

—— 研究助成報告 ——

自己抗体介在性免疫性神経疾患の発症病態の解明

Pathogenesis of autoantibodies in autoimmune encephalopathies

田 中 恵 子^{1,2)}

要旨：原因不明で抗痙攣剤不応の難治性てんかんの一部は、自己免疫的機序を基盤とし、ステロイドなどの免疫療法が有効である。一部で神経・グリア細胞表面受容体に対する自己抗体が検出される（抗NMDA受容体・VGKC複合体抗体など）。いずれも、てんかんに加え、精神症状・意識障害・呼吸不全などを呈する。我々は、抗NMDA受容体抗体の本症病態への関与を検討し、以下を明らかにした。培養海馬細胞に抗体陽性患者髄液を添加すると、細胞膜NMDA受容体数が減少し、抗体除去により回復した。マウスの海馬スライスに患者髄液を添加し、記憶形成のモデルとされる長期増強誘導が抑制されたが、抗体吸収後の髄液で回復した。マウス脳室内に患者髄液を持続投与すると、神経組織の崩壊を伴わず空間認知機能が低下した。このことより、患者抗体はNMDA受容体機能を特異的に阻害し記憶力障害や精神症状に関与するが、神経組織が保たれるため長期予後が良好であることが説明できた。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2015；26：83-90

Key Words：anti-NMDAR encephalitis; autoantibodies; amnesia; mouse; neuron preservation

序論

てんかん患者の約30%は抗けいれん剤での発作抑制が困難といわれ、その原因が特定できない場合がある。一方、自己免疫性中枢神経疾患ではけいれん発作が主徴となる場合が多い。近年、神経細胞やグリアの細胞表面に存在する受容体に対する抗体を検出する技術が急速に進歩し、これまで診断に至らなかった例で相次いで自己抗体が検出され、免疫療法を加えることで発作抑制に至った例が多数知られるようになった。このような自己免疫性てんかんの特徴として抽出されたのは、1) 急性・亜急性（3ヶ月以内）に発症したてんかん、2) 発作型が多様、またはfaciobrachial dystonic seizure：FBDS

（上肢と同側の顔面に短時間のdystonic seizureを呈する）などの特徴的な発作型を示す、3) 抗痙攣剤への反応が不良、4) 先行感染（ウイルス感染症）がある、5) 中枢神経系の炎症を示唆する検査所見（髄液細胞・蛋白・IgG産生増加、オリゴクローナルバンド陽性、頭部MRIでのT2高信号病変、PETでの代謝亢進所見）がある、6) 本人・家族に自己免疫疾患がある、7) 悪性腫瘍の既往があり、後述の自己抗体が検出される、などの点が明らかになった^{1,2)}。このような例では、早期の免疫療法によりけいれん発作が速やかに抑制されるため、自己免疫疾患を基盤とした難治性けいれんの早期の診断が重要となる。

筆者は、自己免疫性脳炎として最も検出率が

¹⁾ 金沢医科大学総合医学研究所生命科学研究領域

²⁾ 金沢医科大学神経内科学

〒920-0293 石川県河北郡内灘町大学1-1]

Keiko Tanaka

¹⁾ Department of Life Science, Medical Research Institute, Kanazawa Medical University, Kanazawa, Japan

²⁾ Department of Neurology, Kanazawa Medical University, Kanazawa, Japan

高い自己抗体の一つである、抗N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) 抗体の検出系を確立したことから、全国諸施設から診断を求めて送付された検体について、以下の方法で抗体検出を行い、陽性例の臨床的特徴を明らかにした。また、本症における自己抗体の病変形成における役割を解明するため、培養神経細胞およびマウス脳スライス標本を用いて、患者抗体が記憶形成のモデルとされる長期増強の誘導を抑制すること、また、マウス脳内への患者抗体慢性投与により生じるマウスの行動変化を解析し、患者髄液投与群で有意に空間的記憶力が低下することを示した。

対象・方法

1. 患者検体

全国諸施設から抗NMDAR抗体脳炎を含む自己免疫性脳炎の可能性が考えられた症例で、金沢医科大学倫理委員会が審査・承認された検査説明に同意が得られ送付された検体を対象とした。

2. 抗NMDAR抗体の検出

NMDARは、グリシンが結合するGluN1 (NR1) サブユニット (必須サブユニット)、グルタミン酸が結合するGluN2 (NR2A~2D) あるいはNR3A-3Bの可変サブユニットが会合して形成される陽イオンチャネルであり、シナプスでのシグナル伝達や可塑性に関わる³⁾。

抗NMDAR抗体の検出には、GluN1およびGluN2サブユニットを共発現させた細胞を抗原として患者検体を反応させる、cell-based assay法を用いる⁴⁾。具体的には、GluN1, GluN2 (2Aまたは2B) をコードするcDNA (GenBank accession number NM-008169) を組み込んだプラスミドをLipofectamine (Invitrogen) にてhuman embryonic kidney (HEK) 293細胞にtransfectし、10 μ M MK-801を含む10% fetal bovine serum (FBS) 加Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) でovernight培養し、細胞表面に受容体を形成させる。その後、HEK 293細胞を4% paraformaldehyde (PFA) /0.1M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) で20分

固定し、10% goat serum/PBSにて非特異的結合をブロックし、患者髄液 (1:2) または血清 (1:40) を添加して4 $^{\circ}$ C overnight反応させ、蛍光ラベル二次抗体を加えてSlowFade Gold antifade reagent (Molecular Probes) で封入し、蛍光顕微鏡下で観察した。

3. 抗体結合によるNMDAR内在化

NMDAR GluN1およびGluN2Bを共発現させたHEK 293細胞に患者髄液を50%混じた培養液で、CO₂インキュベーター内で48時間培養し、FITC-抗ヒトIgGを反応させて形態観察を行った。同様に培養した別の培養皿では、48時間後に髄液を除いた通常の培養液に置換し、さらに48時間培養し、FITC-抗ヒトIgGを添加して形態観察を行った。

4. マウス海馬スライス切片での長期増強誘導に及ぼす患者髄液の効果

C57BL/6 マウス (23-27 g, 3-4ヶ月令) を麻酔下断頭後、海馬領域の横断切片 (300 μ m厚) を作成し、30 $^{\circ}$ C, 95% O₂+5% CO₂バブル下の灌流液 (NaCl 124mM, KCl 3.0mM, CaCl₂ 2.0mM, MgSO₄ 2.0mM, NaH₂PO₄ 1.3mM, NaHCO₃ 26mM, glucose 10-20 mM) で満たしたチャンバー内に60分静置後、CA1領域でfield excitatory postsynaptic potential (fEPSP) を記録した。チャンバー内に患者髄液 (1:30) を加えて5分後に、Schaffer collateralsを頻数刺激し、long-term potentiation (LTP) を誘導した。次いで、患者髄液を除いた灌流液に置換し同様の記録を行った。対照として、患者髄液からNMDAR発現細胞を用いて抗体を吸収した髄液を用い、その他、非炎症性神経疾患患者髄液、ヘルペスウイルス脳炎患者髄液、灌流液のみを用いた系も対照とした。LTPは、fEPSPの傾斜から計算し、平均 $\pm$ s.e.mで表示した。

5. マウス脳内への患者髄液持続投与における効果

マウスはC57BL/6 雄 (8週令, 22-24 g) を用いた。それぞれ8匹ずつ次の3グループ (患者髄液および非炎症性神経疾患対照からの髄液、

生食のみ)に分けて以下の行動解析を行った。

検体のマウス脳内への投与は、あらかじめ37°Cで48時間各検体に浸煎したinfusion micro-osmotic pump (Model 1004, Durect Corporation, Cupertino, CA, 注入速度0.11 μ L/h)を用い、stereotaxicに脳室内に刺入した注入針にカニューレで連結した後、ポンプは皮下に埋め込んだ。7日間の術創回復期間を経て、順次行動解析を行った。

1) Spontaneous locomotor activity

マウスを、赤外線ビームが縦横に放出されるケージ内で自由に行動させ、ビーム遮断回数を24時間記録し計数した。

2) Open-field test

等面積の明室・暗室を有する筒型ケージ中で、マウスが明室・暗室部分にとどまる時間をSMART (Panlab SLU, Cornella, Spain) にて算出した。

