

日本大学医学部
トランスレーショナル
リサーチセンター研究紀要

Bulletin of the Center for Translational Research,
Nihon University School of Medicine

目次

自己免疫性脳炎における免疫グロブリン G 分画特異的な抗神経抗体の作用機序の 解明		原 誠	1
--	-------	-----	---

INDEX

Immunoglobulin G subclass-specific effects of antineuronal antibodies in autoimmune encephalitis	 Makoto HARA	1
---	-------------------	---

自己免疫性脳炎における免疫グロブリン G 分画特異的な抗神経抗体 の作用機序の解明

原 誠¹⁾

Immunoglobulin G subclass-specific effects of antineuronal antibodies in autoimmune encephalitis

Makoto HARA¹⁾

要旨

自己免疫性脳炎では神経細胞のシナプス受容体や膜蛋白を標的とする抗神経表面抗体が発症や進展に重要な役割を担う。これら自己抗体の中で IgG1 と IgG4 の両分画を有する抗体が近年報告されているが、分画特異的な作用については未解明の部分が多い。抗 LGI1 抗体の IgG 分画特異的な作用を明らかにするため、脳炎患者血清から精製した IgG1 と IgG4 分画抗体を用いて、ラット海馬神経細胞に対する作用を検討した。抗 LGI1 抗体はシナプスの AMPA 受容体発現に影響するが、本検討により IgG1 と IgG4 分画抗体の両者においてシナプス AMPA 受容体の発現密度の低下が示され、脳炎の進展に寄与する可能性が示唆された。

1. 背景

自己免疫性脳炎は免疫療法の遅れが重症化や転帰不良につながる疾患群であり、発症や病態の進展には神経細胞膜表面蛋白を標的とする自己抗体（神経表面抗体）群が重要な役割を担っている。著者はこれまでに、海外の研究機関と協力しラット脳を用いて脳炎患者の脳脊髄液から自己抗体群を迅速に抽出/精製する手法を世界に先駆けて確立し、ラット海馬培養神経細胞を用いて免疫グロブリン (Ig) G 抗体が細胞表面標的蛋白の発現を低下させることを見いだしてきた (Hara M, et al. *Neurology* 2017;88:1340-1348, Hara M, et al. *Neurology* 2018; 90: e1386-e1394)。近年、自己抗体群の中でも抗体種類により、IgG1 あるいは IgG4 のような優位な IgG 分画が異なることが明らかにされている。

シナプス関連蛋白である leucine-rich glioma-inactivated 1 protein (LGI1) は脳の興奮性シナプス間隙に存在する分泌型蛋白であり、ADAM22 および ADAM23 を介してシナプス前部の電位依存

性カリウムチャネル Kv1.1 およびシナプス後部の AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) と共役してシナプス膜電位の安定化に関与している。抗 LGI1 抗体は 2010 年に大脳辺縁系を炎症の主座とする原因不明の脳炎患者の血清・脳脊髄液から同定され、神経表面抗体関連脳炎の中で NMDA 受容体抗体と並び検出頻度の多い抗体である。先行研究により、抗 LGI1 抗体が作用した神経細胞ではシナプスの AMPA 受容体の発現変化をきたすことが報告されている。著者は海外との共同研究で 51 例 (血清 57 検体) の抗 LGI1 脳炎患者について LGI1 抗体の IgG 分画を検討した結果、17.5% は IgG1, IgG2, IgG4 の 3 分画を、また 24.6% は IgG2 と IgG4 分画を有し、さらに 57.9% では IgG4 分画のみを有したことを明らかにした (Arino H, Hara M, et al. *Neurology* 2016;87:759-765) が、IgG 分画特異的な抗体作用については未解決の課題として残されてきた。

¹⁾ 日本大学医学部内科学系神経内科学分野
原 誠 : hara.makoto@nihon-u.ac.jp

2. 目的

これまでの成果を発展させて、自己免疫性脳炎患者から検出された神経表面抗体のうち LGI1 を標的とする抗体（抗 LGI1 抗体）について、IgG1 と IgG4 分画を区別して抽出し、精製抗体とラット培養神経細胞を用いて分画特異的な抗体の作用機序を明らかにすることを目的とした。

