

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461286

研究課題名(和文)自己免疫性脳炎の病態解析および新規抗原の解明

研究課題名(英文)analysis of newly target auto antigens in autoimmune encephalitis

研究代表者

渡邊 修 (Watanabe, Osamu)

鹿児島大学・医歯学域 医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：30511802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、抗VGKC複合体抗体関連疾患において、7つの新規抗原(DCC, DPP10, TMEN132A, GABAAR, ADAM23等)を同定した。さらに、LGI-1自己抗体がLGI-1とその受容体であるADAM22との結合を阻害することにより、脳内の興奮性シナプス伝達の大部分を担うAMPA受容体機能を低下させることを明らかにした。また自己免疫性辺縁系脳炎でGABAA受容体に対する自己抗体を持つ一群を報告した。GABAA受容体 3サブユニットの細胞外エピトープが標的となり、抗体の結合により、シナプス上の受容体の減少が起こり、選択的に抑制性シナプス後電流を減少させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established a potential molecular mechanism for the pathogenic role of antibodies to leucine-rich, glioma inactivated 1 (LGI1), which are found in patients with limbic encephalitis (an acquired autoimmune condition presenting with memory loss, temporal lobe seizures and personality change, associated with swelling and inflammation of the medial temporal lobe, with a good response to immunotherapies). LGI1 is a secreted protein that binds to both a disintegrin and metalloproteinase domain 23 (ADAM23) presynaptically, where it is a component of a 'voltage-gated potassium channel (VGKC) complex', and ADAM22 postsynaptically, where it interacts with AMPA receptors. We show that the LGI1 antibodies from patients with limbic encephalitis interfere with the LGI1/ADAM22 interaction, leading to a loss of postsynaptic AMPA receptors. This is a novel finding, which begins to establish a mechanism of action for the LGI1 antibodies.

研究分野：神経免疫学

キーワード：標的抗原解析 イオンチャネル 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の電位依存性カリウムチャンネル (VGKC) に対する自己抗体が、末梢神経の興奮性亢進を引き起こし、筋けいれん、手指の開排制限を主訴とする acquired neuromyotonia (Isaacs 症候群: IS) の原因自己抗体である。申請者らは、この抗 VGKC 抗体が、二価の抗体が、二つの VGKC をカップリングすることで degradation を惹起し、神経細胞膜表面の VGKC の総数を減じることで、総和として VGKC の機能を減じることを明らかにしてきた。また、この抗 VGKC 抗体は、末梢神経系の疾患である IS のみならず、筋けいれんに多彩な自律神経障害や重度の不眠、複雑な夜間異常行動、幻覚、記憶力障害などの中枢神経症状を特徴とする Morvan 症候群 (MoS) や中枢神経疾患である非ヘルペス性 (自己免疫性) 辺縁系脳炎の一部に関与していることが明らかになった。後者は、特定の臨床的特徴を持つことがあきらかになり、抗 VGKC 抗体関連辺縁系脳炎 (VGKC-LE) と称された。末梢神経系から中枢神経系におよぶ抗 VGKC 抗体が関与する疾患を包括する概念として「免疫介在性カリウムイオンチャンネル病」を提唱してきた。

