

シナプス機能障害における自己抗体の探索と病態解明

自然科学研究機構 生理学研究所
深田優子

1. 目的

申請者はこれまで、遺伝性てんかん関連蛋白質LGI1が膜蛋白質ADAM22のリガンドであることを発見し、LGI1がAMPA型グルタミン酸受容体を介した脳内の興奮性シナプス伝達を制御するシナプス伝達修飾リガンドであることを見出した (Fukata et al, Science 2006 ; PNAS 2010)。一方最近、亜急性に記憶障害やけいれんをきたす辺縁系脳炎の患者血清中に抗LGI1自己抗体が存在することが報告された (Lai M et al, Lancet Neurol 2010)。私共は国内の自己免疫性神経疾患患者血清を網羅的に解析し、LGI1自己抗体がLGI1とADAM22との結合を阻害し、AMPA受容体機能を低下させ、辺縁系脳炎の原因となっていることを示した (Ohkawa, Fukata et al, J Neurosci 2013)。このように「シナプス伝達関連分子の自己抗体」は直接様々な脳神経障害を惹起し、脳炎・脳症の多様な病態像を形成すると推測されるが、潜在する自己抗体の全容は不明である。そこで、本研究では、自己免疫性脳炎の原因となる自己抗体を同定し、その標的抗原蛋白質のシナプス伝達制御における生理機能と自己抗体の作用機序を明らかにすることを目的とした。これにより、シナプス機能障害による脳炎病態を解明し、診断・治療法を開発につなげることを目指した。

2. 方法

1) 自己免疫性脳炎の原因となる自己抗体の同定

自己免疫性神経疾患患者の血清・髄液を用いて、患者血清・髄液中に存在する自己抗体を探索した (鹿児島大学医学部神経内科・渡邊修医師及び国立静岡てんかん神経医療センター・高橋幸利医師が全国の主治医を介して患者の同意を得て収集したヒト検体を用いた (実験計画は生理学研究所、鹿児島大学、静岡てんかん神経医療センターの倫理委員会で承認済みである)。これまで未解析だった検体と新規検体約100例をあらたに解析した。シナプス伝達機能分子や修飾分子に対する自己抗体を同定するために、ラット脳、海馬由来の培養神経細胞表面に結合する患者血清を細胞表面免疫染色法にてスクリーニングした。次に結合したヒト免疫グロブリンを免疫沈降し、共沈降した細胞表面抗原を質量分析法にて同定した。