3. 方法

1) 抗 LGI1 抗体陽性脳炎患者の血清および対照血清から IgG 分画特異的レジンを用いて IgG1, および IgG4 分画を精製したのち、2) IgG 分画特異的な 2 次抗体を用いた免疫染色により分画の特異性を確認する。そして、3) IgG1 および IgG4 分画に特異的な抗体作用について、抗 LGI1 分画抗体および対照 IgG 分画をそれぞれ 120 時間反応させたラット海馬初代培養神経細胞（day21）を用いた。AMPA 受容体とシナプスマーカーである PSD95 を標的とした蛍光多重染色により、シナプスにおける AMPA 受容体の発現を比較検討した。AMPA 受容体の発現解析には細胞体近傍で細胞同士の重なりが無い神経突起を選定し、10 μ m あたりの受容体クラスター密度を NIH Image ソフトウェアを用いて定量評価した。定量の際に選定する神経細胞の選択バイアスを最小限にするため、培養細胞の抗体反応から画像取得までの過程を独立して 3 回施行し、1 検討あたり 8 神経突起（計 24 神経突起）を選定し定量解析に用いた。

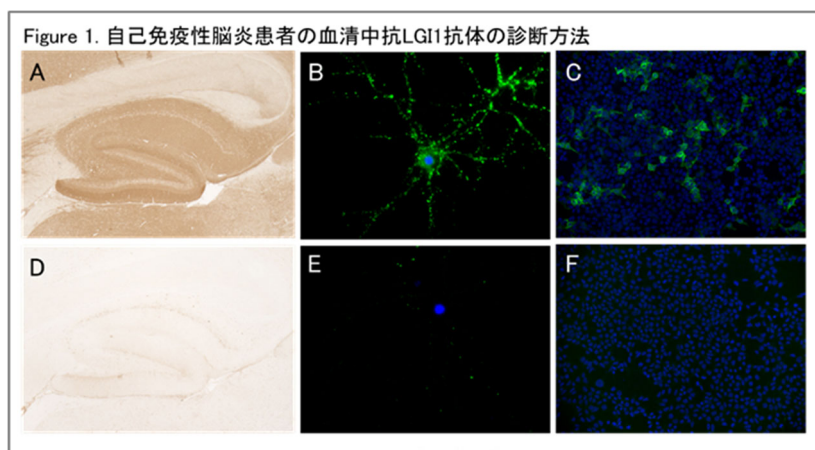
また本研究に使用した抗 LGI1 抗体陽性血清は日本大学医学部附属板橋病院で施行中の多施設共同臨床研究 RK200424-1 で診断した 29 例の抗 LGI1 抗体陽性脳炎患者の残検体を用いた。抗神経表面

抗体群の抗体作用解析患者のための残検体の使用については、日本大学医学部附属板橋病院の臨床研究倫理審査委員会、また海馬神経細胞の初代培養に用いる胚齢 18 日妊娠ラットの使用については日本大学医学部動物実験委員会での承認を得て実施した。

4. 結果

1) 抗 LGI1 抗体陽性血清および対照血清からの IgG1 および IgG4 分画の抽出

抗 LGI1 抗体は抗原の立体構造を抗原基とするため、凍結脳組織切片（Figure 1A）、培養神経細胞（Figure 1B）への反応あるいは LGI1 を強制発現させた HEK293 細胞を用いた cell-based assay 法（Figure 1C）を組み合わせで診断される。抗体陰性例ではいずれの検出法でも反応を認めない（Figure 1D-F）。日本大学医学部附属板橋病院での臨床研究で集積してきた 29 例の抗 LGI1 抗体陽性残血清のうち、精製に十分量が確保され、かつ高抗体力価（LGI1 発現 HEK293 細胞を用いた cell-based assay 法で 640 倍以上）の 3 血清検体を混合して LGI1 抗体陽性 pool 血清とした。同様に神経表面抗体群が陰性であった 3 血清検体を混合して対照 pool 血清として本研究に使用した。カラムに充填した IgG 分画特異的レジン（CaptureSelect™）を用いて各 pool 血清から IgG1 および IgG4 分画を精製した。ヒト血清に含まれる IgG4 分画は IgG1 分画に比較して少量でありカラム操作による喪失を防ぐため、pool 血清を先に IgG4 吸着カラムで回収したのち、フロースルー液を IgG1 吸着カラムで回収した。また IgG 分画抗体の作用を検討する際の陽性対照として、pool



血清の一部を使用し protein A/G レジンを充填したカラムを用いて total IgG を併せて精製した。ヒト血清に含まれる IgG4 分画は IgG1 分画に比較して少量でありカラム操作による喪失を防ぐため、pool 血清を先に IgG4 吸着カラムで回収したのち、フロースルー液を IgG1 吸着カラムで回収した。また IgG 分画抗体の作用を検討する際の陽性対照として、pool 血清の一部を使用し protein A/G レジンを充填したカラムを用いて total IgG を併せて精製した。

