若手研究者助成金 実績報告書

令和　　7 年　　4 月　　30 日

日 本 大 学 学 長　　殿

氏　　名：　　原　誠
所属・資格：　　医学部・准教授
実施研究所：　　医学部・ﾄﾗﾝｽﾚｰｼｮﾅﾙﾘｻｰﾁｾﾝﾀｰ

下記のとおり報告いたします。

1　研究課題

和文表記（40 字以内）
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

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

2　研究期間

令和 5 年度　～　令和 6 年度（※ 延長のため）

3　研究目的

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。研究者はこれまでに、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;88:1340-48, Hara M, et al. *Neurology* 2018; 90: e1386-94, Hara M, et al. *Neurol Clin Neurosci* 2021;9:56-62 ほか）。近年、自己抗体群の中でも抗体種類により、IgG1 や IgG4 のように優位な分画が異なることが明らかにされているが、抗体作用にどのような相違をもたらすかは未解決の課題として残されてきた。

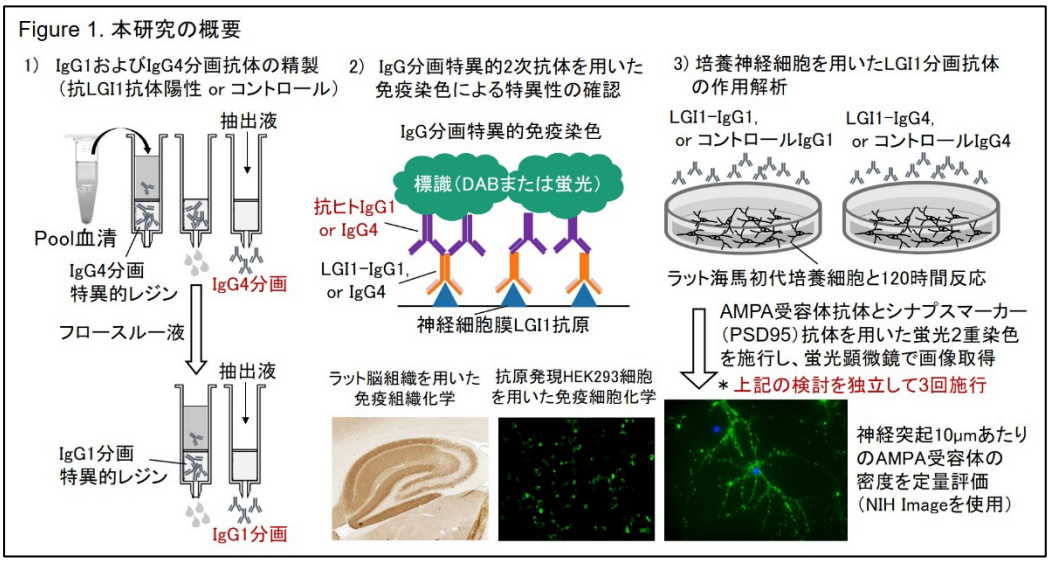
研究者はこれまでの成果を発展させて、自己免疫性脳炎患者から検出された神経表面抗体のうち leucine-rich glioma-inactivated 1 protein（LGI1）を標的とする抗体（抗 LGI1 抗体）について IgG1 と IgG4 分画を区別して抽出し、精製抗体とラット培養神経細胞を用いて分画特異的な抗体の作用機序を明らかにすることを目的とした。

４　研究概要

シナプス関連蛋白である LGI1 は脳の興奮性シナプス間隙に存在し、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・脳脊髄液中から同定され、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。また研究者は海外との共同研究で抗 LGI 抗体が IgG1 と IgG4 分画の両者を有することを初めて報告（Arino H, Hara M, et al. *Neurology* 2016;87:759-65）してきたが、IgG 分画特異的な抗体作用については未解明であった。

本研究の概要を Figure 1 に示す。1) 抗 LGI 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）の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の無い神経突起を選定し、10μm 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。

