

## ウサギ抗ヒトNMDA型GluR抗体のマウスPassive transferによる機能解析

研究代表者 高橋 幸利<sup>1, 2, 3</sup>

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】非ヘルペス性急性辺縁系脳炎（NHALE）の病態に重要な役割を果たすNMDA型GluR抗体の生物学的機能を明らかにする。

【方法】GluN2B-NT2ペプチドを用いてウサギを免疫し、抗ヒトGluN2B-NT2抗体を作成した。その抗体をマウス海馬に投与、行動変化をIrwin法で観察し、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。組織を免疫組織学的に検討し、マイクロアレイで遺伝子発現変化を検討した。

【結果】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。

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*, *naaladl2*, *foxj1*, *gin1*, *ogn*, *gm6280*などの発現増加が認められた。

【結論】GluN2B-NT2抗体は、NMDA型GluRの内化、シナプス・イオンチャネル関連遺伝子の発現変化を起こし、興奮性の行動変化をもたらす可能性が示唆された。

研究協力者：西村成子<sup>1</sup>、高尾恵美子<sup>1</sup>、笠井理沙<sup>1</sup>、平松宏実<sup>1</sup>、井上有史<sup>1</sup>（1 国立病院機構静岡てんかん・神経医療センター、2 岐阜大学医学部小児病態学、3 静岡県立大学薬学部）

### A．研究目的

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、ADL障害は33.3%に、てんかん発作は36.2%に、精神症状は26.3%に、知的障

害は39.7%に、運動障害は31.0%に、記憶障害は63.2%に見られ、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明らかになっている。

2002年に我々はN-methyl-D-aspartate (NMDA)-type GluRsのサブユニットの一つであるGluN2B( $\epsilon$ 2, NR2B)に対する抗体を脳炎患者等の髄液中に見出し（高橋幸利、日児誌、2002）、2007年Dalmauらは卵巣奇形腫脳炎症例でNMDA型GluR複合体に対する抗体（抗NMDAR抗体）を報告（Dalmau, Ann Neurol, 2007）、抗NMDAR抗体による脳炎が注目されるようになった。

抗NMDAR抗体役割として、2010年Hughesは患者髄液によるNMDA型GluRの内化を、培養海馬組織を用いて報告した(J Neurosci, 2010)。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年我々は、NMDA型GluR抗体のシナプスNMDA型GluRに対する作用を明らかにするために、シナプスNMDA型GluRの活性化でリン酸化されるAktについて、培養神経細胞を用いてNHLE髄液及び髄液IgG分画がどのように作用するかを検討した。7DIVのNHLE-CSF-IgG分画を加えた場合のリン酸化Akt濃度の値( $0.97 \pm 0.09$ ,  $n=14$ )は、NHLE-total CSFを加えた場合の値( $1.06 \pm 0.15$ ,  $n=16$ )に比べて有意に低く(Mann Whitney test,  $p=0.0312$ )、NMDA型GluR抗体がシナプスNMDA型GluRを内在化して、Aktリン酸化を抑制しているものと考えた。

このように、NHLE患者髄液によるin vitro研究で、NMDA型GluR抗体を含むIgG分画がシナプス外NMDA型GluRを内在化して脳を護る作用を持つこと、シナプスNMDA型GluRを内在化して、Aktリン酸化を抑制しシナプス機能を低下させる可能性を見出したが、NMDA型GluR抗体そのものの作用かどうかは確定できていない。また、髄液IgG分画には痙攣や意識障害などの急性脳炎症状を説明できる作用を見だせていない。田中らの研究でも患者髄液IgG分画をマウス脳室に投与しても脳炎は起こらなかったとされている。2014年度はNMDA型GluR抗体そのものの作用を明らかにするために、ウサギ抗ヒトNMDA型GluR抗体を作成、passive transfer、その作用をマウス行動解析等で検討した。

## B. 研究方法

1. 抗体の作成：ウサギ(日本白色種)にGluN2B-NT2ペプチド(KERKWERVGVKWKDK)を用いて2週間おき5回免疫し、血清からProtein

- in A 精製によりポリクローナルIgG抗体(ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体)を得た。
2. ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体の特性：ELISAで抗体がGluN2B-NT2ペプチドと反応することを確認した後、GluN2B及びGluN1を発現するHEK細胞と反応することをcell-based assayで確認した。
  3. Passive transfer：SPFマウスはCrl:CD(1CR)(IGS)を用い、予め脳内にカニユーラを留置した。マウスを、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体(蛋白濃度18.9 mg/mL、 $1 \mu\text{l}/1$ 回投与)投与群、正常ウサギ血清Protein A分画(蛋白濃度11.6 mg/mL、 $1 \mu\text{l}/1$ 回投与)投与群、生理食塩水( $1 \mu\text{l}/1$ 回投与)投与群(各群5匹)に分けた。マウス脳には、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体などをDay 0(初回投与日)、Day 7、Day 14及びDay 21に計4回、イソフルラン吸入麻酔下で、カニユーラを経て投与した。
  4. 一般状態の観察：一般症状の有無(立毛、低体温、呼吸数)、眼症状の有無(眼瞼閉鎖、眼球突出)、分泌症状の有無(流涎、排尿、下痢)、中枢興奮の有無(振戦、痙攣)、運動障害の有無(異常歩行)、運動性(自発運動)を観察した。
  5. Irwin法による観察：行動的プロフィール、神経的プロフィール、自律神経的プロフィールを定法に従い、pre(Day -1)、Day 1、Day 4、Day 7、Day 14及びDay 21の抗体などのカニユーラ投与前に盲検下にて観察実施した。
  6. 脳の採取：Day 22に脳(嗅球を除く)を摘出し、ブレインマトリックスにセットして、投与部位を約3 mmの厚さにスライスした(凍結切片用)。凍結切片用以外の脳は、前方を凍結保存、後方を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。
  7. 免疫染色：スライスした脳をドライアイス上で凍結用包埋皿にコンパウンドを満たして包埋し、投与部位についてはクリオスタットで切片を作製、作製した切片のうち、1枚は常法に従いIHE染色を施し、投与部位

を確認、残りの切片は、免疫染色を施し、ウサギIgGの海馬への集積の有無を顕微鏡下で確認した。

8. マイクロアレイ解析: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。
9. マイクロアレイ統計解析: T検定で、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群、正常ウサギ血清Protein A fraction投与群について、遺伝子発現量の変化の有意差検定を実施した。

(倫理面への配慮)

本試験は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(承認番号2013-111)。なお、当試験施設はAAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International、国際実験動物管理公認協会)の認証を取得した施設で行った(認証番号:001182)。

## C. 研究結果

### 1. ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体の特性

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、次に免疫ウサギ血清をProtein A 精製した分画(ポリクロナルIgG)の中にもGluN2B-NT2ペプチド反応する抗体が含まれることをELISAで確認した。次にGluN1とGluN2Bを発現するHEK細胞を用いたcell-based assayで、Protein A 精製IgGがNMDA型Glu

Rと反応することを確認し、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体を得た(図1)。

### 2. Passive transferマウスの一般状態

一般状態に特筆すべき異常は認められず、投与期間中の体重値は経日的に増加した。

### 3. Passive transferマウスのIrwin法による観察

ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群でのみ拳尾反応がDay 1、4、7、14及び21に観察された。拳尾反応は、GluN2B-NT2抗体投与後Day 1では5/9匹のマウスに出現、Day 4では一部のマウスで消褪し1/9匹に観察されたが、Day 7には出現頻度が5/9匹と増加し、Day 14には6/9匹、Day 21日には7/9匹となった。Day7-21では正常ウサギ血清Protein A 分画投与群に比べて有意に高頻度であった(Mann Whitney test、 $p=0.0114, 0.0032, 0.0032$ )。拳尾反応は抗ヒトGluN2B-NT2抗体の繰り返し投与により経日的に頻度が増加した(Two-way ANOVA (図2))。その他のIrwin法による観察項目に有意な変化はなかった。

### 4. 脳組織所見

カニューラは海馬に到達しており、生理食塩水、正常ウサギ血清Protein A 分画、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体は海馬に投与されていた。免疫染色では投与1時間では海馬神経細胞付近にウサギIgGが見られたが、Day 22では消失していた。

Day 22の剖検時に各群の代表5例について評価を行った。投与部位の炎症細胞(好中球、好酸球及び単核細胞)浸潤は、生理食塩水投与群の4例で軽度、正常ウサギ血清Protein A 分画投与群の1例で軽度、3例で中等度、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群の全例で軽度に認められた。海馬領域では、血管周囲性炎症細胞(好中球、好酸球及び単核細胞)浸潤が生理食塩水投与群の1例で軽度、正常ウサギ血清Protein A 分画投与群の4例で軽度に認められた。脳室周囲の炎症細胞(好中球、好酸球及び単核細胞)浸潤は、生理食塩水投与群の全例で軽度、正常ウサギ血清Protein A 分画投与群の2例で軽度、3例で中等度、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投

与群の4例で軽度、1例で中等度に認められた。軟膜の炎症細胞浸潤は、正常ウサギ血清Protein A 分画投与群の2例で軽度、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群の1例で軽度に認められた。免疫染色では、生理食塩水投与群、正常ウサギ血清Protein A 分画投与群、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群の全例でウサギIgGは陰性であった(表1)。3群で組織的变化の大きな違いは認めなかった。

#### 5. マイクロアレイ解析

各群の脳組織から抽出したRNAのTotal RNA quality checkは問題がなかった。ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群と生理食塩水投与群の比較では、2倍以上に発現増加した遺伝子が1000-10000遺伝子あり、発現減少した遺伝子が400-2000遺伝子あった。ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群と正常ウサギ血清Protein A 分画投与群の比較では、2倍以上に発現増加した遺伝子が300-10000遺伝子あり、発現減少した遺伝子が800-6000遺伝子あった。

有意差検定では、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(表2)、*trappc2*、*pde5a*、*cwc22*、*nphs2*、*morn2*、*naaladl2*、*foxj1*、*gin1*、*ogn*、*gm6280*などの発現増加が認められた(表3)。

#### D. 考察

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、海馬には生理食水投与群、正常ウサギ血清Protein A 分画投与群と同程度の組織炎症変化が見られたに過ぎないが、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。

免疫組織検討からは、ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体海馬投与初期には海馬に抗体が見られたが、投与開始22日後には消失し、NMDA型GluRに結合して内在化されてしまったものと推測

される。

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*、*fam53b*の発現低下が見られたが、*napa*はヒトではシナプス放出系のタンパク質-SNAPにあたり、その発現低下はシナプス小胞のリサイクルに障害をもたらす、シナプス機能低下につながる可能性がある。*sv2c*はヒトでは線条体などで発現するシナプス小胞タンパク質にあたり、*glutamate*よりもGABAを輸送するシナプス小胞に多く含まれ、*sv2c*の低下は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。*Pam1*は $Ca^{2+}$ 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<sub>A</sub>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。

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、*trappc2*、*pde5a*、*cwc22*、*nphs2*、*morn2*、*naaladl2*、*foxj1*、*gin1*、*ogn*、*gm6280*などの発現増加が見られたが、*Trappc2*は粗面小胞体からゴルジへの輸送に関与、*Cwc22*はmRNAスプライシングに関与するが、海馬組織侵襲の回復のための普遍的なタンパク合成の増加を起こしている可能性がある。*Nphs2*はシナプス形成に関与するが、修復機構を担っている可能性がある。

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*などのタンパク質の低下をもたらす、NHAI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4)。しかしこの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あり、NMDA型GluR抗体のみならず、複数の病態因子があると思われる。病態をさらに検討し、脳炎の予後を改善したい。

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。

#### E. 結論

GluN2B-NT2抗体は、NMDA型GluRの内在化、シナプス・イオンチャネル関連遺伝子発現変化を起こし、興奮性の行動変化をもたらす可能性が示唆された。GluN2Bの細胞外ドメイン（N末）抗体はNMNHALEなどの神経症状の一部を担っていると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yoshiaki Yamamoto, Yukitoshi Takahashi, et al., Interaction between sulthiame and clobazam: Sulthiame inhibits the metabolism of clobazam, possibly via an action on CYP2C19, *Epilepsy & Behavior*, 2014; 34: 124-126.
2. Armangue T, Takahashi Y, et al., A novel treatment-responsive encephalitis with frequent opsoclonus and teratoma. *Ann Neurol*. 2014; 75(3): 435-441.
3. Kimura N, Takahashi Y. et al., Brain perfusion SPECT in limbic encephalitis associated with autoantibody against the glutamate receptor epsilon 2. *Clin Neurol Neurosurg*. 2014; 118: 44-48.
4. Yamaguchi Y, Takahashi Y, et al., Multifocal Encephalopathy and Autoimmune-mediated Limbic Encephalitis Following Tocilizumab Therapy. *Intern Med*. 2014; 53(8): 879-882.
5. Mayumi Ueta, Yukitoshi Takahashi, et al., Independent strong association of HLA-A\*02:06 and HLA-B\*44:03 with cold medicine-related Stevens-Johnson syndrome with severe mucosal involvement, *Scientific Reports*, 2014 Apr 30;4: 4862. doi: 10.1038/srep04862.
6. Koji Fujita, Yukitoshi Takahashi, et al., Neuronal Antibodies in Creutzfeldt-Jakob Disease, *JAMA Neurology*, 2014; 71(4): 514. doi:10.1001/jamaneurol.2014.27.
7. Kazuyuki Inoue, Takahashi Yukitoshi, et al., Influence of Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase 2B7 -161C>T Polymorphism on the Concentration of

- Valproic Acid in Pediatric Epilepsy Patients, *Therapeutic Drug Monitoring*, 2014; 36: 406-409.
8. Wen-Hung Chung, Yukitoshi Takahashi, et al., Genetic Variants Associated With Phenytoin-Related Severe Cutaneous Adverse Reactions, *JAMA*. 2014; 312(5): 525-534. doi:10.1001/jama.2014.7859.
  9. Rumiko Takayama, Yukitoshi Takahashi, et al., Long-term course of Dravet syndrome: a study from an epilepsy center in Japan, *Epilepsia*, 2014; 55 (6): 942-943.
  10. Kengo Moriyama, Yukitoshi Takahashi, et al., Another case of respiratory syncytial virus-related limbic encephalitis, *Neuroradiology* 2014; 56 (5): 435-436. DOI 10.1007/s00234-014-1350-2.
  11. Kazuyuki Inoue, Yukitoshi Takahashi, et al., 4217C>A polymorphism in carbamoyl-phosphate synthase 1 gene may not associate with hyperammonemia development during valproic acid-based therapy, *Epilepsy Research*, 2014; 108(6): 1046-1051.
  12. Sakakibara E, Takahashi Y, et al., Chronic periodic lateralised epileptic discharges and anti-N-methyl-D-aspartate receptor antibodies. *Epileptic Disord. Epileptic Disord*. 2014; 16(2): 218-222. doi: 10.1684/epd.2014.0655
  13. Yoshiaki Yamamoto, Yukitoshi Takahashi, et al., Impact of cytochrome P450 inducers with or without inhibitors on the serum clobazam level in patients with antiepileptic polypharmacy, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2014; 70 (10): 1203-1210.
  14. Takeshi Kondo, Yukitoshi Takahashi, et al., Limbic encephalitis-associated relapsing polychondritis responded to infliximab and maintained its condition without recurrence after discontinuation -a case report and review of the literature, *Nagoya journal*, 2014; 76(3-4): 361-368.
  15. Nobusuke Kimura, Yukitoshi Takahashi, et al., Developmental outcome after surgery in focal cortical dysplasia patients with early-onset epilepsy, *Epilepsy Research*, 2014; 108(10): 1845-1852.
  16. Hayata Y, Takahashi Y. et al., Anti-glutamate epsilon 2 receptor antibody positive and anti-NMDA receptor antibody negative lobar encephalitis presenting as global aphasia and swallowing apraxia. *Case Rep Neurol*, 2014; 6: 291-296.
  17. Kazushi Miya, Yukitoshi Takahashi,