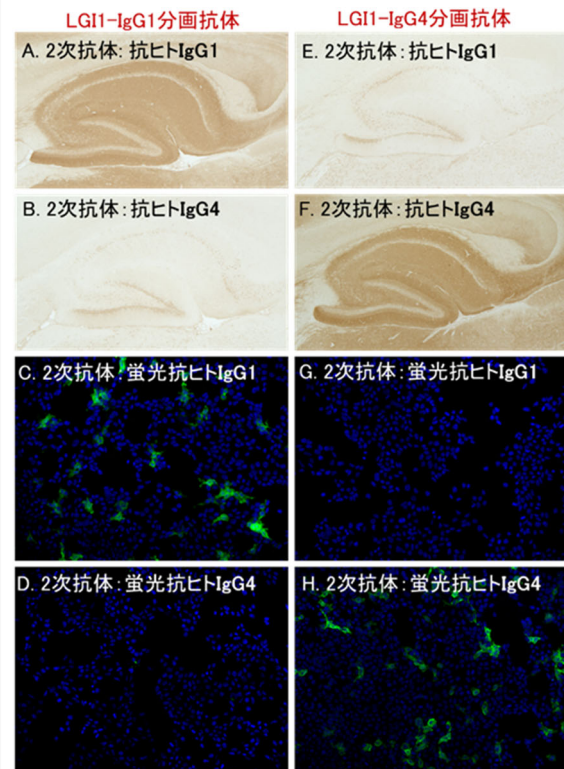
2) IgG 分画特異的検出法を用いた精製 LGI1-IgG1 および LGI1-IgG4 の免疫学的特異性の評価
精製した LGI1-IgG1 および LGI1-IgG4 分画が各々特異的に抽出されているかを評価するため、IgG 分画に特異的な 2 次抗体（抗ヒト IgG1 抗体及び抗ヒト IgG4 抗体）を用いた免疫染色を施行した。結果は Figure 2 に示すように、抽出した LGI1-IgG1 (Figure 2A-D) と LGI1-IgG4

(Figure 2E-H) は凍結脳切片および HEK293 細胞を用いた両検出法に対して IgG 分画特異的に反応を認め、抽出した IgG 分画の免疫学的特異性が確認された。さらに cell-based assay 法を用いた両分画の抗体力価はいずれも 640 倍以上であり、高力価が保持されていることを確認した。

3) IgG 分画特異的検出法を用いた精製 LGI1-IgG1 および LGI1-IgG4 の免疫学的特異性の評価

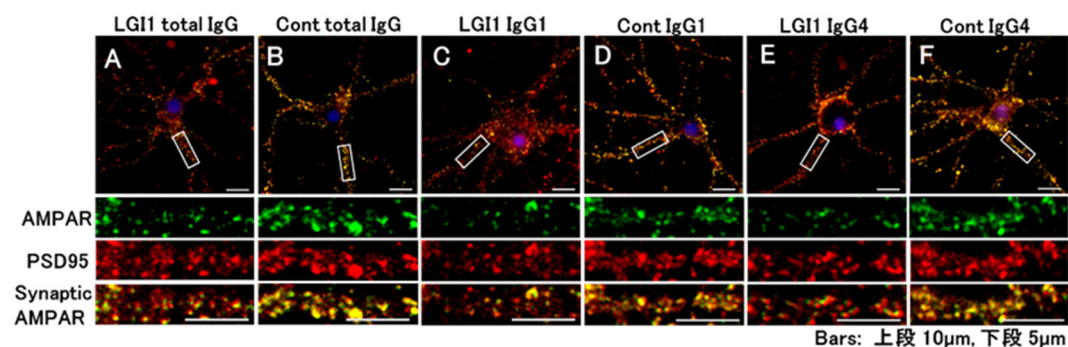
ラット E18 胚から摘出した海馬から調整した神経細胞を poly-L-lysine でコートした 13mm 丸カバーガラス上で 21 日間培養し、神経突起が十分に伸長した成熟海馬初代培養細胞を得た。培養神経細胞を LGI1 total IgG、LGI1-IgG1、LGI1-IgG4 および陰性対照 total IgG、IgG1、IgG4 を

Figure 2. IgG分画特異的な2次抗体を用いた免疫染色による精製LGI1分画抗体の免疫学的特異性の評価



それぞれ 120 時間反応させたのち、各群の細胞を AMPA 受容体抗体とシナプスマーカーである PSD95 抗体で蛍光標識し、蛍光顕微鏡（オールインワン顕微鏡 BZX-810, キーエンス）で撮像した。結果は Figure 3 に示すように、AMPA 受容体の発現は LGI-1 total IgG (Figure 3A)、LGI1-IgG1 (Figure 3C) および LGI1-IgG4 (Figure 3E) を反応させたいずれの細胞群においても、対照 total IgG (Figure 3B)、IgG1 (Figure 3D)

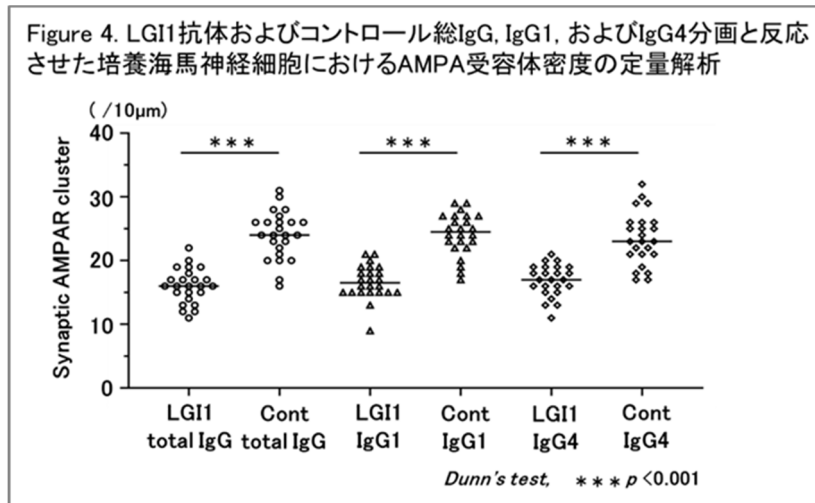
Figure 3. LGI1抗体およびコントロール総IgG, IgG1, およびIgG4分画と反応させた培養海馬神経細胞におけるAMPA受容体の発現量の変化



および IgG4 (Figure 3F) を反応させた細胞群と比較して PSD95 (Figure 3, red) と共局在する AMPA 受容体クラスター (Figure 3, yellow) 数が減少していることが確認された。

上記の結果を踏まえて、total LGI1-IgG、LGI-IgG1 および LGI1-IgG4 を反応させた細胞群のシナプス AMPA 受容体密度を対照細胞群と定量的に比較検討した結果を Figure 4 に示す。LGI1-total IgG、-IgG1 および-IgG4 を反応させた細胞群では、それぞれの対照 IgG と反応させた細胞群と比較し

てシナプス AMPA 受容体の密度が有意に減少していることが示された。また LGI1-IgG1 と LGI1-IgG4 を反応させた両群間ではシナプス AMPA 受容体密度に有意な相違は示されなかった。上記の検討結果から、抗 LGI1 抗体では IgG1 と IgG4 分画の両者が神経細胞に対して pathogenic な作用を有することが示された。今後、シナプス受容体 Kv1.1 の発現に及ぼす IgG 分画特異的な影響についても同様に解析し、さらに定量的イムノプロットを用いた検証を加える。



5. 結語

神経細胞に対する抗 LGI1 抗体の IgG 分画特異的な作用について検討した。本検討により、抗 LGI1 抗体は IgG1 および IgG4 分画の両者においてシナプス AMPA 受容体の発現を低下させる作用が示され、脳炎の進展に寄与することが示唆された。

日本大学医学部トランスレーショナルリサーチセンター研究紀要
Bulletin of the Center for Translational Research,
Nihon University School of Medicine

編集委員会

委員長	松本太郎
委員	西山博孝
幹事	葛西玲広

Editorial Board

Editor-in-Chief	Taro MATSUMOTO
Associate Editors	Hiroataka NISHIYAMA
Managing Editors	Reo KASAI

発行者	日本大学医学部トランスレーショナルリサーチセンター長 松本 太郎
発行所	日本大学医学部 〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1 TEL03-3972-8111
Publisher	Taro MATSUMOTO Director, Center for Translational Research, Nihon University School of Medicine 30-1, Ohyaguchi-kamicho, Itabashi-ku, Tokyo 173-8610 JAPAN Phone +81-3-3972-8111
