

厚生労働科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

自己免疫疾患に伴う中枢神経障害に関連する抗神経抗体の検索と抗原機能の解析：  
病態の解明から治療法確立に向けて

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 木村暁夫

平成20（2008）年 3月

## 目 次

I. 総括研究報告	
自己免疫疾患に伴う中枢神経障害に関連する抗神経抗体の検索と抗原機能の解析： 病態の解明から治療法確立に向けて	----- 1
木村暁夫	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 11
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 12

# I 総括研究報告

自己免疫疾患に伴う中枢神経障害に関連する抗神経抗体の検索と抗原機能の解析：  
病態の解明から治療法確立に向けて

主任研究者：木村 暁夫

岐阜大学医学部附属病院 神経内科・老年科 助手

## 研究要旨

全身性エリテマトーデスやシェーグレン症候群など全身性自己免疫疾患はしばしば中枢神経障害を合併する事が知られており、その臨床症状も精神症状、痙攣、認知障害、運動麻痺など多岐にわたり、いずれも患者の予後を左右する重要な病態である。これらの疾患には多種類の自己抗体が存在することが知られており診断項目の一つにもなっている。しかし一方でこれら自己抗体の特異性および病的意義に関しては不明な点が多い。本研究の目的は、中枢神経障害を合併した全身性自己免疫疾患患者の血清・髄液検体を用いて、疾患特異的抗神経抗体の検出ならびにその認識抗原を同定し、得られた抗原情報をもとに新たな診断および治療法の開発を行うことである。

【抗 Hsp60 抗体】昨年度より我々は二次元免疫ブロット法および高感度ナノ LC-MS/MS システムを構築し様々な免疫性神経疾患と健常者の血清を用い抗神経抗体の検出およびその認識抗原の同定を行ってきた。その中に多発単ニューロパチーで発症し、その後特徴的な大脳・小脳・脳幹に広範な白質病変を呈した CNS ループス患者を経験し、その血清中に 4 種類のラット脳蛋白と免疫学的に反応する抗神経抗体を検出した。その抗原蛋白は質量分析の結果、Beta-actin, Alpha-internexin, Heat-shock protein 60 (Hsp60), GFAP であった。このうちの Hsp60 に関しては、ストレス下に血管内皮細胞表面に発現することが知られている。本年度、抗 Hsp60 抗体が抗血管内皮細胞抗体として大脳微小血管障害をもたらす可能性を推測し、抗 Hsp60 抗体価と大脳深部白質病変の関連性につき検討した。ELISA 法を用い 110 人の神経疾患患者(非炎症性神経疾患 86 名、神経障害を合併した全身性自己免疫疾患 24 名)と 9 人の健常者の抗 Hsp60 抗体価を測定し大脳深部白質病変を Fazekas' rating scale を用い評価した。結果、Fazekas' rating scale が 2, 3 の大脳深部白質病変を有する全身性自己免疫疾患患者の抗 Hsp60 抗体価が健常者 ( $p=0.039$ ) および同 scale が 0, 1 の非炎症性神経疾患患者 ( $p=0.016$ ) の抗体価と比較し有意に高値であった。

【抗  $\alpha$ GDI 抗体】本年度、CNS ループス患者に特異的な自己抗体を検出するため、12 名の健常者と 6 名の CNS ループス患者の血清中の抗神経抗体を二次元免疫ブロットにより検出した。このうち健常者には反応せず CNS ループス患者の血清に反応するスポットを抽出し質量分析を施行した。結果、Stress-70 protein, Rab GDP dissociation inhibitor alpha ( $\alpha$ GDI)、Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, L-lactate dehydrogenase B chain, F-actin-capping protein subunit alpha-2, Rab GDP dissociation inhibitor beta 以上 6 種類の抗体認識抗原蛋白を同定した。このうちの  $\alpha$ GDI に関しては、神経シナプ스에 局在し小胞輸送に必要な G 蛋白 Rab3a のリサイクリングに関与することが知られており、さらに  $\alpha$ GDI をコードする GDI-1 遺伝子は非特異的 X 連鎖精神遅滞の原因遺伝子の 1 つでノックアウトマウスでは、短期記憶障害、攻撃性の低下、社会行動の変化を示すことが報告されている。そこでヒト  $\alpha$ GDI リコンビナント蛋白を用いたウエスタンブロット法により CNS ループス患者、健常者、感染性髄膜脳炎患者それぞれ 12 名ずつの血清中の自己抗体を検索した。結果 2 名の精神症状を呈した CNS ループス患者の血清中にのみ同抗体が検出された。

## A. 研究目的

中枢神経障害を合併した全身性自己免疫疾患患者に対し、疾患特異的抗神経抗体の検出ならびに認識抗原の同定を行い、得られた抗原情報を新たな診断および治療法の開発に反映し、同疾患による精神・身体障害を軽減することにより国民福祉に貢献する。

## B. 研究方法

### 1) 患者サンプルの採取と抗神経抗体の検出

中枢神経障害を合併し、SLE の臨床診断基準(アメリカリウマチ協会、1997年)を満たす患者および健常者より血清を採取した。ラット大脳ホモジネートを抗原サンプルとして等電点電気泳動を行い、その後 SDS-PAGE ならびにブロットングを施行した。ブロット後の PVDF メンブレンを用い上記患者および健常者血清を一次抗体(×1500)とし、HRP で標識したヤギ抗ヒト IgG・A・M 抗体を二次抗体(×2000)として抗原・抗体反応を行い蛍光スキャナーにてスポットを検出した。抗体の反応スポットと、同じサンプルを用いた二次元電気泳動の CBB 染色したゲル上のスポットとマッチングを行った。

### 2) 認識抗原の同定

1)にて一致したスポットに対しゲル内トリプシン消化を行い nanoscale capillary liquid chromatography (LC) system (LV-VP, Shimadzu)および ion-trap を原理とした tandem mass spectrometer (LCQ Advantage max, Thermo electron)を組み合わせた高感度の質量分析システムを用い、データベース検索 [Mass data 収集ソフト X calibur TM (Thermo finnigan), Mass data 解析・蛋白同定ソフト MASCOT (Matrix Science)]により患者血清中の抗神経抗体の認識抗原蛋白の同定を試みた。

### 3) 広範な白質病変を有する CNS ループス患者における検討

多発単ニューロパチーで発症し、その後特徴的な大脳・小脳・脳幹に広がる広範な白質病変を呈した 69 歳 CNS ループス男性患者の血清を用い二次元免疫ブロットにより抗神経抗

体を検出した。その後、その抗体反応スポットを抽出し質量分析を行い抗体認識抗原蛋白を同定した。

### 4) 抗 Hsp60 抗体の ELISA 解析

ELISA kit (Stressgen, Ann Arbor, MI, USA) を用い 110 人の神経疾患患者(非炎症性神経疾患 86 名、神経障害を合併した全身性自己免疫疾患 24 名)と 9 人の健常者の血清中抗 Hsp60 抗体価を測定した。

### 5) 大脳深部白質病変の評価

上記 110 人の神経疾患患者の頭部 MRI 画像を 2 名の神経内科医が解析した。大脳深部白質病変を Fazekas rating scale [grade 0; absent, grade 1; punctate foci, grade 2; initial confluence of foci, grade 3, large confluent areas]を用い評価した。

### 6) 各患者群の抗 Hsp60 抗体価の比較検討

上記 110 人の神経疾患患者を非炎症性神経疾患患者群 (n=86)と神経障害を合併した全身性自己免疫疾患患者群 (n=24)に分類した。さらにそれぞれの群を Fazekas rating scale に基づき高度な大脳深部白質病変を有する群 (Fazekas rating scale grade 2, grade 3)とそれ以外の群 (grade 0, grade 1)に分類した。上記 4 群および健常者群の抗体価を Kruskal-Wallis test を用いて比較検討した。

### 7) CNS ループス特異的自己抗体の検出

CNS ループスに特異的な自己抗体を検出するため、12 名の健常者と 6 名の CNS ループス患者の血清中の抗神経抗体を二次元免疫ブロットにより検出した。このうち健常者の血清には反応せず CNS ループス患者の血清のみに反応したスポットを抽出し質量分析を施行した。

### 8) 抗 $\alpha$ GDI 抗体の検出

Human Rab GDP dissociation inhibitor alpha ( $\alpha$ GDI) recombinant protein (Abnova, Taipei, Taiwan)を用い、CNS ループス患者、感染性髄膜脳炎患者、健常者それぞれ 12 名ずつの血清を一次抗体としてウェスタンブロットを施行し、抗体の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

サンプルとして使用したラット脳の使用に関しては、岐阜大学大学院医学研究科動物実験委員会の承認を得た。

### C. 研究結果

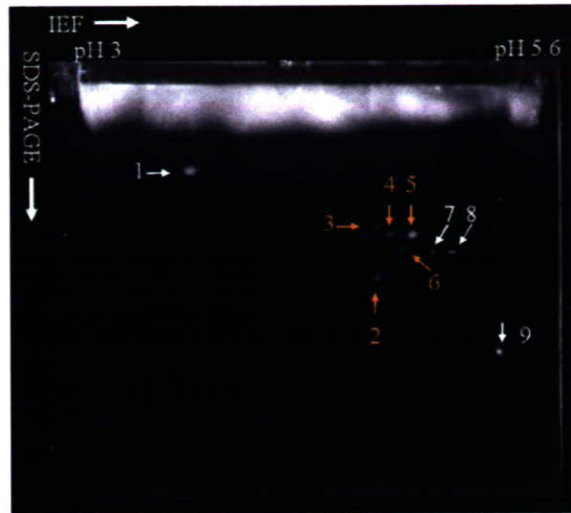
#### 【抗Hsp60抗体】

##### 1) 抗 Hsp60 抗体の同定

昨年度、多発単ニューロパチーで発症し、その後特徴的な大脳・小脳・脳幹に拡がる広範な白質病変(図 1)を呈した CNS ループスの男性患者を経験した。その血清中にラット大脳ホモジネートと反応する 9 つの抗体反応スポットを二次元免疫ブロット法にて確認した(図 2)。これらスポットのうち 4 種類の認識抗原蛋白を同定した。それらは Beta-actin, Alpha-internexin, Heat-shock protein 60 (Hsp60), GFAP であった(表 1)。

この中の Hsp60(図 3)に関しては、ミトコンドリアのシャペロン蛋白で、ミスフォールド・変性蛋白の除去に関与していることが知られている。一方、ストレス下に血管内皮細胞膜表面に発現することも知られており抗 Hsp60 抗体が抗血管内皮細胞抗体として大脳微小血管障害に関与する可能性を考慮し、同抗体価と大脳深部白質病変につき検討した。

(図2) 二次元免疫プロット法



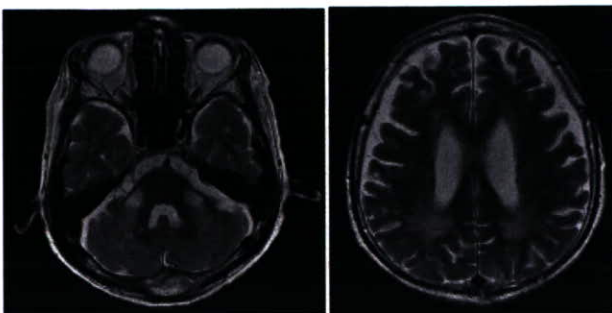
橙色の矢印: 今回同定できたスポット

(表 1) 質量分析の結果

Spot Numb.	protein name	score	peptides	Coverage %	M.W. (kDa)/pI	Theoretical M.W./pI
2	Beta-actin	421	16	41	46K/5.15	42K/5.29
3	Alpha-Inx	203	5	12	63K/5.15	56K/5.20
4	Hsp 60	112	3	6	57K/5.25	61K/5.91
5	Hsp 60	112	3	8	57K/5.4	61K/5.91
6	GFAP	113	2	2	53K/5.3	50K/5.35

Spot number は図 2 の spot number に対応

(図1) 頭部 MRI T2WI



(図 3) Hsp60 アミノ酸配列

```

1 MLRLPTVLRQ MRPVSRALAP HLTRAYAKDV KFGADARALM LQGVLLADA
51 VAVTMGPKGR TVIIQSWGS PKVTKDGVTV AKSIDLKDKY KNIGAKLVOD
101 VANNTEEAG DGITTATVLA RSIAGEFEK ISKGANPVEI RRGVMLAVDA
151 VIAELKKQSK PVTTPPEIAQ VATISANGDK DIGNIISDAM KK VGRKGVIT
201 VKDGKTLNDE LEIIEGMKFD RGYISPYFIN TSKGQKCEFQ DAYVLLSEKK
251 ISSVQSIVPA LEIANHRKP LVIIAEDVDG EALSTLVLNR LKVLQVVAV
301 KAPGFGDNRK NQLKDMAIAT GGAVFGEEGL NLNLEDVQAH DLGKVGVEIV
351 TKDDAMLLKG KGDKAHIEKR IQEITEQLDI TTSEYEKEKL NERLAKLSDG
401 VAVLKVGTS DVEVNEKKDR VTDALNATRA AVEEGIVLGG GCALLRCIPA
451 LDSLKPANED QKIGIEIKR ALKIPAMTIA KNAGVEGSLI VEK ILQSSSE
501 VGYDAMLGDF VNMVEKGIID PTKVVRTALL DAAGVASLLT TAEAVVTEIP
551 KEEKDPGMGA MGGMGGGMMG GMF
    
```

質量分析の結果、一致したスポットを赤字とアンダーラインにて示す

## 2) 抗 Hsp60 抗体と大脳深部白質病変

110 人の対象患者を疾患(非炎症性神経疾患と神経障害を合併した全身性自己免疫疾患)および頭部 MRI 画像所見における大脳深部白質病変(Fazekas rating scale 0,1 と同 scale2,3)により 4 群に分類した。さらにそれぞれの患者につき既知の動脈硬化のリスクファクターの有無につき検討した(表 2)。全身性自己免疫疾患群では 24 例中 1 例に高血圧の合併がみられるのみで大脳深部白質病変合併例ではその背景に通常動脈硬化とは別の機序が存在することが推測された。

上記 4 群と健常者群の ELISA 解析を用いた抗 Hsp60 抗体価の測定結果は下記となった(図 4)。高度の大脳深部白質病変(Fazekas rating scale 2, 3)を有し神経障害を合併した全身性自己免疫疾患患者群においては健常者群および Fazekas rating scale が 0, 1 の非炎症性神経疾患患者群と比較し有意に抗 Hsp60 抗体価の上昇を認めた( $P=0.039$ ,  $P=0.016$ )。

## 3) 抗 Hsp60 抗体価とその他因子との関連性に関する検討

抗 Hsp60 抗体価と、動脈硬化および虚血性疾患に関わるその他因子(高血圧・糖尿病・高脂血症・年齢・性別)との相関性につき検討した。結果、いずれの因子も抗体価との間に有意差をもった相関性は認めなかった(表 3)

(表 2) 対象患者群

患者群	年齢 mean ±SD	男性 %	高血 圧 %	糖尿 病 %	高脂 血症 %
全身性自己免疫疾患 (Grade 2, 3) n=7	58.6± 17.8	57.1 n=4	0	0	0
全身性自己免疫疾患 (Grade 0, 1) n=17	46.4± 18.0	17.6 n=3	5.9 n=1	0	0
非炎症性神経疾患 (Grade 2, 3) n=23	70.0± 13.3	52.2 n=12	47.8 n=11	26.1 n=6	17.4 n=4
非炎症性神経疾患 (Grade 0, 1) n=63	55.0± 16.1	54.0 n=34	17.5 n=11	12. n=8	9.5 n=6

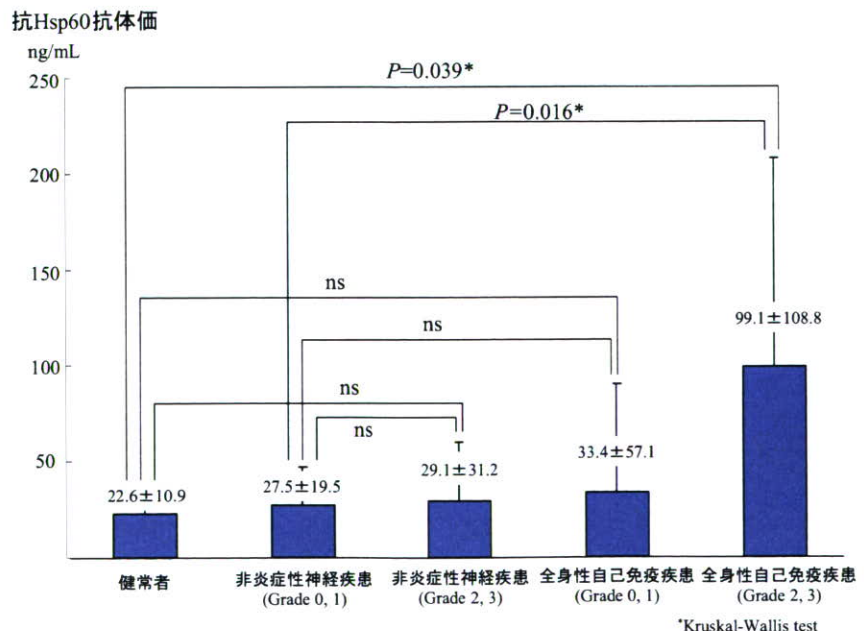
(表 3) 抗 Hsp60 抗体価とその他因子

因子	抗 Hsp60 抗体 [mean±SD, ng/mL]	P 値
高血圧	有り (n=23): 32.7±43.8, 無し (n=96): 31.8±31.6	0.202 <sup>a)</sup>
糖尿病	有り (n=13): 32.5±43.6, 無し (n=106): 32.4±16.1	0.051 <sup>a)</sup>
高脂血症	在り (n=10): 30.9±40.3, 無し (n=109): 49.9±51.9	0.838 <sup>a)</sup>
性別	男性 (n=58): 28.1±33.9, 女性 (n=61): 37.1±48.0	0.983 <sup>a)</sup>
年齢		0.707 <sup>b)</sup>

a) Mann-Whitney's *U* test,

b) Spearman's correlation test

(図 4)  
各群の抗 Hsp60 抗体価の比較



## 【抗 $\alpha$ GDI-1 抗体】

### 1) 抗 $\alpha$ GDI-1 抗体の同定

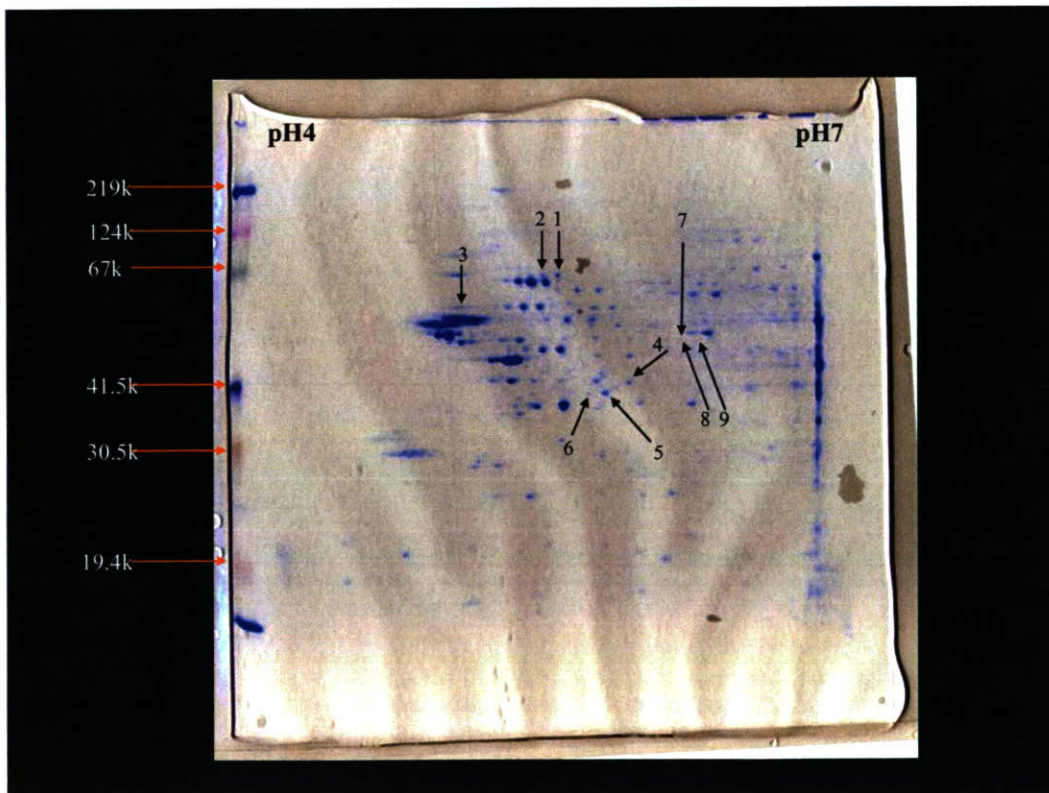
CNS ループスに特異的な自己抗体を検出するため、12名の健常者と6名のCNS ループス患者の血清中の抗神経抗体を二次元免疫ブロットにより検出した。一人あたりの抗体反応スポット数はCNS ループス患者で約6~12個、健常者で約2~38個であった。そのうち健常者の血清に反応せず CNS ループス患者の血清に反応した抗体反応スポット数は9個であった(図5)。これらのスポットに対する質量分析の結果、Stress-70 protein、Rab GDP dissociation inhibitor alpha ( $\alpha$ GDI)、Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha、L-lactate dehydrogenase B chain、F-actin-capping protein subunit alpha-2、Rab GDP dissociation inhibitor beta 以上合計6種類の自己抗体認識抗原蛋白を同定した(表4)

(図5) 健常者にはなく CNS ループス患者に認められたスポット

(表4) 質量分析の結果

Spot number	Protein name	Mascot score	Coverage %	Calculated M.W. (kDa)/pI
1	Stress-70 protein	616	22	74097/5.97
2	Stress-70 protein	30	2	74097/5.97
3	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	171	10	51074/5.00
4	Isocitrate dehydrogenase subunit alpha	363	19	40044/6.47
5	L-lactate dehydrogenase B chain	302	29	36874/5.70
6	F-actin-capping protein subunit alpha-2	83	6	33118/5.57
7	Rab GDP dissociation inhibitor beta	157	10	51018/5.93

Spot number は図5の spot number に対応





## 2) ヒト $\alpha$ GDI リコンビナント蛋白を用いた特異性の検討

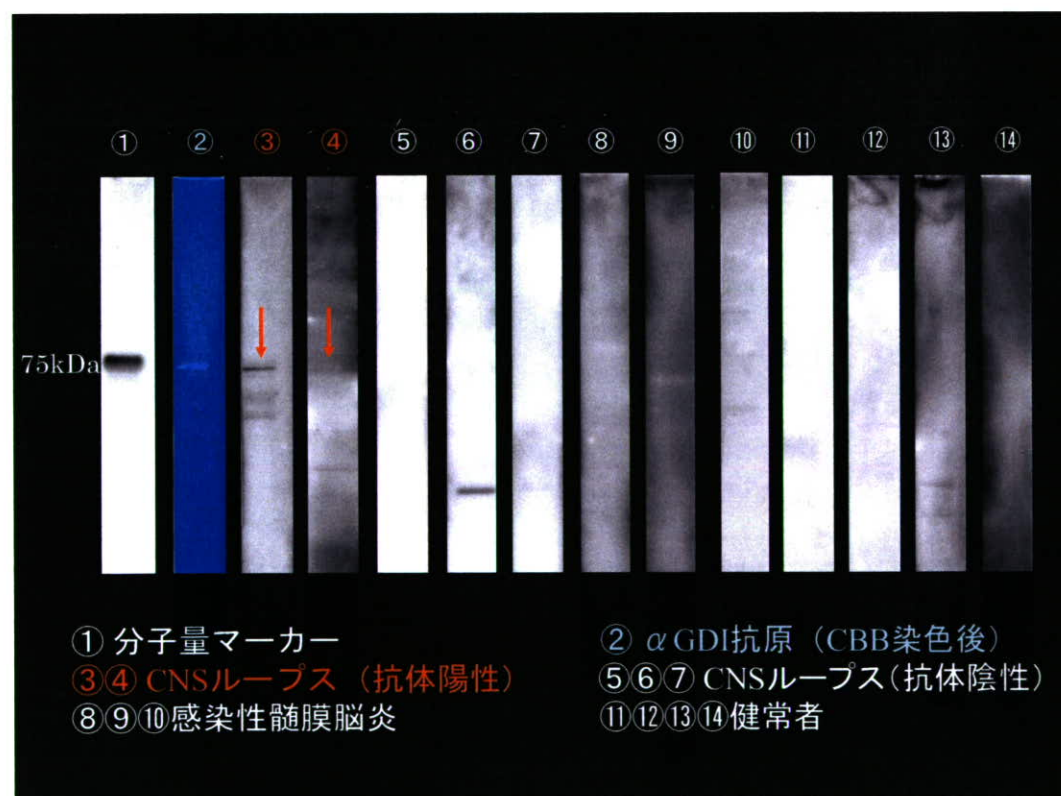
同定した 6 種類の蛋白のうちの Rab GDP dissociation inhibitor alpha ( $\alpha$ GDI) は、神経シナプ스에 局在し小胞輸送に必要な G 蛋白 Rab3a のリサイクリングに関与することが知られており、抗  $\alpha$ GDI 抗体が神経シナプスにおける伝達障害に関与する可能性を考慮し、同抗体の特異性につき検討した。CNS ループス患者、感染性髄膜脳炎患者、健常者それぞれ 12 名ずつの血清を一次抗体としてウエスタンブロットを施行した。結果、2 名の CNS ループス患者 (表 5) のみに同抗体を検出した (図 6)。その 2 名の神経症状は 1 名が myelopathy と psychosis を呈し、残りの 1 名が psychosis を呈した。

(表 5) CNS ループス対象患者の神経所見 (アメリカリウマチ学会全身性エリテマトーデスの精神神経症状の分類による)

age/sex	neurological symptoms
31/F	aseptic meningitis
32/F	myelopathy, psychosis
22/M	psychosis
68/M	polyneuropathy, cognitive dysfunction, psychosis
61/F	movement disorder (chorea)
55/F	mood disorders (depressive), seizure disorders
58/F	mood disorders (depressive), headache
46/F	mood disorders (manic)
16/F	cerebrovascular disease, mood disorder
29/F	cerebrovascular disease, acute confusional state
63/F	cerebrovascular disease
42/F	mood disorders (depressive), headache

赤字の 2 例が抗  $\alpha$ GDI 抗体陽性例

(図 6) ヒト  $\alpha$ GDI リコンビナント蛋白を用いたウエスタンブロット



#### D. 考察

本年度、我々は独自に開発した二次元免疫ブロット法と高感度ナノLC-MS/MSシステムを用いて2つの成果を収めることができた。1つは抗 Hsp60 抗体と全身性自己免疫疾患患者における大脳深部白質の微小血管障害との関連性を指摘したことであり、もう1つは2名の精神症状を呈した CNS ループス患者の血清中に抗  $\alpha$ GDI 抗体を検出し、これまでの検討では同抗体が健常者・感染性髄膜脳炎患者には存在しないことを確認したことである。

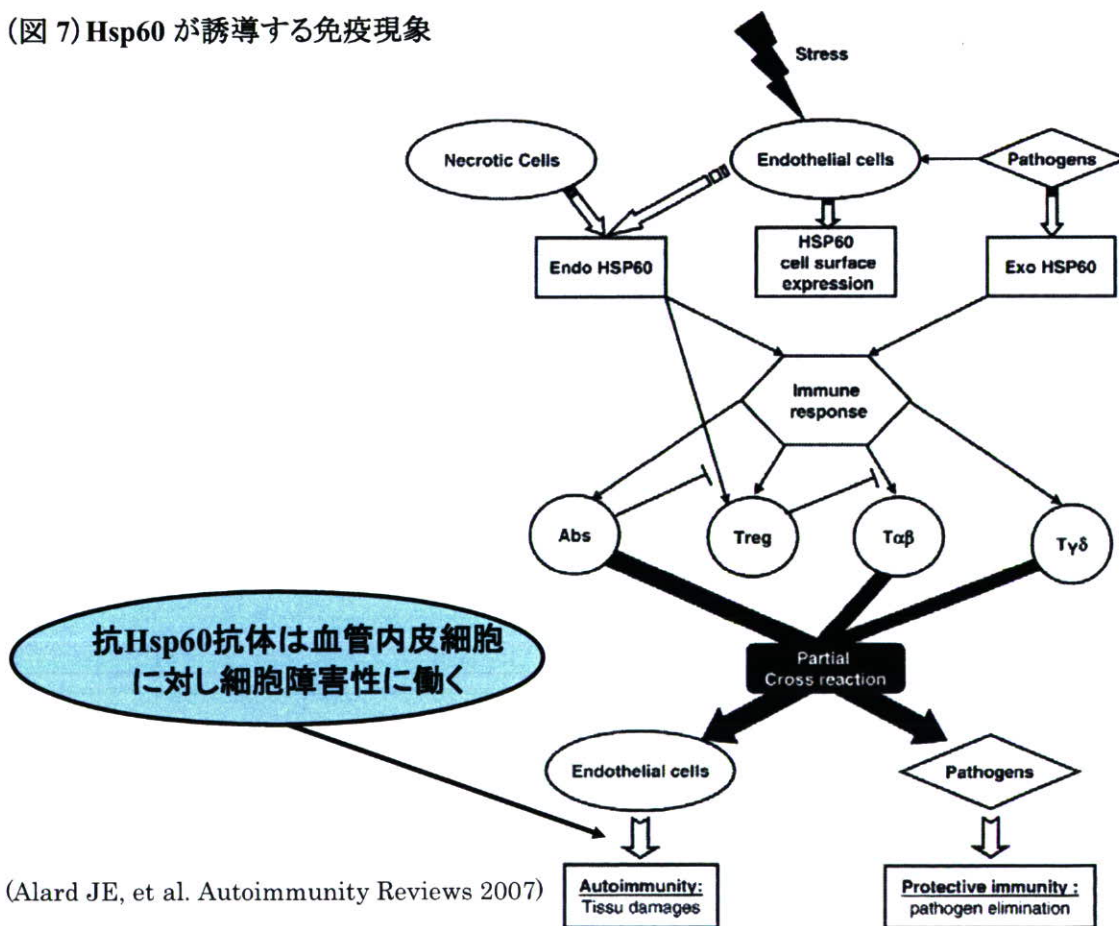
抗 Hsp60 抗体に関する研究は、昨年度、多発単ニューロパチーで発症し、その後特徴的な広範な白質病変を呈した CNS ループスの男性患者を経験し、その血清中より抗 Hsp60 抗体を検出したことにはじまった(Kimura A et al, Lupus 2008)。Hsp60 に関しては、通常ミトコンドリア内のシャペロン蛋白として機能するが(Martin J et al, Science 1992)、同時に細胞膜に発現することが知られている。

ストレス下においては血管内皮細胞膜にも同様に発現し抗血管内皮細胞抗体の重要なターゲットとなり、抗体が血管内皮細胞の apoptosis を誘導し(Schett G et al. J Clin Invest 1995; Dieudé M et al. Arthritis Rheum 2004; Alard JE et al. Autoimmun Rev 2007、図 7 参照)、血管炎の病態形成に係わっているとする報告がある(Jamin et al, Arthritis Rheum, 2005)。

さらに抗 Hsp60 抗体を有する SLE 患者では血栓症の合併頻度が高くなるとする報告もある(Dieude et al., Arthritis Rheum, 2004)。

同抗体と虚血性心疾患や動脈硬化症との関連性を指摘した報告はあるが(Bason et al. , Lancet, 2003、Choy, J Mol Cell Cardiol, 2001)、一方、脳血管障害との関連性を指摘した報告は Gromadzka らの報告のみである(Gromadzka et al., Cerebrovasc Dis, 2001、表 6 参照)。

(図 7) Hsp60 が誘導する免疫現象



(Alard JE, et al. Autoimmunity Reviews 2007)

先の我々が報告した症例では血液検査にて凝固線溶系の亢進を示唆する所見もみられており、広範な白質病変をきたした背景に同抗体を介した微小血管レベルにおける血管内皮障害ならびに循環障害が存在する可能性を考えた。そこで我々は、抗 Hsp60 抗体と大脳深部白質病変との関連性に着目し検討を進めた。その結果、高度な大脳深部白質病変を有し神経症状を呈した全身性自己免疫疾患患者の抗 Hsp60 抗体価が健常者および大脳深部白質病変が軽度もしくは認めないその他神経疾患患者と比較し有意に高値であることを確認した。またこれら患者における高血圧・糖尿病・高脂血症といった既知の動脈硬化のリスクファクターに関する検討では、対象とした全身性自己免疫疾患患者群の内 1 例で高血圧の合併がみられたのみであり、全身性自己免疫疾患患者における抗 Hsp60 抗体価が高値であることは大脳深部白質病変の合併に対し独立した危険因子である可能性が示唆された。広範な大脳白質病変と認知機能障害との関連性を指摘した報告もあり (Vermeer SE et al., N Engl J Med 2003)、全身性自己免疫疾患患者において、抗 Hsp60 抗体から大脳微小血管内皮細胞を保護することが、認知機能障害を予防する新たな治療戦略となる可能性が考えられた。

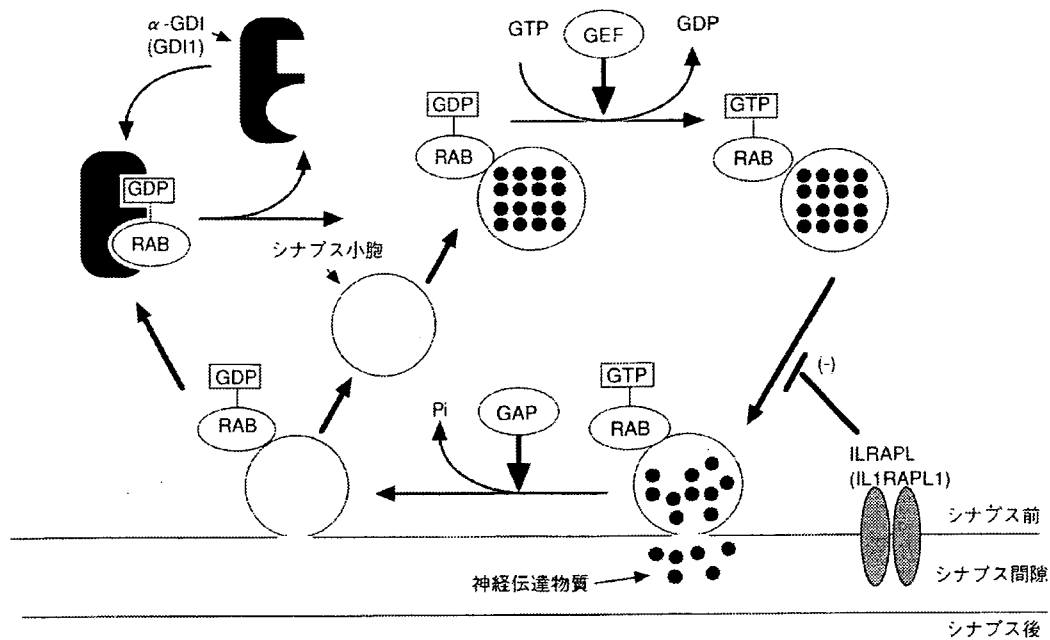
(表 6) 抗 Hsp60/65 抗体と血管障害

Reference	Hsps	Disease	Case/controls	Odds ratio/P
Xu et al., 1993	Hsp65	Carotid AS	867	1.52 (1.09-2.02)
Gruber et al., 1996	Hsp65	Vasculitis	107/90	P<0.001
Hoppichler et al., 1996	Hsp65	CAD, MI	203/76	P<0.05
Mukherjee et al., 1996	Hsp65	CAD	28/12	P=0.036
Birnie et al., 1998	Hsp65	CAD	136	P=0.012
Prohaszka et al., 1999	Hsp60	CAD	74	P<0.0001
Xu et al., 1999	Hsp65	Carotid AS	750	1.42 (1.02-1.98)
Zhu et al., 2001	Hsp60	CAD	274/91	1.86 (1.13-3.04)
Burian et al., 2001	Hsp60	CAD	276/129	2.6 (1.3-5.0)
Gromadzka et al., 2001	Hsp65/70	Stroke	180/64	P<0.0001
Prohaszka et al., 2001	Hsp60	CAD	424/321	P<0.007
Ciervo et al., 2002	Hsp60	CAD	179/100	P<0.05
Huittinen et al., 2002	Hsp60	CAD	239/239	2.0 (1.1-3.6)
Veres et al., 2002	Hsp65	CV	386/386	2.1 (1.2-3.9)
Biasucci et al., 2003	Hsp60	CAD	100/159	P<0.0001
Huittinen et al., 2003	Hsp60	CAD	241/241	2.1 (1.08-4.3)

AS, atherosclerosis; CAD, coronary artery disease; CV, cardiovascular events; MI, myocardial infarction (Mandal et al. Lupus 2005)

これまでの CNS ループス患者における自己抗体に関する報告では、抗リボソーム P 抗体、抗 microtubule-associated protein 2 抗体、抗リン脂質抗体、抗 GFAP 抗体、抗血管内皮細胞抗体などの報告がある。また CNS ループス患者に存在する抗二本鎖 DNA 抗体が NMDA 型抗グルタミン酸受容体の一部 [NR2A (GluRε1) および NR2B (GluRε2)] と交叉反応性を示し、さらにはアポトーシス経路を介して神経細胞死をもたらすとする報告がある (DeGiorgio et al. Nature medicine 2001)。しかし、一方でこれらの抗体は決して特異的といえるものではなく、また病的意義も確立していない。そこで我々は、CNS ループス患者により特異的な抗神経抗体を検出するために健常対象者の血清を用い二次免疫プロットを行い、CNS ループス患者のスポットと比較し特異的なスポットを抽出し解析した。その結果、ストレス蛋白、小胞輸送に関連する蛋白、ミトコンドリア代謝に関連する蛋白、解糖系酵素、細胞骨格に関連する蛋白の合計 6 種類の抗原蛋白を同定した。この中の αGDI は、神経シナプスに局在し小胞輸送に必要な G 蛋白 Rab3a のリサイクリングに関与することが知られている (Pfeffer SR, et al. J Biol Chem 1995、図 8 参照)。さらに αGDI をコードする GDI-1 遺伝子は、精神発達遅滞を唯一の臨床症状とする非特異的 X 連鎖精神遅滞の原因遺伝子の 1 つであり、そのノックアウトマウスでは、短期記憶障害、攻撃性の低下、社会行動の変化を示すことが知られている (D'Adamo P, et al. Nature Genet 1998)。これらの報告を踏まえ抗 αGDI 抗体が神経シナプスにおける伝達障害に関与する可能性を考慮し、同抗体の特異性につきリコンビナント蛋白を用いたウエスタンブロット法により検討した。結果 2 名の CNS ループス患者に同抗体を検出した。この 2 名はともに幻覚を伴った psychosis を呈したことから、同抗体と CNS ループスにみられる psychosis との関連性が疑われた。しかし少数例であり今後も症例数を増やした検討が必要と考えられた。

(図 8) Rab 蛋白質とシナプスにおける小胞融合とリサイクルの概略図 (和田, 神経進歩 2006)



## E. 結論

1、全身性自己免疫疾患患者において高度の  
大脳深部白質病変合併例では、抗Hsp60抗体  
価が高値である。同抗体と血管内皮細胞障害  
との関連性を指摘する報告も多数あることから  
今後、認知機能障害の予防を目的として抗  
Hsp60抗体から大脳微小血管内皮細胞を保護  
する新たな治療法の開発を目指し、免疫動物  
などを用いた検討を行う必要がある。

2、2例の pshychosis を呈した CNS ループス患  
者より、神経シナプスにおける小胞輸送に関与  
する  $\alpha$  GDI に対する自己抗体を確認した。今  
後更なる特異性の検討を行い、臨床現場で  
度々問題となる CNS ループス患者の  
pshychosis の診断ならびに治療法の確立につ  
なげる必要がある。

## F. 健康危険情報

2008年3月15日現在、該当なし

## G. 研究発表

### 1, 論文発表

- Kimura A, Sakurai T, Suzuki Y, Hayashi Y, Watanabe O, Arimura K, Takahashi Y, Hozumi I, Inuzuka T: Autoantibodies against Glutamate Receptor  $\epsilon_2$ -Subunit Detected in a Subgroup of Patients with Reversible Autoimmune Limbic Encephalitis. *Eur Neurol.* 2007;58:152-158.
- Nozaki H, Ikeuchi T, Kawakami A, Kimura A, Koide R, Tsuchiya M, Nakamura Y, Mutoh T, Yamamoto H, Nakao N, Sahashi K, Nishizawa M, Onodera O: Clinical and genetic characterizations of 16q-linked autosomal dominant spinocerebellar ataxia (AD-SCA) and frequency analysis of AD-SCA in the Japanese population. *Mov Disord.* 2007;22:857-862.
- Kimura A, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Takahashi K, Takemura M, Saito K, Seishima M, Inuzuka T. Proteomic analysis of autoantibodies in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus patient with white matter hyperintensities on brain MRI. *Lupus* 2008;17:16-20.
- Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Suzuki Y, Tanaka Y, Hozumi I, Nakajima H, Ichiyama T, Inuzuka T: Longitudinal analysis of cytokines and chemokines in the cerebrospinal fluid of a patient with neuro-Sweet disease presenting with recurrent encephal meningitis. *Internal Medicine* 2008;47:135-141.
- Hayashi Y, Kimura A, Kato S, Koumura A, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Sunden Y, Orba Y, Sawa H, Takahashi H, Inuzuka T: Progressive multifocal leukoencephalopathy and CD4+ T-lymphocytopenia in a patient with Sjögren syndrome. *J Neurol Sci.* 2008; 268.195-198.

- 木村暁夫、保住 功、高橋幸利、犬塚 貴: 抗GluR $\epsilon_2$ 抗体陽性成人急性脳炎患者の臨床的特徴ならびに免疫組織学的解析 *医学のあゆみ* 2007;223;300-301.
- 櫻井岳郎、木村暁夫、田中優司、保住 功、小倉真治、犬塚 貴: 集学的初期治療により治癒した成人インフルエンザ脳症の1例 *臨床神経学* 2007;47:639-643.
- 鈴木真理子、林 祐一、木村暁夫、永澤守、香村彰宏、櫻井岳郎、田中優司、保住功、犬塚 貴: 介護従事者にみられた水痘脊髄炎 *BRAIN and NERVE* 2008;223:79-83.

### 2, 学会発表

- 木村暁夫、櫻井岳郎、山田 恵、香村彰宏、林 祐一、田中優司、保住 功、犬塚 貴. CNS lupus患者における 2D-immunoblotting, LC-MS/MSを用いた抗神経抗体認識抗原の解析. 第48回日本神経学会総会 名古屋 2007,5,16
- 木村暁夫、香村彰宏、櫻井岳郎、鈴木欣宏、田中優司、保住 功、犬塚 貴. 非傍腫瘍性非ヘルペス性辺縁系脳炎患者における抗神経組織抗体の解析. 第19回日本神経免疫学会学術集会 金沢 2007,4,13

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
2008年3月15日現在、該当なし
2. 実用新案登録  
2008年3月15日現在、該当なし
3. その他  
2008年3月15日現在、該当なし

## Ⅱ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kimura A, Sakurai T, Suzuki Y, Hayashi Y, Watanabe O, Arimura K, Takahashi Y, Hozumi I, Inuzuka T	Autoantibodies against Glutamate Receptor $\epsilon$ 2-Subunit Detected in a Subgroup of Patients with Reversible Autoimmune Limbic Encephalitis.	Eur Neurol.	58	152-158	2007
Nozaki H, Ikeuchi T, Kawakami A, Kimura A, Koide R, Tsuchiya M, Nakamura Y, Mutoh T, Yamamoto H, Nakao N, Sahashi K, Nishizawa M, Onodera O	Clinical and genetic characterizations of 16q-linked autosomal dominant spinocerebellar ataxia (AD-SCA) and frequency analysis of AD-SCA in the Japanese population	Mov Disord.	22	857-862	2007
Kimura A, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Takahashi K, Takemura M, Saito K, Seishima M, Inuzuka T.	Proteomic analysis of autoantibodies in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus patient with white matter hyperintensities on brain MRI.	Lupus	17	16-20	2008
Kimura A, Sakurai T, Koumura A, Suzuki Y, Tanaka Y, Hozumi I, Nakajima H, Ichiyama T, Inuzuka T	Longitudinal analysis of cytokines and chemokines in the cerebrospinal fluid of a patient with neuro-Sweet disease presenting with recurrent encephal meningitis.	Internal Medicine	47	135-141	2008
Hayashi Y, Kimura A, Kato S, Koumura A, Sakurai T, Tanaka Y, Hozumi I, Sundén Y, Orba Y, Sawa H, Takahashi H, Inuzuka T	Progressive multifocal leukoencephalopathy and CD4+ T-lymphocytopenia in a patient with Sjögren syndrome.	J Neurol Sci.	268	195-198	2008
木村暁夫、保住 功、高橋幸利、犬塚 貴	抗 GluR $\epsilon$ 2 抗体陽性成人急性脳炎患者の臨床的特徴ならびに免疫組織学的解析	医学のあゆみ	223	300-301	2007
櫻井岳郎、木村暁夫、田中優司、保住 功、小倉真治、犬塚 貴	集学的初期治療により治癒した成人インフルエンザ脳症の1例	臨床神経学	47	639-643	2007
鈴木真理子、林 祐一、木村暁夫、永澤 守、香村彰宏、櫻井岳郎、田中優司、保住 功、犬塚 貴	介護従事者にみられた水痘脊髄炎	BRAIN and NERVE	223	79-83	2008

### Ⅲ 研究成果の刊行物・別刷



# Autoantibodies against Glutamate Receptor $\epsilon_2$ -Subunit Detected in a Subgroup of Patients with Reversible Autoimmune Limbic Encephalitis

A. Kimura<sup>a</sup> T. Sakurai<sup>a</sup> Y. Suzuki<sup>a</sup> Y. Hayashi<sup>a</sup> I. Hozumi<sup>a</sup> O. Watanabe<sup>b</sup>  
K. Arimura<sup>b</sup> Y. Takahashi<sup>c</sup> T. Inuzuka<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Neurology and Geriatrics, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu, <sup>b</sup>Department of Neurology and Geriatrics, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima, and <sup>c</sup>National Epilepsy Center, Shizuoka Institute of Epilepsy and Neurological Disorders, Shizuoka, Japan

## Key Words

Autoantibody · Glutamate receptor  $\epsilon_2$ -subunit · Immunotherapy · Limbic encephalitis · N-methyl-D-aspartate glutamate receptor · Paraneoplastic syndrome

## Abstract

We investigated the presence of autoantibodies against glutamate receptor (GluR)  $\epsilon_2$  in serum and cerebrospinal fluid (CSF) samples from 12 consecutive patients with acute encephalitis/encephalopathy by immunoblotting using recombinant GluR $\epsilon_2$  as antigen. In 4 patients, IgM autoantibodies against GluR $\epsilon_2$  were detected in CSF in the early phase of the disease but were not detectable after several months. Seizures and psychiatric symptoms were noted during the acute phase of the disease in these 4 patients, who showed various degrees of residual amnesia. Immunotherapy was performed on 3 patients (patients 1, 3 and 4), and they showed marked improvements. Immunohistochemistry using these patients' sera showed that immunoreactivity is specifically detected in the cytoplasm of rat hippocampal and cortical neurons. The clinical features and neuroimaging findings of patients with IgM autoantibodies against GluR $\epsilon_2$  in CSF resemble those of patients with reversible autoimmune limbic encephalitis.

Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

## Introduction

There are some reports that indicate the production of autoantibodies in patients with encephalitis [1–3] and encephalopathy [4]. Recently, autoantibodies against the N-methyl-D-aspartate (NMDA)-type glutamate receptor (GluR)  $\epsilon_2$  have been detected in patients with epilepsy partialis continua (EPC) causally related to Rasmussen syndrome [5], nonparaneoplastic limbic encephalitis [6] and acute encephalitis [5, 7]. The NMDA receptor, which is one of the three major ionotropic GluRs, is a heterodimer composed of  $\epsilon$ - and  $\zeta$ -subunit families [8]. There are 4 members in the  $\epsilon$ -subunit family ( $\epsilon_1$ – $\epsilon_4$ ) [9]. The NMDA receptor channel is unique in terms of its functional properties [10, 11]. After birth, the expression of GluR $\epsilon_2$  mRNA becomes restricted to the forebrain, which includes the cerebral cortex and limbic system [12]. GluR $\epsilon_2$  is associated with memory and learning [10, 11]. Therefore, we investigated autoantibodies against GluR $\epsilon_2$  in serum and cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with acute encephalitis/encephalopathy to clarify its clinical features and immunological aspects.

## Materials and Methods

We obtained serum and CSF samples from 12 consecutive patients with acute encephalitis/encephalopathy in our department from August 2003 to January 2005 (n = 12; male:female = 6:6; age

KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2007 S. Karger AG, Basel  
0014–3022/07/0583–0152\$23.50/0

Accessible online at:  
www.karger.com/ene

Dr. Akio Kimura  
Department of Neurology and Geriatrics  
Gifu University Graduate School of Medicine  
1-1 Yanagido, Gifu City, Gifu 501-1194 (Japan)  
Tel. +81 58 230 6253, Fax +81 58 230 6256, E-Mail kimura1@cc.gifu-u.ac.jp

**Table 1.** Autoantibodies against GluR $\epsilon_2$ 

Patient	Age/sex	Clinical diagnosis	Anti-GluR $\epsilon_2$ antibody	
			CSF IgM/IgG	serum IgM/IgG
1	45/F	ILE	+/+	+/+
2	62/M	ILE	+/+	-/-
3	53/F	ILE	+/+	+/+
4	30/M	ILE	+/-	+/+
5	22/F	ILE	-/-	-/-
6	68/M	bacterial meningoen- cephalitis	-/-	-/-
7	57/F	cryptococcal meningo- cephalitis	-/-	-/-
8	18/F	MELAS	-/-	-/-
9	59/F	neuro-Sweet disease	-/-	-/-
10	65/M	PLE (anti-Hu antibody- positive)	-/-	-/+
11	26/M	etiology-unknown meningo- cephalitis	-/-	+/-
12	56/M	brainstem encephalitis	-/-	-/-

ILE = Idiopathic limbic encephalitis; MELAS = mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes; PLE = paraneoplastic limbic encephalitis.

range = 18–68; mean age = 47 years; idiopathic limbic encephalitis, 5; etiology-unknown meningoen- cephalitis, 1; anti-Hu-anti- body-positive paraneoplastic limbic encephalitis, 1; bacterial meningo- cephalitis, 1; mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes, 1; cryptococcal meningo- cephalitis, 1; brainstem encephalitis, 1; neuro-Sweet disease, 1).

#### Detection of Autoantibodies against GluR $\epsilon_2$

The method used has previously been reported [5]. The supernatants of cell extracts from stable NIH3T3-transformant cell lines expressing full-length GluR $\epsilon_2$  were subjected to SDS-PAGE, and the separated proteins on the gels were transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were reacted with diluted sera or CSF and stained with alkaline-phosphatase-labeled secondary antibodies (IgG or IgM; Jackson Immunoresearch, West Grove, Pa., USA). Anti-GluR $\epsilon_2$  autoantibodies were detected as a band corresponding to approximately 180 kDa.

#### Immunohistochemistry Using Patient's Serum

Under ether anesthesia, adult Sprague-Dawley rats were sacrificed. The cerebrums were immediately removed and frozen in dry-ice powder. Frozen sections (8  $\mu$ m thick) of the cerebrums were fixed in 4% paraformaldehyde. The sections were incubated with serially diluted serum from a patient or with an anti-NMDA $\epsilon_2$  antibody (1:500; Santa Cruz Biotechnology, USA). Then, the sections were incubated with a goat biotinylated anti-human IgM ( $\mu$ -chain-specific) antibody (Vector, USA) or a rabbit biotinylated anti-goat IgG (H+L) antibody (Chemicon, USA). After washing, the sections were reacted with a streptavidin-peroxidase complex (Nichirei, Japan). The reactions were finally developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Wako, Japan) and 0.01% H $_2$ O $_2$  in PBS. For adsorption tests, frozen sections after blocking were immunostained with a patient's serum (1:2,000) or with the anti-NMDA $\epsilon_2$  antibody (1:500) that was incubated for 24 h with extracts from transformant cells expressing full-length GluR $\epsilon_2$ .

## Results

#### Detection of Autoantibodies against GluR $\epsilon_2$

The IgM autoantibody against GluR $\epsilon_2$  in CSF was detected in 4 out of 12 consecutive patients in the early phase of the disease but was not detectable after several months (table 1). The IgG autoantibody against GluR $\epsilon_2$  in CSF was detected in 3 of these 4 patients (patients 1–3). No autoantibodies against GluR $\epsilon_2$  were detected in the CSF of the other patients. In the early phase of the disease, patients 1 and 4 had IgM and IgG autoantibodies against GluR $\epsilon_2$  in their serum. Patient 3 had only the IgM autoantibody but became positive for the IgG autoantibody 2 months later.

#### Clinical Features

All the patients who had the IgM autoantibody against GluR $\epsilon_2$  in CSF presented with seizures (i.e. partial seizures evolving to secondary generalized seizures) and psychiatric symptoms (i.e. hallucination, behavioral changes and agitation) in the early phase of the disease and developed prolonged consciousness disturbances with status epilepticus (table 2). None of these patients presented with paralysis or disturbances in sensation in the chronic stage. However, all of them presented with various degrees of recent memory disturbance and amnesia. Patient 3 showed residual psychiatric symptoms after treatment. Three patients (patients 1, 3 and 4) received intravenous methylprednisolone pulse therapy and showed improvement in their seizures and consciousness levels.

**Table 2.** Clinical features of patients with IgM autoantibody against GluR $\epsilon_2$  in CSF

Pa-tient	Age/sex	Clinical diagnosis	Initial symptoms	Sequelae	Steroid treatment
1	45/F	ILE	convulsion, visual and olfactory hallucinations	disorientation, amnesia, recent memory disturbance	responsive
2	62/M	ILE	convulsion, auditory hallucination	disorientation, amnesia, recent memory disturbance	not performed
3	53/F	ILE	convulsion, behavioral changes	disorientation, amnesia, recent memory disturbance, psychiatric symptoms	responsive
4	30/M	ILE	convulsion, behavioral changes	amnesia, recent memory disturbance	responsive

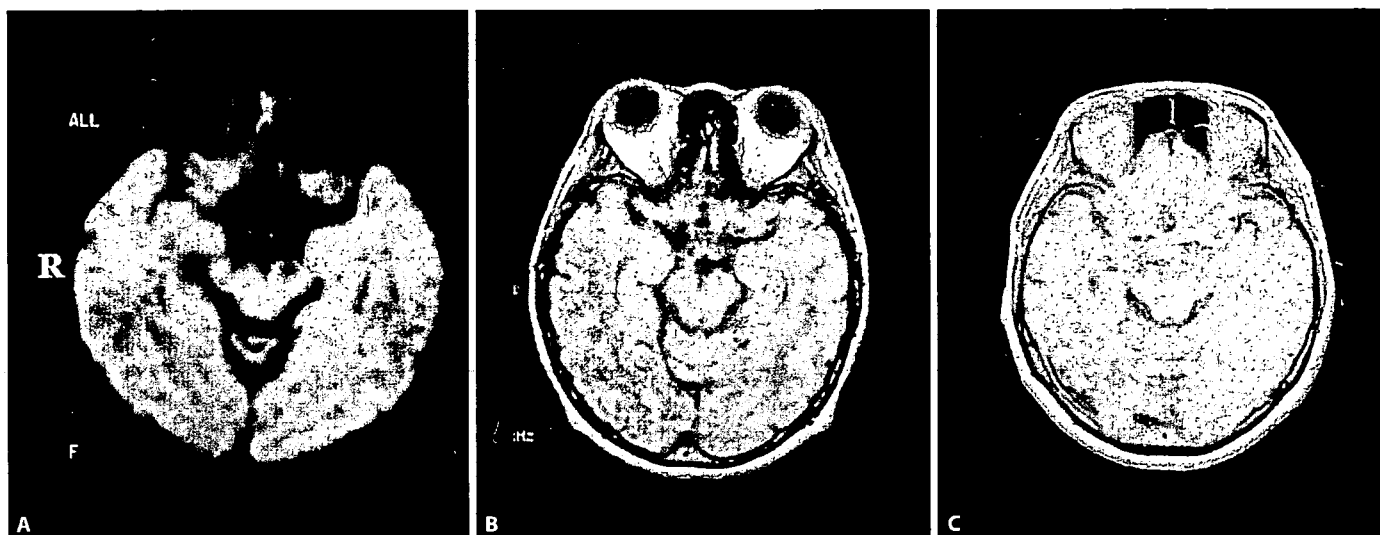
ILE = Idiopathic limbic encephalitis.

### Case Presentation

Here, we describe a representative patient with IgM autoantibodies against GluR $\epsilon_2$  in CSF. Patient 1 has been described previously [6].

Patient 4 was a 30-year-old male initially complaining of headaches with fever. Throughout 1 week, he showed no improvement in these symptoms and presented with agitation and behavioral disturbance. He was admitted to a nearby hospital because he suddenly suffered a generalized tonic seizure. After admission to the hospital, he was treated with antiepileptic drugs and intravenous acyclovir. However, he developed consciousness disturbance and status epilepticus. Then, he was transferred to our hospital. He had an unremarkable medical history, a temperature of 37.7°C, a pulse of 74/min and a blood pressure of 105/68 mm Hg. On neurological examination, he exhibited somnolence. There was lateral gaze-evoked nystagmus. The deep tendon reflexes of all four limbs were slightly hypoactive. There were no pathological reflexes. No meningeal signs were observed. After his consciousness level had improved, muscle strength, sensation and coordination became normal. Laboratory tests revealed leukocytosis and elevated levels of myogenic enzymes: white blood cell count,  $13.8 \times 10^3/\mu\text{l}$ ; creatine kinase level, 3,285 IU/l; aspartate aminotransferase level, 80 IU/l, and lactate dehydrogenase level, 394 IU/l. The serum C-reactive protein level was slightly elevated to 1.89 mg/dl. The serum antinuclear antibody was absent. IgM and IgG autoantibodies against GluR $\epsilon_2$  were present in serum on the day of admission. Analysis of CSF showed 34 cells/mm<sup>3</sup> (mononuclear cells only), 36 mg/dl total protein and 68 mg/dl glucose. He had a mildly elevated IgG index (0.73). IgM and IgG antibodies against herpes simplex virus, cytomegalovirus and varicella-zoster virus were absent in paired sera and CSF tested at 2-week intervals.

PCR analysis showed negativity for herpes simplex virus, cytomegalovirus and human herpesvirus 6/7 DNA in CSF. The IgM autoantibody against GluR $\epsilon_2$  was present, but the IgG autoantibody was absent in CSF on the day of admission. EEG revealed diffuse  $\theta$ -waves with small spikes in the left temporal lobe. Brain MRI revealed no abnormal intensity changes but diffuse cortical edema. <sup>99m</sup>Tc-ECD SPECT performed on the 14th day of hospitalization revealed hypoperfusion in the diffuse cerebral cortex and bilateral mesial temporal lobes. After admission, he was treated with phenytoin. However, the seizures were difficult to control and required treatment with anesthetic agents (pentobarbital sodium and midazolam) under respiratory management. He was treated with an intravenous infusion of 1 g of methylprednisolone for 3 consecutive days. He showed improvement in consciousness level and the frequency of the convulsions decreased following the treatment. However, approximately 2 weeks after steroid therapy, his seizures increased in frequency again, and intravenous immunoglobulin (400 mg/kg/day for 5 consecutive days) was administered. His condition slowly improved. On the 36th day of hospitalization, he required no respiratory management. Afterwards, we carried out the administration of intravenous immunoglobulin and steroid pulse therapy, and his seizures disappeared completely. However, he showed disorientation and severe amnesia. Revised Hasegawa Dementia Scale (HDS-R) and Mini Mental State Examination scores determined approximately 3 months after admission were 10/30 and 13/30, respectively. His Revised Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS-R) full-scale IQ was less than 40, and his verbal and performance subscale scores were 51 and less than 45, respectively. All Revised Wechsler Memory Scale (WMS-R) indexes showed significantly low scores (gen-



**Fig. 1.** MR images of patient 1. An axial diffusion-weighted image (A) and a fluid-attenuated inversion recovery image (B) show hyperintensity in the bilateral mesial temporal lobes in the acute phase (2 days after admission). C A follow-up T<sub>1</sub>-weighted MR image shows the disappearance of signal abnormalities and the appearance of bilateral hippocampal and mild cortical atrophies (1 year after the disease onset).

**Table 3.** Laboratory and neuroimaging findings of patients with IgM autoantibody against GluR<sub>ε</sub><sub>2</sub> in CSF

Patient	WBC n/mm <sup>3</sup>	CRP mg/dl	CSF cell n/mm <sup>3</sup>	CSF protein mg/dl	IgG index	Other auto- antibodies	Initial brain MRI
1	13,800	1.30	81 (M 81)	30	0.53	TPO Ab	hyperintensity in bilateral mesial temporal lobes
2	3,500	0.42	10 (M 9, P 1)	67	0.80	-	hyperintensity in left mesial temporal lobe
3	18,240	<0.05	7 (M 1, P 6)	38	n.e.	ANA	hyperintensity in bilateral mesial temporal lobes, insulae and cingulate gyri
4	17,090	1.89	34 (M 34)	36	0.73	-	normal

WBC = White blood cells; CRP = C-reactive protein; MRI comprised diffusion-weighted, T<sub>2</sub>-weighted and fluid-attenuated inversion recovery imagings; ANA = antinuclear antibody; TPO Ab = thyroid peroxidase antibody; M = mononuclear cell; P = polynuclear cell; n.e. = not examined.

eral memory <50; verbal memory = 54; delayed memory <50; visual memory <50; attention and concentration <50). It was difficult for him to immediately recall things related to logical memory after hearing them. He showed no higher functional impairments such as aphasia, apraxia and agnosia. His memory and cognitive state slowly improved, and he was discharged 4 months after admission. Eight months after the disease onset, his memory and cognitive scale scores improved significantly [HDS-R score 25/30, WAIS-R IQ (total IQ, 70; verbal IQ, 63; performance IQ, 87), WMS-R scores (general memory, 53; verbal memory, 57; delayed memory, 60; visual mem-

ory, 70; attention and concentration, 61)]. Brain MRI revealed no intensity changes; however, mild cortical atrophy was observed 6 months after the disease onset.

#### Laboratory Findings

Virological examinations (table 3) showed negativity for IgM and IgG antibodies against the herpes simplex virus, cytomegalovirus and varicella-zoster virus in paired sera and CSF tested at 2-week intervals. PCR analysis showed negativity for the herpes simplex virus and human herpesvirus 6/7 DNA in CSF. Patient 3 had the antinuclear antibody (ELISA: 34.4, normal <20.0) in her se-