しかしながら、何故、同じ自己抗体が、異なる神経系に作用して、異なる症状を惹起するのかわかりませんでした。2010 年、ほぼ同時期に異なる 2 施設から、これらの疑問を一気に解決する breakthrough と言える報告があった。Lai らは、57 例の「抗 VGKC 抗体」関連辺縁系脳炎の髄液および血清を検討した結果、57 例 55 例で Leucine rich glioma inactivated 1 protein (LGI-1) に対する抗体が陽性であった。この結果を受けて、彼らは、VGKC-LE は、抗 LGI-1 抗体陽性脳炎と呼ぶべきだと論じた。また、Irani らは、96 例の抗 VGKC 抗体陽性疾患群の血清を検討した結果、55 例で LGI-1 に対する抗体が陽性であった。VGKC そのものに対する抗体陽性例は 3 例に過ぎなかった。更に 19 例で、contactin-associated protein-2 (Caspr-2) に対する抗体が陽性であった。抗 Caspr-2 抗体は末梢神経の過興奮性に、抗 LGI-1 抗体は辺縁系の症状に関与する傾向にあった。また抗 Contactin-2 抗体陽性例も存在した。この結果から、彼女らは、従来、デンドロトキシンを用いた RIA 法で測定していた自己抗体は、VGKC そのもののみならず、LGI-1、Caspr-2、および Contactin-2 を標的とするポリクローナルな抗体で、抗 VGKC 複合体抗体と呼ぶべきで、IS、MoS、VGKC-LE を包括して、抗 VGKC 複合体抗体関連症候群という疾患概念を提唱している。

この結果を踏まえて、申請者らは、候補遺伝子導入細胞を用いた免疫化学的手法

(Cell-Based Assay: CBA) で抗 LGI-1 抗体および抗 Caspr-2 抗体の解析に着手した。その中で、複数の自己抗体を持つ症例の存在が明らかになった。効率よく、網羅的に自己抗体を検出する方法として、ラット海馬神経細胞との反応性でスクリーニング後、live cell のまま免疫沈降を行い、主要抗原について直接バンドを切り取り質量分析を行う手法に思い至った。申請者らは、本邦の抗 VGKC 複合体抗体関連症候群を臨床的および血清学的に検討中である。申請時点で、VGKC-LE 38 例中 27 例 (71%) で、抗 LGI-1 抗体が認められ、6 例で抗 Caspr-2 抗体が陽性である。そのうち 5 例で、抗 LGI-1 抗体と抗 Caspr-2 抗体の両方を有していた。さらに 12 例 (31.6%) で、神経系ネットワーク形成に必要な新規同定抗原 (Netrin 受容体である DCC (deleted in colorectal cancer)) に対する抗体を同定している。IS 関連症例でも、21 例中 9 例 (42.9%) で LGI-1 が真の標的抗原であり、3 例で VGKC の機能と発現を調整する新たな標的抗原 (dipeptidyl peptidase :DPP) に対する抗体を同定していた。疾患と自己抗体は 一対一 の関係ではなく、個体が複数の抗原に対する抗体をポリクローナルに産生することで、個々の臨床症状を呈している可能性を見いだしていた。

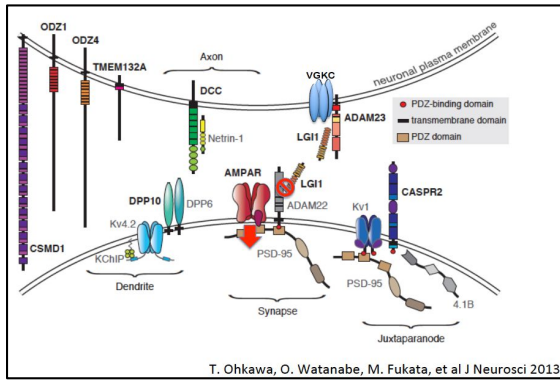
2. 研究の目的

本研究では、抗電位依存性カリウムチャンネル (VGKC) 抗体関連神経症候群と称されていた複数の疾患において、真の標的抗原に対する自己抗体を網羅的に解析する。自己抗体の組み合わせやその量比による症状に差異を検討する。新規抗原の同定とともに、既知の自己抗体の作用機序について明らかにする。診断、経過、予後に貢献するため、各抗原の Cell-Based ELISA assay 系を構築する。以上により新たな診断マーカーの臨床応用へと展開するための研究基盤を確立する。

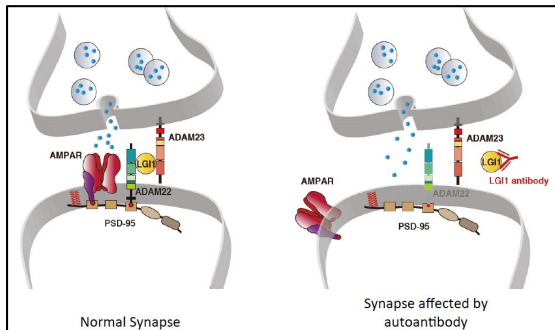
3. 研究の方法

¹²⁵I- α -デンドロトキシンを用いた radioimmunoassay で一次スクリーニング後の検体 (血清・髄液) を用いた。既知の自己抗体については、候補標的抗原の遺伝子を導入した細胞を用いた免疫組織化学的手法で検討した。網羅的自己抗原の解析および新規抗原の同定のためにラットの海馬細胞と検体で免疫沈降を行い、主要なバンドについてはゲルを切り出し、直接、質量分析を行った。自己抗体の定量化のため、cell-based ELISA assay を開発した。症例毎の自己抗体の組み合わせおよびその量比と臨床徴候との関連性について解析を行った。

4. 研究成果



申請者らは、抗 VGKC 複合体抗体関連疾患において、7 つの新規抗原（上図：DCC, DPP10, TMEM132A, GABA_AR, ADAM23 等）を同定した。さらに、LGI-1 自己抗体が LGI-1 とその受容体である ADAM22 との結合を阻害することにより、脳内の興奮性シナプス伝達の大部分を担う AMPA 受容体機能を低下させることを明らかにした（下図）。



また定量試験：cell-based ELISA assay を開発した。標的抗原のリコンビナント蛋白を用いた ELISA システムの開発を試みたが、検出感度が低いため、下記の方法でおこなった。

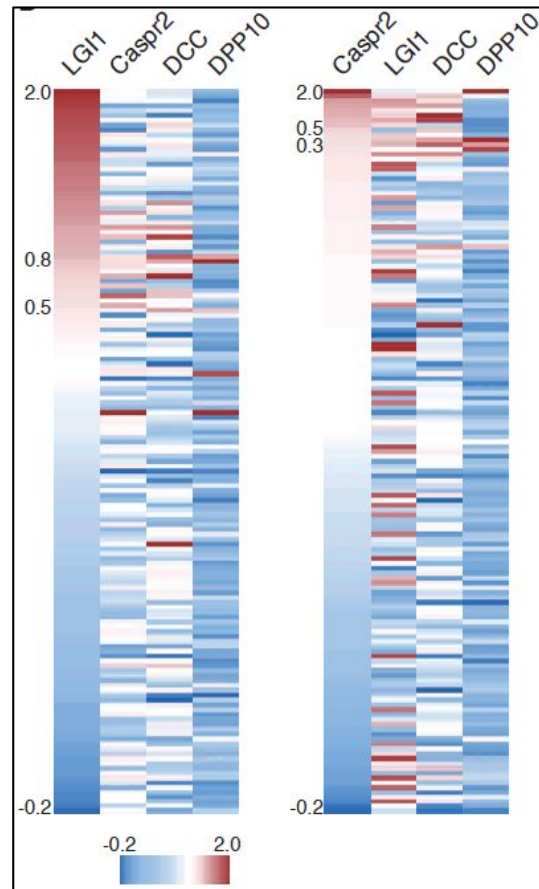
- ・ 96 ウェル上にて、遺伝子導入細胞を培養する。
- ・ 固定・ブロッキングの後、患者 IgG およびハウスキーピング蛋白に対する抗体（ラットなど）と incubation する。
- ・ 二次抗体に HRP 標識抗ヒト IgG 抗体、AP 標識抗ラット IgG 抗体を加える。
- ・ 洗浄後、HRP および AP に対する蛍光基質を加え、発色させる。
- ・ 励起 540nm/蛍光 600nm および励起 360nm/蛍光 450nm の条件で測定する。
- ・ ハウスキーピング蛋白の測定結果でウェル間の蛋白量を補正し、定量を行う。

右図は既に、150 検体にて施行した cell-based ELISA assay の結果である。症例毎にポリクローナルな抗体産生が認められる（ラット海馬細胞）。