3) Novel object recognition test

マウスは空のケージ内で3分間自由に行動させる。その後、ケージ内に相同の2つの物体を5cm間隔で静置し、3分間の探索行動をさせ、一旦飼育ケージに戻す。24時間後、2つの物体の一方を異なる物体に置換した検査用ケージに戻し、3分間行動させ、新規物体の探索時間を計測してnovelty index を算出した。

4) Morris water maze test

水を張った円形プールの中、水面下1cmに置かれたプラットフォームの探索軌跡と到達時間を計測する。5日間プールの4カ所の異なる部位からマウスを投入してプラットフォームの探索訓練を行い、5日目にプラットフォームを除去して60秒間探索させ、その軌跡と目標付近を探索する時間をSMARTを用いて解析した。

5) 行動解析後の脳組織の形態学的観察

行動解析後、ランダムに選択したマウスを麻酔下でカニューレからメチレンブルーを注入し、検体が脳室内に投与されたことを確認した。すべてのマウスは麻酔・断頭後、刺入部から頭側・尾側各2mmの範囲を切り出して、一部は急速凍結後クリオスタット切片を作成し、残りの部分は4%PFA/PBSで固定後、パラフィン切片を作成してhematoxylin-eosin染色、および

NMDAR GluN1 (x100), GluN2B (x100), glial fibrillary acidic protein (GFAP) (x1000), リンパ球表面マーカー (CD4 (x20), CD8a (x50), CD138 (x100), CD68 (x100), またヒトIgGの沈着については抗ヒトIgGを用いて免疫染色を行った。

6) 脳組織での抗GluN1抗体を用いたウェスタンブロット

患者髄液、対照髄液、生食のみ注入のそれぞれのマウスから海馬領域を切離し、lysis buffer (20mM HEPES pH7.9, 0.3M NaCl, 0.1% Triton X-100, 10% glycerol, protease inhibitor cocktail) 中でホモジェナイズ、遠心後、上清を10%-20% Ready Gelsで電気泳動し、polyvinylidene fluoride transfer membraneにブロットし、マウス抗-GluN1抗体 (1:20) およびウサギ抗actin抗体 (1:2000) を反応させ、HRPラベル二次抗体を反応させた後、chemiluminescence substrate kitおよびLAS-4000でバンドを描出し、染色バンドの強度をImage J softwareを用いてactinとの相対比として求め、各群の平均値を算出した。

結果

1. 抗NMDAR抗体の検出

NMDAR GluN1およびGluN2Bを共発現させたHEK 293細胞の表面受容体に患者髄液 (1:2) が結合した自験抗NMDAR抗体陽性例 (Fig. 1) は、384例あり (2009-2014年)、抗体陽性例の臨床的特徴は、男女比1:12 (女92%)、平均発症年齢 23 ± 7.1 (3-60) 歳、精神症状での発症 85%、てんかん発作 47% (全身性45%, 部分性10%、うち重積3.6%)、不随意運動 71% (orofacial 55, choreoathetosis 47, abnormal catatonic posture 47)、自律神経症状 59%、中枢性低換気 59%、脳波異常 (徐波81%, てんかん性棘波19%)、MRI異常 62% (側頭葉内側面 36%)、髄液細胞増多 56%、蛋白増加 24%、OCB 27%、卵巣成熟奇形腫・嚢腫 54%、初期治療反応性良好 48%、再発 21%などの特徴が見られた。

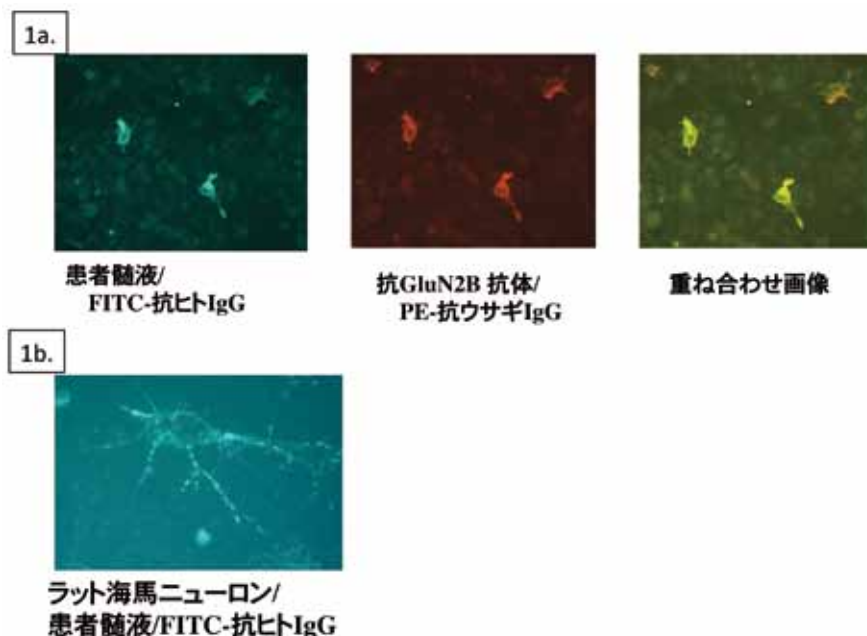


Fig. 1 Cell-based assay法による抗NMDAR 抗体染色パターン

- 1a. NMDAR GluN1およびGluN2Bを共発現させたHEK 293細胞に患者髄液を反応させ、FITC-抗ヒトIgGを加えて発色させると、細胞表面に沿った染色パターンが得られた。(同時にウサギ抗GluN2B抗体を反応させ、PE-抗ウサギIgGで二重染色を行い、患者抗体の結合局在が一致することを確認)
- 1b. 培養海馬細胞に患者髄液を反応させると、細胞表面および樹状突起に沿って染色が見られる。

2. 抗体結合によるNMDAR内在化

NMDARを発現する細胞に患者髄液を加えて培養すると、染色パターンが細胞表面から細胞内でのドット状のパターンとして見られるようになり、抗体を除去して培養を続けた細胞では新たに細胞表面が染色されるパターンに戻った (Fig. 2)。抗体が結合したことによる受容体の

内在化が生じたと考えられた。

3. マウス海馬スライス切片での長期増強誘導に及ぼす患者髄液の効果

マウス海馬切片でのLTP誘導においては、患者髄液を加えた場合、LTPの誘導が抑制されたが、抗体を吸収した髄液を用いたものでは誘

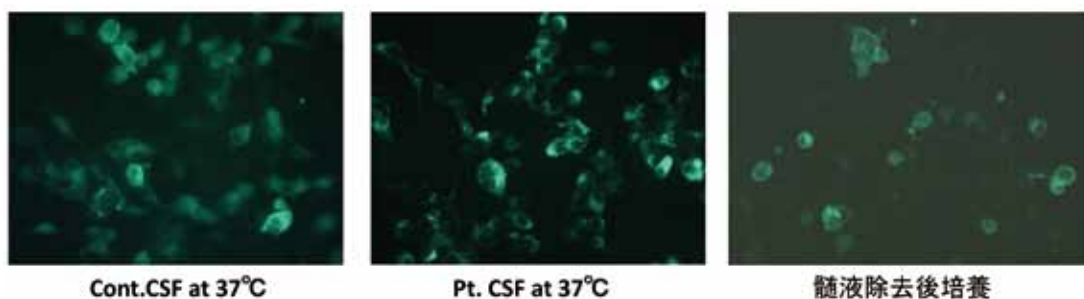


Fig. 2 抗NMDAR抗体による受容体の内在化

NMDAR GluN1およびGluN2Bを共発現させたHEK 293細胞を患者髄液とともに48時間培養すると、受容体の細胞表面での染色性が消失し、細胞内が染色された (中央)。患者髄液を培養液に置換して培養を続けると、再び細胞表面受容体が染色された (右)。

Fig3a. 海馬CA1シナプスでのLTP誘導における抗NMDAR抗体の効果

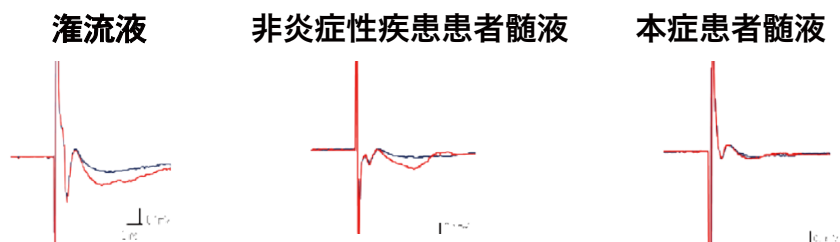


Fig3b. NMDARによる抗体吸収前後でのLTP誘導における効果

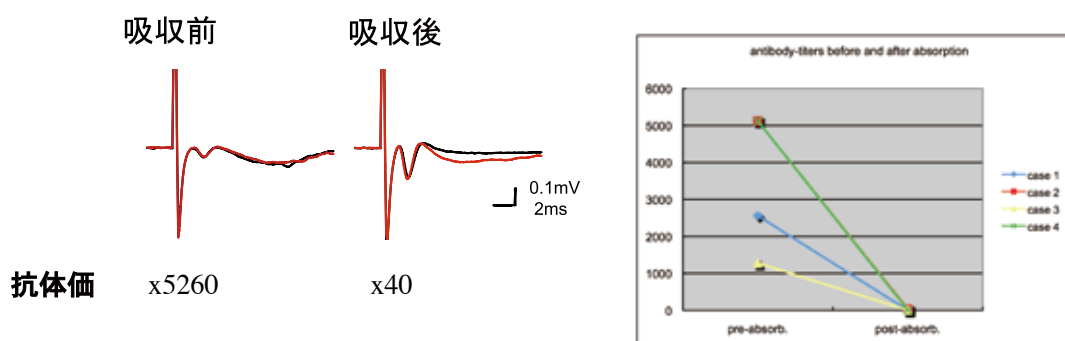


Fig. 3 患者髄液由来抗NMDAR抗体によるマウス海馬CA1シナプスでの長期増強誘導抑制
患者由来抗NMDAR抗体はマウス海馬スライスでの長期増強の誘導を抑制した (3a.右)。抗体を抗原で吸収した後の髄液では抑制が解除された (3b)。

導抑制が解除された (Fig. 3)。このことより、患者髄液中の抗NMDAR抗体はLTP誘導抑制に直接関与することが示され、自己抗体の存在が本症患者に生じる記銘障害に関与するものと考えられた。

4. マウス脳内への患者髄液持続投与における効果

検査したすべてのマウスで、検体が脳室内に投与されていることを確認した。Spontaneous locomotor activity, Open-field test, Novel object recognition test では、患者髄液群・対照髄液群の間で有意な差異は見られなかった。Morris water maze testでは、患者髄液群では、プラットフォームへの到達時間が対照に比し経時的に遅延し、その差は有意であった。また、プラットフォーム撤去後、同部位での探索

時間を比較したものでは患者髄液投与群で対照群に比し有意に短く、いずれの結果も空間認知機能の低下を示していた。

5. 行動解析後の脳組織の形態学的観察

HE染色標本で、患者髄液投与群では、側脳室内に少数の単核球浸潤を認めたが、海馬領域を含めた脳実質内には炎症細胞の浸潤は見られず、神経細胞脱落、グリア増生も見られなかった。抗GluN1抗体を用いた免疫染色では、患者髄液群で対照群に比し、海馬領域の染色性が低下していた。そのほか、リンパ球表面マーカーで染色される細胞は見られず、GFAPでの染色性増強は見られなかった。ヒトIgGの沈着はびまん性に見られたが、特定の構造に集積する傾向はなかった。

6. 脳組織での抗GluN1抗体を用いたウェスタンブロット

患者髄液投与群および対照髄液投与群の海馬領域のウェスタンブロットでは、患者髄液群でGluN1蛋白量が低下していた。

考察

自己抗体が介在する免疫性神経疾患のうち、抗NMDA受容体脳炎は、特徴的な臨床像を呈する比較的頻度の高い疾患である。若年女性に多く、亜急性の経過で精神症状、けいれん、意識障害、不随意運動などを呈し、重症例では数ヶ月にわたり人工呼吸器装着下で寝たきりとなるものの、早期に血液浄化療法および免疫療法で抗体産生を抑制することにより、後遺症なく治癒する場合がある⁵⁾。患者血清・髄液中に抗NMDA受容体抗体が検出されるが、抗体の存在と病態形成機序との関連は不明であった。

今回我々は、本症での自己抗体の病変形成における役割を解明するため、神経組織を用いた*vitro*での解析およびマウス脳内に抗体を投与しての*vivo*での検討を行った。

マウス海馬スライス標本を用いて、記憶形成のモデルとされる長期増強誘導に及ぼす影響を電気生理学的に解析した結果、患者由来のIgG抗体を添加することで、長期増強誘導を抑制、IgGを抗原蛋白で吸収した検体では誘導抑制が生じないことを確認した⁶⁾。このことは、本症での抗NMDAR抗体が、記憶力障害やそれを背景にした精神症状の発現に直接関与しうることを明らかにしたのは初めての報告となった。また、抗体をマウス脳内に長期投与することで空間認知機能の障害が検出できた。これらのマウス脳では炎症性の神経組織破壊が見られず、本症患者が重篤な精神症状や難治性けいれんを呈するものの、長期的には後遺症を残さず良好な予後を呈する場合があることの背景を説明するものと考えられた^{7,8)}。

文献

- 1) Toledano M, Britton JW, McKeon A, Shin C, Lennon VA, Quek AM, et al. Utility of an immunotherapy trial in evaluating patients with presumed autoimmune epilepsy. *Neurology*. 2014 ; **82**(18) : 1578-86.
- 2) Ramanathan S, Bleasel A, Parratt J, Orr C, Dale RC, Vincent A, et al. Characterization of a syndrome of autoimmune adult onset focal epilepsy and encephalitis. *J Clin Neurosci*. 2014 ; **21** : 1169-115.
- 3) Köhr G. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res* 2006 ; **326** : 439-446.
- 4) Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 2008 ; **27** : 1091-98.
- 5) Titulae MJ, McCracken L, Gabilondo I, Armangué T, Glaser C, Iizuka T, et al. Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study. *Lancet Neurol* **12** : 157-65, 2013.
- 6) Zhang Q, Tanaka K, Sun P, Nakata M, Yamamoto R, Sakimura K, et al. Suppression of synaptic plasticity by cerebrospinal fluid from anti-NMDA receptor encephalitis patients. *Neurobiol. Dis.* 2012 ; **45** : 610-615.
- 7) Tanaka K, Li Y, Kato N, Takegami T. Memory disturbance of the mice treated with intraventricular administration of CSF from NMDAR-encephalitis patients. AAN Annual Meeting 2014, Philadelphia (Abstr. P5.178.)
- 8) Planagumà J, Leypoldt F, Mannara F, Gutiérrez-Cuesta J, Martín-García E, Aguilar E, et al. Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain*. 2015 ; **138**(Pt 1) : 94-109.

Summary

Pathogenesis of autoantibodies in autoimmune encephalopathies

Keiko Tanaka

Autoimmune epilepsy producing disease-specific autoantibodies has been increasingly recognized with the development of new antibody-detection method. In these disorders, the autoantibodies to synaptic cell surface antigens, such as anti- N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)- and leucine-rich glioma-inactivated protein 1 (LG11)-antibodies have attracted considerable attention. Those with antibodies against cell surface proteins are usually well responsive to immune therapy such as plasmapheresis or antibody-deprivation therapies.

We studied the pathogenesis of the autoantibodies in anti-NMDAR encephalitis. The NMDARs are expressed on the cell surface with assemblies of 4 subunits (GluN1/GluN2) that recognized with the patients' IgG. We could show the direct effects of the patients' IgG containing anti-NMDAR antibodies on the internalization of receptor clusters expressed on the neuronal cell surface, inhibition on induction of long term potentiation, and producing memory disturbance in mice chronically treated with the patients' CSF into lateral ventricles without neuronal tissue destruction.

These results suggested that the autoantibodies directly affected the functional disturbance of NMDARs causing amnesic symptoms in this encephalitis without neuronal tissue damage resulted in favorable outcome of the disease.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2015 ; 26 : 83-90

