

抗NMDAR複合体抗体の測定とGluR基礎研究

研究分担者 森 寿¹

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、デルタ型グルタミン酸受容体の発現を試みた。

研究協力者：宮 一志²、田村 賢太郎³、（1 富山大学大学院医学薬学研究部分子神経科学講座、2 富山大学大学院医学薬学研究部小児科学講座・助教、3 富山大学大学院医学薬学研究部小児科学講座・医員）

A．研究目的

急性辺縁系脳炎の病態に関わると考えられる抗NMDA受容体（NMDAR）自己抗体を、既に確立した接着性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ならびにデルタ型グルタミン酸受容体（GluR）発現浮遊性培養細胞株を樹立し、Flow Cytometryによる評価が可能なスクリーニング系を確立して、より定量性が高く簡便な自己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HEK293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、大分大学と共同したアジア地域の原因不明脳炎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ならびにデルタ型GluRの遺伝子発現ベクターを導入して、Cell Sorting法を用いて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、アジア地域の原因不明脳炎の多数サンプル解析では、抗NMDAR自己抗体の検出頻度ならびに抗体価が非常に低い事が明らかとなった。一方、イスラエルの統合失調症患者では、1名で抗NMDAR抗体を検出した。浮遊性293F細胞株を用いた安定発現株の作製では、デルタ型GluRでは、約50%の細胞でデルタ型GluRを発現する安定発現細胞株を

得た。一方、NMDARの安定発現細胞株は得られなかった。

D. 考察

アジア地域での原因不明脳炎では、抗NMDAR自己抗体がほとんど検出されなかったことから、解析前に患者の臨床情報を十分に吟味する必要が示唆された。一方、統合失調症の一部には抗NMDAR抗体が関与する可能性が示された。この症例では、NMDARの機能を向上させるD-セリンの投与が症状の軽減に有効であったことから、さらに症例を増やしてD-セリンの効果を検証する必要がある。また、この患者の抗体の作用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の病態機構の理解につながる可能性がある。また、デルタ型GluRの安定発現細胞株を用いて自己抗体を計測し、抗体の作用機構をあきらかにすることで、小脳が関わる運動障害の病態過程の診断と発症機構の解明に資すると考えられる。一方、NMDARについては、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、今後更なる検討が必要と考えられる。

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、統合失調症、小脳性の運動障害の病態診断、病態の発症機構解明に資する。

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, V. N., Zehl, M., Jensen, O. N., Mori, H., Radziszewsky, I., Wolosker, H. FBXO22 is required for optimal synthesis of the NMDA receptor co-agonist D-serine. **J. Biol. Chem.** 289: 33904-33915, 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., Hirano, S., Toyooka, N. In silico and pharmacological screenings identify novel serine racemase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 24:3732-5, 2014.
10. Tabata, T., Yamaguchi, Y., Hata, Y., Ichida, F., Mori, H. Modification of KCNH2-Encoded Cardiac Potassium Channels by KCNE1 Polymorphism - Reply - **Circ. J.** 78: 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 I_{Ks} 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. (Review) **Brain Dev-JPN.** 36: 645-652, 2014.
16. Mori, D., Ranawaka, U., Yamada, K., Rajindrajith, S., Miya, K., Kumara, H., Perera, K., Matsumoto, T., Dassanayake, M., Mitui, M. T., Mori, H., Nishizono, A., Söderlund-Venermo, M., Ahmed, K. Human Bocavirus in Patients with Encephalitis, Sri Lanka, 2009–2010. **Emerg. Infect. Dis.** 19: 1859-1862, 2013.
17. Horio, M. Mori, H., Hashimoto, K. Is D-Cycloserine a Prodrug for D-Serine in the Brain? **Biol. Psychiatry.** 73:e33-e34, 2013.
18. Horio M, Ishima T, Fujita Y, Inoue R, Mori H., Hashimoto K. Decreased levels of free D-aspartic acid in the forebrain of serine racemase (Srr) knock-out mice. **Neurochem. Int.** 62: 843-847, 2013.
19. Rosenberg D, Artoul S, Segal AC, Kolodney G, Radziszewsky I, Dikopoltsev E, Foltyn VN, Inoue R, Mori H., Billard JM, Wolosker H. Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity. **J Neurosci.** 33:3533-44, 2013.
20. LeMaistre, J. L., Lu, L., Anderson, H.D.I., Mori, H., Anderson, C.M. Astrocyte-induced cortical vasodilation is mediated by D-serine and endothelial nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 110:3149-3154, 2013.
21. Kinoshita, K., Yamaguchi, Y., Nishide, K., Kimoto, K., Nonobe, Y., Fujita, A., Asano, K., Tabata, T., Mori, H., Inoue, H., Hata, Y., Fukurotani, K. and Nishida, N. A novel missense mutation causing-a-go-go-related gene channel. **J. Cardiovasc. Electrophysiol.** 23: 1246-1253, 2012.
22. Wolosker, H. and Mori, H. Serine racemase: an unconventional enzyme for an unconventional transmitter. **Amino Acids** 43:1895-1904, 2012 (Review).
23. Harai, T., Inoue, R., Fujita, Y., Tanaka, A., Horio, M., Hashimoto, K., Hongou, K., Miyawaki, T., Mori, H. Decreased susceptibility to seizures induced by pentylentetrazole in serine racemase knockout mice. **Epilepsy Research** 102:180-187, 2012.
24. Ishimoto, T., Mano, H., Ozawa, T., Mori H. Measuring CREB activation using bioluminescence probes that detect KID-KIX interaction in living cells. **Bioconjugate Chem.** 22:1136-44, 2012.
25. Horio, M., Kohno, M., Fujita, Y., Ishima, T., Inoue, R., Mori, H., Hashimoto, K., Role of Serine Racemase in Behavioral Sensitization in Mice after Repeated Administration of Methamphetamine. **PLoS ONE** 7:e35494, 2012.
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の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.
 13. Mori D, Ranawaka U, Yamada K, Rajindrajith S, Miya K, Matsumoto T, Mitui MT, Mori H, Nishizono A, Söderlund-Venermo M, Ahmed K. Bocavirus encephalitis in Sri Lankan children and adults: The 28th International Congress of Chemotherapy and Infection; 2013 Jun 5-8, Yokohama
 14. 宮一志, 田中朋美, 宮脇利男, 高橋幸利, 森寿. 培養細胞を用いた NMDA 型グルタミン酸受容体に対する自己抗体測定の検討; 第 55 回日本小児神経学会学術集会; 2013 May 31; 大分.
 15. 田端彩子, 森寿, 井上蘭. セリンラセマーゼノックアウトマウスでの炎症性疼痛感受性の上昇; Neuro2013; 2013 Jun 21; 京都
 16. 堀尾茉央, 石間環, 藤田有子, 井上蘭, 森寿, 橋本謙二. セリンラセマーゼ遺伝子欠損マウス脳における D-アスパラギン酸濃度の低下; 第 9 回 D-アミノ酸研究会学術講演会; 2013 Sep 5; 大阪.
 17. 井上蘭, 吉久陽子, 東條洋介, 岡村智恵子, 吉田雄三, 岸本治朗, Luan Xinghua, 渡辺雅彦, 水口峰之, 鍋島裕子, 浜瀬健司, 松永憲治, 清水忠道, 森寿. 皮膚におけるセリンラセマーゼの発現および機能解析; 第 9 回 D-アミノ酸研究会学術講演会; 2013 Sep 5; 大阪.
 18. 宮一志, 原井朋美, 宮脇利男, 森寿「発熱を契機に行動異常が増悪し, 抗 NMDA 受容体抗体が陽性であった広汎性発達障が

いの一例」第 54 回 日本小児神経学会
2012 年 5 月 17-19 日、札幌

3. 書籍の刊行

1. 井上蘭, 森寿. Clinical Neuroscience. Vol.31; 中外医学社; 2013. 海馬における D-セリンの役割: p1409-10.
2. Mori, H. and Izumi, H. Bioluminescence imaging of Arc expression detects activity-dependent and plastic changes in the visual cortex of adult mice. J. M. Harris et al., Ed. "Visual Cortex: Anatomy, Function and Injuries" pp165-184. 2012 Nova Science Publishers, Inc.

1.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得、出願

- フェノキシ-(N-置換カルバモイルメチル)-アセトアミド誘導体およびそれを有効成分とするセリンラセマーゼ阻害剤 森寿、豊岡尚樹、水口峰之他 特願
2012-015233.
- N-(置換)-2-(置換スルファモイルアミノ)-アセトアミド誘導体およびそれを有効成分とするセリンラセマーゼ阻害剤 森寿、豊岡尚樹、水口峰之他 特願
2012-037977.
- N-[(アシル)ヒドラジノカルボチオニル]-アセトアミド誘導体およびそれを有効成分とするセリンラセマーゼ阻害剤 森寿、豊岡尚樹、水口峰之他 特願
2012-049955.
- ベンゼンスルホニルアミド誘導体およびそれを有効成分とするセリンラセマーゼ阻害剤 森寿、豊岡尚樹、水口峰之他 特願
2012-135591.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし