

Figure 3. Intracellular distribution of exophilin4, Rab27a, and glucagon granules. (A) TC1.6.6 cells were transfected with a plasmid encoding either HA-tagged exophilin4 (a–c) or Xpress-tagged Rab27a (d–f). They were then double-immunostained with anti-glucagon and either anti-HA (a–c) or anti-Xpress antibodies (d–f), and observed with a confocal microscope. Merged fluorescent signals are shown in c and f. (B) TC1.6/phogrin-EGFP cells (a–c) or those transiently transfected with an expression plasmid encoding HA-tagged full-length (d–f) or C-terminal exophilin4 (579–910 amino acids; g–i) were fixed and stained with anti-glucagon (a–c) or anti-HA antibodies (d–i). Intrinsic EGFP fluorescence signals (a, d, and g), immunostaining signals (b, e, and h), and merged signals (c, f, and i) are shown. Bars, 10 μ m.

area and did not induce the peripheral redistribution of the granules (Figure 3A, d–f). These findings suggest that exophilin4 is localized on glucagon granules in the cell periphery and may target interior granules close to the plasma membrane.

To examine the peripheral targeting activity more directly, we established an TC1.6 cell line that stably ex-

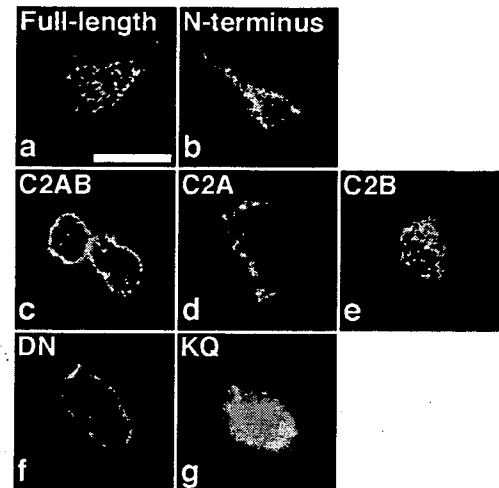


Figure 4. Subcellular localization of N-terminal and C-terminal portions of exophilin4. TC1.6 cells were transfected with an expression plasmid encoding the full-length (a), N terminus (b), C2AB domain (c), C2A domain (d), or C2B domain (e) of exophilin4 with the HA-tag. The HA-tagged C2A domain harboring the DN (f) or KQ mutation (g) was similarly expressed in TC1.6 cells. The cells were fixed and stained with anti-HA antibodies and observed with a confocal microscope. Bar, 10 μ m.

pressed phogrin-EGFP. We previously used this fusion protein as a fluorescent marker of secretory granules and showed that overexpression of granuphilin promotes the plasma membrane targeting of insulin granules in a cell line (Torii *et al.*, 2004). Immunostaining analysis indicated that phogrin-EGFP was colocalized with glucagon on the secretory granules, although it was also colocalized with it around the perinuclear Golgi/endosomal region (Figure 3B, a–c). We thus can follow the motion of glucagon granules by tracking the EGFP fluorescence in these cells. When HA-tagged exophilin4 was transiently overexpressed, EGFP signals were clearly redistributed at the peripheral region exactly where exogenous exophilin4 was colocalized (Figure 3B, d–f). In contrast, neighboring untransfected cells showed only punctate EGFP signals mainly distributed in the interior cytoplasm. The peripheral redistribution of EGFP signals was not seen by the expression of the C-terminal exophilin4 lacking the Rab binding region (Figure 3B, g–i). These observations support the notion that exophilin4 induces translocation of glucagon granules toward the plasma membrane, as granuphilin does for insulin granules (Torii *et al.*, 2004).

We previously showed that granuphilin mediates the docking of insulin granules to the plasma membrane, in which the interaction of its N-terminal region with the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) protein syntaxin-1a is critical (Torii *et al.*, 2002, 2004; Gomi *et al.*, 2005). Thus, in the present study, we explored whether exophilin4 also interacts with the plasma membrane SNARE proteins syntaxin-1a and/or SNAP-25 by using coimmunoprecipitation experiments. However, we failed to detect such interactions, although the possibility remains that our anti-exophilin4 antibodies raised against the N-terminal region might have sterically hindered them. To identify the region most important for the plasma membrane-targeting activity, we expressed a portion of exophilin4 protein with the HA tag in TC1.6 cells and determined the subcellular localization by an immunostaining analysis (Figure 4, a–e). We found that full-length exophilin4 is dis-

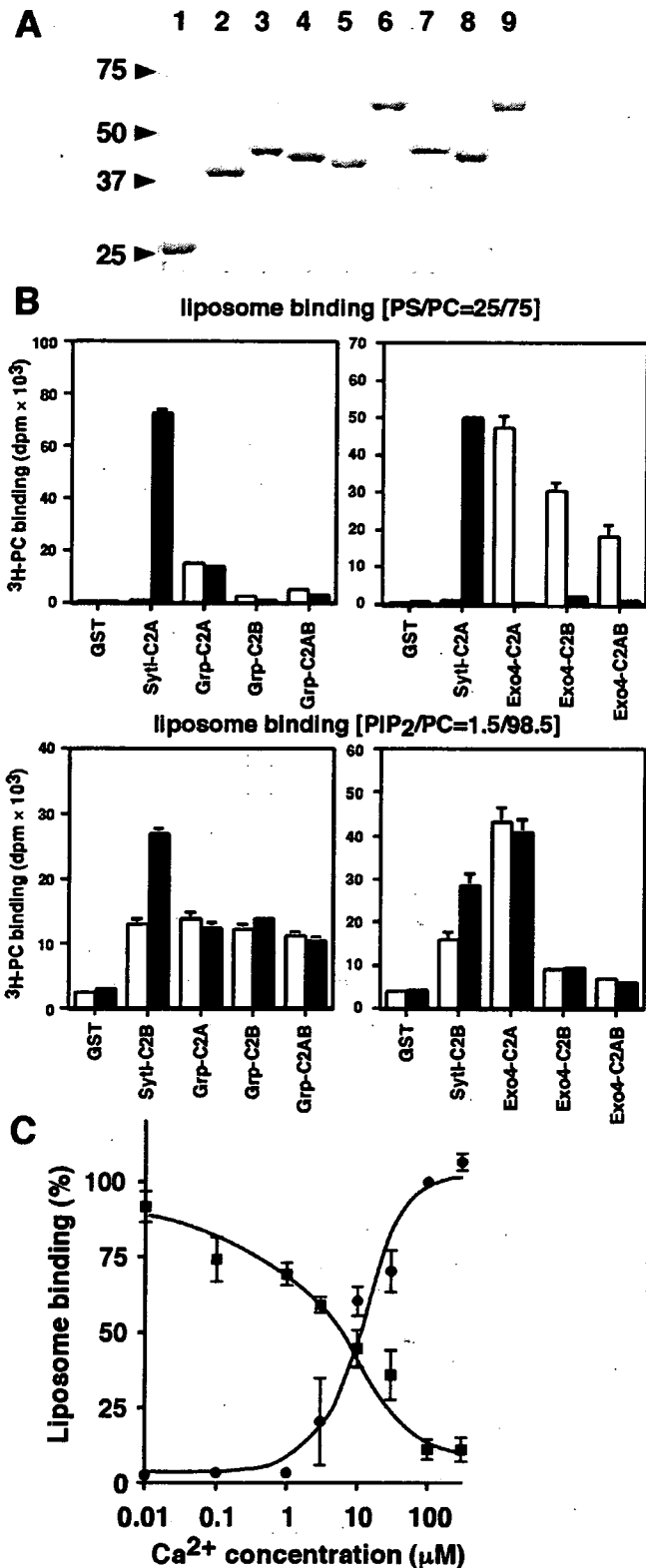


Figure 5. Liposome binding to the C2 domains of synaptotagmin I, granuphilin, and exophilin4. (A) Recombinant proteins were produced in *E. coli* and purified with glutathione-Sepharose 4B. Equivalent amounts (2 μg) of each GST-fused protein were electrophoresed on a 10% polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue: GST protein (lane 1); synaptotagmin I-C2A (lane 2) and synaptotagmin-C2B (lane 3); exophilin4-C2A (lane 4), exophilin4-C2B (lane 5), and exophilin4-C2AB (lane 6); and granuphilin-C2A (lane 7),

tributed in both peripheral and interior regions, whereas the Rab27a-interacting N-terminal region showed only an intracellular punctate pattern. In contrast, the C-terminal region containing the C2AB domains or the single C2A domain was concentrated in the periphery, although the single C2B domain was localized diffusively in the cytoplasm. These findings suggest a role of the C2 domains, especially the C2A domain, for the targeting activity.

Ca²⁺ and Phospholipid Binding of Exophilin4 C2 Domains

Although some C2 domains reportedly interact with other proteins, their unequivocal function is the ability to bind phospholipids either in a Ca²⁺-dependent or -independent manner (Nalefski and Falke, 1996). To examine the Ca²⁺- and phospholipid-binding activity, GST-fused C2 domains of exophilin4 were produced in *E. coli* and purified (Figure 5A). For comparison, the C2 domains of synaptotagmin I and granuphilin were produced. As established previously (Davletov and Südhof, 1993), the first C2 domain of synaptotagmin I (GST-SytI-C2A) showed a high binding activity to the ³H-labeled liposomes containing PS, a negatively charged, plasma membrane phospholipid, only in the presence of 100 μM Ca²⁺ (Figure 5B, top left). Also as reported previously (Wang et al., 1999), the first C2 domain of granuphilin (GST-Grp-C2A) had a weak, Ca²⁺-independent binding activity to the PS liposome, whereas the second C2 domain (GST-Grp-C2B) had no binding activity to it. By contrast, the C2 domains of exophilin4 (GST-Exo4-C2A, -C2B, and -C2AB), especially the C2A domain, exhibited binding activities comparable to GST-SytI-C2A, but surprisingly, only in the absence of Ca²⁺ (Figure 5B, top right). Thus, the PS-binding activity of GST-Exo4-C2A had a Ca²⁺ sensitivity that was completely opposite to that of GST-SytI-C2A. We then measured the Ca²⁺ sensitivity of these two proteins in detail in buffers containing various free Ca²⁺ concentrations (Figure 5C). Consistent with a previous report (Davletov and Südhof, 1993), Ca²⁺ cooperatively stimulated the PS-liposome binding of GST-SytI-C2A (EC₅₀ 11.6 μM). In contrast, Ca²⁺ inhibited the binding of GST-Exo4-C2A in a dose-dependent manner (EC₅₀ 6.2 μM). Because regulated exocytosis generally occurs with a Ca²⁺ dependence in the 2–30 μM range (Burgoyne and Morgan, 2003), exophilin4 may physiologically dissociate from PS on the plasma membrane, as synaptotagmin I associates with it, in response to a secretory stimulus.

We next examined the binding activity of these C2 domains toward PIP₂, a highly charged phospholipid that is implicated in the fusion of secretory vesicles with the plasma membrane in response to a secretagogue (Martin, 2001). The

granuphilin-C2B (lane 8), and granuphilin-C2AB (lane 9). Numbers to the left of the panel are molecular masses in kilodaltons. (B) GST-fused recombinant proteins bound to glutathione-Sepharose 4B were incubated with ³H-labeled liposomes in the absence (open bars) or presence (black bars) of 100 μM Ca²⁺. ³H-labeled liposomes were composed of PC mixed with either PS (top) or PIP₂ (bottom). Phospholipid binding was measured by scintillation counting of the beads after extensive washing and are represented as the means ± SEM (n = 7). (C) Binding of ³H-labeled liposomes containing PS to synaptotagmin I-C2A (circles) or exophilin4-C2A (squares) was examined in buffers containing various free Ca²⁺ concentrations. The data are normalized to the binding of synaptotagmin I-C2A at 100 μM Ca²⁺ or that of exophilin4-C2A without the addition of the CaCl₂ solution, respectively, and are represented as means ± SEM (n = 3).

second C2 domain of synaptotagmin I (GST-SytI-C2B) exhibited a significant binding activity to the PIP₂ liposome, which was modestly stimulated by Ca²⁺ (Figure 5B, bottom), as reported previously (Bai *et al.*, 2004). GST-Exo4-C2A had a higher PIP₂-binding activity than GST-SytI-C2B both in the presence and absence of Ca²⁺. By contrast, the C2B domain of exophilin4 and both C2 domains of granophilin showed relatively weak, Ca²⁺-independent binding activities to the PIP₂ liposome. GST-Exo4-C2AB exhibited weaker binding activities toward both PS and PIP₂ than GST-Exo4-C2A or -C2B, suggesting inefficient folding of the larger C2AB protein in bacteria and/or interference in lipid binding by the intramolecular interaction between the C2A and C2B domains.

