

抗NMDAR複合体抗体の測定とGluR基礎研究

研究分担者 森 寿

富山大学大学院医学薬学研究部分子神経科学講座 教授

研究要旨

変異型NMDA受容体安定発現細胞を用いて、急性脳炎・脳症患者および統合失調症患者血清中に存在する抗NMDA受容体自己抗体の定量解析を実施した。更に、より簡便で定量的な自己抗体スクリーニング系の開発を目指し、浮遊性培養細胞での変異型NMDA受容体の発現を試みた。

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）

A．研究目的

急性辺縁系脳炎や統合失調症の病態に関わると考えられる抗NMDA受容体（NMDAR）自己抗体を、既に確立した培養細胞アッセイ系を用いて定量解析する。また、病態機構解明のために、NMDAR発現浮遊培養細胞を用いたスクリーニング系を確立して、より簡便な抗体測定系を構築することを目的に研究を行った。

B．研究方法

既に報告した、変異型NMDAR（GluR 2N/R-DsRed と GluR 1N/R-EGFP）を安定的に発現するH EK293細胞株を用いた免疫細胞化学法ならびにOn-cell Western法にて、本邦の症例患者の血清と脳脊髄液中の抗NMDAR抗体の定量的解析、さらに、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。また、浮遊性293F細胞にNMDARの遺伝子発現ベクターを導入し、Cell sorting 法を用いて安定発現細胞株樹立を試みた。

（倫理面への配慮）

本研究には遺伝子組換え実験が含まれるので、本学の組換えDNA実験安全委員会に研究申請を

行い、第二種使用等拡散防止措置の確認を受けて構築した発現ベクターを用いて研究を実施した。

また、使用した患者血清は、本学倫理委倫理委員会ならびに、国立静岡てんかん・神経医療センター等における倫理委員会で承認を受けたものを使用した。

C．研究結果

培養細胞株を用いた自己抗体測定系で、本邦のいくつかの症例で抗NMDAR自己抗体を検出した。また、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。浮遊性293F細胞株を用いた安定発現株の作製では、Cell sorting 法を繰り返したが、NMDARの安定発現細胞株が得られなかった。

D．考察

統合失調症の一部症例に、抗NMDAR抗体が関与したNMDARの機能低下が存在する事が示唆された。今回の症例では、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-セリンの効果をさらに検証する必要がある。また、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につながる可能性がある。一方、浮

遊性293F細胞株を用いた安定発現株が得られなかったことから、この細胞株では、NMDARの発現による細胞生存率の低下か、Cell sorting後の細胞増殖の低下の可能性が示唆された。

E. 結論

培養細胞による自己抗体定量測定系は、非ヘルペス性急性辺縁系脳炎や統合失調症の病態診断、さらには発症機構の解明に資する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tamura, K., Ikutani, M., Yoshida, T., Tanaka-Hayashi, A., Yanagibashi, T., Inoue, R., Nagai, Y., Adachi, Y., Miyawaki, T., Takatsu, K., Mori, H. Increased production of intestinal immunoglobulins in *Syntenin-1*-deficient mice. **Immunobiology** In press.
2. Heresco-Levy, U., Durrant, A. R., Ermilov, M., Javitt, D. C., Miya, K., Mori, H. Clinical and electrophysiological effects of D-serine in a schizophrenic patient positive for anti N-methyl-D-aspartate receptor antibodies. **Biological Psychiatry** 77:e27-e29, 2015.
3. Yamamoto, S., Niida, S., Azuma, E., Yanagibashi, T., Muramatsu, M., Huang, T-T., Sagara, H., Higaki, S., Ikutani, M., Nagai, Y., Takatsu, K., Miyazaki, K., Hamashima, T., Mori, H., Matsuda, N., Ishii, Y., Sasahara, M. Inflammation-induced endothelial cell-derived extracellular vesicles modulate the cellular status of pericytes. **Sci. Rep.**, 5:8505, 2015.
4. Tanaka-Hayashi, A., Hayashi, S., Inoue, R., Ito, T., Konno, K., Yoshida, T., Watanabe, M., Yoshimura, T., Mori, H. Is D-aspartate produced by glutamic-oxaloacetic transaminase-1 like 1 (Got111), a putative aspartate racemase? **Amino Acids** 47: 79-86, 2015.
5. Kambara, K., Ohashi, W., Tomita, K., Takashina, M., Fujisaka, S., Hayashi, R., Mori, H., Tobe, K., Hattori, Y. *In vivo* depletion of CD206⁺ M2 macrophages exaggerates lung injury in endotoxemic mice. **Am. J. Pathol.** 185: 162-171, 2015.
6. Dikopoltsev E, Foltyn VN, Zehl M, Jensen ON, Mori H, Radziszewsky I, Wolosker H. FBXO22 Protein Is Required for Optimal Synthesis of the N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) Receptor Coagonist D-Serine. **J Biol Chem.** 289(49):33904-15, 2014.
7. Mano H, Ishimoto T, Okada T, Toyooka N, Mori H. Discovery of novel adenylyl

cyclase inhibitor by cell-based screening. **Biol Pharm Bull.** 37:1689-1693, 2014.