さらに自己免疫性辺縁系脳炎で GABA_A 受容体に対する自己抗体を持つ一群を報告した。その臨床的特徴は、浸潤性胸腺腫を合

併し、免疫療法に反応しがたく、言語性記憶障害が残存しやすいというものであった。血清学的には、GABA_A 受容体 3 サブユニットの細胞外エピトープが標的となり、抗体の結合により、シナプス上の受容体の減少が起こり、選択的に抑制性シナプス後電流を減少させることを明らかにした。

これらの結果を踏まえ、神経学会、神経科学会、神経免疫学会などでシンポジウム発表を行った。



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 13 件）

1. Sakiyama Y, Watanabe O, et al. (32 人中 7 番目). New type of encephalomyelitis responsive to trimethoprim/sulfamethoxazole treatment in Japan. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2015 Aug 13;2(5):e143. 2015（査読あり）
2. Yoshiko Murata, Osamu Watanabe, et al. (9 人中 2 番目). A case of autoimmune epilepsy associated with anti-leucine-rich glioma inactivated subunit 1 antibodies manifesting electrical shock-like sensations and transparent sadness. *Epilepsy and Behavior Case Reports* 4 91-93 2015（査読あり）
3. Kyoko Kanazawa, Osamu Watanabe, et al. (9 人中 6 番目) Persistent frequent subclinical seizures and memory impairment after clinical remission in smoldering limbic encephalitis. *Epileptic Disord* 16 312-317 2014（査読あり）

4. Ohkawa T, Watanabe O, Fukata M, et al. (10人中8番目 co-corresponding author) Identification and Characterization of GABA_A Receptor Autoantibodies in Autoimmune Encephalitis. J Neurosci 2014. 8151-8163. (査読あり)
5. Ohkawa T, Watanabe O, Fukata M, et al. (9人中8番目 co-corresponding author) Autoantibodies to epilepsy-related LGI1 in limbic encephalitis neutralize LGI1-ADAM22 interaction and reduce synaptic AMPA receptors. J Neurosci 2013 18161-18174. (査読あり)
6. Kaneko K, Watanabe O, Aoki M, et al. (10人中8番目) Anti-voltage-gated potassium channel antibody is associated with chronic autonomic and sensory neuropathy. J Neurol. 2013 Jan;260(1):315-7. (査読あり)
7. 渡邊 修. VGKC 関連抗体. BRAIN and NERVE 2013 65 巻(4): 401-411. (査読なし)
8. 渡邊 修. VGKC 複合体抗体関連疾患とアフェレス 日本アフェレス学会雑誌 32(3) 185-190 2013 (査読なし)
9. 渡邊 修. 「VGKC抗体」と神経疾患 神経内科 79(3) 319-326 2013 (査読なし)
10. 渡邊 修. 抗VGKC複合体抗体関連症候群 最新医学 68(7) 147-152 2013 (査読なし)
11. 渡邊 修. 自己免疫性脳炎の広がりとその進歩 心身医学 53(10) 2013 (査読なし)
12. 渡邊 修. 抗VGKC複合体抗体と免疫性神経疾患. 日本臨牀 71(5) 915-920 2013 (査読なし)
13. Fujita K, Yuasa T, Watanabe O, et al. (9人中3番目) Voltage-gated potassium channel complex antibodies in Creutzfeldt-Jakob disease. J Neurol. 2012 259:2249-50. (査読あり)

[学会発表](計9件)