Ca²⁺ and Phospholipid Binding of Exophilin4 Mutants

To examine the functional role of the Ca²⁺- and phospholipid-binding activity, we introduced mutations into the C2A domain of exophilin4. One of the mutations, designated KQ, changes a cluster of five lysine residues to glutamine residues. The corresponding mutant in mouse exophilin4 was previously shown to lose the PS-binding activity (Kuroda and Fukuda, 2004). Another novel mutant, designated DN, carries three substitutions of asparagine for aspartate. The corresponding aspartate residues in the C2A domain of synaptotagmin I are crucial for the Ca²⁺ binding (Südhof and Rizo, 1996; Bai and Chapman, 2004), although only three of the five aspartates in synaptotagmin I are conserved in exophilin4. These mutant proteins were bacterially produced (Figure 6A) and used for the liposome binding assay as described above. GST-Exo4-C2A^{KQ} lacked the binding activity to PS regardless of the presence of Ca²⁺ (Figure 6B). By contrast, GST-Exo4-C2A^{DN} exhibited a high PS-binding activity even in the presence of Ca²⁺ and largely lost the Ca²⁺ sensitivity, although a small Ca²⁺-dependent decrease was still observed. We then examined the binding activity to the PIP₂ liposome (Figure 6C). GST-Exo4-C2A^{KQ} again lost the binding activity to PIP₂, whereas GST-Exo4-C2A^{DN} showed a Ca²⁺-independent PIP₂-binding activity similar to the wild type. These findings indicate that the series of positively charged lysine residues in the C2A domain are essential for binding to both PS and PIP₂ and that the three aspartates whose homologous residues are involved in the Ca²⁺ binding of the synaptotagmin I-C2A domain are critical for the Ca²⁺-inhibitory PS-binding activity of exophilin4.

The Granule-targeting Activity of Exophilin4 Mutants

We next examined whether the drastic changes in the affinity to phospholipids affect the subcellular localization of these mutants. The HA-tagged, mutant C2A domain was expressed in TC1.6 cells and subjected to the immunostaining analysis. As shown before (Figure 4, d), the wild-type C2A domain was located in both interior and peripheral cell areas. The DN mutant exhibited a more prominent peripheral distribution (Figure 4, f). By contrast, the KQ mutant was diffusively localized in the cytoplasm (Figure 4, g), as was found in melan-a cells (Kuroda and Fukuda, 2004). Thus, the plasma membrane localization of the C2A proteins is highly correlated with the binding activity to phospholipids, especially to PS.

We then expressed full-length exophilin4 protein that contained either the wild-type or mutant C2A domain in TC1.6/phogrin-EGFP cells to examine the subcellular localization and the granule-targeting activity. Exogenous human exophilin4 was expressed at levels that were 3 times higher than those of endogenous mouse exophilin4 by recombinant adenoviruses (Figure 7A). The localization of the

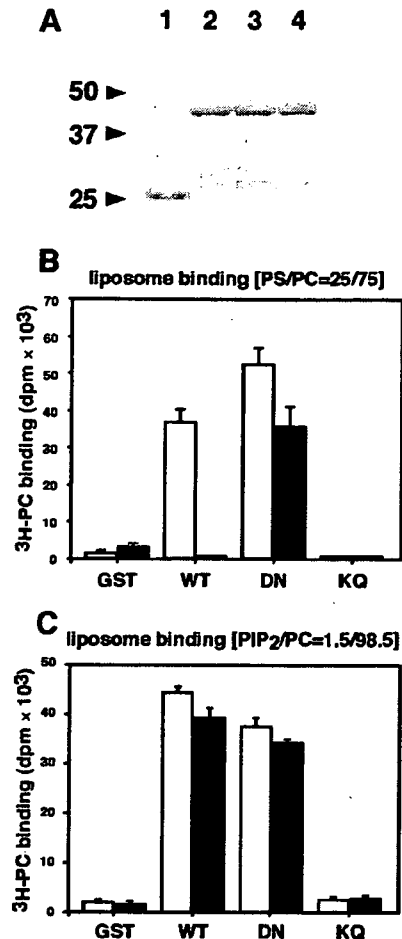


Figure 6. Liposome binding to the wild-type and mutant C2A domains of exophilin4. (A) Equivalent amounts (2 μ g) of GST protein (lane 1), wild type (lane 2), DN mutant (lane 3), and KQ mutant, GST-fused exophilin4-C2A proteins (lane 4) were electrophoresed and stained by Coomassie blue. Numbers to the left of the panel are molecular masses in kilodaltons. (B and C) GST-fused recombinant proteins were incubated with ³H-labeled liposomes containing either PS (B) or PIP₂ (C) in the absence (open bars) or presence (black bars) of 100 nM Ca²⁺. Data are shown as means SEM (B, n = 7; C, n = 6).

full-length exophilin4 proteins was highly correlated with that of each C2A domain (Figure 7B, left column). Thus, the wild type was located in both interior and peripheral regions, whereas the DN mutant was strongly concentrated in the periphery. By contrast, the KQ mutant was exclusively located in the interior. In contrast to the single C2A domains; however, the full-length proteins were punctately localized in the cytoplasm probably via the N-terminal interaction with Rab27a on glucagon granules. These findings suggest that the C2A domain has a predominant role in determining the plasma membrane localization of the whole exophilin4 protein. The EGFP fluorescence reflecting the granule distribution was concentrated exactly where the exogenous exophilin4 was accumulated (Figure 7B, middle and right columns). Cells infected with the adenovirus expressing wild-type exophilin4 displayed a more peripheral redistribution of EGFP-labeled granules compared with those expressing control β -gal protein. The DN mutant showed a significant enhancement in the granule-targeting activity. Quantitative measurement revealed an 1.7-fold increase compared with the wild type (Figure 7C). By contrast, the KQ mutant com-

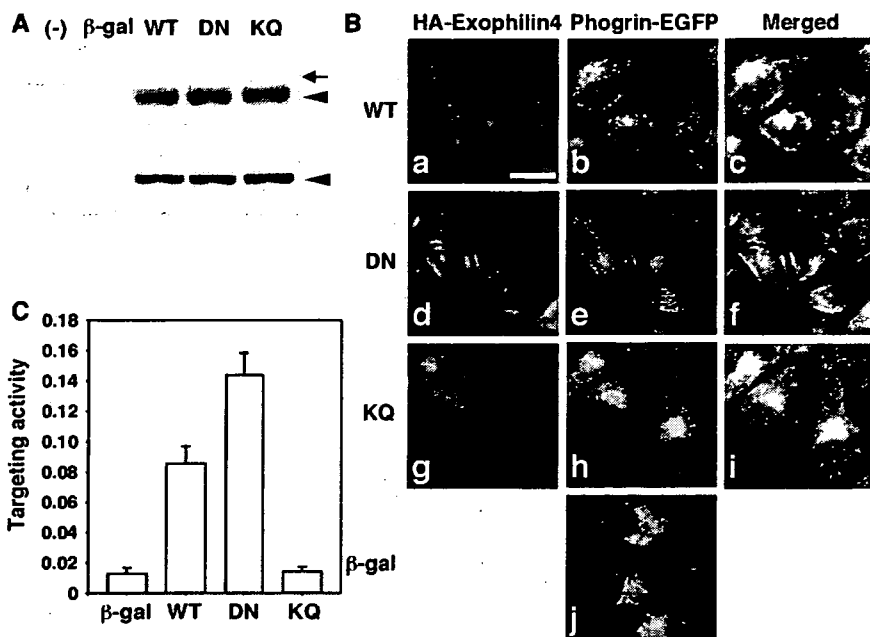


Figure 7. Granule-targeting activity of wild-type and mutant exophilin4. (A) TC1.6/phogrin-EGFP cells were infected with adenovirus bearing β -gal, HA-tagged exophilin4^{WT}, exophilin4^{DN}, or exophilin4^{KQ} cDNA. The expression levels of endogenous (arrow) and exogenous exophilin4 (arrowhead) were determined by immunoblotting with anti-exophilin4 antibodies (top). Exogenous human exophilin4 migrated slightly faster than endogenous mouse exophilin4. The expression levels of exogenous exophilin4 (arrowhead) were also examined by immunoblotting with anti-HA antibodies (bottom). (B) TC1.6/phogrin-EGFP cells were infected with recombinant adenovirus encoding HA-tagged exophilin4^{WT} (a–c), exophilin4^{DN} (d–f), or exophilin4^{KQ} (g–i), as well as control adenovirus encoding β -gal (j), under the same conditions as for A. The cells were fixed and stained with anti-HA and Cy3-labeled anti-rat IgG antibodies. Cy3 fluorescence (a, d, and g), intrinsic EGFP fluorescence (b, e, h, and j), and merged fluorescence (c, f, and i) are shown. Bar, 10 μ m. (C) The targeting activities of wild-type and mutant exophilin4 examined as in B were quantified as described in *Materials and Methods*. Data are shown as means \pm SEM (n = 6).

pletely lost the activity to induce the peripheral redistribution (Figure 7, B and C). These findings indicate that the binding activity of the C2A domain to phospholipids, especially to PS, primarily determined the targeting activity of exophilin4.

Exophilin4 Modulates the Regulated Exocytosis of Glucagon Granules

Finally, we investigated the effect of wild-type and mutant exophilin4 on the exocytosis of glucagon granules. Infection with recombinant adenovirus expressing β -gal affected neither basal nor high K⁺-stimulated glucagon release (Figure 8A). Although expression of wild-type exophilin4 did not influence basal glucagon secretion, it significantly inhibited high K⁺-induced secretion by 30%. The inhibitory effect was specific to the exocytosis of glucagon granules because exogenous exophilin4 similarly expressed in the β -cell line MIN6 did not affect insulin secretion in either a basal or a high K⁺-stimulated state. Expression of the KQ and DN mutants produced distinct effects on evoked glucagon secretion in TC1.6 cells, although neither mutant affected basal secretion (Figure 8B). The DN mutant inhibited evoked secretion as the wild type and had a tendency to decrease it further. By contrast, the KQ mutant did not reduce evoked secretion and instead tended to increase it compared with noninfected cells or those expressing control β -gal protein. Therefore, the effect of wild-type and mutant exophilin4 on fusion reactions was inversely correlated with the targeting activity of each C2A domain.

DISCUSSION

The present study indicated that the Rab27a effector exophilin4 is specifically expressed in pancreatic β cells and promotes the targeting of fluorescently labeled glucagon granules to the plasma membrane. Using a similar method, we previously showed that another Rab27a effector granophilin promotes the targeting of insulin granules to the plasma membrane in MIN6/phogrin-EGFP cells (Torii *et al.*, 2004). We then demonstrated by electron microscopy that granophilin-

deficient mouse pancreatic β cells exhibit severe impairment in the docking of insulin granules to the plasma membrane (Gomi *et al.*, 2005). The targeting activity of wild-type and mutant granophilins overexpressed in cultured β cells (Torii *et al.*, 2004) is highly correlated with their activity to restore docked granules in granophilin-deficient pancreatic β cells (Gomi *et al.*, 2005). Therefore, it is highly likely that the targeting activity of exophilin4 found here in TC1.6/phogrin-EGFP cells reflects its activity to dock glucagon granules to the plasma membrane *in vivo*. Consistent with this idea, knockdown of exophilin4 by small-interfering RNAs has been shown to markedly reduce the number of melanosomes in the cell periphery of cultured melanocytes (Kuroda and Fukuda, 2004). In this case, however, the knockdown has at the same time induced a more rounded shape of melanocytes, which makes it difficult to judge whether the change in melanosome distribution is a primary effect or a secondary phenomenon resulting from the rounding of the cell shape.

The mechanism for exophilin4 to mediate the docking of secretory granules seems to be distinct from that of granophilin. We previously showed that granophilin interacts with one of the plasma membrane SNARE proteins, syntaxin-1a, through its N-terminal domain (Torii *et al.*, 2002). The L43A granophilin mutant that possesses the intact C2 domains but largely loses the interaction with syntaxin-1a in cells (Torii *et al.*, 2002) neither promotes the targeting of fluorescently labeled granules in MIN6 cells (Torii *et al.*, 2004) nor restores docked granules in granophilin-null β cells (Gomi *et al.*, 2005). Furthermore, granophilin-b, another isoform expressed in β cells, which lacks the C2B domain but shows stronger interaction with syntaxin-1a (Torii *et al.*, 2002), has a higher targeting activity than canonical granophilin-a in MIN6/phogrin-EGFP cells (Torii *et al.*, 2004). These findings suggest that the interaction of granophilin with syntaxin-1a is essential for the docking activity, although the C2 domains with a modest binding activity to the plasma-membrane phospholipids (Wang *et al.*, 1999; the present study) likely plays another role to appose granules to the plasma membrane. However, we

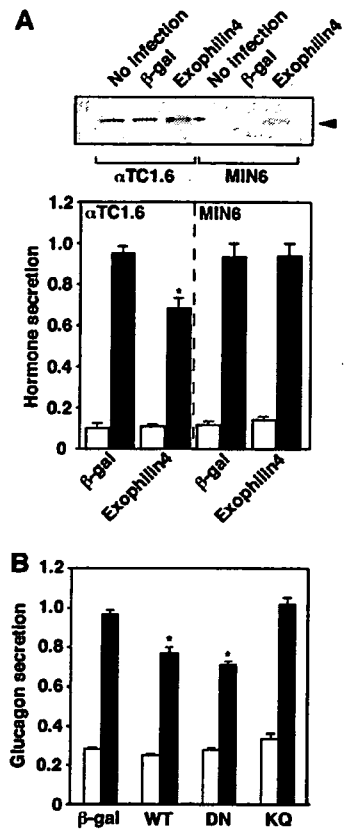


Figure 8. Effect of overexpression of wild-type and mutant exophilin4 on glucagon and insulin secretion. (A) α TC1.6 and MIN6 cells were infected with adenoviruses bearing either β -gal or wild-type human exophilin4 cDNA. The expression levels of endogenous and exogenous exophilin4 were determined by immunoblotting with anti-exophilin4 antibodies (top). Exogenous human exophilin4 (arrowhead) migrates slightly faster than endogenous mouse exophilin4 (small arrow). Note that MIN6 cells do not express exophilin4 endogenously. The infected α TC1.6 cells were incubated for 30 min in either modified KRB (16.7 mM glucose; open bars) or the buffer modified to include high K (60 mM KCl and 1.38 mM glucose; solid bars). The infected MIN6 cells were incubated for 30 min in either modified KRB (including 1.38 mM glucose; open bars) or the buffer modified to include high K (60 mM KCl and 16.7 mM glucose; solid bars). Secreted glucagon or insulin in the media was measured (bottom). Note that exogenous expression of exophilin4 does not affect evoked insulin secretion in MIN6 cells, in contrast to the inhibition of glucagon secretion in α TC1.6 cells. (B) α TC1.6 cells infected by adenovirus as in Figure 7A and the effect of expression of wild-type and mutant exophilin4 on glucagon secretion was examined as in A. Values are normalized to the release of glucagon or insulin from uninfected cells stimulated by high K and are given as means \pm SEM. * p < 0.001 versus high K-stimulated cells infected with the same titer of the virus bearing β -gal cDNA (A and B, n = 6).

failed to detect such protein interactions for exophilin4. Instead, the C2 domains, particularly the C2A domain, of exophilin4 showed markedly higher phospholipid-binding activities than those of granuphilin. The phospholipid-binding activity of the C2A domain should play a predominant role because its KQ mutation that entirely destroys the affinity to PS and PIP₂ impaired both the plasma membrane localization and the granule-targeting activity of the whole protein. This finding is consistent with a previous report that showed that the homologous mutant in mouse exophilin4 lacks both the plasma membrane localization and the activ-

ity to induce peripheral distribution of melanosomes (Kuroda and Fukuda, 2004). Therefore, even if other protein interactions might be hidden, the phospholipid binding activity of the C2A domain is crucial in the docking function of exophilin4. Recently, rabphilin, another Rab3/Rab27 effector, has been reported to interact with the plasma-membrane SNARE protein, SNAP-25, via its C2B domain (Tsuboi and Fukuda, 2005). Thus, different Rab27a effectors, granuphilin, exophilin4, and rabphilin, seem to use distinct strategies to mediate the docking process.

We found a robust binding activity of the C2A domain of exophilin4 to PIP₂ as well as to PS, although the affinity to PIP₂ was not previously detected using a dot blot assay on nitrocellulose membrane (Kuroda and Fukuda, 2004). This discrepancy is likely due to differences in the binding assays used because we found that the dot blot assay produces highly variable results depending on the buffer components (e.g., detergent and blocking reagents) and sometimes exhibits data discrepant from those obtained by the more physiological liposome assay adopted here (Yu and Izumi, unpublished observation). We cannot discriminate between PS and PIP₂ as a target of the C2A domain of exophilin4 because the docking-incompetent mutant KQ loses the binding activity to both lipids. However, the mutant DN, that has a higher PS- but a comparable PIP₂-binding activity compared with the wild type, showed a stronger targeting activity, indicating a primary role of PS. Alternatively, the C2B domain of exophilin4 that has a considerable PS-binding activity but only a weak PIP₂-binding activity was not able to associate with the plasma membrane when it was singly expressed in α TC1.6 cells, suggesting that the PIP₂-binding activity is also important. PS has a single net negative charge and is present evenly throughout the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane (McLaughlin and Murray, 2005). In contrast, PIP₂, although a minor component of the plasma membrane lipids, is highly charged and sequestered adjacent to any protein with a cluster of four or more basic residues located at the plasma membrane (McLaughlin and Murray, 2005). Therefore, we suggest that the C2A domain of exophilin4 first attaches to PS and then recruits PIP₂ to form a microdomain through its basic cluster to stabilize the plasma membrane association.

The most notable finding in the present study was the Ca²⁺-inhibitory PS-binding activity of the exophilin4-C2A domain, which was completely the reverse of that of the synaptotagmin I-C2A domain. Because the Ca²⁺ sensitivity was in a range of the concentration induced by secretagogue stimulation, this novel property of exophilin4 probably has physiological relevance. Although only three aspartate residues are conserved in the C2A domain of exophilin4 among the five critical aspartates for Ca²⁺ binding of synaptotagmin I (Südhof and Rizo, 1996; Bai and Chapman, 2004), the replacement of these residues largely disrupts the inhibition by Ca²⁺ and results in a constitutive PS-binding activity. Furthermore, expression of this DN mutant heavily accumulated granules close to the plasma membrane and impeded stimulus-induced exocytosis. In contrast, the mutant KQ, which loses both the PS-binding and the granule-targeting activities, did not affect evoked exocytosis. These findings are consistent with our previous proposal that stable docking is not necessarily essential but inhibitory for fusion and that undocked vesicles are releasable with a functionally meaningful time course in regulated exocytosis (Gomi *et al.*, 2005). It seems that the docking machinery must be displaced from exocytic sites so that the opposing membrane can fuse. Although the exact function of the Ca²⁺-inhibitory PS-binding activity of the exophilin4-C2A domain remains

unknown, it may play a role in the disassembly of the preformed docking machinery. The Ca^{2+} increase induced by external secretagogues, however, may not be sufficient because we failed to detect morphological detachment of exophilin4 from the plasma membrane when cells were stimulated with Ca^{2+} ionophores, at least on the level of light microscopy (Kasai and Izumi, unpublished observation). This failure may simply reflect the fact that the PIP_2 binding of exophilin4, which would happen subsequent to the PS binding as described above, is no longer Ca^{2+} sensitive. The alternative and not incompatible possibility is that the Ca^{2+} -inhibitory PS-binding activity prevents stable docking during secretory stimulation. Further investigation is required to explore the coupling and uncoupling mechanisms between docking and fusion processes.

Finally, the present study discloses that professional secretory cells use distinct machinery and molecular interaction for vesicle docking, even between developmentally close cells such as pancreatic and β cells. This suggests that the docking machinery is differentially configured to meet the biological demands of particular cell types. The first glimpse of distinct exocytotic machinery between pancreatic and β cells should lead to further understanding of the differential mechanism of secretion of the two vital hormones, glucagon and insulin, in both physiological and pathological states.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. S. Zhao for assistance with the immunostaining analyses at the beginning of this project and Dr. M. Hosaka for advice on the liposome assay. This work was supported by grants in aid for scientific research and a grant of the 21st Century COE program from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. It was also supported in part by grants from Astellas Foundation for Research on Metabolic Disorders and Novo Nordisk Insulin Study Award (to T.I.).

REFERENCES

- Bal, J., and Chapman, E. R. (2004). The C2 domains of synaptotagmin-partners in exocytosis. *Trends Biochem. Sci.* 29, 143–151.
- Bal, J., Tucker, W. C., and Chapman, E. R. (2004). PIP_2 increases the speed of response of synaptotagmin and steers its membrane-penetration activity toward the plasma membrane. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 36–44.
- Burgoyne, R. D., and Morgan, A. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiol. Rev.* 83, 581–632.
- Davletov, B. A., and Südhof, T. C. (1993). A single C₂ domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca^{2+} /phospholipid binding. *J. Biol. Chem.* 268, 26386–26390.
- Desai, R. C., Vyas, B., Earles, C. A., Littleton, J. T., Kowalchuck, J. A., Martin, T.F.J., and Chapman, E. R. (2000). The C2B domain of synaptotagmin is a Ca^{2+} -sensing module essential for exocytosis. *J. Cell Biol.* 150, 1125–1135.
- Fukuda, M. (2005). Versatile role of Rab27 in membrane trafficking: focus on the Rab27 effector families. *J. Biochem.* 137, 9–16.
- Gomi, H., Mizutani, S., Kasai, K., Itohara, S., and Izumi, T. (2005). Granuphilin molecularly docks insulin granules to the fusion machinery. *J. Cell Biol.* 171, 99–109.
- Hamaguchi, K., and Leiter, E. H. (1990). Comparison of cytokine effects on mouse pancreatic β -cell and α -cell lines: viability, secretory function, and MHC antigen expression. *Diabetes* 39, 415–425.
- Hosaka, M., Suda, M., Sakai, Y., Izumi, T., Watanabe, T., and Takeuchi, T. (2004). Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. *J. Biol. Chem.* 279, 3627–3634.
- Izumi, T., Gomi, H., Kasai, K., Mizutani, S., and Torii, S. (2003). The roles of Rab27 and its effectors in the regulated secretory pathways. *Cell Struct. Funct.* 28, 465–474.
- Izumi, T., Gomi, H., and Torii, S. (2005). Functional analysis of Rab27a effector granuphilin in insulin exocytosis. *Methods Enzymol.* 403, 216–229.
- Kasai, K., Ohara-Imazumi, M., Takahashi, N., Mizutani, S., Zhao, S., Kikuta, T., Kasai, H., Nagamatsu, S., Gomi, H., and Izumi, T. (2005). Rab27a mediates the tight docking of insulin granules onto the plasma membrane during glucose stimulation. *J. Clin. Invest.* 115, 388–396.
- Kuroda, T. S., and Fukuda, M. (2004). Rab27A-binding protein Sip2-a is required for peripheral melanosome distribution and elongated cell shape in melanocytes. *Nat. Cell Biol.* 6, 1195–1203.
- Martin, T.F.J. (2001). $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ regulation of surface membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 493–499.
- McLaughlin, S., and Murray, D. (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* 438, 605–611.
- Nagashima, K., Torii, S., Yi, Z., Igarashi, M., Okamoto, K., Takeuchi, T., and Izumi, T. (2002). Melanophilin directly links Rab27a and myosin Va through its distinct coiled-coil regions. *FEBS Lett.* 517, 233–238.
- Nalefski, E. A., and Falke, J. J. (1996). The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci.* 5, 2375–2390.
- Patton, C., Thompson, S., and Epel, D. (2004). Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. *Cell Calcium* 35, 427–431.
- Powers, A. C., Efrat, S., Mojsos, S., Spector, D., Habener, J. F., and Hanahan, D. (1990). Proglucagon processing similar to normal islets in pancreatic β -like cell line derived from transgenic mouse tumor. *Diabetes* 39, 406–414.
- Südhof, T. C., and Rizo, J. (1996). Synaptotagmins: C₂-domain proteins that regulate membrane traffic. *Neuron* 17, 379–388.
- Torii, S., Takeuchi, T., Nagamatsu, S., and Izumi, T. (2004). Rab27 effector granuphilin promotes the plasma membrane targeting of insulin granules via interaction with syntaxin 1a. *J. Biol. Chem.* 279, 22532–22538.
- Torii, S., Zhao, S., Yi, Z., Takeuchi, T., and Izumi, T. (2002). Granuphilin modulates the exocytosis of secretory granules through interaction with syntaxin 1a. *Mol. Cell Biol.* 22, 5518–5526.
- Tsuboi, T., and Fukuda, M. (2005). The C2B domain of rabphilin directly interacts with SNAP-25 and regulates the docking step of dense core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 280, 39253–39259.
- Wang, J., Takeuchi, T., Yokota, H., and Izumi, T. (1999). Novel rabphilin3-like protein associates with insulin-containing granules in pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.* 274, 28542–28548.
- Yi, Z., Yokota, H., Torii, S., Aoki, T., Hosaka, M., Zhao, S., Takata, K., Takeuchi, T., and Izumi, T. (2002). The Rab27a/granuphilin complex regulates the exocytosis of insulin-containing dense-core granules. *Mol. Cell Biol.* 22, 1858–1867.

= 症例報告 =

グルタミン酸受容体 $\epsilon 2$ (GluR $\epsilon 2$) 抗体陽性を示した ミオクロニー失立発作てんかんの男児例

高橋あんず¹ 瀬島 斉¹ 吉岡誠一郎¹ 岸 和子¹ 高橋 幸利² 山口 清次¹

要旨 症例は3歳1カ月男児。「はっ」と発声後に頸部後屈を伴い倒れる発作と、強直間代発作で発症した。脳波では、背景に6~7 Hzの全般性徐波が目立ち、1~2 Hzの高振幅全般性棘徐波群発が頻発していた。頭部MRI、SPECT、血液一般生化学検査では異常はなかったが、髄液中の抗グルタミン酸受容体 $\epsilon 2$ (GluR $\epsilon 2$) 抗体が陽性であった。臨床症状からミオクロニー失立発作てんかん (MAE) と診断し、種々の抗てんかん薬、ステロイドパルス療法、免疫 γ -globulin 療法を試みたが無効であった。発症8カ月時に、ACTH療法を行ったところ、発作はほぼ消失し、脳波異常も改善した。これまで抗GluR $\epsilon 2$ 抗体が陽性を示したMAEの報告は見当たらない。本症例は、MAEの病態に免疫学的機序の関与を示唆するものである。

見出し語 ミオクロニー失立発作てんかん、抗グルタミン酸受容体抗体 $\epsilon 2$ 、ACTH療法

はじめに

ミオクロニー失立発作てんかん (myoclonic astatic epilepsy, 以下MAE)^{1)~3)}は、失立発作、ミオクロニー発作、非定型欠神、強直間代発作などがみられる全般性てんかんである。多くは2~5歳に発症し、遺伝的素因をもつといわれている。発症前の発達は正常であるが、予後は良好なものから難治で知的障害を伴うものまで様々である。我々は、抗神経自己抗体の一つである抗グルタミン酸受容体 $\epsilon 2$ (GluR $\epsilon 2$) 抗体陽性を示し、ACTH療法で症状と脳波所見の改善を認めたMAEを経験したので、報告する。

I 症 例

症 例 3歳1カ月の男児
主 訴 けいれん
家族歴 母方いとこがてんかん(詳細不明)で治療中。
周産期歴 特記事項なし
発達歴 定顎3カ月、寝返り6カ月、座位8カ月、人見知り12カ月、有意語15カ月、一人歩き15カ月
現病歴 症状出現前に感染症の罹患はなく、入院2カ月前より、覚醒時に「はっ」と発声を伴い頸部後屈、時に転倒す

る短い発作が出現し、連日みられるようになった。加えて全身強直間代発作を、時折認めるようになり、近医小児科を受診した。てんかんと診断され、zonisamide (ZNS)を開始されたが、発作が続くため、当科に紹介入院となった。

身体所見 身長96.3 cm (+0.67 SD)、体重14.8 kg (+0.55 SD)、発語が少なく、表情に活気がない。動作が緩慢。胸腹部異常なし。遠城寺式発達検査では、DQ=103、言語のみ2歳6カ月相当で、発作の影響と思われる遅れがあった。

検査所見 血液一般生化学・尿・髄液細胞数や蛋白、糖は正常であった。髄液(表1)抗GluR $\epsilon 2$ 抗体(IgG)陽性、血清・髄液抗GluR $\delta 2$ 抗体(IgG)陽性であった。

脳波所見 発作間欠期(図1A)では、覚醒時に前頭部中心部優位に4~7 Hzの θ 波を全般性に認めた。非定型欠神発作時(図1B)では、高振幅全般性棘徐波群発が約20秒間持続し、頻発していた。音・光刺激でも誘発された。

画像所見 頭部MRI、SPECTは正常であった

経 過 (図2) 入院後、1) ミオクローヌスを伴い意識減損する発作、2) 発声とともに頸部後屈し、時に転倒する失立発作、3) 全身強直発作あるいは間代発作と数種の発作型がみられたことや脳波所見、家族歴、発達歴からMAEと診

表1 血清・髄液中の抗GluR抗体

	発症時		寛解時	
	血清	髄液	血清	髄液
$\epsilon 2$ IgG	-	+	-	-
$\epsilon 2$ IgM	-	-	-	-
$\delta 2$ IgG	+	+	-	-
$\delta 2$ IgM	+	-	-	-

¹ 島根大学医学部小児科

² 国立病院機構静岡てんかん・神経医療センター小児科

連絡先 〒693-8501 出雲市塩冶町89-1

島根大学医学部小児科(高橋あんず)

E-mail: anzu.1010@w8.dion.ne.jp

(受付日: 2007. 2. 13, 受理日: 2007. 5. 1)

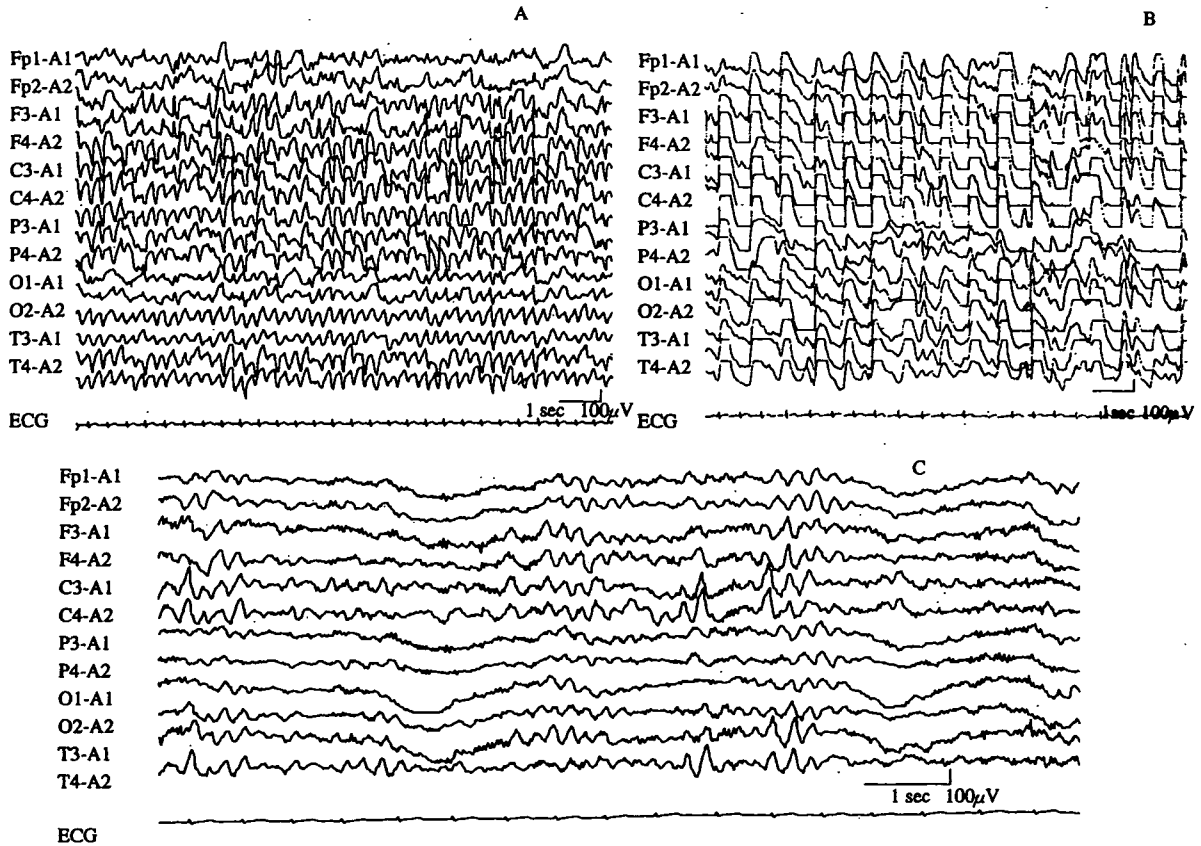


図1 脳波

- A : 発作間欠期脳波 : 4 ~ 7 Hz θ 波を全般性に持続して認めた。
- B : 非定型欠神発作時脳波 : 高振幅全般性棘徐波群発が頻発した。
- C : ACTH 療法後脳波 : 発作波は消失。

断した。ほぼ持続的に脳波異常と意識減損状態が続くため、小発作重積状態と考え、midazolam (MDL) 持続静注を行ったところ、重積状態から脱した。しかし、ZNS, ethosuximide (ESM), valproate sodium (VPA), clobazam (CLB), potassium bromide (KBr), phenobarbital (PB), lidocaine, clonazepam (CZP), clorazepate (CLZ), ステロイドパルス療法 (30 mg/kg/日 × 3 日間を 2 コール), 免疫 γ -globulin 療法 (1 g/kg × 1 日間, 0.25 g/kg × 3 日間) は効果がみられなかった。PB 大量療法によって MDL から離脱できたが、約 2 週間後には再燃した。TRH 療法も無効であり、治療に難渋した。発症から 8 カ月後、ACTH 療法 (コートロシン Z 0.025 mg/kg/日 × 14 日間連日, 以後隔日投与 14 日間) を行ったところ、発作はほとんど消失した。脳波 (図 1C) では、抗てんかん薬の影響と考えられる低振幅速波を全般性に認めるが、てんかん性異常波は改善していた。髄液中の抗 GluR ϵ 2 抗体も消失していた。ACTH 療法後 5 カ月が経過した現在も発作の再発はない。退院時の遠城寺式発達検査では、DQ = 93、発作により遅れているように思われた言語面は 3 歳 6 カ月相当であった。運動・社会性は発症前と比べて変わらず、停滞

したままだった。

II 考 察

MAE⁹⁾ は、Doose らが提唱した、乳幼児の全般性小発作を特徴とするてんかんである。臨床的に以下のような特徴がある。1) 発症前の発達正常、2) 5 歳未満の発症、3) 男児に多い、4) 発作型はミオクローニー発作、失立発作、ミオクローニー失立発作を中心として短時間欠神、小発作重積症、全般性強直間代発作を合併、5) 焦点性発作や焦点性脳波発射はまれで、全般性 2 ~ 3 Hz 棘徐波と背景脳波に頭頂部優位全般性 6 ~ 7 Hz θ 波の存在、6) 予後不良例では経過中睡眠時に強直発作を合併する。本症例でも、上記のうち 5 つの症状 (1 ~ 5) を認め MAE と診断した。治療予後に関しては、良好な例では抗てんかん薬 (VPA, ESM) に反応したり、突然寛解することがある一方で、全身性強直間代発作や小型発作重積症がそのまま持続し、知的予後が不良な症例もある。本症例では、抗てんかん薬が無効であり、 γ -globulin 療法、ステロイドパルス療法にも反応しなかった。最終的に ACTH 療法で寛解した。小国らは ACTH 療法が MAE にも効果を示す

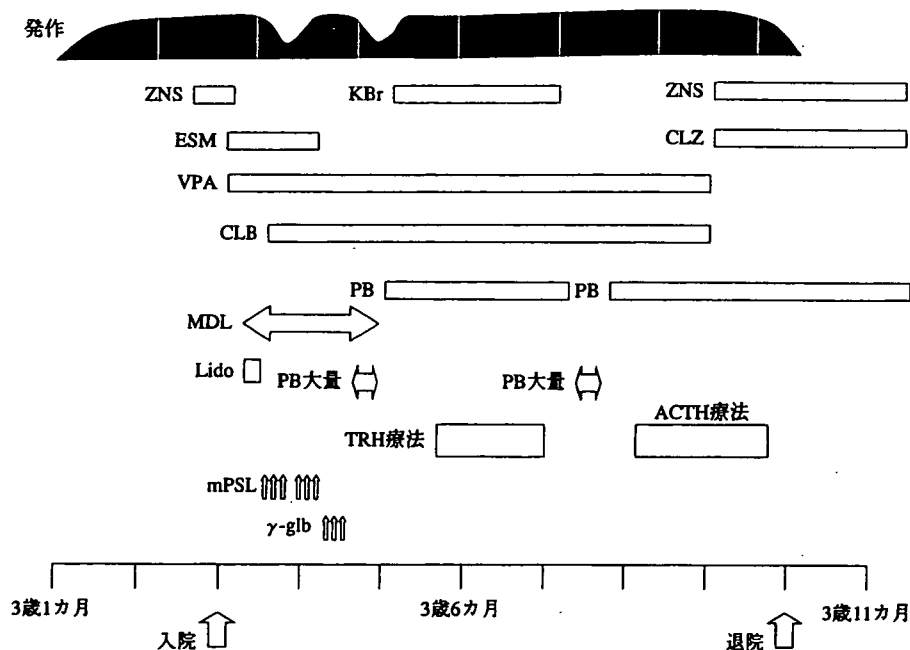


図2 臨床経過

1回目のmPSL療法, PB大量療法後に発作が軽減したが, すぐに再燃. ACTH療法後, 発作が消失.
 ZNS: zonisamide, KBr: potassium bromide, ESM: ethosuximide, CLZ: clorazepate, VPA: valproate sodium,
 CLB: clobazam, MDL: midazolam, PB: phenobarbital, Lido: lidocaine, mPSL: methylprednisolone pulse therapy,
 γ -glb: γ -globulin

と報告している⁹⁾. MAEでACTH療法を行った22例中13例(59%)が有効(発作の消失あるいは50%以上の減少)であった. 特に非定型欠伸発作やミオクロニー発作に効果を示しており, MAEの治療の選択肢のひとつと考えられる.

また, 本症例では, 発症時の髄液抗GluR ϵ 2抗体(IgG)陽性, 血清・髄液抗GluR δ 2抗体(IgG・IgM)陽性を示し, 寛解時にはこれら全てが陰性となった. 抗GluR抗体は, 当初, Rasmussen脳炎や小児慢性持続性部分てんかんで陽性になると考えられてきた¹⁰⁾. 最近では, Rasmussen脳炎以外にも, 部分てんかんや詳細不明だが, 全般性てんかんでも陽性例があると分かってきている¹¹⁾. しかし, 我々の症例のようにMAEでのGluR ϵ 2抗体陽性の報告はない. 寛解時に陰性化しており, 発症前に抗体産生されるようなエピソードが何かあったのではないかと推測される. 一般的に, MAEは遺伝的素因が関係していると述べられているが, 笹川らは γ -globulin大量療法が著効したMAEの報告⁹⁾をし, 免疫学的な機序が関与している可能性を述べている. 本症例では, γ -globulin療法やステロイドパルス療法の効果がなく, 免疫学的機序のみでは, 病態は説明できない. Lennox-Gastaut症候群やWest症候群で有効といわれているACTH療法の効果があったことは, 抗てんかん薬不応のMAEと両者の病態に共通した部分があるのかもしれない. 本症例において抗GluR抗体がどこまで病態に関与しているのか不明であるが, MAEに免疫学的機序も関与している可能性を示すものと思われる.

文 献

- 1) Guerrini R, Parmeggiani L, Kaminska A, Dulac O. Myoclonic astatic epilepsy. In: Roger J, Bureau M, Dravet C, Genton P, Tassinari CA, Wolf P, eds. *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence*. Chapter 8. London: John Libbey, 2002: 105-12.
- 2) 小国弘量. ミオクロニー失立発作てんかん. *小児科* 2002;43: 1409-16.
- 3) 大府正治, 鶴沢礼実, 益崎まゆみ, 満留昭久. ミオクロニー失立発作てんかん. *小児内科* 2002;34:965-9.
- 4) Guerrini R, Aicardi J. Epileptic encephalopathies with myoclonic seizures in infants and children (severe myoclonic epilepsy and myoclonic-astatic epilepsy). *J Clin Neurophysiol* 2003;20:449-61.
- 5) Oguni H, Tanaka T, Hayashi K, et al. Treatment and long-term prognosis of myoclonic-astatic epilepsy of early childhood. *Neuropediatrics* 2002;33:122-32.
- 6) Takahashi Y, Mori H, Mishima M, et al. Autoantibodies to NMDA receptor in patients with chronic forms of epilepsy partialis continua. *Neurology* 2003;61:891-6.
- 7) Takahashi Y. Infections as causative factors of epilepsy. *Future Neurol* 2006;1:291-302.
- 8) 高橋幸利, 西村成子, 角替史野, ら. てんかんと自己免疫. *最新精神医学* 2006;11:349-54.
- 9) 笹川睦男, 来生陽子. ガンマグロブリンが著効したミオクロニー失立てんかん(Doosie症候群)の1女児例. *脳と発達* 1997;29:261-3.

A Case of Myoclonic Astatic Epilepsy with Autoantibody for Glutamate Receptor ϵ 2

Anzu Takahashi, MD, Hitoshi Sejima, MD, Seiichiro Yoshioka, MD,
Kazuko Kishi, MD, Yukitoshi Takahashi, MD and Seiji Yamaguchi, MD

Department of Pediatrics, Shimane University Faculty of Medicine, Izumo, Shimane (AT, HS, SY, KK, SY) ;
National Epilepsy Center, Shizuoka Institute of Epilepsy and Neurological Disorders, Shizuoka (YT)

A 3-year-old boy was admitted to our hospital with repetitive drop attacks and generalized tonic-clonic seizures. Brain MRI, SPECT and blood laboratory tests did not show any abnormalities, while antibody to glutamate receptor ϵ 2 (GluR ϵ 2) in spinal fluid was positive. Interictal EEG showed generalized 6 ~ 7 Hz slow, wave and ictal EEG showed 1 ~ 2 Hz high amplitude generalized spike and slow wave burst. We made a diagnosis as myoclonic astatic epilepsy (MAE). However, his seizures were refractory to almost all antiepileptic drugs, steroid pulse therapy and γ -globulin therapy. Eight months after the first attack, administration of ACTH therapy was effective. Seizures disappeared and EEG findings improved. To our knowledge, there have been no previous reports of MAE in which autoantibody to GluR ϵ 2 was positive. It is suggested that autoimmunity in this case was associated with the pathogenesis of MAE.

No To Hattatsu 2008; 40: 38-41

研究グループ紹介

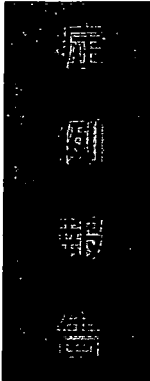
第51回多摩小児神経懇話会

期 日 平成 19 年 11 月 17 日

会 場 都立府中療育センター大会議室（府中）

演 題

- 大頭症と多小脳回を認めた 4q-症候群男児の 1 剖検例
富田 直, 熊田聡子, 星野 愛, 花房由季子, 栗原栄二 (都立神経病院神経小児科), 望月葉子, 小谷俊雄 (同 検査科病理診断部門), 林 雅晴 (東京都神経科学総合研究所臨床神経病理)
- 胃内持続吸引・早期中心静脈栄養法にてイレウスが改善した重症心身障害者の 1 例
小沢 浩 (島田療育センター支援部), 小沢 浩, 中島末美, 大瀧 潮, 長美代子, 佐々木匡子, 上石晶子, 石塚文広, 有本 潔, 木実谷哲史 (同 小児科), 岩田清二 (同 整形外科)
- 原因不明の重度精神運動発達遅滞児に生じたショックの原因としてバルプロ酸によるカルニチン欠乏, 肺炎が疑われた 1 例
松井秀司, 松田光展, 大越優美, 牧野道子, 長 博雪, 舟橋満寿子, 鈴木康之 (東京小児療育病院)
- 産科医療補償制度設計に係わる医学的調査に参加して一脳性麻痺を中心とする無過失補償制度の可能性に期待する一
鈴木文晴 (都立東大和療育センター小児神経科)
- 左片麻痺にて発症した脳梗塞の 9 歳男児—脳梗塞の初期対応について—
柏井洋文, 雨宮 馨, 鈴木里伊奈, 小出彩香 (都立八王子小児病院内科), 谷口 真 (都立神経病院脳神経外科), 田沼直之, 宮田理英, 林 雅晴 (東京都神経科学総合研究所臨床神経病理)
- 急性脳症後の痙縮にパクロフェン髄注療法とボツリヌス毒素療法の併用が有効であった 3 歳男児例—新しい痙縮治療についての検討—
長澤哲郎, 星野英紀, 水口浩一, 久保田雅也 (国立成育医療センター神経内科), 井原 哲, 師田信人 (同脳神経外科)
- 四肢体幹の異常運動, 精神運動発達遅滞を認めた 1 例
花井彩江, 小牧宏文, 斎藤義明, 佐久間啓, 須貝研司, 中川栄二, 佐々木征行 (国立精神・神経センター武蔵病院小児神経科)



ムンプス髄膜炎に合併した opsoclonus myoclonus ataxia syndrome の1例

村上綾子*1 篠崎 誓子*1 玉川 公子*1
 近藤 信哉*1 久保田 雅也*2 高橋 幸利*3

Key Words

opsoclonus myoclonus ataxia syndrome
 抗グルタミン酸受容体δ2抗体
 ムンプス
 脳幹障害

要 旨

症例は発達順調な1歳9カ月男児。ムンプス髄膜炎の急性期にopsoclonus myoclonus ataxia syndromeを合併した。同時に構音障害、咀嚼困難、顔面神経麻痺、自律神経障害などを呈し脳幹障害が示唆された。病初期に抗グルタミン酸受容体δ2抗体が陽性であったが、回復期に陰性化し、自然経過で著明な症状改善が認められた。今後、多数例の検討が自己抗体の診断的意義を明確にし、予後予測につながる可能性が考えられる。

はじめに

Opsoclonus myoclonus ataxia syndromeは、左右共同性の不規則で多方向性の異常眼球運動と、ミオクローヌス、小脳失調を特徴とする症候群であり、その責任病巣として小脳/脳幹部が推測されている。一方、本症において抗グルタミン酸受容体δ2抗体 (GluR δ2抗体) が高率に検出され、症状発現との関係が注目されている。今回、opsoclonus myoclonus ataxia syndromeに脳幹障害を示唆する多彩な症状を呈した症例で、急性期にGluR δ2抗体が検出され、回復期に抗体が陰性化した予後良好な1例を報告する。

症 例

症 例 1歳9カ月の男児。

主 訴 体幹のふらつき、発語不能。

家族歴・既往歴 特記すべき事項なし。

発達歴 正常。

現病歴 39℃台の発熱と翌日からの両側耳下腺の腫脹、疼痛があり、流行性耳下腺炎と診断された。4日後(第1病日)、発熱、耳下腺腫脹は軽快傾向にあったが、嘔吐、体幹のふらつきが出現、発語不能となったため当院を受診。ムンプス髄膜炎と急性小脳失調症の疑いで入院と

*1 (財)多摩北部医療センター小児科 *2 東京都立八王子小児病院小児内科

*3 国立病院機構静岡てんかん・神経医療センター小児科

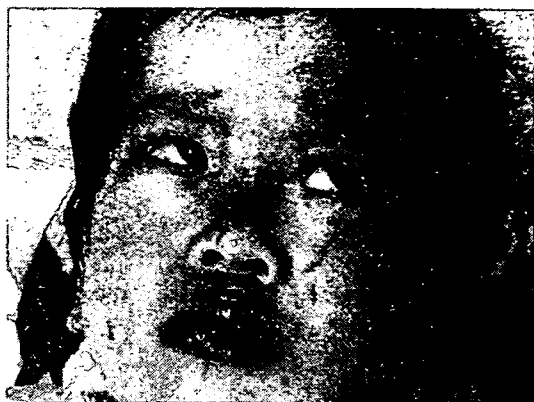


図1 オブソクローヌス (第2病日)

左右共同性の不規則で多方向性の異常眼球運動。不穏状態で顔に掻破痕あり (御家族の承諾を得て掲載)

なった。

初診時身体所見 37℃台の微熱と両側耳下腺腫脹あり。項部硬直は不明瞭。意識清明だが、激しい不穏状態。体幹失調があり wide based gait。坐位保持は不安定ながら可能。企図振戦あり。ミオクローヌス、異常眼球運動なし。

入院時検査所見 末梢血、血液生化学では、アミラーゼ高値以外は異常なし。髄液は細胞数 1,572/ μ L (好中球/リンパ球：24/1,548)、蛋白 67 mg/mL、糖 54 mg/dL。

入院後経過 髄液はリンパ球優位の細胞数の増加と蛋白の軽度上昇を認め、ムンプスウイルスによる無菌性髄膜炎に合併した急性小脳失調症と考え、無治療で経過観察とした。第2病日に opsochlorosis (図1)、myoclonus が出現し、体幹失調著明となり坐位保持不能となった。無表情で全く発語せず、くぐもった鼻声で泣き構音障害と考えられた。このような状態でも食欲はあったが、大半を食べこぼすため食物を口腔内の奥のほうに入れると、むせることなく嚥下できた。固形物の咀嚼は困難で、ストローからジュースを吸い上げることができなかった。発汗過多、唾液分泌亢進、流涎、自傷行為を伴う激しい不穏状態なども呈した。opsochlorosis myoclonus ataxia syndrome と診断をあらため、ステ

ロイド、 γ -グロブリンなどの治療を考慮したが、第2, 3病日をピークに、その後は徐々に opsochlorosis, myoclonus, ataxia は軽快し症状の動揺を認めず、リハビリなどの補助的な療法のみ行い経過観察とした。第13病日には支えなしで坐位保持可能となり、opsochlorosis, myoclonus は興奮したときにときおりみられる程度になった。また同時に不穏状態がおさまり意思表示がはっきりし始めたが、表情は乏しく、笑うときに両側の口角が上がらず不自然な笑顔であった。第15病日には寝返り、つかまり立ちが可能となり、数個の単語を発するようになった。スプーン操作時、軽度の振戦を認めた。ストローの半分位までジュースを吸えるようになったが、発病前にはなかった流涎、食べこぼしは相変わらず著明であった。第18病日には opsochlorosis, myoclonus が完全に消失。その後異常眼球運動はみられなかった。表情は豊かになり、発語が盛んに聞かれた。ストローでジュースを飲み、食べこぼしが減少したが流涎は続いた。第21病日よりつたい歩き、手つなぎ歩行、第28病日よりひとり立ち、第31病日より独歩可能となった。第52病日まで37～38℃台の発熱が断続的に続いたが、症状の増悪なし。第58病日には時おり流涎がみられる以外、症状は軽快し退院。なお、髄液所見は第7病日にはほぼ正常化。経過中に施行した腹部超音波および尿中 VMA, HVA 値は正常。第8病日に実施した頭部 MRI は、diffusion 画像、T2 強調画像、FLAIR のいずれも異常所見を認めず。第18病日の脳波、第24病日の ABR 異常なし。ムンプスウイルス抗体価は有意の上昇あり。急性期の第7病日と回復期の第50病日の血清、髄液中の抗グルタミン酸レセプター δ 2 抗体は、第7病日で陽性、第50病日では陰性化した (図2)。

外来で経過観察中であるが、3歳3カ月の時点まで、感冒などによる症状の再燃はみられず、粗大運動、微細運動、言語発達、いずれも年齢

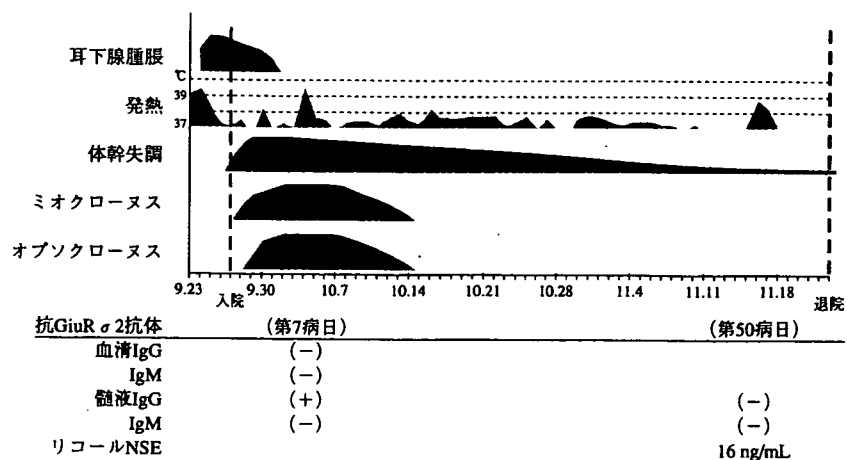


図2 臨床経過と検査所見

相応で順調である。

考 察

Opsoclonus myoclonus ataxia syndrome は、小児では神経芽細胞腫に伴う傍腫瘍性、あるいはウイルス感染に関与して発症することが多い比較的まれな症候群で、ムンプス感染に引き続いての発症も散見される¹⁾²⁾。小児例では、知的障害や小脳症状を残すことが、治療開始遅延例にとくに多いとの報告がある。また神経芽細胞腫を合併しない例での突然死の報告もあり、脳幹の広汎な障害が示唆されている³⁾。同じく自己免疫機序が疑われる予後良好な急性小脳失調症とは対照的である。

本症例でも opsoclonus myoclonus ataxia の三症状のほかに、構音障害、咀嚼筋麻痺、顔面神経麻痺、発汗過多や唾液分泌亢進といった自律神経機能の障害が認められ、小脳のみならず脳幹の障害が示唆された。近年、さまざまな神経疾患において、グルタミン酸受容体に対する自己抗体が検出されることが報告されている。GluR δ 2抗体は小脳の purkinje 細胞に局在する GluR δ 2に対する自己抗体であるが、その持続的な存在が種々の小脳症状の発現に関与している可能性が報告されている。

高橋ら⁴⁾は、opsoclonus myoclonus ataxia syndrome で GluR δ 2抗体が9例全例に検出されたと報告した。杉山ら⁵⁾は、発症初期に急性小脳失調症と診断し、小脳症状が遷延化した症例で GluR δ 2抗体が検出され、その持続的な存在が慢性的な小脳の炎症をもたらしていると考え、あらためて慢性小脳炎と診断したと報告した。

また本症例では陰性だが、Rasmussen 脳炎・パラネオ・辺縁系脳炎・急性脳炎などで陽性になる GluR ϵ 2抗体についての高橋ら⁶⁾の検討によると、急性脳炎には病初期に GluR ϵ 2抗体が作られ、その後抗体価が低下する一群と、回復期から慢性期に GluR ϵ 2抗体ができてくる一群がある。前者は限局性脳炎の臨床特徴を示すことが多く、その発病に自己抗体が関与し、後者は全脳炎の臨床特徴を示すことが多く、その後遺障害発症に自己抗体が関与している可能性がある。さらに、その神経症状の発症時期が感染症状発現後3～5日であることから、抗原特異的T細胞反応が神経症状に関与していると推定している。

GluR δ 2抗体においても同様の機序が働いていると仮定すると、今回のわれわれの症例は、前者の病初期に自己抗体が作られ、その後抗体

価が低下する一群と考えられ、後遺障害なく順調であった臨床経過とも矛盾しない。今後、多数例の検討を重ねることにより、自己抗体測定の診断的意義が明確となり、またその消長を含めた検討をも行うことで、種々の神経疾患の予後判定に有用であると考えられる。

- 3) 石崎朝世：日児誌 91:3325-3340, 1987
- 4) 高橋幸利・他：Neuroimmunology 11:78, 2003
- 5) 杉山延喜・他：脳と発達 36:60-63:2004
- 6) 高橋幸利・他：平成15～16年度文部科学省科学研究費補助金（基盤研究C2）研究成果報告書：報告A. 20-32, 2005

● 文 献 ●

- 1) 大石芳久・他：脳と発達 34:369, 2002
- 2) 立野佳子・他：小児感染症 15:333, 2003

著者連絡先

〒189-8511 東京都東村山市青葉町1-7-1
 多摩北部医療センター小児科
 村上綾子

診断と治療〔第96巻・第3号〕特集予告
 特集／ウイルス性肝炎のプライマリケア

【慢性ウイルス性肝炎の診断と経過観察】

- 1. ウイルス性肝炎の診断と節目検診榎 本 信 幸
- 2. ウイルス性慢性肝炎の自然経過とチェックポイント金 子 周 一
- 3. 注意すべき病態—肝炎劇症化・急性肝不全持 田 智 宇
- 4. ウイルス性肝炎の肝組織像坂 元 亨 宇
- 5. 肝細胞癌のスクリーニングと早期発見松 崎 靖 司

【慢性ウイルス性肝炎の予防と患者指導】

- 6. 肝炎ワクチン小 池 和 彦
- 7. 慢性ウイルス性肝炎患者の栄養と運動指導坂 井 田 功
- 8. 肝移植とインフォームドコンセント市 田 隆 文

【A型肝炎】

-荒 瀬 康 司

【EBウイルス・その他の急性肝炎】

-橋 本 悦 子

【B型肝炎】

- 1. 診療ガイドライン茶 山 一 彰
- 2. 抗ウイルス薬の進歩横 須 賀 收

【C型肝炎】

- 1. 診療ガイドライン泉 並 木
- 2. ペグインターフェロン・リバビリン併用療法の現状と問題点多 田 慎 一
- 3. C型肝炎硬変のインターフェロン治療西 口 修 平
- 4. 小児のC型肝炎藤 澤 知 雄
- 5. 高齢者の治療加 藤 道 夫
- 6. 日常診療における肝発癌予防対策八 橋 弘 二
- 7. 瀉血療法加 藤 淳 二

【トピックス】

- 1. わが国におけるD型肝炎森 山 光 彦
- 2. わが国におけるE型肝炎とその他のウイルス肝炎三 代 俊 治
- 3. 肝炎の進行と線維化マーカー河 田 則 文
- 4. ウイルス肝炎と肥満竹 井 謙 之
- 5. ウイルス遺伝子型と臨床溝 上 雅 史
- 6. HGFの臨床応用井 戸 章 雄

= 症例報告 =

グルタミン酸受容体 (GluR) 抗体が陽性であった髄膜脳炎の 16歳男児例

富岡 志保¹ 下野 昌幸¹ 加藤 絢子¹ 高野 健一¹ 塩田 直樹¹ 高橋 幸利²

要旨 全般性けいれんの後に発熱、頭痛、項部硬直が持続した16歳男児。ごく軽度の意識低下、脳波で前頭葉に連続性棘徐波および髄液細胞数上昇、IgG indexの上昇とoligoclonal IgG band陽性を認めた。頭部MRIのFLAIR像で両側半球に散在する部分的灰白質の信号亢進が疑われた。髄膜脳炎と判断し、methylprednisolone pulse療法を実施したところ、臨床症状と脳波異常は軽快した。髄液中の抗グルタミン酸受容体(以下GluR)は入院時 $\epsilon 2 \cdot \delta 2$ に対するIgG・IgM抗体がともに陽性であり、軽快時は両抗体がともに陰性となった。抗GluR抗体が陽性になる髄膜脳炎の中に、Rasmussen脳炎とは明らかに異なる経過をとり、治療に反応する予後良好な一群が存在する可能性が強く示唆された。

見出し語 自己免疫性髄膜脳炎, IgG index, グルタミン酸受容体抗体, methylprednisolone pulse療法

はじめに

ステロイド治療に良好に反応する脳炎と反応に乏しい脳炎があることは以前から報告されている。しかし、その機序は現在も明らかにはされていない。

一方、大脳の神経細胞に対する抗体が検出され、発症や症状増悪に自己免疫的機序の関与が疑われる脳炎がある。このうちRasmussen脳炎、辺縁系脳炎は、グルタミン酸受容体(以下GluR)に対する抗体が時に髄液中に検出されることが報告されている^{1)~3)}。今回我々は、発熱、項部硬直とごく軽度の意識低下、髄液細胞数上昇とGluR抗体が陽性で、前頭葉に脳波で連続性棘徐波複合を認めた自己免疫性髄膜脳炎と思われる患児を経験した。同症例にmethylprednisolone(以下m-PSL) pulse療法を施行し、著効したので経過を報告する。

I 症 例

症 例 16歳、男児。

主 訴 4週間以上持続する発熱、頭痛、項部硬直。

既往歴 1歳時に嘔吐下痢症、3歳時に無菌性髄膜炎で入院歴あり、13歳時に*Campylobacter*腸炎に罹患した。

家族歴 特記事項なし。

現病歴 生来健康な男児。平成14年12月5日から37度台の微熱、5分間の全般性けいれんが認められ、近医に入院した。髄液一般検査に異常なく、細菌培養は陰性であった。初回けいれん後の脳波を図1aに示す。左前頭部に散発性の棘徐波を認め、局在関連性てんかんの診断でcarbamazepine 400 mgを開始した。一旦解熱したが、1週間後より発熱し、12月12日と27日に数分の全般性強直けいれんを再度起こし、valproate sodium 1,200 mgの内服を併用した。項部硬直を認めたため髄液検査を再施行し、細胞数30/mm³(単核球90%)、蛋白50 mg/dl、圧300 mm H₂Oと上昇を認めた。細菌性髄膜炎を疑い、cefotaxime, panipenem, betamipron, amikacin, sulfateclindamycinの単剤もしくは2剤の抗生物質の静脈投与とclarithromycin内服を実施し、また、ガンマグロブリンを1月3日より3日間連続で合計200 mg/kg投与した。髄液細菌培養は2度目も陰性であった。発熱が持続し精査加療目的で1月7日に当院小児科に紹介入院した。

入院時現症 見当識、記憶力、計算力に問題はなかったが、笑顔表出がなく表情に乏しかった。項部硬直と眼底の鬱血乳頭、歩行時に軽度のふらつきがあり、指-鼻-指試験等の協調運動は可能であった。知覚、深部腱反射に異常を認めなかった。

入院時検査所見 血算でWBC 16,100/ μ l、分葉核球88%と増加を認めた。生化学検査ではCRP 0.7 mg/dl、赤沈は30 mm/hrと軽度亢進していた。血清免疫グロブリン・尿一般検査に異常を認めなかった。髄液検査(表1)では前回同様に細胞数40/mm³(単核球37/mm³)、蛋白58 mg/dlと増加があり、糖は正常であった。髄液中のoligoclonal IgG bandは陽性、IgG index 0.71、myelin basic protein(以下MBP) 207

¹ 産業医科大学医学部小児科

² 国立病院機構静岡てんかん・神経医療センター小児科

連絡先 〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1

産業医科大学医学部小児科(富岡志保)

E-mail: shihot@dp.u-netsurf.ne.jp

(受付日: 2006. 12. 28, 受理日: 2007. 5. 8)

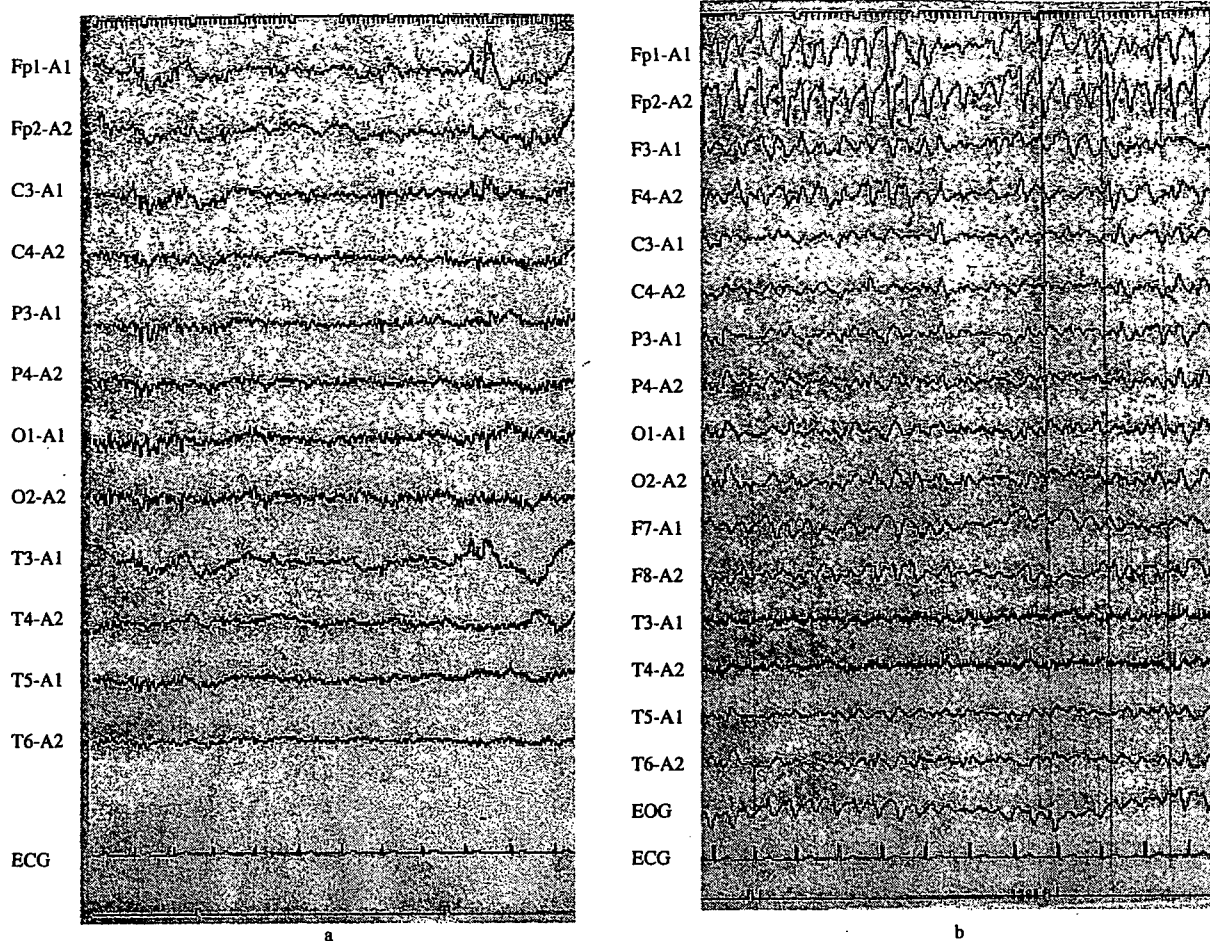


図1 覚醒脳波（発作間欠時）

a : 初回けいれん後

b : 当院入院当日

初回けいれん後の脳波では左前頭部に散発性の棘徐波を認める。当院入院当日の脳波では、両側前頭極部の2.5 Hz棘徐波が連続性に出現している。後頭部の基礎波は6.0 Hzで連続性に乏しい。

表1 入院時検査

髄液			
細胞数	40/mm ³ (単核球 37)	neuron specific enolase	12.6 ng/ml (4.1 ~ 8.5)
初圧	350 mmH ₂ O	oligoclonal IgG band	陽性
蛋白	58 mg/dl	myelin basic protein	207 pg/ml (102 以下)
糖	46 mg/dl	IgG index	0.71 (0.30 ~ 0.55)
血液抗体価			
マイコプラズマ (PA)			40 倍未満 → 40 倍未満
アデノウイルス (CF)			4 倍未満 → 8 倍
風疹ウイルス (EIA)			IgG 14.4 倍, IgM 0.42 倍 (正常; 0.80 未満)
HSV I (NT) 1 型補体要求性中和抗体			4 倍未満 → 8 倍
HSV II (NT)			4 倍未満 → 4 倍未満
EBV (FA)			VCAIgG 160 倍, VCAIgM 10 倍未満, EBNA20 倍
CMV (EIA)			IgG 38.6 倍, IgM 0.31 倍 (正常 0.80 未満),
トキソプラズマ			160 倍未満
髄液・尿ウイルス分離			陰性

HSV: herpes simplex virus, EBV: Epstein-Barr virus, CMV: cytomegalovirus

pg/ml (正常値 102 pg/ml 以下), 髄液 neuron-specific enolase (以下NSE) は 12.6 ng/ml (正常値 4.1 ~ 8.5 ng/ml) であり,

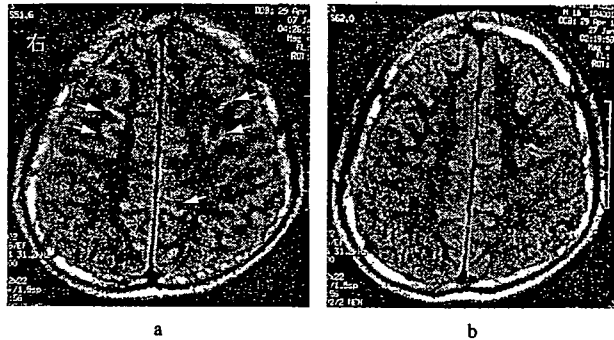


図2 頭部MRI (FLAIR像)

a: 入院時 (1月7日)

b: methylprednisolone pulse 治療3クール後 (1月27日)

治療前はFLAIR像で、両側大脳半球皮質の灰白質に散在する部分的な信号亢進が疑われる (白矢印)。治療後は異常信号は認められない。

いずれも上昇していた。血液中の各種ウイルス抗体価、髄液と尿中ウイルス分離は陰性であった。当院入院時の脳波・画像検査所見を示す。脳波 (図1b) では前頭葉優位に連続性棘徐波を呈し、後頭葉の基礎波は連続性に乏しく6.0 Hz前後で全般的に徐波化していた。脳波上は部分けいれん重積状態と考えた。造影を含むMRI検査では、T₁・T₂強調像、拡散強調像で異常所見を認めず、FLAIR像で両側半球に散在する部分的灰白質の信号亢進が疑われた (図2)。脳血流シンチグラフィでは異常所見を認めなかった。

入院後経過 入院後経過を図3に示す。抗生剤、内服の抗てんかん薬は全て中止し、phenytoin, acyclovirおよびglycerin静注を開始した。入院3日目に血液中のヘルペスウイルス、Epstein-BarrウイルスPCRが陰性であることを確認後acyclovirは中止し、m-PSL pulse療法 (1 g/day × 3日間)を開始した。m-PSL pulse療法2クール目終了時には解熱し、髄膜刺激症状、鬱血乳頭は改善し、髄液検査所見も初圧160 mmH₂O、細胞数6/mm³に低下した。m-PSL pulse療法3クー

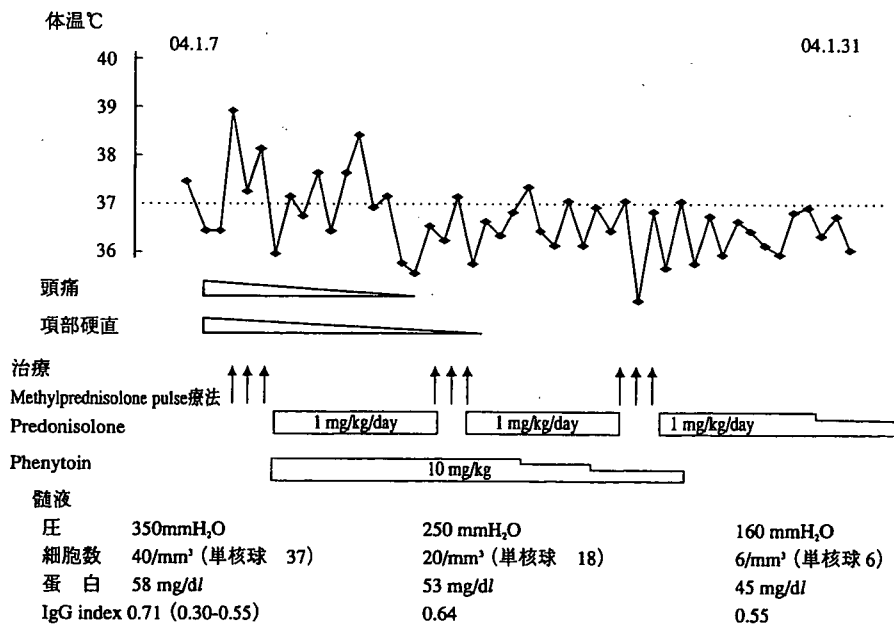


図3 本症例の経過

Methylprednisolone pulse 療法を3クール行い、頭痛、項部硬直などの臨床症状や髄液の圧、細胞数の著明な改善を認めた。

表2 血液・髄液グルタミン酸受容体 (GluR) 抗体および GluR 抗原による末梢血リンパ球幼若化テスト

	血液・髄液グルタミン酸受容体 GluR 抗体							
	入院時 (2003. 1. 7)				軽快時 (2003. 1. 30)			
	IgG ε 2,	IgM ε 2,	IgG δ 2,	IgM δ 2	IgG ε 2,	IgM ε 2,	IgG δ 2,	IgM δ 2
髄液	+	+	+	+	-	-	-	-
血液	-	-	+	-	-	-	+	-

	GluR 抗原によるリンパ球幼若化テスト				
	対照	PHA	GluR 非含有	GluR ε 2 含有	GluR δ 2 含有
	855	50272	1513	1398	1262

ル目終了後の脳波では全般性徐波が減少し、基礎波は11.0 Hzに改善した。以降 phenytoin 静注を valproate sodium 内服(16 mg/kg)に変更し、m-PSL pulse 療法後は prednisolone (以下 PSL) を1 mg/kg/日で内服し、3週間で漸減中止した。臨床症状、脳波所見の増悪は示さず、2月初旬に退院した。

本症例の病態に自己免疫機序が関与した可能性を疑い、髄液、血液中 GluR ϵ 2 \cdot δ 2 に対する抗体を入院時と軽快時で測定した(表2)。入院時は髄液中に GluR ϵ 2 \cdot δ 2 に対する IgG \cdot IgM 抗体がともに陽性で、改善時の髄液では全て陰性化した。一方末梢血では入院時、GluR δ 2 に対する IgG 抗体のみが存在し、経過を通じて変化は認められなかった。また、今回髄液中の GluR ϵ 2 に対する IgG \cdot IgM 抗体が陰性化した後の末梢血リンパ球で GluR ϵ 2 \cdot δ 2 含有ホモジネートによる幼若化刺激を実施したが、反応は得られなかった。

II 考 察

1991年、Rogers等¹⁾は AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) 型 GluR3 の自己抗体が血清中に存在する脳炎の存在を報告した。以来、自己免疫学的機序が関与する脳炎が注目されるようになった。この自己抗体は GluR に結合して興奮性に作用し、てんかん発作、異常興奮による細胞死、補体依存性あるいは非補体依存性に細胞障害を起こすことが報告されている²⁻⁴⁾。よってこれらの自己抗体が検出される脳炎では、てんかんや知能低下等、さまざまな中枢神経症状が起きることが推測される⁵⁾。

本症例では髄液中で免疫グロブリンが産生されており、病態に自己免疫の関与が疑われた。入院時は髄液中に GluR ϵ 2 \cdot δ 2 に対する IgG \cdot IgM 抗体がいずれも検出され、改善時の髄液では両受容体抗体はともに陰性化した。この GluR ϵ 2 抗体の変化は病状を良く反映したように考えられた。また、髄液中 GluR ϵ 2 抗体が陰性化した後の GluR ϵ 2 \cdot δ 2 含有ホモジネートによる末梢血リンパ球幼若化試験では全く反応が得られなかった。よって免疫反応は中枢神経系で起こっており、末梢血中 GluR 抗体は中枢神経系で産生された抗体の一部が漏れ出した可能性が高い。この結果は、Rasmussen 脳炎での GluR ϵ 2 自己抗体のエピトープが血清中より髄液中に広範囲に認められ、中枢神経系で GluR 抗体が作られている可能性が大きいとする高橋等の報告⁶⁾と一致する。

今回の症例は、臨床的に発熱、項部硬直と軽度の意識障害があり、髄液中に炎症細胞の増加が認められ、急性期に GluR ϵ 2 \cdot δ 2 に対する IgG \cdot IgM 抗体が検出され、改善時には両抗体は陰性化した。以上の点から自己免疫機序に由来した髄膜脳炎および非けいれん性部分てんかん重積が伴ったものと推察した。しかし、頭部 MRI では T₁ \cdot T₂ 強調像、拡散強調像で異常所見を認めず、FLAIR 像では軽度の灰白質の信号上昇が疑われたのみで、画像上の変化に乏しかった。山口らも GluR ϵ 2 抗体陽性の複雑部分てんかん重積状態の女兒例

を報告している⁶⁾。本女兒では発症後5カ月間でてんかん発作が急激に増加し、意識障害を認め、脳波上てんかん重積所見を呈していた。髄液細胞数の記載はないが、経過中の頭部 MRI には全く異常所見を認めなかった。また、 γ -globulin 大量療法に対する反応は大変良好で、治療1カ月後に脳波上のてんかん波は消失し、背景波も著明に改善した。彼らの症例は我々の症例との共通点が非常に多い。高橋らは急性期に自己抗体が出現し、回復期には消失する限局性脳炎では後遺症を残さないことが多く、回復期に自己抗体が出現する広汎性脳炎では後遺症を残す可能性が高いと報告している⁷⁻⁹⁾。しかし、これらの脳炎にはどのような病態の差異が存在するのか明らかにされていない。

今回の症例の様に髄液中の GluR 抗体が陽性になる脳炎の中には、脳波ではてんかん重積や基礎波の徐波化を起こし、MRI ではほとんど異常を認めない一群が存在する。この一群は、治療開始までに数カ月経ってもステロイドや γ -globulin 大量療法に反応し、Rasmussen 脳炎の経過とは明らかに異なる経過をとる。今回の我々の症例では実証できていないが、髄液中に自己抗体が出現する脳炎には、免疫反応が神経細胞の GluR 刺激にとどまってステロイドや γ -globulin 治療に良好に反応する例、これに加え細胞障害性 T 細胞活性化や炎症性サイトカインの誘導が生じ治療抵抗性になる例があるのではないかと推察している。今後も症例の蓄積をし、さらなる検討が必要と考えられる。

文 献

- 1) Rogers S W, Andrews P I, Gahring L C, et al. Autoantibodies to glutamate receptor GluR3 in Rasmussen's encephalitis. *Science* 1994;265:648-51.
- 2) 高橋幸利, 松田一己, 西村成子, 八木和一. Rasmussen 脳炎と抗神経抗体. *神経内科* 2003;59:38-44.
- 3) 葛谷 聡, 下濱 俊. Rasmussen 脳炎: グルタメイト受容体チャネルパッチ. *神経進歩* 2003;47:225-30.
- 4) 三品昌美. グルタミン酸受容体チャネルの分子的多様性と生理機能. *蛋白質 核酸 酵素* 1997;42:283-94.
- 5) Takahashi Y, Mori H, Mishina M, et al. Autoantibodies to NMDA receptor in patients with chronic forms of epilepsy partialis continua. *Neurology* 2003;61:891-6.
- 6) 山口貴美子. ガンマグロブリン大量療法により症状の改善が得られた抗グルタミン酸レセプター抗体陽性の難治性てんかんの女兒例. *小児科* 2004;45:1805-9.
- 7) Takahashi Y. Infections as causative factors of epilepsy. *Future Neurology* 2006;1:291-302.
- 8) 高橋幸利. 急性限局性脳炎(辺縁系脳炎)における GluR ϵ 2 自己抗体と予後の関連: 第一報. 厚生労働科学研究(こころの健康科学研究事業)「急性脳炎のグルタミン酸受容体自己免疫病態の解明から新たな治療法確立に向けた研究」平成17年度報告書. 2006:20-2.
- 9) 高橋幸利. 小児の急性脳炎(広汎性脳炎)における GluR ϵ 2 自己抗体と予後の関連: 第一報. 厚生労働科学研究(こころの健康科学研究事業)「急性脳炎のグルタミン酸受容体自己免疫病態の解明から新たな治療法確立に向けた研究」平成17年度報告書. 2006:17-9.

A 16-Year-Old Boy with Meningoencephalitis with Auto-Antibody against Glutamate Receptor

Shiho Tomioka, MD, Masayuki Shimono, MD, Ayako Kato, MD,

Kenichi Takano, MD, Naoki Shiota, MD and Yukitoshi Takahashi, MD

Department of Pediatrics, School of Medicine, University of Occupational and

Environmental Health, Kitakyushu, Fukuoka (ST, MS, AK, KT, NS) ;

National Epilepsy Center, Shizuoka Institute of Epilepsy and Neurological Disorders, Shizuoka (YT)

We herein report a 16-year-old boy who presented with fever and generalized convulsion. His symptoms progressively worsened, and electroencephalography (EEG) showed status with bi-frontal focus. One month after the initial presentation, examination of the cerebrospinal fluid showed pleocytosis, an increase in the IgG index and a positive oligoclonal IgG band. Brain MRI suggested slightly high signal intensity in the cerebral gray matter on FLAIR images. We considered that the patient had autoimmune meningoencephalitis, and therefore treated him with methyl-prednisolone pulse therapy, which substantially improved both his clinical condition and EEG findings. Before the therapy, the IgM and IgG auto-antibodies against glutamate receptor (GluR) ϵ 2 and δ 2 were positive, however they became negative after the therapy. In conclusion, some cases of meningoencephalitis with auto-antibodies against GluR may show an electrical status, mild brain MRI findings, and a good response to methylprednisolone pulse therapy. These clinical features were quite different from those observed for cases of Rasmussen's encephalitis.

No To Hattatsu 2008; 40:42-46

神経学の散歩道(59)

ピューロンの豚

ギリシャの哲学者ピューロンは、ある日、たまたま、友人のポセイドニオスといっしょに嵐の海を航行する船に乗っていた。同じ船に乗り合わせた人達が、嵐のために顔色を失っていた時に、彼自身は平静を保ちながら、船に積まれていた仔豚が無心に餌を食べ続けている姿を指して、船の難破を恐れて驚きさわぐ人間よりも、無心に餌を食べる豚の方がしあわせであると言ったと伝えられる。(ギリシャ哲学者列伝(下)第11章. 岩波文庫, 2004).

この説話に似た事態は、予後不良の疾患の治療や、危険を伴う手術などを行う臨床の現場で日常的に見聞きされる。

それはともかく、“ピューロンの豚”は大変歯切れのよいたとえ話であるので、わが国にもこれに似た説話がありはしまいかと心あたりを探して見た。心あたりと言っても、ことわざ事典ぐらいが主な情報源であったためか、それらしいものを発見することは出来なかった。あえて言うならば、「知らぬが佛」がやや近いかも知れない。教訓的ではないが。

(馬場 一雄)



特 集 □ 情報伝達処理におけるグリアの機能と異常

哺乳類中枢神経系における D-セリンの役割

Roles of D-serine in the Mammalian Brain

Zhao Ying-Luan* 森 寿*

Ying-Luan Zhao, Hisashi Mori

Abstract

D-Serine has recently been identified as a major gliotransmitter in the mammal central nervous system (CNS). The distribution of D-serine is analogous to the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)-type glutamate receptors in the brain. D-Serine is as potent as glycine as a coagonist at the glycine-binding site of NMDA receptors. Thus, D-serine has been considered as an endogenous ligand of the NMDA receptors in the brain. D-Serine is synthesized by serine racemase (SR) from L-serine. Both D-serine and SR have been enriched to astrocytes which are the dynamic partners of neurons at synapses and participate in controlling synaptic transmission, synaptic plasticity and synaptogenesis. The present review highlights the most recent findings on the molecular mechanisms of controlling D-serine metabolism in the CNS, the physiological role of D-serine in synaptic plasticity, and the pathological relevance of D-serine to schizophrenia, excitotoxicity- and neuroinflammation-induced neuronal death as well as neuropathic pain. Finally, as we have recently established SR knockout mouse strain with pure C57BL/6 genetic background, this novel mouse model will contribute the analysis of physiological and pathophysiological role of D-serine *in vivo*.

Key words : astrocyte, D-serine, gliotransmitter, NMDA receptor, serine racemase

はじめに

D型異性体アミノ酸の1つであるD-セリンが、哺乳類の脳に豊富に存在し、その分布がNMDA型グルタミン酸受容体(GluR)と類似していることが1993年、初めて報告された。D-セリンはNMDA型GluRサブユニットのグリシン結合領域に結合し、内在性コアゴニストとしてその機能を調節していると考えられることから、生理的なシナプス可塑性だけでなく神経細胞死や、精神疾患の病態に関与していることが示唆されている。D-セリンの合成に関わると考えられているセリンラセマーゼが、グリア細胞の1つであるアストロサイトに存在していることから、D-セリンはグリア細胞由来の新しい神経伝達調節因子(gliotransmitter)の1つとして注目されている。本稿では、脳内D-セリンの役割について、最新の知見を中心に概説する。

I. D-セリンの合成と分解

1. D-セリンの合成と脳内分布

脳内D-セリンの合成酵素は不明であったが、Woloskerらはマウスのセリンラセマーゼを精製し、部分アミノ酸配列情報をもとに遺伝子をクローニングした。D-セリンを持たないHEK293細胞にセリンラセマーゼ遺伝子を発現させたところ、L-セリン濃度依存的なD-セリンの合成と分泌の増加が認められた¹⁾。しかし、このセリンラセマーゼが哺乳類の脳内D-セリンの合成にどこまで関わっているかについては明らかではない。そこで筆者らは、セリンラセマーゼノックアウト(KO)マウスを作製した(Fig. 1)。成体KOマウスでは、前頭前野ならびに海馬におけるD-セリンの含有量が有意に低下した。したがって、セリンラセマーゼが脳における主要なD-セリンの合成酵素であることが示唆された(未発表)。グリシン開裂酵素活性を欠く、非ケト-シス型高グリシン血症

* 富山大学大学院医学薬学研究部分子神経科学〔〒930-0194 富山市杉谷2630〕Department of Molecular Neuroscience, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan