

非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の前駆期-先行感染症期の病態解明による 障害防止研究

研究代表者 高橋 幸利

独立行政法人国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター副院長

研究要旨

【目的】我々のこれまでの研究で、成人発病の非ヘルペス性急性辺縁系脳炎（NHALE）は年間220人が罹患していて、記憶障害は63.2%に残り、1万人程度がNHALEによる記憶障害などの後遺障害を患っている可能性がある。これらの障害を防ぐために、発病の数年前の前駆期、発病直前の先行症状期に着目し、その病態を明らかにすることで、早期診断治療、発病予防につなげたい。

【前駆期-既往歴研究】NHALEの前駆期の可能性がある髄液GluN2B-NT2抗体高値の精神疾患患者8名の既往歴には、アルコール依存あるいは大量飲酒が3名、橋本病が1名にみられ、NHALE症例の既往歴と類似した。自己免疫素因-精神障害関連疾患-NHALE発症という経過がありうると考えた。

【前駆期-正常対照の抗体値研究】2013年度の0-20歳の非炎症性の病因のてんかん症例(55例)と、静岡てんかん・神経医療センター職員(74例)の血清を用いた検討で、20-40歳の女性の中に、回帰曲線からかなり外れた高い値をとる群が存在し、NMDA型GluR抗体が高い前駆期症例の存在を示唆した。2014年度は症例数を増やして検討するために、グルタミン酸受容体(GluR)抗体(抗原:GluN2B-NT2, GluN1-NT, GluN2-NT)を、職員(179例)の血清を用いて検討した。

【前駆期-患者髄液IgG分画 in vitro研究】NMDA型GluR抗体を含むNHALE患者髄液中のIgG分画が、Aktリン酸化を抑制することを見出し、シナプスNMDA型GluRを内在化してしていると考えた。

【前駆期-passive transfer研究】ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体をマウス海馬に反復投与することで、生理食塩液投与群と正常ウサギ血清protein A 吸着分画投与群と比較して、拳尾反応が高率に認められ、興奮性の行動変化が起こった。マイクロアレイ解析で脳の*napa*, *sv2c*, *pam*, *fam53b*の発現低下が見られ、シナプス機能低下、GABA作動性抑制性シナプス伝達に障害をもたらし、興奮性行動につながる可能性が示唆された。

【先行症状期-一般髄液検査値研究】先行症状期の髄液データがあるNHALE17例では、髄液細胞数が非炎症性の疾病対照群に比べて有意に多く、脳炎発病に向けて低下した。NHALE先行症状期には、感染対照群である無菌性髄膜炎に比べて髄液蛋白濃度は有意に高値で、髄液糖濃度は有意に低値であった。無菌性髄膜炎であっても蛋白がかなり高く糖が低い特徴があれば、NHALEへの移行に注意する必要がある。

【その他-新規抗体測定系開発研究】浮遊性293F細胞株を用いたNMDA型GluR抗体測定系を開発している。

【まとめ】NHALEの10%程度の症例に、前駆期症状と推定できる精神障害関連疾患の既往歴があり、20-40歳の女性正常対照の中に血清NMDA型GluR抗体が著しく高値の群が見つかり、NMDA型GluR抗体をマウスにpassive transferすると、マウスに興奮性の行動変化が観察された。これらのことから、NHALE患者には、発病のかなり前からNMDA型GluR抗体が存在し、前駆期として軽度の精神神経症状を呈する症例があると推測できる。先行症状期の無菌性髄膜炎では、NHALEに移行

しない症例に比べて髄液蛋白濃度は有意に高値で、髄液糖濃度は有意に低値であり、早期診断に繋がる可能性がある。

これらの研究結果は、学問的に検討過程にあり即臨床応用できる段階ではないことに、ご注意願いたい。

分担研究者：

- 森寿、富山大学大学院医学系研究科分子神経科学、教授。
- 西田拓司、静岡てんかん・神経医療センター、精神科医長。

研究協力者：

- 宮一志、富山大学大学院医学薬学研究部小児科学講座、助教。
- 千葉悠平、横浜市立大学、精神科。
- 西村成子、国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター、臨床研究部。

- 高尾恵美子、国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター、臨床研究部。
- 笠井理沙、国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター、臨床研究部。
- 平松宏実、国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター、臨床研究部。
- 井上有史、国立病院機構 静岡てんかん・神経医療センター、臨床研究部。
- 今村淳、岐阜県総合医療センター小児科。
- 木村暢佑、大津赤十字病院小児科。
- 美根潤、島根大学小児科。

A. 研究目的

1. 2011年度までの研究のまとめ

2005-2007年度の厚生労働科学研究（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」（主任研究者、高橋幸利）それに続く2008-10年度の「急性脳炎・脳症のグルタミン酸受容体自己免疫病態の解明・早期診断・治療法確立に関する臨床研究」（主任研究者、高橋幸利）において、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎（NHAE）を中心に病態解明を行い（参照1：2008-2010研究班総合報告書）、「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症」の診断スキーム-20101017-にまとめた。

2. 後遺障害の頻度

我々のこれまでの研究で、成人発病のNHAEは年間220人が罹患していて、ADL障害は33.3%に、てんかん発作は35.1%に、精神症状は26.3%に、知的障害は38.6%に、運動障害が29.8%に、記憶障害は63.2%に見られ、1万人程度がNHAEによる記憶障害などの後遺障害を患っている可能性が明らかになっている。

免疫介在性脳炎であるNHAEは、病態解明、早期診断、治療法改良により予後を改善できる可能性があり、この研究班では病態解明に取り組んできている。

3. 2012年度からの研究仮説

NHAE 100例の既往歴を調査すると、脳炎発病の数年前（前駆期と呼ぶ）から、うつ症状（6例）、薬物等依存（5例）、発達障害（5例）等が見いだされ、前駆期からすでに18例で何らかの中枢神経症状が始まっている可能性が示唆された。またNHAEには、急性期に言動異常が1-2日あるのみで発熱や痙攣や意識障害がなく収束し、その後記憶障害が明らかとなる軽症例も見られる。また、脳炎症状が再発性の経過をとる症例も存在する。これらの事実は、NHAEの発病前の前駆期からNMDA型GluR抗体が存在し、軽度の一過性中枢神経系症状を発現する可能性を示唆する（図1、2）。視神経脊髄炎（NMO）では発症の10年前からAQP4抗体が血清中に認められた症例が東北大学より報告されており（Nishiyama, et al., Neurology）、抗体が血清中に存在する前駆期が、かなり長く存在することが分かっている。

これまでの研究で、NMDA型GluR抗体のエピトープはGluRの細胞外ドメインから細胞内ドメインまで幅広いことが分かり、NMDA型GluR抗体は感染交差免疫ではなくNMDA型GluR自身が抗原となって産生されていることを推測している。末梢血T細胞、血小板などにNMDA型GluRが

発現し、PHA刺激で発現増加することが知られており (Migilio, et al. BBRC 2005)、感染によるリンパ球の活性化 NMDA型GluR発現 リンパ球アポトーシス NMDA型GluR断片化 NMDA型GluR抗体産生という仮説を立てている (図2)。脳炎発病数年(前駆期)からこのプロセスが徐々に始まり、一部の症例では軽度の中中枢神経症状が観察され、その後先行感染症に

伴ってNHALEが発病するという病態仮説のもとに、これまで国内外で検討されてこなかった前駆期と発病直前の先行症状期の病態を詳しく検討し、先行症状出現時点でのNHALE発病リスク診断、NHALE発病抑止対策、早期治療を、今回の研究では可能にしたい。

目的: NHALE前駆期—先行感染症期の病態解明 → 障害の防止・軽減

方法: A) 前駆期自己免疫状況

- ① NHALE症例の前駆期保存検体
- ② 若年成人で精神・神経症状のある症例

B) 感染症に対する生体反応

- ① NHALE先行感染症における経時的变化
- ② NHALE後遺症期患者の非脳炎感染症時における経時的变化
- ③ 健康対照の非脳炎感染症時における経時的变化

C) 病歴

NHALE患者既往歴・家族歴

検討項目

一般検査:
WBC, LDH, etc.
免疫関連:
granzyme B, Fas, cytokine, etc.
血液脳関門:
MMP-9, TIMP-1, etc.
自己抗体:
抗NR2B, NR1, GluRδ2, LGI1, Caspr2, ADAM22, ADAM23抗体、抗NMDAR複合体抗体。

効果:

リスク因子

早期発病リスク診断

発病予防・早期治療

障害の防止・軽減

図1. 研究の目的、方法及び期待される効果 (流れ図)

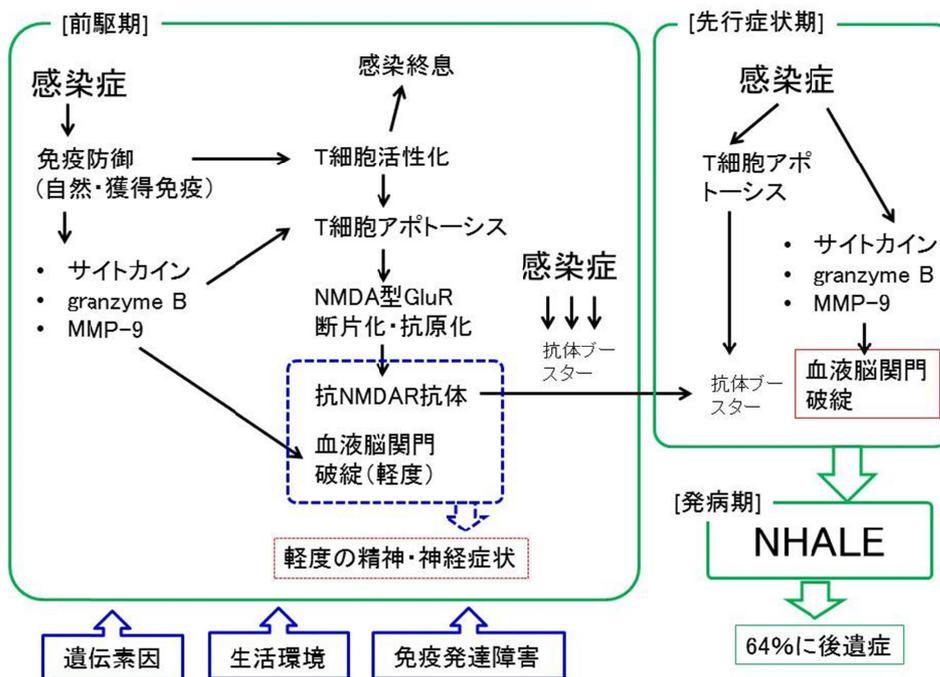


図2. 研究仮説

4. 2012年度研究結果(参照2)

非傍腫瘍性NHALE患者217名の検討では、精神障害関連既往症が21名(10%)に、自己免疫性疾患関連が9名(4%)に、婦人科関連疾患が8名(4%)にみられた。精神障害関連既往症の内訳は、気分障害8名、依存症8名、発達障害5名であった。

非傍腫瘍性NHALE患者207例中162例(78%)に先行症状を認め、162例中23例(14%)で感染病原体が確定された。先行症状がありながら病原体の確定ができなかった139例について検討すると、発熱(81%)>頭痛(53%)>悪心嘔吐(24%)>上気道炎症状(18%)>下痢(3%)の順で、上気道炎などの中枢神経系以外の局所感染症状は比較的少なかった。脳炎症状出現前に髄液検査された18例中18例で無菌性髄膜炎の診断がされていた。

NHALE発病から20病日以内の髄液granzyme B濃度は、疾病対照に比べ有意に高値で($p<0.0009$)、髄液細胞数との間に正の相関があった($p<0.005$)。髄液granzyme Bが疾病対照の平均+2SD以上の群ではそれ以下の群と比べて、NMDA型GluR抗体が有意に高値であった。

培養ラット胎児神経細胞にNMDA型GluR抗体陽性NHALE患者髄液あるいは患者髄液IgG分画を加え、培養上清のLDH濃度、培養細胞の総cAMP-Responsive-Element-Binding protein (tCREB)濃度およびリン酸化CREB(pCREB)濃度を測定し、同時測定対照との比を求めて評価した。NMDA型GluR抗体陽性NHALE髄液は、髄液IgG分画より強くCREBリン酸化を促進した。対照髄液もCREBリン酸化を促進したことから、正常髄液成分の中にCREBリン酸化を促進する成分が含まれると推定した。NHALE患者髄液IgGは、対照髄液IgG分画に比べてCREBリン酸化が低く、わずかにシナプスNMDA型GluRを内在化している可能性が示唆された。

これらの知見から、NHALE患者ではNMDA型GluR抗体がかなり以前(前駆期)から存在し、軽度の精神神経症状を呈しうるとすると理解しやすい。NHALE発病期の病態はNMDA型GluR抗体のみでは説明できず、granzymeBなどの複数の因子が関与していると考えた。

5. 2013年度研究結果(参照3)

0-20歳の非炎症性の病因のてんかん症例(55

例)と、静岡てんかん・神経医療センター職員(74例)の血清を用いて、正常対照のグルタミン酸受容体(GluR)抗体(抗原:GluN2B-NT2, GluN1-NT, GluD2-NT)を検討した。20-40歳の女性の中に、回帰曲線からかなり外れた高い値をとる群が存在し、NMDA型GluR抗体が高い前駆期症例の存在を示唆した。

非傍腫瘍性NHALE42例、てんかん患者で感染症状を呈した年齢・性を合わせた感染症対照42例、年齢・性を合わせた感染のないてんかん小児と健康成人対照42例について、一般臨床検査値を比較検討した。非傍腫瘍性NHALEのリンパ球数は感染症対照($p<0.01$)、対照($p<0.01$)に比べて有意に低値で、発病日に向けて低下する傾向を認めた。血小板数は感染対照($p<0.05$)や対照($p<0.01$)より有意に低値であった。CRPは、発病日に向けて増加する傾向を認め、対照($p<0.02$)より有意に高値であったが、感染症対照($p<0.01$)より有意に低かった。IgAは感染症対照($p<0.03$)や対照($p<0.01$)より有意に高値であった。

非傍腫瘍性NHALE髄液では、IgG1-4すべてのサブクラスが疾病対照髄液に比べて高値であった。脳炎発病後の経過で見ると、発病から10-15病日にかけてIgG1、IgG3のサブクラスが高値となる検体が増加、IgG4サブクラスは徐々に低値の検体が増加した。IgG1サブクラスは、急性期入院日数・てんかん発作予後・認知機能予後と直線的回帰が認められ、相関関係が認められた。IgG3サブクラスは、Barthel score・てんかん発作予後・認知機能予後・運動機能予後と直線的回帰が認められ、相関した。サブクラスと関係する補体が予後を規定している可能性がある。

NHALE患者には、発病のかなり前からNMDA型GluR抗体が存在し、前駆期として軽度の精神神経症状を呈し得る。先行症状期にはリンパ球・血小板が減少することが明らかとなり、リンパ球・血小板に発現するNMDA型GluRが抗原として抗体をブースターし、発病に至る可能性がある。NHALE発病期の病態はNMDA型GluR抗体のみでは説明できず、granzymeB、補体などの複数の因子が関与していると考え

6. 2014年度研究目標

先行症状期などの病態解析を行うことにした。

2014年度は表1に示す研究を計画し、前駆期、

表1. 2014年度研究計画内容

「前駆期関連」

1. NHALE 症例の前駆期保存検体を用いた前駆期自己免疫状況の検討(2012-14年度、高橋、森が担当)
現在9名のNHALE等の脳炎患者さんの献血保存血研究使用同意を得ており、保存義務期間終了、使用許可をまって、前駆期の免疫病態を検討する。(目標20例)
2. Passive transfer マウスモデルを用いた前駆期自己免疫状況の検討(2013-14年度、高橋、森が担当)
2012年度に、ウサギGluN2B-NT2抗体を作成し、2013年度マウスにpassive transferし、不安行動変化を見出した。このマウスの海馬組織のマイクロアレイ解析で遺伝子発現の変化を解析し、変化のあった遺伝子について、遺伝子発現解析システムQuantigene Plexにより定量する。
3. 正常対照の年齢・性別血清GluN2B-NT2抗体の自然経過と抗体高値対照例の検討(2014年度、高橋が担当)
2013年度に職員対照ボランティアの中に見出した若年女性成人の抗体高値例について、正常抗体例と臨床的、精神心理的、血液学的に差がないかを検討する。
4. 精神症状を有する症例の精神症状と免疫マーカーの関連(2012-14年度、西田、高橋が担当)
NHALE前駆期の可能性がある精神症状を持つ若年者、自閉症などで、血液・髄液免疫マーカーと精神症状の関連を検討する。(目標20例)
5. 免疫調節遺伝子のゲノム解析(2012-14年度、高橋が担当)
2013年度の48例に引き続き、Foxp3, CTLA-4, PDCD-1, T-betなどの免疫調節遺伝子のゲノム解析症例を増やす。(目標合計60例)

「先行症状期関連」

6. NHALE 先行症状期に無菌性髄膜炎を呈した症例の髄液所見の検討(2014年度、高橋が担当)
無菌性髄膜炎からNHALEに至った症例(18例確保)と、通常の無菌性髄膜炎のみを呈した症例で髄液検査データを比較する。
7. Passive transfer マウスモデルを用いた先行症状期自己免疫状況の検討(2014年度、高橋、森が担当)
Passive transferのGluN2B-NT2抗体量を2013年の量より増量し、前駆期から先行症状期への移行が可能か? 検討する。
8. NHALE 先行症状期における免疫マーカーの経時的変化の検討(2012-14年度、高橋、森が担当)
先行症状期の血清を集め、MMP-9、サイトカイン(BioPlex)、granzyme B、自己抗体(NR2B、NR1、GluRδ2、LG11、Caspr2、ADAM22、ADAM23、NMDAR複合体抗体)等の免疫マーカーを、経時的に測定する。(目標20例)

「その他」

9. 免疫調節遺伝子(Foxp3, CTLA-4, PDCD-1, T-bet)の発現解析(2012-14年度、高橋が担当)
NHALE発病期の血液中RNAを用いて、免疫調節遺伝子の発現を検討し、免疫寛容の状況を調べ、自己抗体形成のメカニズムを検討する。さらに、ゲノムの変異の有無を検討する。
10. 抗神経抗体の測定法開発(2012-14年度、高橋、森が担当)
抗NMDA型GluR抗体を含む抗神経抗体測定法の改良、開発を行う。

B . 研究方法

1. 急性辺縁系脳炎・脳症の多施設共同研究による症例の収集

研究班で作成した多施設共同研究のための症例登録基準(参照4の中の資料1-4)に合わせて、前方視的に幅広く急性辺縁系脳炎・脳症の症例を集積し、自己免疫病態を検討した。

2. 「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症」の診断スキームの改訂

この診断スキームは先行研究班で作成開始し、自己免疫介在性脳炎・脳症の正確な診断法、より良い治療法を情報提供するために、現時点で必要かつ可能と思われる検査について記載し、これまでの知見・文献などを整理し、広く臨床に役立ててもらうことを目的としている。これまでに明らかになった知見を追加する(高橋、森、西田)。

3. NHALE既往歴の検討

髄液中のGluN2B-NT2抗体が対照髄液(非炎症性部分てんかん)の平均+2SD以上の高値を示した精神疾患患者8名の既往歴について、NHALE症例と既往歴を比較した(西田)。

4. 精神症状の検討

髄液中のGluN2B-NT2抗体が対照髄液(非炎症性部分てんかん)の平均+2SD以上の高値を示した精神疾患患者8名と、精神症状を伴う脳炎後てんかん患者4名について、精神症状を比較検討した(西田)。

5. NHALE患者の前駆期自己免疫状況の検討

2012年度研究で、髄液データのあるNHALE217例で前駆期ありと思われる47例を検討したが、紹介元病院で前駆期の血清などの保存は必ずしも行われていない現状が判明した。2013年度は207例全例にアンケート調査を送付し、前駆期の保存検体を調査したが、やはり検体保存は確認できなかった。

NHALE発病前に献血のある症例で、献血保存検体を使用する研究を行うこととし、2012年度に院内の倫理委員会で「自己免疫介在性脳炎・脳症に関する前駆期研究」を審議いただき、承認を得た。その後、2013年1月に日赤血液センターの公募研究に応募したが、採択されなかった。今年度は患者同意書をもって、日本赤十字社に個別研究として献血11年後に廃棄される

保管検体の利用をお願いする。日赤での許可が出次第、保存血清の血液脳関門攻撃因子(MMP-9)、サイトカイン(BioPlex)、細胞傷害性T細胞因子(granzyme B)、自己抗体(GluN2B、GluN1、GluD2、LGI1、Caspr2、ADAM22、ADAM23、NMDA型GluR複合体)等を測定する(高橋)。

6. 精神病症状を有する症例のNMDA型GluR抗体の推移

対象は、Structured Clinical Interview for DAM-IV Axis I Disorders(SCID-I)で、調査時あるいは過去の精神病症状が確認できたてんかん患者で、複数回血清あるいは髄液中のGluN2B-NT2抗体などを測定できた8名である。血清中あるいは髄液中のGluN2B-NT2抗体、GluN2B-C抗体、GluN1-NT抗体、GluD2-NT抗体をELISAにより測定し、経時的変化を検討した。患者の抗体価が疾病対照の血清あるいは髄液と比較して平均+2SD以上を示す場合を高値とした(西田、高橋)。

7. 統合失調症患者の血清を用いた抗NMDAR抗体の検討

イスラエル、ヘブライ大学との共同研究で、NMDAR機能低下が示唆される統合失調症患者の血清を用いた抗NMDAR抗体の計測を実施した(森)。

8. 健常者の年齢・性別NMDA型GluR抗体分布と推移

2013年度に続いて、倫理委員会承認の方法で同意を得られた静岡てんかん・神経医療センター職員(179例)の血清を用いて、自己抗体(GluN2B、GluN1、GluD2、LGI1、Caspr2、ADAM22、ADAM23、NMDA型GluR複合体)等を測定する。自己抗体の値と一般臨床検査値との比較を行う(高橋)。

9. NMDA型GluR抗体のシナプスNMDA型GluRに対する作用の検討:Akt in vitro

NHALEのNMDA型GluR抗体のシナプスNMDARに対する作用を明らかにするために、培養ラット胎児神経細胞にNMDA型GluR抗体陽性NHALE患者髄液あるいは患者髄液IgG分画を加え、培養上清のLDH濃度、培養細胞の総Akt濃度およびリン酸化Akt(pAkt)濃度を測定し、同時測定対照との比を求めて髄液あるいは髄液IgG分画の神

経細胞への影響を評価した（高橋）。

10. NMDA型GluR抗体のPassive transfer-行動解析 in vivo

ウサギにGluN2B-NT2ペプチドを用いて免疫し、ポリクローナルIgG抗体（ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体）を得た。GluN2B-NT2抗体がGluN2B、GluN1を発現するHEK細胞と反応することを確認したのち、マウス脳室内に1週おきに4回投与し、マウスの行動観察（Irwin法）を盲検下にて実施し、中枢神経系への影響を検討した。さらに開始後22日に脳を摘出し、病理組織学的検査を実施した。対照として、生理食塩液、正常ウサギ血清protein A 吸着分画（以下、正常ウサギ血清）も脳室内に投与する群を作った（高橋）。

11. NMDA型GluR抗体のPassive transfer-マイクロアレイ解析

前述の抗体をマウス海馬に投与、22日後に凍結保存した脳組織からmiRNeasy mini Kit (QIAGEN)を用いてtotal RNAを精製し、Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies)を用いてcDNAの合成とcRNAのラベルと増幅を行い、RNeasy mini spin columns (QIAGEN)によりラベル化cRNAを精製し、RNeasy mini spin columns (QIAGEN)によりcRNAターゲット溶液の精製を行った。SurePrint G3 Mouse GE 8x60K 1color解析 (Agilent Technologies)でハイブリダイゼーションを行い、洗浄、スキャン、データ解析を行った。発現遺伝子を生理食塩水投与群、正常ウサギ血清Protein A 分画投与群と比較した。

12. NHALE患者にみられる先行症状期の髄液一般データの検討

非傍腫瘍性NHALE217例の中で脳炎症状出現前の先行症状期の髄液データがある17例（NHALE群）、非炎症性のもんかん等で髄液検査を行った症例中NHALE群と年齢を可能な範囲でマッチさせた86例（疾病対照群）、無菌性髄膜炎で脳炎に移行しなかった症例中NHALE群と年齢を可能な範囲でマッチさせた78例（感染対照群）の3群について、髄液一般検査値を比較した。有意差検定はMann Whitney testを用いた（高橋）。

13. 浮遊系293F細胞を用いた抗NMDAR抗体ならびに抗デルタ型GluR抗体測定系の開発

現在の固定培養細胞（HEK293T）を用いたcell-based assayによる細胞表面上NMDARを認識する自己抗体のスクリーニングシステムでは、定性反応であることと、結果判定までに約7日を要するという問題があった。そこで、浮遊系293F細胞にNMDA型GluRならびにデルタ型GluRの遺伝子発現ベクターを導入して、浮遊細胞を用いた簡便なスクリーニングシステムの開発を試みた（森）。

14. NHALE後遺症期患者の非脳炎感染症時における一般・免疫マーカーの経時的変化

NHALE回復後の患者さんで、上気道炎などの感染症罹患時の血清などを収集し、血液脳関門攻撃因子(MMP-9)、サイトカイン(BioPlex)、細胞傷害性T細胞因子(granzyme B)、自己抗体(GluN2B、GluN1、GluD2、LGI1、Caspr2、ADAM22、ADAM23、NMDA型GluR複合体)等を測定する（高橋）。

15. 健康対照の非脳炎感染症時における一般・免疫マーカーの経時的変化

健康対照あるいは疾病対照で、上気道炎などの感染症罹患時の血清などを収集し、血液脳関門攻撃因子(MMP-9)、サイトカイン(BioPlex)、細胞傷害性T細胞因子(granzyme B)、自己抗体(GluN2B、GluN1、GluD2、LGI1、Caspr2、ADAM22、ADAM23、NMDA型GluR複合体)等を測定する（高橋）。

16. 免疫調節遺伝子(*Foxp3*, *CTLA-4*, *PDCD-1*, *T-bet*)の発現検討

NHALE患者の自己免疫病態を解明する目的で、免疫調節遺伝子(*forkhead box P3*, *Foxp3*; *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*, *CTLA-4*; *programmed cell death-1*, *PDCD-1*; *T-bet*)の発現を検討した。パックスジーンにて採血した血液からRNAを抽出し、QuantiTect® Reverse Transcription kit (QIAGEN)を用いてcDNAを作成、Real-Time PCR (LightCycler) 用キット(ヒト：*Foxp3*リアルタイムPCRプライマーセット、ロシュ、4450205；ヒト：*CD152*リアルタイムPCRプライマーセット、ロシュ、488932；ヒト：*PDCD1*リアルタイムPCRプライマーセット、ロシュ、486777；ヒト：*T-bet*リアルタイムPCRプライマーセット、ロシュ、487232)を用いて免疫調節遺伝子濃度を定量し、*-actin*遺伝子濃度との比で検討した（高橋）。

17. 免疫調節遺伝子(*Foxp3*, *CTLA-4*, *PDCD-1*, *T-bet*)のSNP検討

患者のEDTA血から、ゲノムDNAをMagNA Pure (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)により分離し、連結可能匿名化した。その後、タカラバイオ株式会社にてゲノム多型変異解析を行った。*CTLA4* 遺伝子は全長6175bp を10領域に分け、PCR 増幅した。*PDCD1* 遺伝子は全長9625bp 及びエクソン1上流領域、エクソン5下流領域を16 領域に分け、PCR 増幅した。*T-bet*遺伝子は全長12876bp、プロモーター領域(-1993T>C、-1514T>C、-1499G>A)、5' UTR(rs17244544)、エクソン6下流領域(3' UTR(rs17250967))を10 領域に分け、PCR 増幅した。それぞれのPCR 産物を鋳型に両鎖ダイレクトシーケンスを行った。得られたシーケンスデータは、解析ソフト(SEQUENCHER)にてリファレンス配列と比較し変異塩基をリストアップした。ゲノム頻度を日本人HapMapデータと比較する(高橋)。

18. NHALE急性期の抗体産生に関わるNMDA型GluR抗原の検討

NHALE急性期のNMDA型GluR抗体産生の抗原刺激となるNMDA型GluR抗原の起源を明らかにする目的で、急性期の患者血液からRNAを抽出し、

QuantiGene Plex 2.0 Assay (Magnetic Assay) kit (Veritas)を用いて*GRIN2D*, *GRIN2A*, *PGK1*, *GAPDH*, *TBP*, *GRID2*, *GRIN1*, *GRIN2B*, *HPRT1*, *GRIN2C*の発現量を検討した(高橋)。

(倫理面への配慮)

組換えDNA実験について:マウスDNAを組み込んだ細胞を用いており機関承認実験に該当し、静岡てんかん・神経医療センターのP2レベル実験室にて、機関承認を経て行なっている。

臨床研究倫理指針について:本研究は、厚生労働省の臨床研究倫理指針(平成15年7月)に従い、静岡てんかん・神経医療センター院長の許可の下、被験者の人権に十分に留意しながら、書面による説明同意を得た上で自己抗体測定を行っている。

各研究は、倫理委員会の承認の方法にて行っている(表3)。

動物実験はIACUC(Institutional Animal Care and Use Committee,動物実験審査委員会)によって承認された方法で行った(承認番号2013-111)。

表2. イオンチャネル型GluRサブユニット命名法

	NC-IUPHAR subunit nomenclature	Previous nomenclatures	Human gene name
AMPA	GluA1	GLU _{A1} , GluR1, GluRA, GluR-A, GluR-K1, HBGR1	<i>GRIA1</i>
	GluA2	GLU _{A2} , GluR2, GluRB, GluR-B, GluR-K2, HBGR2	<i>GRIA2</i>
	GluA3	GLU _{A3} , GluR3, GluRC, GluR-C, GluR-K3	<i>GRIA3</i>
	GluA4	GLU _{A4} , GluR4, GluRD, GluR-D	<i>GRIA4</i>
Kainate	GluK1	GLU _{K5} , GluR5, GluR-5, EAA3	<i>GRIK1</i>
	GluK2	GLU _{K6} , GluR6, GluR-6, EAA4	<i>GRIK2</i>
	GluK3	GLU _{K7} , GluR7, GluR-7, EAA5	<i>GRIK3</i>
	GluK4	GLU _{K1} , KA1, KA-1, EAA1	<i>GRIK4</i>
	GluK5	GLU _{K2} , KA2, KA-2, EAA2	<i>GRIK5</i>
NMDA	GluN1	GLU _{N1} , NMDA-R1, NR1, GluR ξ 1	<i>GRIN1</i>
	GluN2A	GLU _{N2A} , NMDA-R2A, NR2A, GluRe1	<i>GRIN2A</i>
	GluN2B	GLU _{N2B} , NMDA-R2B, NR2B, hNR3, GluRe2	<i>GRIN2B</i>
	GluN2C	GLU _{N2C} , NMDA-R2C, NR2C, GluRe3	<i>GRIN2C</i>
	GluN2D	GLU _{N2D} , NMDA-R2D, NR2D, GluRe4	<i>GRIN2D</i>
	GluN3A	GLU _{N3A} , NMDA-R3A, NMDAR-L, chi-1	<i>GRIN3A</i>
Orphan	GluN3B	GLU _{N3B} , NMDA-R3B	<i>GRIN3B</i>
	GluD1	GluR δ 1	<i>GRID1</i>
	GluD2	GluR δ 2	<i>GRID2</i>

Greek symbols in NMDA receptor subunit names were applied to the mouse orthologue only.

Neuropharmacology, 2009 January; 56(1): 2-5. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.06.063.

表3. 倫理委員会申請研究課題

承認番号	課題名	承認日
2007-12	ラスムッセン症候群等の自己免疫介在性中枢神経系疾患に関する研究(2007改訂)	2007年7月20日
2008-19	自己免疫介在性中枢神経系疾患に関する国際共同研究	2008年11月28日
2012-12	自己免疫介在性脳炎・脳症に関する前駆期研究	2012年12月14日
2012-3	自己免疫介在性脳炎・脳症の病態解明のための感染症症例に関する研究	2012年10月1日
2012-5	自己免疫介在性脳炎・脳症の病態解明ための精神症状例に関する研究	2012年10月1日
2013-2	自己免疫介在性神経疾患に関する研究-対照症例について	2013年4月26日
2013-27	自己免疫介在性脳炎・脳症に関する多施設共同研究2013	2014年1月24日
2013-29	自己免疫介在性神経疾患に関する研究-対照調査研究について	2014年1月24日
2014-1	自己免疫性脳炎および難治性てんかんにおける自己抗原の同定、および自己抗体の作用機構の解明(2013改訂)	2014年4月8日
2014-2	自己免疫介在神経疾患の免疫調節関連遺伝子の解析201402	2014年4月8日

C . 研究結果

1. 急性辺縁系脳炎・脳症の多施設共同研究による症例の収集

2013年11月-2014年10月の集積数は、NHALE (123例/年)、卵巣奇形腫合併脳炎(21例/年)、痙攣重積型脳炎(44例/年)、その他の急性脳炎(67例/年)、局在関連性てんかん(116例/年)など、合計760例/年であった(表4)。

2. 「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症」の診断スキームの改訂

2013年3月に、NMDA型GluR構造とGluN2B(GluR2)抗体の項などに最近の知見を加え、ホームページの診断スキーム

(<http://www.shizuokamind.org/images/stories/pdf/06-1-2-15.pdf>)を更新した。2014年度は、スキームを見直すべく検討中である(高橋、森、西田)。

3. 既往歴の検討

髄液GluN2B-NT2抗体が疾病対照(非炎症性部分てんかん)の平均+2SD以上の高値を示した精神疾患患者8名の主たる精神症状は、抑うつ2名、幻覚妄想2名、躁1名、行動異常1名、不安1名、見当識障害1名だった。既往歴では、アルコール依存あるいは大量飲酒が3名、橋本病が1名でみられた(西田)。

4. 精神症状の検討

髄液GluN2B-NT2抗体高値の精神疾患患者8名の主たる精神症状は、抑うつ2名、幻覚妄想2名、躁1名、行動異常1名、不安1名、見当識障害1名だった。精神症状を伴う脳炎後てんかん患者4名は全例部分てんかんで、主たる精神症状は、興奮、衝動行為、行動異常、幻聴だった(西田)。

5. NHALE患者の前駆期自己免疫状況の検討

2014年度に、同意書をいただいている8名の脳炎患者さんの同意書等を日本赤十字社に送付し、献血11年後に廃棄される保管検体の利用をお願いした。今後、日赤から検体をいただければ、保存血清の血液脳関門攻撃因子(MMP-9)、サイトカイン(BioPlex)、細胞傷害性T細胞因子(granzyme B)、自己抗体(GluN2B、GluN1、GluD2、LGI1、Caspr2、ADAM22、ADAM23、NMDA型GluR複合体)等を測定する(高橋)。

6. 精神病症状を有する症例のNMDA型GluR抗

体の推移

精神病症状が確認できたてんかん患者8名中、血清あるいは髄液GluN2B-NT2抗体、GluN2B-CT抗体、GluN1-NT抗体、GluD2-NT抗体のいずれかが高値を示したのは3名だった。3名中1名では精神症状寛解後も血清中の抗体価は高値を示し、1名では精神症状寛解後は血清中の抗体価は高値を示さなくなり、1名では精神症状寛解後も髄液中の抗体価は高値を示したが低下した。NMDA型GluR抗体と精神症状の経時的関連は更なる検討を要すると考えられ、NHALE前駆期の精神症状と抗体価の関係を検討していきたい(西田、高橋)。

7. 統合失調症患者の血清を用いた抗NMDAR抗体の検討

イスラエルの統合失調症患者の1名で、抗NMDAR抗体を検出し、この患者ではNMDARの機能を向上させるD-セリン投与が症状の改善に有効であった(森)。

8. 健常者の年齢・性別NMDA型GluR抗体分布と推移

2013年度には0-20歳の非炎症性の病因のてんかん症例と、静岡てんかん・神経医療センター職員(74例)の血清を用いた健常者の自己抗体(GluN2B、GluN1、GluD2)を検討した。2014年度には倫理委員会承認の方法で同意を得られた静岡てんかん・神経医療センター職員(179例)の血清を用いて、自己抗体(GluN2B、GluN1、GluD2、LGI1、Caspr2、ADAM22、ADAM23、NMDA型GluR複合体)等を測定した。今後データを検討する(高橋)。

8. NMDA型GluR抗体のシナプスNMDA型GluRに対する作用の検討: Akt in vitro

NMDA型GluR抗体陽性NHALE患者の髄液あるいは髄液IgG分画を培養神経細胞に加えたが、tAkt濃度には、変化は見られなかった。pAkt濃度は、7DIVのNHALE-total CSFを加えた場合(1.06±0.15, n=16)が、7DIVのNHALE-CSF-IgGを加えた場合(0.97±0.09, n=14)(Mann Whitney test, p=0.0312)及び10DIVのNHALE-total CSFを加えた場合(0.78±0.15, n=12)(Mann Whitney test, p<0.0001)より有意に高値であった。p-Akt/tAkt比は、7DIV

のNHALE-total CSFを加えた場合(1.06±0.15, n=16)が、7DIVのNHALE-CSF-IgGを加えた場合(0.97±0.10, n=14) (Mann Whitney test、p=0.0337)及び10DIVのNHALE-total CSFを加えた場合(0.75±0.12, n=12) (Mann Whitney test、p<0.0001)より有意に高値であった(高橋)。

8. NMDA型GluR抗体のPassive transfer-行動解析 in vivo

GluN2B-NT2ペプチドで免疫したウサギの血清にはELISAでGluN2B-NT2ペプチド反応する抗体が含まれることを確認、GluN1とGluN2Bを発現するHEK細胞を用いたcell-based assayでもNMDA型GluRと反応する抗体の存在を確認し、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体を得た。

ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群マウスでは、生理食塩水投与群、正常ウサギ血清Protein A 分画投与群に比べて挙尾反応が高頻度に観察された。

免疫組織学的検討では、ウサギIgGは投与1時間では海馬神経細胞付近に見られたが、22日後では消失していた。ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群などの3群で、組織の炎症性変化などの大きな違いは認めなかった。

9. NMDA型GluR抗体のPassive transfer-マイクロアレイ解析

脳組織マイクロアレイ解析では、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群では正常ウサギ血清Protein A 分画投与群に比べて、*napa*, *sv2c*, *pam*, *fam53b*の発現低下、*trappc2*, *pde5a*, *cwc22*, *nphs2*, *morn2*, *naalad12*, *foxj1*, *gin1*, *ogn*, *gm6280*などの発現増加が認められた。

10. NHALE患者にみられる先行症状期の髄液一般データの検討

NHALE群の髄液細胞数(平均±SD、320.8±372.8 counts/mm³)は、疾病対照群(20.8±372.8 counts/mm³)に比べて有意に多く(p<0.0001)、脳炎発病に向けて低下した(p=0.03)。NHALE群の髄液蛋白濃度(120.6±97.4mg/dl)は、感染対照群(40.7±21.5mg/dl)、疾病対照群(20.9±8.7mg/dl)に比べて有意に高値であった(p<0.0001)。NHALE群の髄液糖濃度(56.9±21.0mg/dl)は、感染対照群(59.5±10.3mg/dl)、疾病対照群(61.1±6.8mg/dl)

に比べて有意に低値であった(p=0.0006、p=0.0230)。髄液糖は発病年齢が高いほど高値をとる傾向を示した(p=0.0168)。NHALE群の髄液IgG濃度(7.6±2.6mg/dl)は、疾病対照群(1.8±1.3mg/dl)に比べて有意に高値であった(p<0.0001)。NHALE群の髄液albumin濃度(51.0±34.3mg/dl)は、疾病対照群(13.5±6.8mg/dl)に比べて有意に高値であった(p<0.0001)(高橋)。

11. 浮遊系293F細胞を用いた抗NMDAR抗体ならびに抗デルタ型GluR抗体測定系の開発

浮遊性293F細胞株を用いた安定発現株の作製では、2013年度にデルタ型GluRの安定発現細胞株を得た。2014年度、Cell sorting法を繰り返したが、NMDA型GluRの安定発現細胞株が得られなかった(森)。

13. NHALE後遺症期患者の非脳炎感染症時における一般・免疫マーカーの経時的変化

血液脳関門攻撃因子(MMP-9)、サイトカイン(BioPlex)、細胞傷害性T細胞因子(granzyme B)、自己抗体(GluN2B、GluN1、GluD2、LGI1、Caspr2、ADAM22、ADAM23、NMDA型GluR複合体)等を測定中である(高橋)。

14. 健康対照の非脳炎感染症時における一般・免疫マーカーの経時的変化

疾病対照として、てんかん患者の上気道炎などの感染症罹患時の血清などを収集し、血液脳関門攻撃因子(MMP-9)、サイトカイン(BioPlex)、細胞傷害性T細胞因子(granzyme B)、自己抗体(GluN2B、GluN1、GluD2、LGI1、Caspr2、ADAM22、ADAM23、NMDA型GluR複合体)等を測定中である(高橋)。

15. 免疫調節遺伝子(*Foxp3*, *CTLA-4*, *PDCD-1*, *T-bet*)の発現検討

NHALE患者の免疫調節遺伝子(*forkhead box P3*, *Foxp3*; *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*, *CTLA-4*; *programmed cell death-1*, *PDCD-1*; *T-bet*)の発現を検討している(高橋)。

16. 免疫調節遺伝子(*Foxp3*, *CTLA-4*, *PDCD-1*, *T-bet*)のSNP検討

NHALE患者の免疫調節遺伝子(*forkhead box P3*, *Foxp3*; *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*, *CTLA-4*; *programmed cell death-1*, *PDCD-1*; *T-bet*)両鎖ダイレクトシーケンスを行い、検体を蓄積中である(高橋)。

**17. NHALE急性期の抗体産生に関わるNMDA型
GluR抗原の検討**

成人NHALE16例、小児NHALE7例、成人卵巣奇形腫合併脳炎8例、小児痙攣重積型脳炎8例、健

康対照1例などの、末梢血のRNAを用いたGluR発現量の測定を行った。今後データを増やしたのち解析を進める予定である（高橋）。

表 4. 多施設共同研究の症例収集状況 病態分類別症例数

	201011-2011	201111-2012	201211-20131	201311-20141
	10	10	0	0
非ヘルペス性急性辺縁系脳炎	136	141	148	123
卵巣奇形腫合併脳炎	20	14	18	21
痙攣重積型脳炎	44	37	38	44
脳幹脳炎	1	6	5	2
その他の急性脳炎	72	67	69	67
CNS ループス	6	11	8	23
橋本脳症	4	13	9	20
ADEM	7	7	4	6
再発性脳炎	19	29	37	34
亜急性脳炎	49	46	54	84
傍腫瘍性脳炎	7	2	8	5
ALS	10	7	0	0
CJD	17	7	6	2
精神疾患	26	29	51	39
Rasmussen 症候群	28	24	13	25
局在関連性てんかん	100	101	153	116
West 症候群	7	6	9	4
症候性全般てんかん	11	9	11	3
小脳炎	44	31	27	38
不随意運動	7	8	3	6
HPV ワクチン関連				45
その他	63	79	53	53
合計	678	674	724	760

D. 考察

前駆期研究のまとめと今後の戦略

前駆期に対するアプローチの中で、患者既往歴についての検討は順調に進んでいて、NHALE症例にアルコールなどの依存症(10%)、自己免疫性疾患(4%)の既往歴があり、前駆期症状の存在が示唆された(図3)。NHALE患者の発病前献血保存血の入手は保存義務の11年を待つ必要があり、免疫マーカーの解析はすぐにはできないが、今後の解析を待ちたい。

NHALE前駆期の可能性のあるGluN2B-NT2抗体陽性精神疾患患者の精神症状は多彩で、GluN2Bが発現している部位が中枢神経系の広範な場所であるためと推測しているが、前駆期の精神症状も多彩である可能性がある。

2013年度研究で、正常対照の中に血清NMDA型GluR抗体が著しく高値の群が見つかり、その群の年齢・性がNHALEの好発年齢である若年女性に一致した。この高値群が前駆期症状を有しているかどうかを検討し、前駆期の研究につなげたい。

NMDA型GluR抗体をマウスにpassive transferすることで、行動変化、分子生化学的变化をとらえる動物モデルを構築できた。現在行っているGluN2B-NT2抗体投与モデルでの行動解析を多方面からすすめ、前駆期病態をさらに詳しく検討する。今後はGluN1-NT抗体投与モデルマウスでも解析を行う。

1. NHALE患者にみられる既往歴の検討

非傍腫瘍性のNHALE患者の10%に、うつなどの気分障害およびアルコールや覚醒剤に対する依存症が既往歴として見られ、4%に自己免疫性疾患の既往がみられることが分かっている(2012年度研究)。髄液GluN2B-NT2抗体高値を示した精神疾患患者では、アルコール依存あるいは大量飲酒が3名、橋本病が1名で既往歴としてみられ(2014年度研究)、NHALE患者とGluN2B-NT2抗体陽性精神疾患患者の既往歴に共通点がある。NMDA型GluR抗体がNHALE発病前から存在し、前駆期症状として精神障害をもたらしている可能性がある。

2. 精神症状の検討

NHALE前駆期の可能性のあるGluN2B-NT2抗体

陽性精神疾患患者と、精神症状を伴う脳炎後てんかん患者の精神症状は多彩であった。GluN2Bが発現している部位が中枢神経系の広範な場所であるために、GluN2B-NT2抗体による精神症状が多彩であるものと推測している。てんかん精神病患者の精神症状とNMDA型GluR抗体の推移を多数例でさらに検討し、NHALE前駆期の抗体値と症状の関係の理解につなげたい。

3. 統合失調症とNMDA型GluR

NHALE前駆期の可能性がある統合失調症の一部症例に、抗NMDAR抗体の存在が報告されるようになった。我々研究班の症例では、NMDARの機能を向上させるD-セリンの投与が有効であったことから、同様の抗NMDAR抗体が関与する症例でのD-セリンの効果をもさらに検証する必要がある。この患者の抗体の作用機構を明らかにすることで、脳炎と統合失調症で観察される精神症状発症機構の理解、治療につながる可能性がある。

4. 健常者の年齢・性別NMDA型GluR抗体分布と推移

0-20歳の非炎症性の病因のてんかん症例と、静岡てんかん・神経医療センター職員の血清を用いた健常者のGluN2B-NT2抗体等の検討で、NHALE後発年齢帯の20-40歳の女性にNMDA型GluR抗体が著しく高い群が認められたことは、NHALEの発病前にNMDA型GluR抗体が著しく高い前駆期が存在することを示唆すると考える。今後、20-40歳の女性で症例数を増やし、NMDA型GluR抗体が著しく高い群について、健康調査を行い前駆期症状の有無を検討したい。

5. 患者髄液を用いたNMDA型GluR抗体作用の検討：in vitro

培養ラット胎児神経細胞にNMDA型GluR抗体陽性NHALE患者髄液あるいは患者髄液IgG分画を加え、in vitroでNMDA型GluR抗体の機能を検討している。

2011年我々は、NMDA型GluR抗体陽性脳炎髄液は培養神経細胞のアポトーシスを促進するが、髄液IgG分画はシナプス外NMDA型GluRを内在化し、興奮毒性によるアポトーシスを抑制することを報告した。このことからNMDA型GluR抗体はシナプス外NMDA型GluRを内在化して脳を護る作用を持つことが分かった。

2012年度、

cAMP-Responsive-Element-Binding proteinのリン酸化CREBを評価した。NHALE患者髄液IgGは、対照髄液IgG分画に比べてCREBリン酸化が低く、わずかにシナプスNMDA型GluRを内在化している可能性が示唆された。

2013-4年度にはNHALE患者髄液中のIgG分画に含まれるNMDA型GluR抗体が、Aktリン酸化を抑制することを見出し、シナプスNMDA型GluRを内在化してしていると考えた。

NMDA型GluR抗体によるシナプスNMDA型GluRの内在化は、シナプス結合蛋白にアンカーされているため、シナプス外NMDA型GluRの内在に比べて弱く、比較的早期に回復する症例があるのではないかと推測している。

6. NMDA型GluR抗体のPassive transfer研究

ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体をマウス海馬に反復投与することで、挙尾反応が高率に認められ、反復投与でその頻度が増加した。挙尾反応は、モルヒネ投与時などに見られるマウスの興奮性行動変化と考えられており、NMDA型GluRの一つのサブユニットであるGluN2BのN末に対する抗体が行動変化を起こすことが分かった(図4)。

ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体をマウス海馬に反復投与することで、*napa*、*sv2c*、*pam*、*fa*、*m53b*の発現低下が見られ、シナプス機能低下、GABA作動性抑制性シナプス伝達に障害をもたらす、興奮性行動につながる可能性がある。Pam (Protein associated with Myc)は、ヒトではTuberinのユビキチン化を行い、mTOR系を活性化する。Pamが低下するとmTOR系が低下し、タンパク合成が低下し、神経機能抑制につながる可能性がある。Pamはkcc2に作用しClイオンを細胞外にくみ出す作用があるが、Pamが低下すると細胞内のClイオンが増加し、GABAがGABA_A受容体に作用するとClイオンが細胞外に流れ、発達初期と同じく興奮性の作用を示す可能性がある。

GluN2B-NT2抗体はNMDA型GluRを内在化し、NMDA型GluR拮抗作用をもたらすのみではなく、*Napa*、*Sv2c*、*Pam*などのタンパクの低下をもたらす、NHALEにおける興奮性行動変化など種々の神経機能の変化をもたらしていると推測した(図3)。

先行症状期研究のまとめと今後の戦略

2012年度の先行症状期の臨床症状研究では、NHALE207例中78%に先行症状を認め、感染病原体が確定される症例は14%と少なく、発熱、頭痛といった非特異的な症状が多いこと、脳炎症状出現前に髄液検査された18例中18例で無菌性髄膜炎の診断がされていたことが分かった(図3)。2013年度の傍腫瘍性NHALEの既往歴調査で4%に脳炎・髄膜炎があったことと合わせると、前駆期から髄膜炎を発症してNHALEの先行症状期に至り、その後NHALE発病期に至るという我々の仮説が支持される。

2013年度の先行症状期の一般臨床検査値の検討では、リンパ球、血小板の減少、IgA高値、CRPの比較的low値が特徴として見られ、早期診断に繋がる可能性があることが分かった。発熱、頭痛といった非特異的な症状の症例で、リンパ球、血小板の減少、IgA高値、CRPの比較的low値がある場合には、積極的に髄液一般検査、髄液NMDA型GluR抗体測定を行うことで、早期診断につながる可能性がある。

2014年度、非傍腫瘍性NHALE217例の中で先行症状期の髄液データがある17例について検討すると、髄液細胞数が非炎症性の疾病対照群に比べて有意に多く、脳炎発病に向けて低下し、感染対照群である無菌性髄膜炎に比べて髄液蛋白濃度は有意に高値で、髄液糖濃度は有意にlow値であった。無菌性髄膜炎であっても蛋白がかなり高く糖が低い場合には、NHALEへの進展に注意することができる。

NHALE先行症状期に無菌性髄膜炎がある場合、CNSでリンパ球が細胞死を起こし、リンパ球に発現するNMDA型GluRの破砕-抗原提示が起こり、CNS内でNMDA型GluR抗体産生にブースターがかかるために、NHALE発症につながる可能性が推定される。CNSでリンパ球が細胞死を起こし、NMDA型GluR抗体産生にブースターがかかることで髄液IgG濃度が増加しているものと推測している。2013年度研究で末梢血のリンパ球や血小板が先行症状期に減少することも分かっており、末梢においてもNMDA型GluRの破砕-抗原提示が起こり、NMDA型GluR抗体産生にブースターがかかるものと思われる。NHALEの発病予防

のためには、末梢およびCNSでリンパ球の細胞死を導く要因を検討する必要がある。抗原供給の観点から発病予防につながる治療がある。

NHALE群の髄液albumin濃度が高いのは、血液脳関門の破綻によるものと推測している。2013年度研究で、末梢血albumin濃度は、対照より有意に低値で、発病日に向けて低下する傾向を認め、先行症状期から血液脳関門の破綻があり、albuminが血中から中枢神経系へシフトしていることを示唆している。NHALE発病予防には血液脳関門の保護も重要である。

痙攣や意識障害など、NMDA型GluR抗体による作用のみでは説明しづらい症状がNHALE急性期にはあり、NMDA型GluR抗体のみならず、複数の病態因子が先行症状期から発病期には関与すると思われる。病態をさらに検討し、脳炎の予後を改善したい。

発病期研究のまとめと今後の戦略

NMDA型GluR抗体陽性NHALE患者髄液による培養ラット胎児神経細胞への影響をin vitroでみる研究から、NHALEの髄液の中のIgG分画はシナプス外NMDA型GluR複合体の内在化を起しアポトーシスを抑制するが、髄液中のIgG分画以外の成分（granzyme Bなど）がアポトーシスを起こしていることが分かってきている（参照1、2）。GluN2B-NT2抗体のPassive transfer研究においても、抗体のみでは急性脳炎の症状は再現できていない。NHALEの髄液成分はNMDA型GluR抗体のみならず、補体、granzyme Bなど複数の因子が病態に影響していて、複雑な病態を形成していると思われる（図5）。

発病期のNMDA型GluR抗体ブースターのメカニズムを明らかにするために、末梢血におけるNMDA型GluR抗原等の発現検討をさらに進め、免疫調節遺伝子の発現量を検討する。

非傍腫瘍性NHALEでは、髄液GluN2B-NT2抗体はすべてのIgGサブクラスが増加するが、遅れて上昇するIgG3、IgG1サブクラス抗体と予後が関連した。IgG3、IgG1サブクラス抗体が誘導する補体介在性の神経障害が重症度、予後を規定している可能性がある。今後、活性化補体の検討を進める予定である。

その他の研究

1. Autoimmune Encephalitis Mosaic1キットによる自己抗体スクリーニングの検討

2012年度に、Euroimmune社製のAutoimmune Encephalitis Mosaic1のキットを用いて、髄液、血清のスクリーニングを検討した。痙攣重積型脳症の血清は抗GABA_BR抗体、抗LG11抗体、抗CASPR2抗体に±であり、この検出系には特異性の問題がある可能性がある。抗VGKC抗体陽性例の血清では抗LG11抗体、抗CASPR2抗体ともに陰性であり、これらの抗体検出系の感度が低いと思われる。抗AMPA抗体は再発性脳炎の1例の髄液で±であったが、感度がやはり低い可能性がある。抗NMDAR抗体は髄液では卵巣奇形種合併脳炎1検体で陽性、他の疾患ではすべて陰性であり、特異性が高い可能性があるが、卵巣奇形種合併脳炎でも陰性例があり、GluN2B-NT2抗体がELISAで高い症例でも陰性であり、感度が低い可能性がある。キットにはポジコン血清が1種類ついているのみであるため、判定が困難な面があり、多種類の自己抗体を判定できるようになるには複数回購入し、熟練を要する。

2. 自己抗体測定系の改良

NMDA型GluR抗体、デルタ型GluR抗体のより簡便で定量性の高い検出系を確立するために、浮遊性293F細胞株を用いた安定発現株の作製とFACSによる自己抗体解析系の確立を進め、ビーズ法による抗体測定系確立の検討を行っている。

我々がGluN2B-NT2抗体のELISA測定に用いているペプチドで作成した抗体が、passive transferで行動変化並びに遺伝子発現変化を起こすことを証明できた。よって、このペプチドで測定するELISA抗体は臨床的に意義があると推測できる。

3. 自己免疫介在性脳炎・脳症の診断スキームの作成

2013年3月、「急性辺縁系脳炎等の自己免疫介在性脳炎・脳症」の診断スキームの自己抗体部分をアップデートした（参照3）。今後さらに病態等の知見を加えていく予定である。

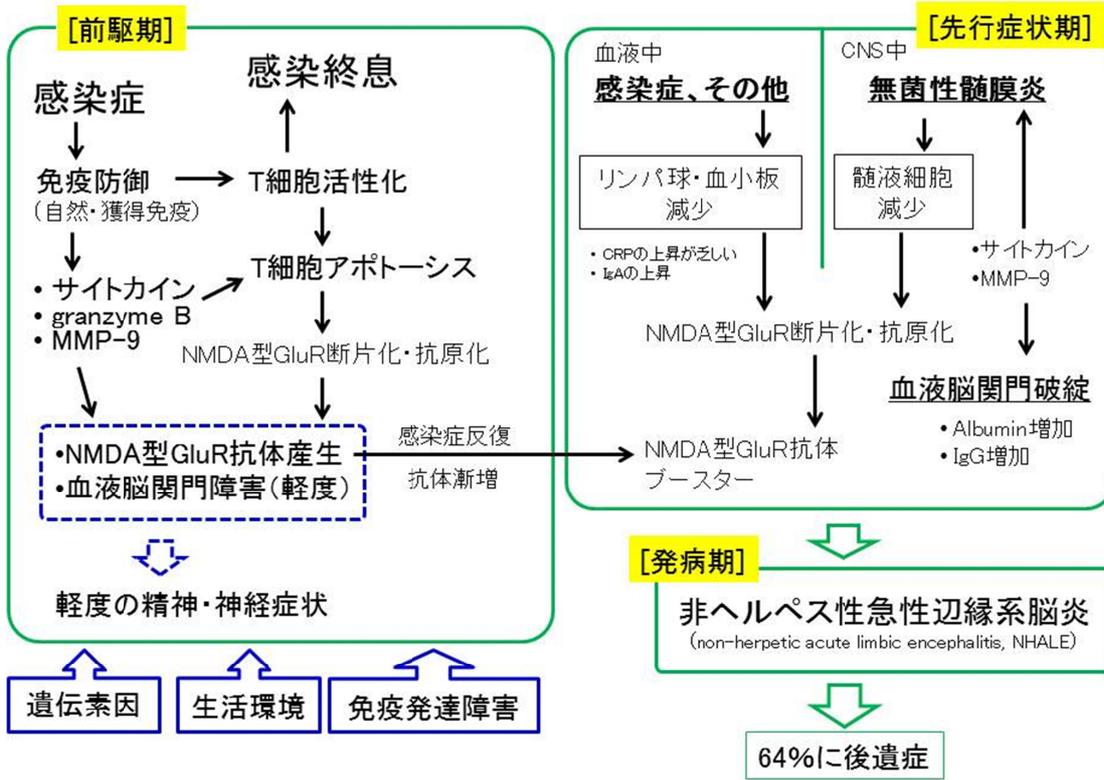


図3. NHALEの前駆期、先行症状期、発病期病態仮説

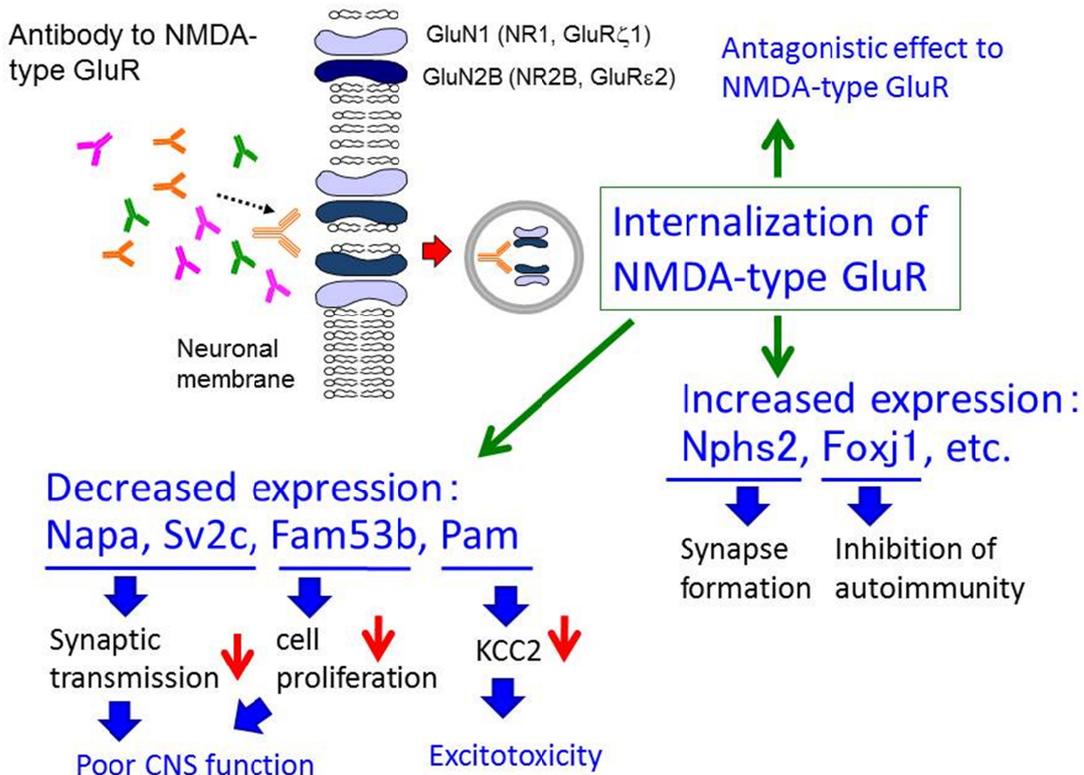


図4. NMDA型GluR抗体の病態機能仮説

E. 結論

前駆期に対する研究アプローチの中で、NHALEの10%程度の症例に、前駆期症状と推定できる依存症などの既往歴があり、20-40歳の女性正常対照の中に血清NMDA型GluR抗体が著しく高値の群が見つかった。NMDA型GluR抗体をマウスにpassive transferする動物モデルにおいても、マウスに興奮性の行動変化が観察され、NMDA型GluR抗体高値の前駆期がNHALE発病前に存在するものと確信してきた。動物モデルと発病前献血保存血清を有機的に結びつけた前駆期病態研究を推進したい。

先行症状期の研究では、発熱、頭痛といった非特異的な症状が多いこと、脳炎症状出現前に髄液検査された18例中18例で無菌性髄膜炎の診断がされていたこと、血液検査ではリンパ球・血小板の減少、IgA高値、CRPの比較的低値が特徴として見られ、早期診断に繋がる可能性

があることが分かった。髄液検査でも髄液細胞数が非炎症性の疾病対照群に比べて有意に多く、脳炎発病に向けて低下した。リンパ球に発現するNMDA型GluRの破砕-抗原提示が起こり、CNS内でNMDA型GluR抗体産生にブースターがかかるために、NHALE発症につながる可能性が推定される。NHALEの発病予防のためには、末梢血およびCNSでリンパ球の細胞死を導く要因を検討する必要がある。NMDA型GluR抗体の抗原供給の観点から発病予防につながる治療があるか？今後検討したい。NMDA型GluR抗体による作用のみでは、痙攣や意識障害など説明しづらい症状がNHALE急性期にはあり、passive transferする動物モデルを用いて、NMDA型GluR抗体以外の脳炎に不可欠な因子を見出し、脳炎の予後を改善したい。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 2014年8月29日、NMDA型グルタミン酸受容体抗体による不安モデルマウスの開発、発明者：高橋幸利 特願 2014-174749、出願：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団。
- 2014年10月30日、プライマーセット及び免疫介在性てんかんの診断方法、発明者：高橋幸利 特願 2014-221632、出願：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団。

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

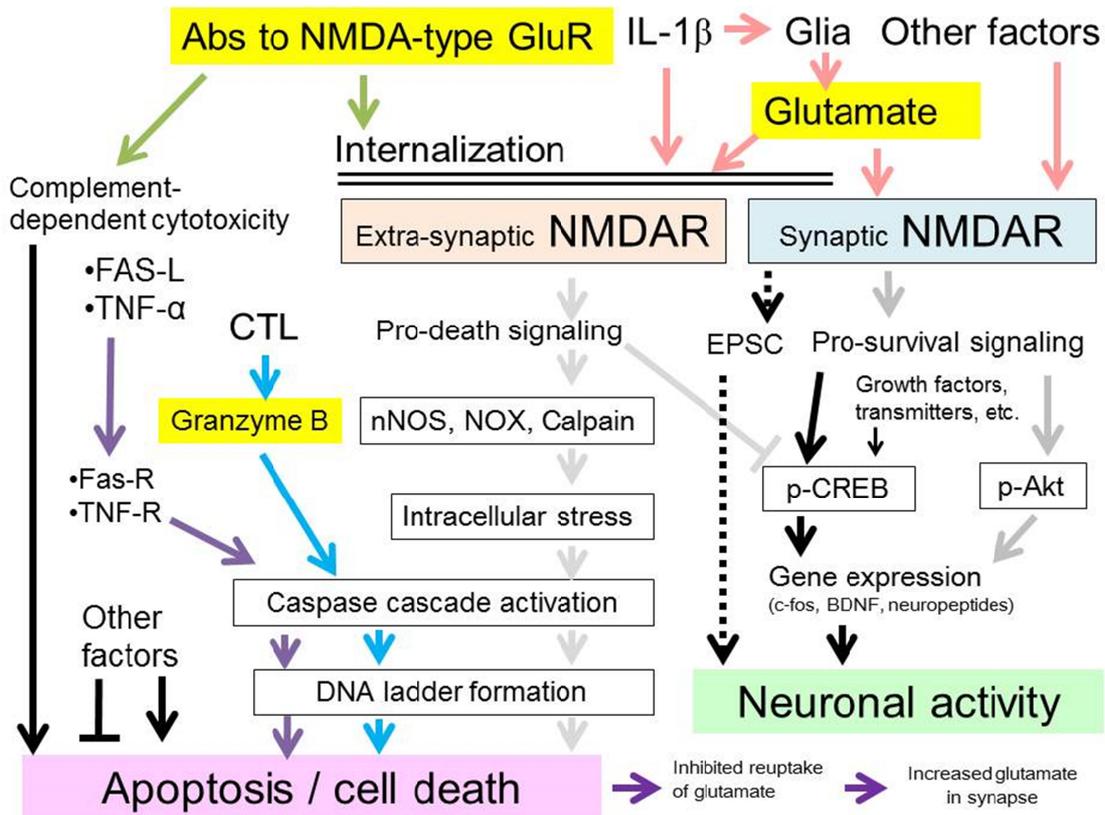


図5. NHALEにおける抗体、サイトカイン、granzyme Bなどの役割