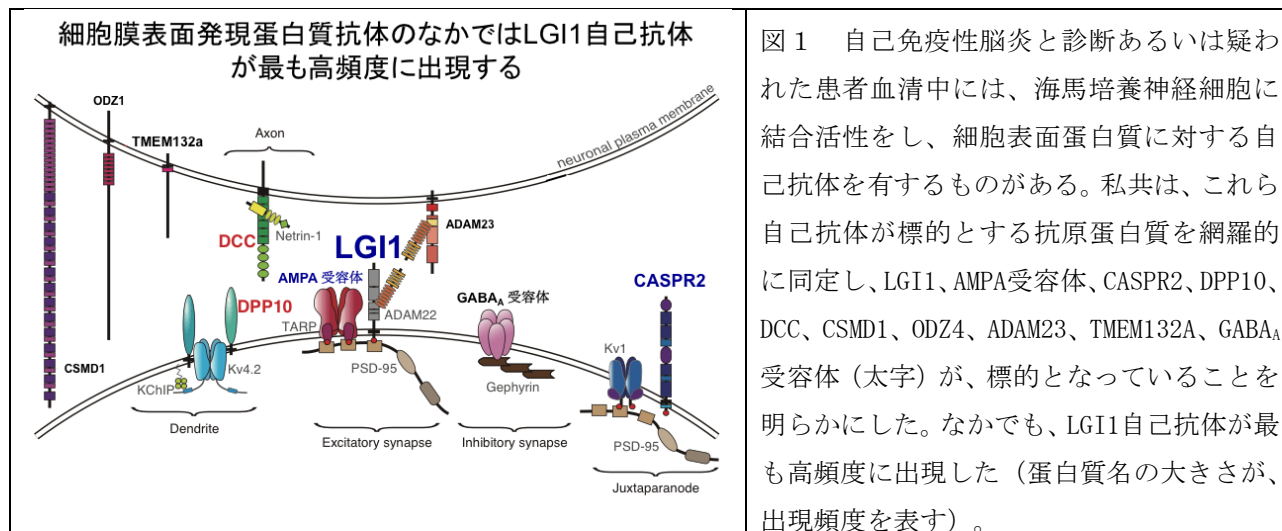
2) 自己抗体標的蛋白質のシナプス伝達制御における生理機能の解析

上記で得られた標的抗原の中で、1) 高頻度に出現し、2) 患者間共通の脳・神経症状 (例えば記憶障害やけいれん等) があり、3) 選択的単独で標的となっているもの (複数の自己抗体が共存していないもの) に着目して、その生理機能を解明することとした。本研究では、1) の新規スクリーニングによってもやはり、自己免疫性脳炎患者において最も高頻度かつ単独に自己抗体の標的であることが分かったLGI1に着目してさらに生理機能の解析を進め、下記3で述べる結果を得た。また、患者検体 (血清、髄液) 中のLGI1自己抗体を迅速、特異的に検出する手法の開発を進めた。

3. 結果

1) 前回のスクリーニング (Ohkawa, Fukata et al, J Neurosci 2013) と併せた約250例の血清検体 (自己免疫性神経疾患と診断あるいは疑われる) において、LGI1に対する自己抗体が最も高頻度に出現した (図1)。LGI1自己抗体を定量的に検出するELISA法を用いた結果、辺縁系脳炎と診断された92例のうち、50例 (54.3%) がLGI1自己抗体強陽性であった。一方、LGI1自己抗体強陽性の全60例のうち、83.3%が辺縁系脳炎と診断されており、またそのほとんどの症例で他の自己抗体が検出されず単独関与と考えられた。LGI1自己抗体は、

末梢神経系症状を示す自己免疫疾患である神経筋緊張症の数例でも検出された (8.3%) が、常にCASPR2自己抗体やDCC自己抗体と共存していた。健常者や神経変性疾患など他の脳疾患でLGI1自己抗体が陽性になることはなかった。一方、今回検体数を増やした結果、ある特徴的な中枢神経症状を単独で示し、辺縁系脳炎と診断されなかった症例でもLGI1自己抗体が出現することが分かった (8.3%)。以上の結果から、大脳辺縁系症状を特徴とする自己免疫性脳炎では、LGI1自己抗体の関与がもっとも強く、LGI1蛋白質が大脳辺縁系機能に必須である可能性が強く示唆された。また、LGI1自己抗体は、辺縁系脳炎の範疇に入らない脳病態とも関与する可能性があり、さらなる解析が必要であると考えられた。



2) 辺縁系脳炎の診断において、LGI1自己抗体の測定は高い陽性的中率(83.3%)とともに、すでに報告しているように(Ohkawa, Fukata et al, J Neurosci 2013)、高い特異度93.9%を示した。患者検体 (血清、髄液) 中のLGI1自己抗体を迅速、特異的に検出する手法の開発に向けて、ヒトLGI1蛋白質を細胞表面に発現する安定発現細胞株を得た。この細胞株は、自己免疫性辺縁系脳炎患者血清中のヒトIgGと特異的な結合を示すことを確認した。LGI1自己抗体測定法を辺縁系脳炎の診断法として確立するため、技術提供を開始した。

3) 私共はこれまでに、LGI1が分泌蛋白質でありADAM22を受容体とすること、AMPA受容体を介したシナプス伝達を制御すること、LGI1を欠損させたノックアウトマウスが致死性てんかんを必発することを報告してきた。またLGI1が大脳辺縁系のなかでも海馬(歯状回、CA1およびCA3)および嗅内皮質に高発現していることを見出した (以上、Fukata et al, Science 2006; Fukata et al, Proc Natl Acad Sci USA 2010; Yokoi et al, Nat Med 2015)。今回、LGI1ノックアウトマウスの海馬歯状回の顆粒細胞のみにLGI1を発現させたマウスを樹立し、LGI1の組織染色を行ったところ、LGI1蛋白質は顆粒細胞の軸索に相当するMossy繊維と、樹状突起が分布する歯状回分子層に特異的に発現していることを見出した。すなわち、LGI1はプレシナプス (軸索側) とポストシナプス (樹状突起側) の両方から分泌されることが明らかとなった。次に、UCSFのNicolli博士らとの共同研究にて、LGI1受容体であるADAM22のノックアウトマウスにおいてもLGI1ノックアウトマウスと同様にAMPA受容体を介したシナプス伝達が減弱していることを見出した (Lovero K et al, Proc Natl Acad Sci USA 2015)。以上の結果から、シナプス間隙で分泌されたLGI1とADAM22の結合が海馬の興奮性シナプス伝達を制御することが明らかになった。現在、LGI1-ADAM22下流の細胞内情報伝達経路の解析を進めている。

