

氏 名 大川 都史香

学位(専攻分野) 博士(医学)

学位記番号 総研大甲第 1691 号

学位授与の日付 平成26年3月20日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Global profiling of synaptic autoantibodies reveals a mode of  
action of anti-LGI1 autoantibodies in limbic encephalitis

論文審査委員 主 査 教授 吉村 由美子  
教授 深田 正紀  
教授 鍋倉 淳一  
教授 田淵 克彦 信州大学

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

**Global profiling of synaptic autoantibodies reveals a mode of action of anti-LGI1 autoantibodies in limbic encephalitis**

More than 30 mutations in human LGI1, a secreted neuronal protein, have been reported with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. Consistent with human genetic evidence, LGI1 homozygous knockout (KO) mice display repeated generalized seizures and die within three weeks after birth. LGI1 heterozygous KO mice exhibit increased susceptibility to seizure-inducing stimuli. The pivotal role of LGI1 in epileptic disorders was further expanded with the recent discovery of LGI1 autoantibodies in patients with autoimmune limbic encephalitis (LE), which is characterized by amnesia and seizures. Here, I aimed to clarify a pathogenic role and a mode of action of LGI1 autoantibodies in LE.

To select the sera containing LGI1 autoantibodies and cover as many autoantibodies as possible, I analyzed human serum samples from 145 patients who were diagnosed with immune-mediated neurological disorders including LE, neuromyotonia (NMT: characterized by peripheral nerve hyperexcitability), Morvan syndrome (MoS: characterized by peripheral nerve hyperexcitability with neuropsychiatric features), and so on. First, I screened serum antibodies for binding to the cell surface of cultured rat hippocampal neurons. The serum from 48 patients bound to the neuronal cell surface. Target proteins were then immunoprecipitated from cultured neurons with the bound serum antibodies and identified using mass spectrometry. Then, to directly determine the cell-surface antigen of serum antibodies, the identified candidate proteins were displayed on the surface of COS7 cells and the serum antibodies were tested for the binding to the cells. I obtained 44 serum samples with LGI1 autoantibodies and found the presence of autoantibodies against two more known and seven novel target antigens. I also found that some patients had multiple autoantibodies against different target antigens. To investigate the relative contribution of individual autoantibodies to diseases, I developed the quantitative cell-based ELISA test against LGI1, CASPR2, DCC, and DPP10, the top four of frequent autoantigens in the present screening. I applied this ELISA test to all the serum samples from 145 patients, and found that 85.3% (29/34) of

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

patients with high levels of LGI1 autoantibodies had been diagnosed with LE, and most of these LE patients (89.7%, 26/29) had only the LGI1 autoantibody. In contrast, 75.0% (9/12) of patients with CASPR2 autoantibodies had been diagnosed with NMT/MoS, and all these patients concurrently had multiple autoantibodies to LGI1, DCC, and/or DPP10. These results indicate that among identified autoantibodies, LGI1 autoantibodies play an exclusive role in LE.

I next explored a mode of action of LGI1 autoantibodies. I asked whether the LGI1 autoantibody directly affects the interaction of LGI1 with its major receptor, ADAM22. When COS7 cells displaying LGI1 tagged with FLAG-GPI at the cell surface were incubated with the soluble extracellular domain of ADAM22 (ADAM22ex-HA), ADAM22ex-HA specifically bound to LGI1-FLAG-GPI at the cell surface. In contrast, when cells were pre-treated with serum #8 from a patient with LE, which contains monospecific antibodies to LGI1, the antibodies inhibited the interaction of LGI1-FLAG-GPI with ADAM22ex-HA in a dose-dependent manner and by targeting the ADAM22 binding domain of LGI1 (EPTP domain). In addition, most of sera from patients with LE, containing monospecific LGI1 antibodies, significantly inhibited the LGI1-ADAM22 interaction. Next, to examine the disease specificity of the effect of LGI1 autoantibodies on the LGI1-ADAM22 interaction, I reassessed the inhibitory effect of all the anti-LGI1 sera from patients with LE and NMT. Importantly, anti-LGI1 sera from patients with LE significantly inhibited the LGI1-ADAM22 binding, whereas anti-LGI1 sera from patients with NMT did not. Taken together, these results strongly suggest that the antibody-mediated inhibition of the LGI1-ADAM22 interaction is a pathogenic mechanism for LE.

I next investigated whether LGI1 autoantibodies inhibit the interaction of endogenous LGI1 with ADAM22. When ADAM22 was immunoprecipitated from cultured rat hippocampal neurons treated with control serum, LGI1 was efficiently coimmunoprecipitated. In contrast, when neurons were pretreated with the patient serum, the amount of coimmunoprecipitated LGI1 was significantly reduced. It has been reported that in LGI1 KO mice AMPA receptor-mediated synaptic transmission is reduced in the hippocampus and lethal epilepsy inevitably occurs. However, it remains unclear whether acute disruption of the LGI1-ADAM22 interaction affects synaptic

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

AMPA receptors. I found that the treatment of cultured neurons with the patient serum significantly reduced the number of synaptic AMPA receptors. Furthermore, disruption of LGI1-ADAM22 interaction by soluble extracellular domain of ADAM22 was sufficient to reduce synaptic AMPA receptors. Consistently, I observed that levels of AMPA receptor were greatly reduced in the hippocampal dentate gyrus in the epileptic LGI1 KO mouse. Thus, either genetic or acquired loss of the LGI1-ADAM22 interaction reduces the AMPA receptor function to cause epileptic disorders. These results suggest that by finely regulating the synaptic AMPA receptors, LGI1-ADAM22 interaction maintains physiological brain excitability throughout life.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

てんかんは有病率が約1%の神経疾患でその一部は難治性である。Leucine-rich glioma inactivated (LGI1)遺伝子の変異はある種のヒトの遺伝性側頭葉てんかんの原因となることから、LGI1は脳の安定な興奮性維持に重要な役割を担っていると考えられている。これまでに、出願者の所属する研究室は、1) 分泌蛋白質LGI1がADAM22受容体と結合してAMPA型グルタミン酸受容体を介したシナプス伝達を制御すること、そして、2) LGI1欠損マウスではシナプス伝達異常により、生後2-3週間で致死性てんかんを必発することを報告してきた。一方ごく最近、海外の研究者らにより記憶障害やけいれん発作を主徴とする自己免疫性辺縁系脳炎患者血清中に抗LGI1自己抗体が存在することが報告された。しかし、自己免疫性神経疾患には多くの自己抗体が見出されており、LGI1自己抗体が他の自己抗体と比較してどれほど強く辺縁系脳炎の発症と関連するのか、また、LGI1自己抗体の作用機構は不明であった。

大川都史香氏はこのような背景で、LGI1の機能破綻によるてんかん・けいれん病態機構を明らかにするために、「LGI1自己抗体と辺縁系脳炎発症との関連性、およびLGI1自己抗体がどのようにして辺縁系脳炎を引き起こすのか」という課題に取り組んだ。まず、国内の145名の辺縁系脳炎を含む自己免疫性神経疾患の患者血清を網羅的に解析し、神経症状を呈する患者が有する自己抗体として、LGI1抗体を含む既知のものに加えDCC、DPP10、GABA<sub>A</sub>受容体など7種類の新規自己抗体を見出した。さらに、これら複数の自己抗体の相対的寄与を定量化するためのELISA検査法(多種抗体価測定法)を開発し、LGI1に対する自己抗体価のみが辺縁系脳炎発症と極めて高い相関を示すことを見出した(特異性94%、陽性的中率85%、LGI1単独関与90%)。さらに、LGI1自己抗体の作用機序の解明を進め、LGI1自己抗体はLGI1とその受容体であるADAM22との結合を阻害することにより、脳内の興奮性シナプス伝達の大部分を担うAMPA受容体機能を低下させることを明らかにした。AMPA受容体は脳の興奮性シナプス伝達の大部分を担い、記憶、学習の根幹を成すと考えられていることから、LGI1自己抗体によるAMPA受容体機能制御の破綻は辺縁系脳炎の記憶障害やてんかん症状を引き起こすことが強く示唆された。本研究成果は、1) 辺縁系脳炎の確定診断および治療効果の判定に即実用可能な検査法を開発した、2) LGI1自己抗体と辺縁系脳炎発症との関連を明確に示した、3) けいれん・てんかん病態におけるLGI1とADAM22の重要性を示した点で、基礎、臨床医学の両側面から意義深いと考えられる。さらに、LGI1機能障害はこれまで遺伝性(先天性)側頭葉てんかんの原因として注目を浴びてきたが、今回の研究により、後天的にLGI1とADAM22の結合が阻害されてもてんかん病態が惹起されることが明らかになった。本研究は、LGI1とADAM22の結合は脳が安定な興奮状態を維持するために、一生涯を通じて必要不可欠なシステムであること、またLGI1とADAM22はこれまでとは異なるてんかん創薬の標的候補となることを提唱するものである。

本研究は、「LGI1の機能破綻によるてんかん病態機構の解明、ならびにLGI1の生理機能の解明」を研究テーマに掲げ、生化学、分子生物学、細胞生物学等の手法を駆使して、学際的な共同研究を展開して行われたものである。また、大川氏は本研究内容

(Separate Form 3)

を国際誌に筆頭著者として発表している（受理 1 報、投稿中 1 報）。これらのことも鑑みて、本研究が学位論文としてふさわしいものであるとして、審査委員全員の意見が一致した。