- Hisashi Mori, Anti-NMDAR autoimmune encephalitis, *Brain & Development*, 2014; 36(8): 645-652.
18. Hiroyuki Fujita, Y. Takahashi, et al., The serum level of HMGB1 (high mobility group box 1 protein) is preferentially high in drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms, *British Journal of Dermatology*, 2014 Dec;171(6):1585-1588. doi: 10.1111/bjd.13162. Epub 2014 Oct 27.
  19. Chiba Yuhei, Takahashi Yukitoshi, et al., Lymphopenia Helps Early Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus for Patients with Psychosis as an Initial Symptom, *Psychosomatics*, in press, 2013 Sep 23. doi:pil: S0033-3182(13)00136-9. 10.1016/j.psych. .
  20. Yoshiaki Yamamoto, Yukitoshi Takahashi, et al., Individualized phenytoin therapy for pediatric Japanese epilepsy patients based on CYP2C9 and CYP2C19 genotypes, *Therapeutic Drug Monitoring*, in press.
  21. Takahiro Furukawa, Yukitoshi Takahashi, et al., Increased proinflammatory cytokines in sera of patients with multifocal motor neuropathy, *J Neurol Sci*. 2014 Aug 4. pii: S0022-510X(14)00505-X. doi: 10.1016/j.jns.2014.07.059.
  22. Hiroshi Sakuma, Yukitoshi Takahashi, et al., Intrathecal overproduction of pro-inflammatory cytokines and chemokines in febrile infection related refractory status epilepticus, *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, in press.
  23. Yoshiaki Yamamoto, Yukitoshi Takahashi, et al., Influence of uridine diphosphate glucuronosyltransferase inducers and inhibitors on the plasma lamotrigine concentration in pediatric patients with refractory epilepsy, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, in press.
  24. Masaki Yoshimura, Yukitoshi Takahashi, et al., An analysis of epileptic negative myoclonus by magnetoencephalography, *Epilepsy Research*, in press.
  25. Norimichi Higurashi, Yukitoshi Takahashi, et al., Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in PCDH19 female epilepsy, *Seizure*, in press.
  26. Matsumoto R, Takahashi Y, et al., Possible induction of multiple seizure foci due to parietal tumour and anti-NMDAR antibody. *Epileptic Disord*. 2015 Feb 3, in press.
  27. Yoshiki Kawamura, Yukitoshi Takahashi, et al., Pathogenic role of human herpesvirus 6B infection in mesial temporal lobe epilepsy, *Journal of infectious disease*, in press.
  28. 高橋幸利、東本和紀、てんかん、編集、山崎麻美、坂本博昭、小児脳神経外科学（改訂2版）、金芳堂、p、印刷中。
  29. 高橋幸利、渡辺陽和、2脳炎-1総論、編集：兼本浩祐、他、「臨床てんかん学」、医学書院、p、印刷中。
  30. 高橋幸利、大星大観、2脳炎-2免疫介在性脳炎（小児）、編集：兼本浩祐、他、「臨床てんかん学」、医学書院、p、印刷中。
  31. 高橋幸利、西田拓司、山口解冬、自己免疫性脳炎、編集：辻省次、吉良潤一、アクチユアル脳・神経疾患の臨床、免疫性神経疾患 病態と治療のすべて、中山書店、印刷中。
  32. 高橋幸利、山口解冬、難治性てんかんの病態を探る-脳炎後てんかんと免疫、脳と発達、2014；46：195-201。
  33. 高橋幸利、他、てんかんー基礎・臨床研究の最新知識- -10. 抗てんかん薬の副作用、日本臨床、2014：72：908-919。
  34. 神里尚美、高橋幸利、他、両手指の麻痺性拘縮を呈した抗 NMDA 型グルタミン酸受容体抗体陽性脳炎の一例、沖縄県立南部医療センター・こども医療センター雑誌、2014；7：13-17。
  35. 戸島麻耶、高橋幸利、他、急性無菌性髄膜脳炎の経過中に局所性皮質反射性ミオクローヌスを呈し抗グルタミン酸受容体抗体が検出された2例、臨床神経学、54：543-549, 2014。
  36. 高橋幸利、他、抗てんかん薬の薬物動態・薬剤相互作用、小児内科、2014；46：1238-1241。
  37. 横山桃子、高橋幸利、他、水痘に続発して起こった非ヘルペス性辺縁系脳炎の4歳女児例、小児科臨床、2014;67(9):1481-1486。
  38. 高橋幸利、他、免疫介在性神経疾患、小児感染免疫、2014；26：403-414。
  39. 関谷芳明、高橋幸利、他、甲状腺クリーゼに抗 NMDA 受容体脳炎を併発した1例、日本集中治療医学会雑誌、2014；21：659-660。
  40. 許全利、高橋幸利、他、高齢男性に発症した抗 NMDA 受容体脳炎の症例、老年精神医学雑誌、2014；25（10）：1153-1159。
  41. 真野ちひろ、高橋幸利、他、subclinical seizure が観察された非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の1症例、小児科臨床、2014；67：2153-2158。
  42. 長濱明日香、高橋幸利、他、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の症状を呈した橋本脳症の1小児例、小児科臨床 2014；67(11): 2145-2151。
  43. 高橋幸利、他、小児の慢性進行性持続性部分てんかん・非進行性持続性部分てんかん：Rasmussen 症候群を主体に、別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ、2014；31：41-46。

44. 高橋幸利、他、神経疾患と NMDA 型グルタミン酸受容体抗体、日本小児科学会誌、2014 ; 118 ( 12 ) : 1695-1707.
  45. 高橋幸利、他、新しい抗てんかん薬の適応と使い方、小児科診療、2015; 78: 207-214.
  46. 朱膳寺圭子、高橋幸利、他、前頭葉に病変が及んだ非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の 1 例、東京女子医科大学雑誌、2014; 84(s1): 197-203.
  47. 保坂孝史、高橋幸利、他、先行感染後に opsoclonus-myooclonus syndrome を認め、髄液中の抗 GluR 2 抗体と GluR 2 抗体が陽性であった 1 例、運動障害、2014 ; 24(1):1-6.
  48. 出口健太郎、高橋幸利、他、卵巣奇形腫摘出術後に痙攣重積状態をきたした抗 NMDA 受容体脳炎の 1 例、ICU と CCU、2014;38(9): 648-651.
  49. 宮城哲哉、高橋幸利、他、失語発作を主症状とする成人型ラスムッセン症候群の一例、てんかん研究、2015 ; 32 : 556-563.
  50. 西口亮、高橋幸利、他、両側耳介軟骨炎に抗グルタミン酸受容体 (GluR 2) 抗体陽性の非ヘルペス性急性辺縁系脳炎を合併した 1 例、臨床神経学、印刷中.
  51. 高橋幸利、他、自己免疫性脳炎、Medical Practice、印刷中
  52. 上野弘恵、高橋幸利、他、めまいで発症し亜急性に四肢の筋力低下・歩行障害が進行した橋本脳症の 1 男児例、脳と発達、印刷中.
  53. 高橋幸利、他、増刊号：免疫性神経疾患-基礎・臨床研究の最新知見- Rasmussen 症候群 (脳炎)、日本臨床、印刷中.
2. 学会発表
    1. 高橋幸利、難治てんかんの病態・治療 - 脳炎後てんかんとスパズム-、Shizuoka-Kumamoto collaboration meeting of epilepsy towards better community healthcare 第 1 回勉強会、2014 年 4 月 25 日、熊本.
    2. 高橋幸利、他、シンポジウム 3 脳炎後てんかんの病態・治療を探る、免疫病態、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松.
    3. 高橋幸利、薬事委員会主催セミナー、Rasmussen 症候群に対するタクロリムスの有効性、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松.
    4. Yuki toshi Takahashi, Pre-congress symposium: Update of Rasmussen syndrome: Immunopathogenesis, The 48th Congress of the Japan Epilepsy Society, Oct 1st-3rd 2014, Tokyo.
    5. 高橋幸利、他、シンポジウム 5 VGKC 複合体等に関連する免疫介在性亜急性脳炎とてんかん：VGKC 複合体抗体陽性例の NMDA 型 GluR 抗体の意義、第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014 年 10 月 2-3 日、東京.
  6. 高橋幸利、NMDA 型 GluR 抗体の機能解明 in vitro & in vivo、第 44 回日本臨床神経生理学会学術大会 教育講演、2014 年 11 月 19-21 日、福岡.
  7. 高橋幸利、他、HPV ワクチン後に中枢神経症状が出現した症例のステロイドパルス治療、ワークショップ「Human Papillomavirus (HPV) ワクチン関連神経免疫異常症候群(HANS: ハンス症候群)」、第 29 回日本臨床リウマチ学会、2014 年 11 月 30 日、福岡.
  8. 高橋幸利、脳炎と脳炎後てんかんの病態・治療、第 9 回日本てんかん学会中国・四国地方会、2015 年 2 月 7 日、徳島.
  9. 高橋幸利、NMDA 型 GluR 免疫と疾患、第 49 回慶應ニューロサイエンス研究会、2015 年 2 月 21 日、東京.
  10. 小池大輔、高橋幸利、他、早期の治療介入により良好な経過をたどったインフルエンザワクチン後非ヘルペス性辺縁系脳炎の 1 例、第 93 回山陰小児科学会、2014 年 4 月 6 日
  11. 村田強志、高橋幸利、他、特異な橋病変を呈した自己免疫関連性脳炎の一例、日本内科学会総会、2014 年 4 月 11-13 日、東京.
  12. 高橋幸利、他、NMDAR 抗体陽性非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の早期診断：先行症状期血液検査値の検討、第 117 回日本小児科学会学術集会、2014 年 4 月 11-13 日、名古屋.
  13. 藤田貴子、高橋幸利、他、当院における突発性発疹症の神経合併症、第 117 回日本小児科学会学術集会、2014 年 4 月 11-13 日、名古屋.
  14. 河村吉紀、高橋幸利、他、内側側頭葉硬化症発症におけるヒトヘルペスウイルス 6B の役割、第 117 回日本小児科学会学術集会、2014 年 4 月 11-13 日、名古屋.
  15. 大久保真理子、高橋幸利、他、両側性の Epilepticus Partialis Continua を呈した 1 例、第 64 回多摩小児神経懇話会、2014 年 4 月 19 日、八王子.
  16. 山田舞乃、高橋幸利、他、当院での自己免疫性脳炎の経過 抗 NMDA 受容体脳炎は再発に注意が必要である、第 55 回日本神経学会学術大会、2014 年 5 月 22-24 日、福岡.
  17. 上野弘恵、高橋幸利、他、橋本脳症の 1 男児例-小児における橋本脳症の臨床像の検討-、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松.
  18. 鳥巢浩幸、高橋幸利、他、小児多発性硬化症における治療抵抗性の検討、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松.
  19. 中野祐子、高橋幸利、大脳皮質に限局した病変を示した自己免疫性辺縁系脳炎の 1 例、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松.
  20. 西倉紀子、高橋幸利、他、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎 7 例の臨床的検討、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松.

21. 森山剣光、高橋幸利、他、RS ウイルス感染関連 NMDA 受容体抗体陽性辺縁系脳炎の 1 例、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松。
22. 渡辺陽和、高橋幸利、他、Rasmussen 症候群のステロイドパルス療法の検討、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松。
23. 佐久間啓、高橋幸利、他、難治頻回部分発作重積型急性脳炎の髄液中におけるインターフェロン誘導性ケモカインの増加、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松。
24. 平澤絢香、高橋幸利、他、WISC- で処理速度低下を示した軽症抗 NMDA 受容体脳炎の一例、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-31 日、浜松。
25. 山口解冬、高橋幸利、他、シンポジウム 3 脳炎後てんかんの病態・治療を探る、脳炎脳症後てんかんの慢性期におけるステロイドパルス治療の経験、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-5 月 31 日、浜松。
26. 谷口祐子、高橋幸利、他、限局性的大脑皮質病変を示した自己免疫性辺縁系脳炎の 1 例、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-5 月 31 日、浜松。
27. 藤井裕士、小林良行、石川暢恒、高橋幸利、グルタミン酸受容体 (GluR) 抗体が陽性であった Late onset Lennox-Gastaut 症候群の 14 歳女児例、第 56 回日本小児神経学会、2014 年 5 月 29-5 月 31 日、浜松。
28. 庄司圭祐、今高橋幸利、他、関節リウマチの免疫療法中に発症した抗グルタミン酸受容体抗体陽性の互急性白質脳症の一例、第 204 回日本内科学会近畿地方会、2014 年 6 月 14 日、大阪。
29. 杉本精一郎、高橋幸利、他、うつ症状を呈した辺縁系脳炎の一症例、第 206 回日本神経学会九州地方会、2014 年 6 月 28 日、宮崎。
30. 小野田統、高橋幸利、他、単純ヘルペス脳炎に続発した抗 NMDA 受容体脳炎の 1 例、第 139 回日本神経学会東海北陸地方会、平成 26 年 7 月 5 日、名古屋。
31. 元木崇裕、高橋幸利、他、免疫グロブリン治療が奏功した抗グルタミン酸受容体抗体陽性のてんかん性脳症の 1 例、第 8 回日本てんかん学会関東・甲信越地方会、2014 年 7 月 11 日。
32. 浅田昌照、高橋幸利、他、抗 NMDA 受容体脳炎による意識障害を呈し診断に難渋した一例、近畿精神医学会、2014 年 7 月 26 日。
33. 高橋幸利、他、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の病態解明：NMDAR 型 GluR 抗体の passive transfer 研究、第 19 回日本神経感染症学会総会・第 26 回日本神経免疫学会、2014 年 9 月 4-6 日、金沢。
34. 高橋幸利、他、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎の病態解明：正常対照の GluR 抗体と年齢、第 19 回日本神経感染症学会総会・第 26 回日本神経免疫学会、2014 年 9 月 4-6 日、金沢。
35. 高橋幸利、他、HPV ワクチン後に中枢神経症状が出現した症例の検討：髄液の自己免疫学的検討、第 19 回日本神経感染症学会総会・第 26 回日本神経免疫学会、2014 年 9 月 4-6 日、金沢。
36. 武久康、高橋幸利、他、NMDA 受容体脳炎の治療とその効果に対する検討、第 19 回日本神経感染症学会総会・第 26 回日本神経免疫学会、2014 年 9 月 4-6 日、金沢。
37. 河村吉紀、高橋幸利、他、内側側頭葉硬化症発症におけるヒトヘルペスウイルス 6B の役割、第 19 回日本神経感染症学会総会、2014 年 9 月 4-6 日、金沢。
38. 先浜大、高橋幸利、他、伝染性単核球症に続発した自己免疫介在性脳炎の 1 例、日本内科学会 第 205 回近畿地方会、2014 年 9 月 20 日、大阪。
39. Yoshiki Kawamura, Yukitoshi Takahashi, 他、Pathogenic role of human herpes virus 6B in mesial temporal sclerosis, 第 48 回日本てんかん学会、2014 年 10 月 2-3 日、東京。
40. 福岡正隆、高橋幸利、他、左右大脳半球に再発性病変を呈し Rasmussen 脳炎が疑われた 1 例、第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014 年 10 月 2-3 日、東京。
41. Kazumi Matsuda, Yukitoshi Takahashi, 他、Pre-congress symposium: Update of Rasmussen syndrome : Update of Rasmussen syndrome : Neuroimaging and histopathology of Rasmussen syndrome, The 48th Congress of the Japan Epilepsy Society, Oct 1st-3rd 2014, Tokyo.
42. 宇田川紀子、高橋幸利、他、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎後に難治てんかんを残した 1 男児例、第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014 年 10 月 2-3 日、東京。
43. 阿部圭市、高橋幸利、他、発作型、焦点、画像上の変化を認めた慢性肉芽腫性脳炎による難治性てんかんに対し側頭葉切除を行った一例、第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014 年 10 月 2-3 日、東京。
44. 東本和紀、高橋幸利、他、髄液中リンパ球表面マーカーの検討：疾病対照の年齢経過、第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014 年 10 月 2-3 日、東京。
45. 山本達也、高橋幸利、他、リツキシマブによる治療を行ったオプソクローヌス・ミオクローヌス症候群の 1 例、第 20 回日本小児神経学会東北地方会、2014 年 10 月 18 日、盛岡。
46. 池田光憲、高橋幸利、他、当センターで経験した非ヘルペス性急性辺縁系脳炎 (NHALE) 9 例の臨床的検討、日本救急医学会総会、2014 年 10 月 28 日。
47. 村上丈伸、高橋幸利、他、特異な橋病変を呈した抗 NMDA 受容体抗体陽性脳炎の一例、臨床神経生理学学会、2014 年 11 月 19-21 日、福岡。
48. 武久康、高橋幸利、他、NMDA 受容体脳炎における脳血量 SPECT、第 26 回日本脳循環代



- 謝学会、2014年11月21-22日、岡山。
49. 布施ひと美、高橋幸利、他、抗てんかん薬により認知機能が改善した抗 NMDA 受容体抗体陽性の側頭葉てんかん、第 27 回日本総合病院精神医学会、2014 年 11 月 28 日、つくば。
  50. 眞山英徳、高橋幸利、NMDA 型 GluR 抗体が検出された髄膜脳炎発症の混合性結合組織病の 1 例、神経学会関東地方会、2014 年 11 月 29 日、東京。
  51. 井上沙織、高橋幸利、他、抗 NR2 抗体陽性辺縁系脳炎に対するシクロフォスファミド大量静注療法が有効であったがループス腎炎が再燃した小児期発症 SLE の一例、日本リウマチ学会関東支部学術集会、2014 年 12 月 14 日、横浜。
  52. 伊藤弘道、高橋幸利、他、VNS により発作頻度、認知行動面に改善が認められた AERRPS の 1 例、第 9 回日本てんかん学会中国・四国地方会、2015 年 2 月 7 日、徳島。
  53. 関口由利子、高橋幸利、他、抗 NMDA 型グルタミン酸受容体抗体陽性であった、非ヘルペス性急性脳炎の 1 女児例、第 32 回日本小児科学会神奈川県地方会、2015 年 2 月 21 日、横浜。
  54. 永迫友規、高橋幸利、他、口唇のけいれんで始まり、失調性構音障害、失読失書・失

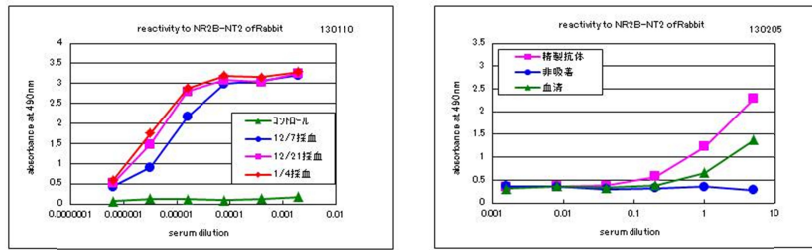
名辞を呈した抗グルタミン酸受容体抗体陽性脳炎、第 212 回神経学会地方会、2015 年 3 月 14 日、東京。

3. 書籍の刊行  
該当なし。

#### H. 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

A. ウサギ血清のGluN2B-NT2抗体(ELISA) B. Protein A精製分画のGluN2B-NT2抗体(ELISA)



C. Protein A精製分画のNMDAR抗体(Cell-based assay)

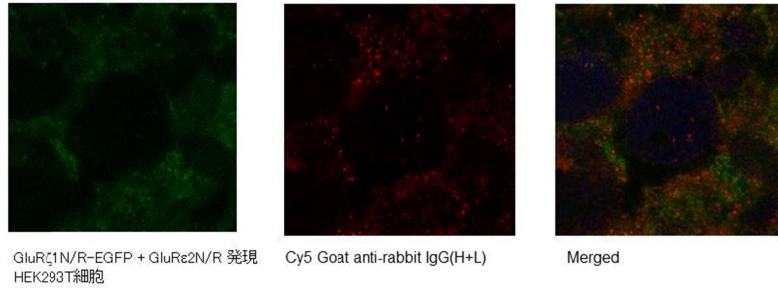


図1. ウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体の特徴.

ELISAによるGluN2B-NT2抗体測定は以下の方法で行った。固相化(0.5 μg/well GluN2B-NT2 peptide)、ブロッキング(0.5%Gelatin/PBS-T)、一次抗体(Protein A精製抗体)、二次抗体(5000倍希釈 HRP標識抗ウサギIgG(H+L))、発色(0.5mg/mL OPD)、反応停止(2N硫酸)、吸光度測定(490nm)

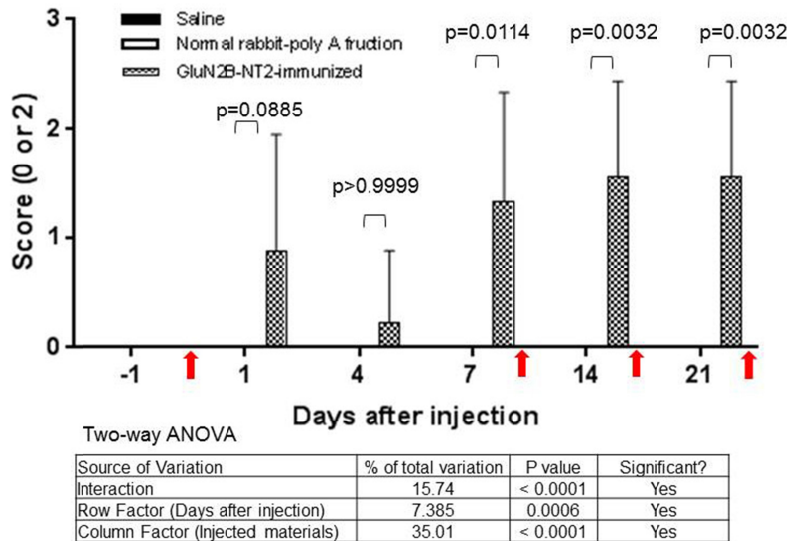


図2. Irwin法による挙尾反応観察.

Saline、生理食塩水投与群、normal rabbit-poly A fraction、正常ウサギ血清をpoly A精製した分画を投与した群、GluN2B-NT2-immunized、GluN2B-NT2ペプチドで免疫したウサギ血清をpoly A精製した分画を投与した群。挙尾反応が見られた場合がscore 2、見られない場合がscore 0となる。赤矢印は投与時期を示す。グラフ内のp値はウサギ抗ヒトGluN2B-NT2抗体投与群と正常ウサギ血清Protein A分画投与群の比較(Mann Whitney test)。

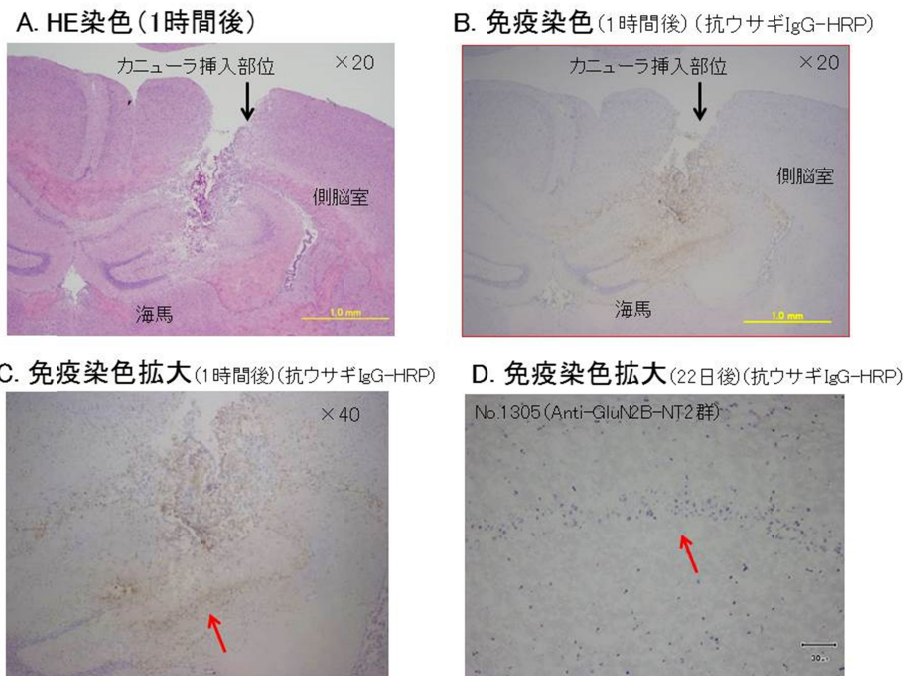


図3. 脳組織所見.

A-Cは投与後1時間の組織所見、Dは投与開始後22日の剖検時の組織所見、Cの矢印はウサギIgG陽性細胞、Dの赤矢印はウサギIgG陰性海馬細胞。

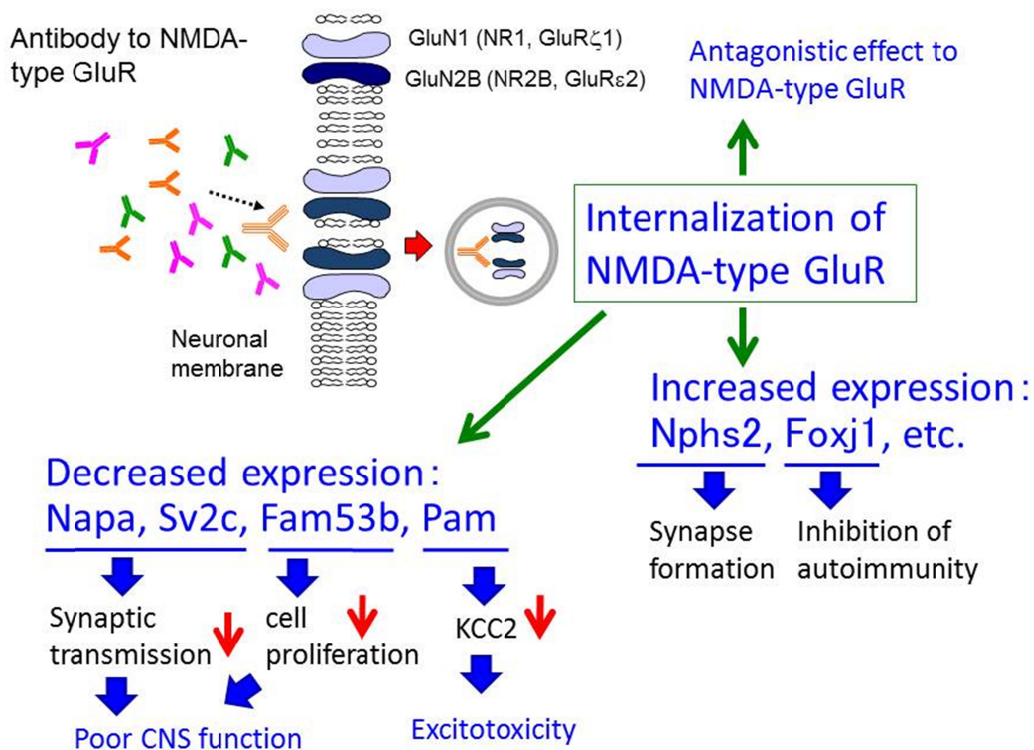


図4. NMDA型GluR抗体の作用仮説

表1. 脳病理組織学的検査

	Saline					Normal rabbit serum protein A fraction					GluN2B-NT2-immunized rabbit protein A fraction				
	1101	1102	1103	1104	1108	1202	1203	1204	1205	1207	1301	1302	1303	1304	1305
Injection site: Inflammatory cell infiltration	1	1	1	1	/	0	2	2	1	2	1	1	1	1	1
Hippocampus: Perivascular inflammatory cell infiltration	0	1	0	0	/	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Lateral ventricle: Inflammatory cell infiltration	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1	2
Leptomeninx: Inflammatory cell infiltration	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Immunostaining of rabbit IgG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

22日：各群の代表5例について評価した。

表2. 有意差検定で発現量低下の見られた遺伝子(T-test)

Description	Gene symbol	蛋白機能
Mus musculus N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein alpha (Napa), mRNA [NM_025898]	Napa	シナプス放出系のタンパク、 $\alpha$ -SNAP: N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha, also known as NAPA or alpha-SNAP
Mus musculus synaptic vesicle glycoprotein 2c (Sv2c), mRNA [NM_029210]	Sv2c	線条体などで発現するシナプス小胞タンパク
Mus musculus peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (Pam), mRNA [NM_013626]	Pam	Pam (Protein associated with Myc)、TSC2と反応する酵素
lincRNA:chr5:137411861-137413010 forward strand		
Mus musculus family with sequence similarity 53, member B (Fam53b), mRNA [NM_212473]	Fam53b	needed for cell proliferation and that it is probably associated with the maintenance of a pluripotent state.

表3. 有意差検定で発現量増加の見られた遺伝子(T-test)

Description	Gene symbol	蛋白機能
Mus musculus trafficking protein particle complex 2 (Trappc2), mRNA [NM_025432]	Trappc2	Spondyloepiphyseal dysplasia (SED) の原因遺伝子、role in <b>endoplasmic reticulum-to-Golgi vesicular transport</b>
Mus musculus phosphodiesterase 5A, cGMP-specific (Pde5a), mRNA [NM_153422]	Pde5a	PDE5A metabolically inactivates the intracellular second messenger cGMP. PDE5A is most highly expressed in smooth muscle, notably in the <b>vasculature</b> .
CWC22 spliceosome-associated protein homolog (S. cerevisiae)	Cwc22	hCWC22 is required for <b>mRNA splicing</b>
Mus musculus nephrosis 2 homolog, podocin (human) (Nphs2), mRNA [NM_130456]	Nphs2	Neph proteins are expressed in the developing nervous system of mammals and suggest that these proteins may have a conserved function in <b>synapse formation or neurogenesis</b> .
Mus musculus trafficking protein particle complex 2 (Trappc2), mRNA [NM_025432]	Trappc2	Spondyloepiphyseal dysplasia (SED) の原因遺伝子、role in <b>endoplasmic reticulum-to-Golgi vesicular transport</b>
Mus musculus MORN repeat containing 2 (Morn2), mRNA [NM_194269]	Morn2	
PREDICTED: Mus musculus N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 2, transcript variant 2 (Naaladl2)	Naaladl2	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase is a membrane-bound brain peptidase which cleaves the neuropeptide N-acetyl-aspartyl-glutamate to N-acetyl-aspartate and glutamate.
Mus musculus forkhead box J1 (Foxj1)	Foxj1	<b>自己免疫抑制遺伝子</b>
Mus musculus 16 days embryo lung cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:8430411H10 product:gross passage A viral integration region 1, full insert sequence. [AK018404]	Gin1	
Mus musculus osteoglycin (Ogn),	Ogn	OG was associated with the vasculature of all the organs analyzed
PREDICTED: Mus musculus predicted gene 6280 (Gm6280), mRNA [XM_886462]	Gm6280	