4) 今回のスクリーニングでは、前回までのスクリーニング(Ohkawa, Fukata et al, J Neurosci 2013)で同定された抗原 (図1) を繰り返し見出したが、新たな標的抗原を見出すことはなかった。現在の手法で検出可能な自己抗体は、ほぼすべて同定できたと考えられる。今後、他に潜在する抗体がないか新たな検出法により調べる必要があるだろう。これまでの全スクリーニングを併せて、複数症例 (計2例) で検出され

た機能未知の標的抗原について、その生理機能の解析を開始した。現在、生化学的、組織学的にこの蛋白質の細胞内、脳内発現、局在を調べている。今後、シナプス伝達や海馬機能における生理機能を明らかにする。

4. 考察

自己免疫性神経疾患領域は、現在最も注目を集めている神経内科の研究領域と位置づけられる。とくに、脳炎・脳症は早期の適切な診断と治療がその予後すなわち後遺症の有無を左右する。本研究のようなアプローチにより、自己抗体と臨床症状の関連性、自己抗体の標的抗原の生理機能を詳細に明らかにできれば、自己免疫性脳炎の病態の理解と診断手法の開発に大きく貢献できると考えられる。なかでも、辺縁系脳炎の病原性抗体の標的として明らかになったLGI1は、ヒトの家族性てんかんの原因遺伝子としても知られおり、最近私共はLGI1と受容体ADAM22の結合の重要性を遺伝学的に示した (Yokoi et al Nat Med 2015 ; Lovero K et al, Proc Natl Acad Sci USA 2015) 。さらに最近、ADAM22遺伝子の変異をヒトのある脳疾患で初めて見出し、この変異がADAM22のLGI1結合を低下させることを明らかにした (Muona M et al, Neurology Genetics in press) 。LGI1-ADAM22は脳機能において普遍的に必須な機能を発揮するものと考えられる。今後、LGI1-ADAM22の結合の脳機能における生理機能と脳病態における役割について、さらに明らかにすることを目指す。

5. 参考文献(発表論文)

1. Muona M, Fukata Y, Anttonen A, Laari A, Palotie A, Pihko H, Lönnqvist T, Valanne L, Somer M, Fukata M, Lehesjoki A. Dysfunctional ADAM22 implicated in progressive encephalopathy with cortical atrophy and epilepsy. **Neurol Genet.** in press.
2. Fukata Y, Murakami T, Yokoi N, Fukata M. Local palmitoylation cycles and specialized membrane domain organization. **Curr Top Membr.** in press.
3. Lovero KL, Fukata Y, Granger AJ, Fukata M, Nicoll RA (2015) The LGI1-ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. **Proc Natl Acad Sci USA.** 112:E4129-37. (F1000 Prime, Recommended)
4. Yokoi N, Fukata Y, Kase D, Miyazaki T, Jaegle M, Ohkawa T, Takahashi N, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Imoto K, Meijer D, Watanabe M, Fukata M (2015) Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial temporal lobe epilepsy. **Nat Med.** 21:19-26.
5. Fukata M, Sekiya A, Murakami T, Yokoi N, Fukata Y (2015) Postsynaptic nanodomains generated by local palmitoylation cycles. **Biochem Soc Trans.** 43:199-204.
6. 横井紀彦、深田正紀、深田優子 (2015) 「ケミカルシャペロンを用いた蛋白質構造異常の修復はてんかんモデルマウスの上昇したけいれん感受性を軽減する」 **細胞工学** (秀潤社) 34, 512-513.