精卵1031個を集めて蛋白化学的分析を行った。Immunoblottingではこれら組織にNR1とNR2Bの蛋白分画があることが見出された。そこで未受精卵の細胞膜から抽出した蛋白分画をLC-MS/MSで解析したところ、SPFGRFK, KNLQDR, GVEDALVSLK, QPTVAGAPK, NEVMSSKの5個のペプチドを得た。これらはNR1、NR2A、NR2B、NR2Cの部分アミノ酸配列と一致した。

研究成果の概要(英文)：To clarify the pathogenesis of anti-NMDAR encephalitis, bovine ovaries and ova were examined. Immunohistochemical examinations revealed NR2B immunoreactivity in the cytoplasm of oocytes in ovary and in that of isolated ovum. In SDS-PAGE and immunoblotting analysis of ovarian tissues and collected ova two clear bands of NR1 and NR2B immunoreactivity were shown. Using these protein fractions extracted from fresh ovaries and collected ova we chemically identified five different peptides: SPFGRFK, KNLQDR, GVEDALVSLK, QPTVAGAPK, NEVMSSK. The former 2 are consistent with the partial sequences of NR1, and the latter 3 correspond to those of NR2A, NR2B and NR2C, respectively. The presence of NMDAR in normal oocytes is very helpful in explaining why young females are mainly involved in this encephalitis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：非ヘルペス性辺縁系脳炎 自己免疫性脳炎 NMDA受容体 シナプス異常症 卵巣奇形腫

1. 研究開始当初の背景

抗 NMDAR脳炎は若年女性に好発する非常に重篤な非ヘルペス性辺縁系脳炎である。臨床的には感冒症状に続いて精神症状で発症し、次いで意識障害と頻回の痙攣、高度な血圧変動・不整脈を含む自律神経障害、ロジスキネジアに代表される全身の不随意運動を来す。特に全身性痙攣は通常の薬物治療に抵抗性を示し、長期間にわたるチオペンタールの持続的点滴と人工呼吸器管理(所謂人工冬眠療法)を余儀なくされることが多い。本疾患の治療はステロイド・パルス療法、血漿交換、免疫グロブリンの大量静注療法などが試みられているが、疾患の原因が不明であるため、確立された治療法がない。このため疾患の予後は死亡率0.7%、後遺症のため社会復帰が困難な割合が30%と不良である。本邦における疾患の発症率は0.33/100万人とされているが、最近、疾患の認知度が高まり、小児科領域を含めて患者数は増加している。

本疾患の成因として神経伝達物質に関連するグルタミン酸受容体(GluR)の一種である *N*-methyl-D-aspartate receptor(NMDAR)の NR1/NR2ヘテロマーに対する特異的自己抗体(抗NMDAR抗体)の存在が注目されている。NMDAR、特にNR2B subunitはヒトの海馬を含む前脳に広く発現しており、抗NMDAR抗体によりこれらの神経細胞機能が抑制されることにより、行動異常、記憶力障害、高度な自律神経障害等の本疾患に特徴的な臨床症状が出現すると推察されている。抗NMDAR抗体の出現機序については米国の Dalmauらが本症患者には卵巣奇形腫が必ず存在しており、この腫瘍内の未成熟な神経組織がNMDAR抗原を提示することで抗NMDAR抗体の産生に至ると報告して(Ann Neurol:2005, 2007)、本疾患を傍腫瘍性病候群の一型であると位置付けた。また卵巣奇形腫が抗原提示に至る機序としては炎症が介在していると推測されている。抗NMDAR脳炎と卵巣奇形腫の因果関係は本邦の

患者においても Iizukaらの研究(Neurology:2008)により確認されている。しかし本症患者が多数例集積されるようになった最近では卵巣奇形腫の合併率が徐々に減少しており、Dalmauらの報告では60%(Lancet Neurol:2008)、本邦 Kamei(Intern Med:2009)と英国 Irani(Brain:2010)の報告では40%弱とされている。また少数ながら男性例の報告もみられている。則ちNMDAR抗原を提示する組織がヒトの体内に奇形腫以外の別な形で存在するということである。

申請者らは抗NMDAR脳炎が圧倒的に若年女性に集中的に発生していることから、生殖器に着目し、少数例を対象とした若年女性の卵巣と若年男性の睾丸をNMDARの複数のsubunitに対する抗体を用いて免疫組織化学的に検索した結果、正常卵巣の卵細胞の胞体内にNMDAR抗原が発現している可能性を見出した(Intern Med:2010)。卵巣は女性の生理周期において外界に開放される時期があり、感染を受け易い臓器である。現在の仮説としてはウイルスその他による先行感染を契機として卵巣炎が起り、卵細胞内に存在するNMDAR関連蛋白が抗原提示をすることで、抗NMDAR脳炎が発生しうると考えている。しかしNMDAR関連抗原を有する卵細胞がどの年代の女性の卵巣に多いのか、本細胞内に含まれるNMDAR関連抗原の蛋白化学的性状は全く不明である。また男性の睾丸においてNMDAR関連抗原が発現しているのかどうかについても不明である。

2. 研究の目的

本研究では以下の3点の解明を目的とする。
1) 抗NMDAR脳炎発症者から摘出された卵巣奇形腫と非脳炎患者の同腫瘍において、病理組織像、NMDAR関連抗原の発現に差異があるのかどうかを病理組織学的、免疫組織化学的に検討する。特に奇形腫における炎症性細胞浸潤の程度と浸潤している細胞の種類の違いを

リンパ球の細胞表面抗原を用いた免疫組織化学的検討から明らかにする。2) 正常対照者の卵巣または精巣においてNMDAR関連抗原が発現しているかどうかを検討する。具体的には思春期から中年期に至る女性の卵巣、男性の睾丸、ウシの卵巣をNMDAR関連抗原に対する抗体を用いて免疫組織化学的に検索を行い、同抗原が発現している細胞を同定する。3) NMDAR関連抗原が発現しているとすれば、その主な蛋白成分が何であるのかを蛋白化学的に解析する。標的細胞としては卵細胞を想定しており、剖検時に採取し凍結保存されているウシの卵細胞を用いて、細胞質に含まれるNMDAR関連抗原を immunoblotting法で解析する。

3. 研究の方法

i) 平成 23 年度

抗 NMDAR 脳炎患者から摘出した卵巣奇形腫 13 個と対照とする非脳炎合併患者から得られた卵巣奇形腫 10 個（既に収集済み）を対象として、通常の組織染色ならびに免疫組織化学的染色を行う。後者に用いる抗体は抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP), phosphorylated neurofilament (SMI-31), ヒト synaptophysin 抗体等の抗神経組織抗体、ならびに NMDAR 関連抗原に対する抗 NR1、NR2A、NR2B、Glu R1、Glu R2&3 抗体であり、免疫組織化学的染色は通常の ABC 法で行う。また卵巣奇形腫組織に炎症細胞浸潤が有意に見られれば、リンパ球の細胞表面抗原に対する複数の抗体を用いて免疫組織化学的染色を行い、浸潤細胞の詳細を解析した。

ii) 24 年度

剖検で得られたヒト卵巣 11 個（年齢 18～29 歳）、精巣 3 個（年齢 19～34 歳）とウシ卵巣 5 個（年齢 3～5 歳）のパラフィンブロックか

ら連続切片を作成して、NMDAR 関連抗原に対する 3 種類の抗体（抗 NR1、抗 NR2A、抗 NR2B 抗体）と抗 GFAP 抗体を用いて免疫組織化学的染色を施行した。

iii) 25 年度

剖検時に採取して凍結保存してあるウシ卵巣とウシの未受精卵 1031 個を用いて、NMDAR 関連蛋白の分離・同定を試みた。ウシ卵巣と未受精卵をホモゲナイズして遠心分離。沈殿分画をさらに RIPA 溶液でホモゲナイズし遠心上清を NMDAR サブユニットの各抗体で免疫沈降した。得られた沈降物を用いて immunoblotting を行った。ウシ未受精卵の細胞膜分画から得られた蛋白をトリプシン消化した後、液体クロマトグラフィー質量分析器 (LC-MS/MS) で分析した。またウシ未受精卵と抗 NMDAR 脳炎患者の血清から分離・精製した IgG を反応させ、両者の親和性を免疫蛍光抗体法で検討した。

4. 研究成果

I. 卵巣奇形腫における神経組織の発現、炎症細胞浸潤に関する検討

同腫瘍に占める神経組織の割合は 4.7～31.2%と個々の例でばらつきが大きかったが、この割合は脳炎群と非脳炎群で差がなかった。次に卵巣奇形腫における炎症細胞浸潤の程度を軽度、中等度、高度の 3 段階で評価し、また浸潤単核細胞を CD3, 20, 45RO 抗原で免疫染色して、リンパ球のサブグループの検索も行った。炎症細胞浸潤の陽性率は脳炎合併例で 71.4%、非脳炎合併例で 70.0%と両群間に差がなく、またその程度にも違いがなかった。さらにリンパ球の表面抗原の解析からも、両群における浸潤炎症細胞において、T細胞、B細胞、memory T細胞のいずれの細胞においてもその優位性は見出せなかった。

II. 正常卵巣と精巣における NMDAR 関連抗原の発現に関する検討

正常卵巣と精巣における NMDAR 抗原の検索

としては、ヒト11例とウシ5頭の卵巣の卵胞細胞（特に原始卵細胞）の細胞質にNR2B抗原の発現があることが確認された。しかし精巣ではNMDAR関連抗原の発現は見出せなかった。

III. ウシ正常卵巣からのNMDAR関連蛋白の分離・同定

凍結卵巣と未受精卵300個を集めて、蛋白化学的分析を行ったところ、immunoblottingではこれらの組織にNR1とNR2Bの蛋白分画があることが見出された。そこで未受精卵の細胞膜から抽出した蛋白分画をLC-MS/MSで解析したところ、SPFGRFK, KNLQDR, GVEDALVSLK, QPTVAGAPK, NEVMSSKの5個のペプチドを得ることが出来た。最初の2個はNR1に、残り3個はそれぞれNR2A, NR2B, NR2Cの部分アミノ酸配列と一致していた。さらに抗NMDAR脳炎患者の血清から精製したIgGが未受精卵の細胞膜と強く結合することも免疫細胞化学的に証明された。

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4件）

1. 立花直, 池田修一.
N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体脳炎の治療動向. 神経治療学 31 (1): 30-36, 2014. 査読無
2. Tachibana N, Kinoshita M, Saito Y, Ikeda S. Identification of the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)-related epitope, NR2B, in the normal human ovary: implication for the pathogenesis of anti-NMDAR encephalitis. Tohoku J Exp Med 230: 13-16, 2013. <http://dx.doi.org/10.1620/tjem.230.13>. 査読有
3. Tachibana N, Ikeda S. Localization of NMDAR-related epitopes in ovarian teratoma: comparison between patients

and controls. 臨床神経学.

52:982-984, 2012. <http://dx.doi.org/10.5692/clinicalneuro.52.982>. 査読有

4. 立花直子, 有馬邦正, 池田修一. 抗NMDA受容体脳炎に合併した卵巣奇形腫と正常卵巣におけるNMDA受容体の分布. 最新医学 66 (5): 967-972, 2011. 査読無

〔学会発表〕（計7件）

1. 立花直子, 木下通亨, 亀谷富由樹, 田中恵, 小松洋太郎, 池田修一. 卵巣奇形腫非合併抗N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体脳炎の抗原提示部位: ウシ未受精卵・卵巣におけるNMDA受容体完全型の同定. 第18回日本神経感染症学会総会. 2013/10/12, 宮崎
2. 木下通亨, 立花直子, 斉藤祐子, 高橋利幸, 池田修一. NMDA受容体関連脳炎患者の卵巣奇形腫におけるNMDA受容体関連抗原の発現についての免疫組織化学的検討. 第17回日本神経感染症学会総会. 2012/10/20, 京都
3. 立花直子, 木下通亨, 斉藤祐子, 高橋利幸, 池田修一. 正常卵巣および精巣におけるNMDAR関連抗原の発現に関する免疫組織化学的検討. 第17回日本神経感染症学会総会. 2012/10/20, 京都
4. 木下通亨, 立花直子, 齊藤祐子, 有馬邦正, 池田修一. 脳炎を合併しない卵巣奇形腫に含有する中枢神経組織に関する免疫組織化学的検討. 第53回日本神経学会学術大会. 2012/5/24, 東京
5. 木下通亨, 立花直子, 斉藤祐子, 有馬邦正, 池田修一. 脳炎を合併しない卵巣奇形腫における神経組織関連抗原の発現についての免疫組織化学的検討. 第17回日本神経感染症学会総会. 2011/11/5, 東京
6. 立花直子, 高橋利幸, 田中恵子, 斉藤祐子, 有馬邦正, 池田修一. 抗NMDAR脳炎患者

と非脳炎患者の卵巣奇形腫における炎症細胞浸潤の比較検討. 第17回日本神経感染症学会総会. 2011/11/5, 東京

7. 立花直子, 石井恵子, 高橋幸利, 田中恵子, 有馬邦正, 池田修一. 若年女性の卵巣におけるNMDAR関連抗原の発現に関する免疫組織化学的検討. 第52日本神経学会学術大会. 2011/5/19, 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 修一 (IKEDA, Shu-ichi)

信州大学・医学部・教授

研究者番号 : 60135134

(2) 研究分担者

高橋 幸利 (TAKAHASHI, Toshiyuki)

独立行政法人国立病院機構 静岡・てんか

ん神経医療センター臨床研究部・統括診療

部・部長

研究者番号 : 70262764