1. Osamu Watanabe, Kimiyoshi Arimura, Satoshi Nozuma, Kumiko Michizono, Eiji Matsuura, Hiroshi Takashima. A proposal: Isaacs' syndrome (acquired neuromyotonia) diagnostic criteria. World Congress of Neurology 2015 10/31-11/5 Santiago(Chile)
2. 渡邊 修. VGKC 複合体抗体が関連する脳炎・脳症～LGI-1抗体脳炎とMorvan症候群～. 第20回日本神経感染症学会学術集会(シンポジウム 自己免疫性脳炎の臨床像と治療) 2015 10/22-23 ホテルメルパルク長野(長野県、長野市)
3. 渡邊 修. 筋緊張症候群と自己抗体. 第27回日本神経免疫学会学術集会(シンポジウム 免疫性神経疾患における診断マーカーとしての自己抗体の役割) 2015 9/15-16 長良川国際会議場(岐阜県、岐阜市)
4. Osamu Watanabe. Immune-mediated channelopathy in neuroimmunological diseases. Neuro2014(Neuroimmunology Cutting Edge Symposium) 2014 11/11-13 Yokohama (Japan)
5. 渡邊 修. Caspr-2抗体陽性 CNS 疾患: Morvan 症候群の血清学的・臨床的特徴. 第48回日本てんかん学会 2014 10/2-3 京王プラザホテル(東京都新宿区)
6. 渡邊 修. 抗 VGKC 複合体抗体に関する最近の話題～神経自己抗体によるチャンネル・受容体生體のメカニズム～ 第26回日本神経免疫学会(シンポジウム Autoimmune channelopathies-update) 2014 9/4-6 金沢歌劇場(石川県、金沢市)
7. 渡邊 修. 抗 VGKC 複合体抗体関連脳炎の最近の知見. 第55回日本神経学会総会(シンポジウム 自己免疫性脳炎の最近の知見) 2014 5/21-24 福岡国際会議場他(福岡県、福岡市)
8. 渡邊 修. VGKC 複合体抗体関連疾患におけるア

フェレス療法の有用性: up-to-date. 第34回日本アフェレス学会(シンポジウム難治性神経筋疾患におけるアフェレス療法) 2013 11/1-3 軽井沢プリンスホテル(長野県、軽井沢町)

9. 渡邊 修. Isaacs 症候群とその周辺疾患. 第54回日本神経学会(シンポジウム免疫性神経疾患の新しい展開) 2013 5/29-6/1 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

[図書](計7件)

1. 渡邊 修. 抗 VGKC 複合体抗体が関連する Isaacs 症候群、Morvan 症候群、辺縁系脳炎. Annual Reviews 2015 神経 中外医学社 93-99 2015
2. 渡邊 修. 抗 VGKC 複合体抗体辺縁系脳炎. 日本臨牀 73 巻(増刊号) 免疫性神経疾患 613-618 2015
3. 有村公良, 渡邊 修. Isaacs 症候群. 日本臨牀 73 巻(増刊号) 免疫性神経疾患 801-805 2015
4. 有村公良, 渡邊 修. Morvan 症候群. 日本臨牀 73 巻(増刊号) 免疫性神経疾患 806-810 2015
5. 渡邊 修. 抗 VGKC 複合体抗体を伴った辺縁系脳炎. 神経症候群(第二版) 日本臨牀 723-727 2014
6. 有村公良, 渡邊 修. アイザックス症候群. 今日の神経疾患治療指針. 水澤英洋、鈴木則宏、梶 龍児、吉良潤一、神田 隆、齊藤延人編. 822-824 医学書院 2013 東京
7. 渡邊 修. Isaacs 症候群と Morvan 症候群. 免疫性神経疾患ハンドブック(楠進編) 南江堂 285-295 2013

[産業財産権]

- 出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~intmed3/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 修 (WATANABE, Osamu) 鹿児島大学学術研究院医歯学域 医学部・歯学部病院 講師
研究者番号: 30511802

(2) 研究分担者

岸田昭世 (KISHIDA, Shosei) 鹿児島大学学術研究院 医歯学域医学系 教授
研究者番号: 50274064

高嶋 博 (Takashima, Hiroshi) 鹿児島大学学術研究院 医歯学域医学系 教授
研究者番号: 80372803

(3) 連携研究者

深田正紀 (Fukata, Masaki) 大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 生理学研究所 教授
研究者番号: 00335027