Figure 1. 本研究の概要

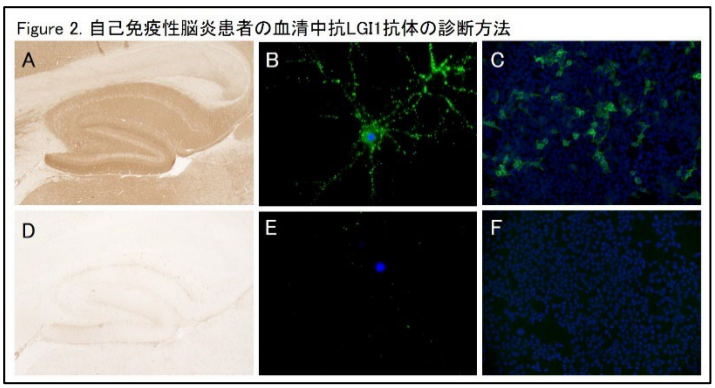


また本研究に使用した抗 LGI1 抗体陽性血清は附属板橋病院で施行中の多施設共同臨床研究 RK200424 -1 で診断した 29 例の抗 LGI 抗体陽性脳炎患者の残検体を用いた。患者残検体の使用を含む本研究計画については附属板橋病院の臨床研究倫理審査委員会（承認番号：RK230912-13）、また海馬神経細胞の初代培養に用いる胚齢 18 日妊娠ラットの使用については日本大学動物実験委員会（承認番号：AP23MED044）での承認を得て実施した。

５　研究結果

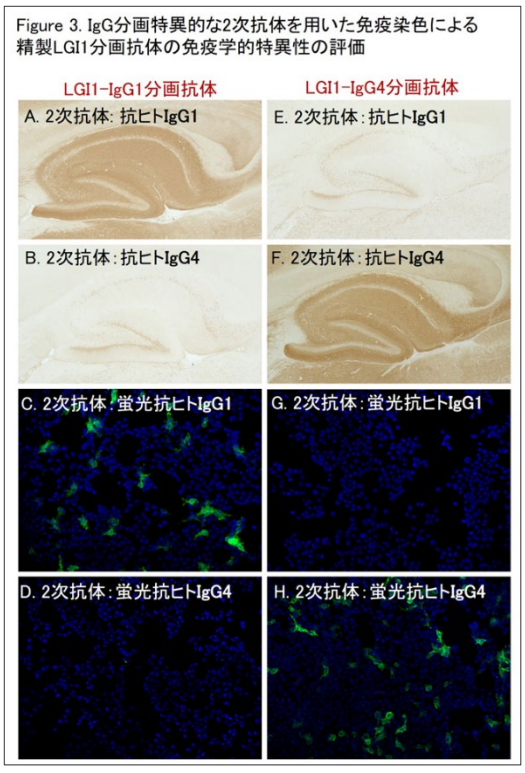
1)　抗 LGI1 抗体陽性血清および対照血清からの IgG1 および IgG4 分画の抽出

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 2A）、培養神経細胞（Figure 2B）への反応あるいは LGI を強制発現させた HEK293 細胞を用いた cell-based assay 法（Figure 2C）を組み合わせて診断される。抗体陰性例ではいずれの検出法でも反応を認めない（Figure 2D-F）。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＜）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（Figure 1）。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 3 に示すように、抽出した LGI1-IgG1（Figure 3A-D）と LGI1-IgG4（Figure 3E-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＜であり、高力価が保持されていることを確認した。



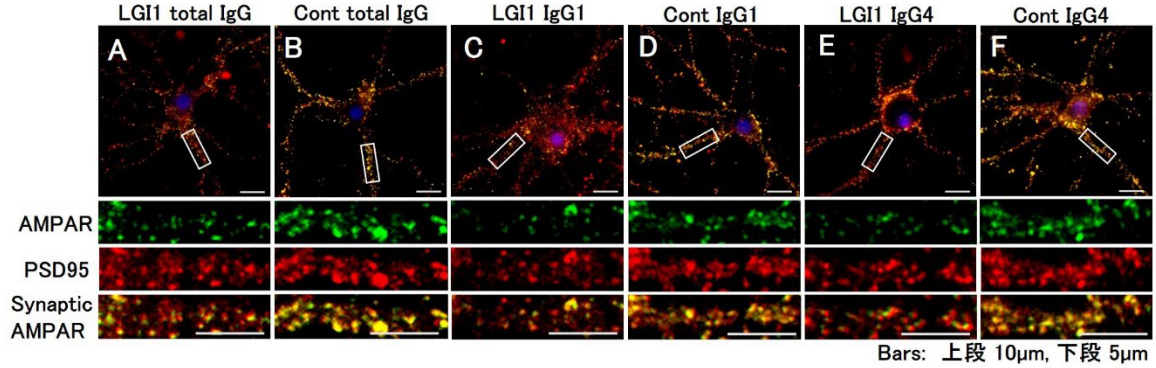
3)　ラット海馬初代培養神経細胞を用いた LGI1 IgG1, および IgG4 分画の作用の定量解析

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

〔５　研究結果（つづき）〕

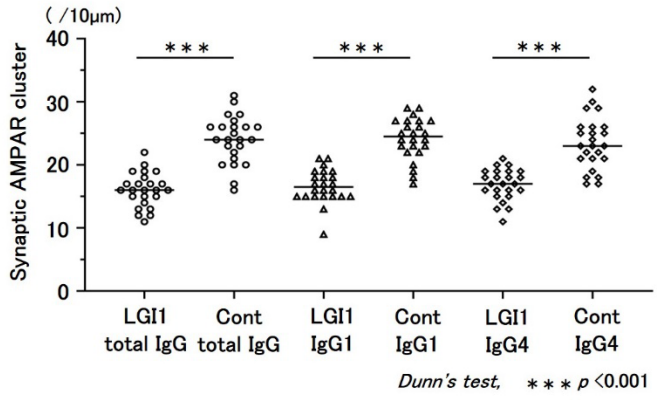
丸カバーグラス上で 21 日間培養し、神経突起が十分に伸長した成熟海馬初代培養細胞を得た。培養神経細胞を LGI1 total IgG、LGI1-IgG1、LGI1-IgG4 および陰性対照 total IgG、IgG1、IgG4 をそれぞれ 120 時間反応させたのち、各群の細胞を AMPA 受容体抗体とシナプスマーカーである PSD95 抗体で蛍光標識し、蛍光顕微鏡（オールインワン顕微鏡 BZX-810, キーエンス）で撮像した（Figure 1)。結果は Figure 4 に示すように、AMPA 受容体の発現は LGI-1 total IgG（Figure 4A)、LGI1-IgG1（Figure 4C）および LGI1-IgG4（Figure 4E）を反応させたいずれの細胞群においても、対照 total IgG（Figure 4B)、IgG1（Figure 4D）および IgG4（Figure 4F）を反応させた細胞群と比較して PSD95（Figure 4, red）と共局在する AMPA 受容体クラスター（Figure 4, yellow）数が減少していることが確認された。

Figure 4. 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



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 5 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明らかになった。

Figure 5. 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受容体密度の定量解析



６　将来獲得を目指す学内外競争的資金の種類

日本学術振興会 科学研究費助成（科研費）　基盤研究（B）

日本学術振興会 科学研究費助成（科研費）　挑戦的研究（萌芽）

７　本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏　　名	申請年度	研 究 種 目	研　究　課　題	採・否
該当なし				

８　学会発表等

要旨集の抜き刷り，発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会，発表会名等	発表テーマ	発表年月
原誠	第 28 回日本神経感染症学会総会・学術大会	シンポジウム 7. 自己免疫性脳炎の病態と治療「抗神経表面抗体の作用機序からみた自己免疫性脳炎の病態 update」	2024 年 10 月

９　著書・雑誌論文

著書，雑誌，抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
該当なし				

１０　本研究課題に関するその他の発表（新聞，一般雑誌掲載等）

該当なし

１１　他の研究への発展

現在、研究者は科研費課題 23K06974 として神経表面抗体が標的とする細胞応答経路を同定するために発現遺伝子を網羅的に解析し、標的遺伝子を同定する「発現遺伝子の視点」から抗体作用の解明にアプローチした研究を遂行している。本研究は神経表面抗体の作用を「発現蛋白の視点」からアプローチした研究であることから、科研費採択課題の研究と連続性を有する。そのため、本研究で用いた研究手法・成果と科研費採択課題での研究手法・成果を踏まえて、他の神経表面抗体群における形態学的および分子遺伝学的作用に関する研究へと発展させていく予定である。

１２　その他の成果

該当なし

１３　本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

名　　称	知的財産の種類	発　明　者 （考案者・創作者）	権　利　者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日
該当なし						

※ホームページ等での公開（☑可・□否）いずれかをチェックしてください。
否の場合は，理由書を別途添付のこと。