8. Tabata-Imai A, Inoue R, Mori H. Increased sensitivity to inflammatory pain induced by subcutaneous formalin injection in serine racemase knock-out mice. **PLoS One.** 9:e105282, 2014.
9. Mori H., Wada R, Li J, Ishimoto T, Mizuguchi M, Obita T, Gouda H, Hirono S, Toyooka N. In silico and pharmacological screenings identify novel serine racemase inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett.** 24: 3732-3735, 2014.
10. Tabata T, Yamaguchi Y, Hata Y, Ichida F, Mori H. Modification of KCNH2-encoded cardiac potassium channels by KCNE1 polymorphism. **Circ J.** 8: 2331, 2014.
11. Kinoshita K, Komatsu T, Nishide K, Hata Y, Hisajima N, Takahashi H, Kimoto K, Aonuma K, Tsushima E, Tabata T, Yoshida T, Mori H., Nishida K, Yamaguchi Y, Ichida F, Fukurotani K, Inoue H, Nishida N. A590T mutation in KCNQ1 C-terminal helix D decreases IKs channel trafficking and function but not Yotiao interaction. **J Mol Cell Cardiol.** 72: 273-280, 2014.
12. Hata Y., Mori H., Tanaka A., Fujita Y., Shimomura T., Tabata T., Kinoshita K., Yamaguchi Y., Ichida F., Kominato Y., Ikeda N., Nishida, N. Identification and characterization of a novel genetic mutation with prolonged QT syndrome in an unexplained postoperative death. **Int. J. Legal Med.** 128: 105-115, 2014.
13. Inoue R, Yoshihisa Y, Tojo Y, Okamura C, Yoshida Y, Kishimoto J, Luan X, Watanabe M, Mizuguchi M, Nabeshima Y, Hamase K, Matsunaga K, Shimizu T, Mori H. Localization of serine racemase and its role in the skin. **J Invest Dermatol.** 134: 1618-1626, 2014.
14. Yamaguchi, Y., Nishide, K., Kato, M., Hata, Y., Mizumaki, K., Kinoshita, K., Nonobe, Y., Tabata, T., Sakamoto, T., Kataoka, N., Nakatani, Y., Ichida, F., Mori, H., Fukurotani, K., Inoue, H., Nishida, N. Glycine/serine polymorphism at position 38 influences KCNE1 subunit's modulatory actions on rapid and slow delayed rectifier K⁺ currents. **Circ. J.** 78: 610-618, 2014.
15. Miya K., Takahashi Y, Mori H. Anti-NMDAR autoimmune encephalitis. **Brain Dev.** 2014 Sep; 36(8): 645-652.

2. 学会発表

1. 森寿. セリンラセマーゼと D-セリンの生体機能; 第 87 回日本薬理学会年会; 2014 Mar.19; 仙台.
2. 和田亮吾, 李杰, 合田浩明, 広野修一, 水口峰之, 豊岡尚樹, 森寿. セリンラセマーゼ新規阻害剤の開発; 第 87 回日本薬

- 理学会年会; 2014 Mar.19; 仙台.
3. 草開祥平, 渡辺祐紀, 種市尋宙, 田中朋美, 田仲千秋, 宮一志, 森寿, 足立雄一. ステロイドパルス療法 of 反復が有効であった抗 NMDA 受容体抗体陽性辺縁系脳炎の 11 歳男児例; 第 56 回小児神経学会学術集会; 2014 May 29; 浜松.
 4. H Mori, A Tabata-Imai, R Inoue. Increased sensitivity to inflammatory pain induced by subcutaneous formalin injection in serine racemase KO mice; IDAR2014; 2014 Sep 4; 宇都宮.
 5. 石本哲也, 眞野寛生, 森寿. スプリットルシフェラーゼを用いたマウス脳内 CREB のリン酸化イメージング; 第 37 回日本神経科学大会; 2014 Sep 11; 横浜.
 6. 井上蘭, 田中-林亜由美, 森寿. ストレスによる恐怖記憶制御における扁桃体外側核グルココルチコイド受容体の役割; 第 37 回日本神経科学大会; 2014 Sep 11; 横浜.
 7. 笹原正清, Chung Thanh Dang, 石井陽子, 濱島丈, 山本誠士, 大川宣昭, 斎藤喜人, 井ノ口馨, 森寿. PDGFR- α の不活化は OPC の分化, および間葉系幹細胞の動員と OPC への分化を誘導する; 第 37 回日本神経科学大会; 2014 Sep 11; 横浜.
 8. 塩田倫史, 笹原正清, 森寿, 福永浩司. 細胞内におけるドパミン D2L 受容体の新しい活性化機構; 第 37 回日本神経科学大会; 2014 Sep 11; 横浜.
 9. 福地守, 前畑陽祐, 和泉宏謙, 田中亜由美, 井上蘭, 森寿, 田淵明子, 津田正明. PACAP による BDNF 遺伝子発現誘導-生物発光イメージングを利用した解析; 2014 Sep 12; 横浜.
 10. 田中-林亜由美, 井上蘭, 吉田知之, 林修平, 伊藤智和, 吉村徹, 森寿. Got111 ノックアウトマウスの解析; 第 87 回日本生化学会; 2014 Oct 18; 京都.
 11. T Ishimoto, H Mano, H Mori. In vivo imaging of CREB phosphorylation using a novel transgenic mouse line expressing bioluminescence probes; Society For Neuroscience; 2014 Nov 15; Washington DC.
 12. 吉田知之, 城島知子, 山崎真弥, 阿部学, 山形敦史, 深井周也, 森寿, 崎村建司, 岩倉洋一郎, 三品昌美. インターロイキン-1 受容体ファミリータンパク質による中枢シナプス形成の調節; 第 37 回日本分子生物学会年会 ワークショップ; 2014 Nov 26; 横浜.
- 書籍の刊行
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得、出願
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし