

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04845

研究課題名(和文) グライコアレイ法を用いた免疫性神経疾患の標的抗原の同定と病態解析

研究課題名(英文) Analysis of target antigens and pathogenetic mechanisms of neuroimmunological diseases using glycoarray

研究代表者

楠 進 (KUSUNOKI, Susumu)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：90195438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000 円

研究成果の概要(和文)：グライコアレイ法を用いて、免疫性神経疾患患者血中の糖脂質および糖脂質複合体に対する抗体を網羅的に検討した。ギラン・バレー症候群(GBS)における sulfatide を含む複合体に対する抗体や、多巣性運動ニューロパチーにおける GalNAc-GD1a を含む複合体に対する抗体などの新規抗体が見出され病態との関連が示唆された。抗GQ1b抗体陽性症例の中で、GBSではGD1bを含む複合体に対する抗体が同時にみられる例が多く、そうした例には重症例が多かった。また、抗Gal-C抗体陽性の免疫性神経疾患や、抗neurofascin 155抗体陽性ニューロパチーの特徴が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Serum antibodies to glycolipids and glycolipid complexes in patients with neuroimmunological diseases were investigated comprehensively using glycoarray. Antibody activities to glycolipid complexes containing sulfatide in Guillain-Barré syndrome (GBS) and to those containing GalNAc-GD1a in multifocal motor neuropathy (MMN) were newly found by the present study. It was suggested that those antibodies are involved in the pathogenetic mechanisms of GBS and MMN. Among the patients with anti-GQ1b antibody-associated diseases, antibodies to glycolipid complexes containing GD1b were frequently present in GBS. Patients with such antibodies were frequently affected with severe GBS. Clinical features of neuroimmunological diseases with anti-Gal-C antibodies and those of neuropathy with anti-neurofascin 155 antibodies were revealed.

研究分野：神経内科学

キーワード：免疫性神経疾患 自己抗体 糖脂質 ガングリオシド 末梢神経障害

## 1. 研究開始当初の背景

免疫性神経疾患では、しばしば自己抗体が認められる。とくにギラン・バレー症候群 (GBS) や IgM パラプロテイン血症を伴うニューロパチー (IgM-N) などの免疫性末梢神経障害では、ガングリオシドなどの糖脂質が標的抗原であることが多い。われわれは、GBS の亜型である Fisher 症候群 (眼球運動障害と運動失調をきたす) で 90% 以上の症例に GQ1b ガングリオシドに対する抗体が陽性となることを見出した。この発見は糖脂質抗体が特異的因子であることを明確に示したものである。また、GD1b を特異的に認識する抗体は深部感覚障害による運動失調性の末梢神経障害にみられるが、GD1b は深部感覚を伝える後根神経節の大型神経細胞に局在することから、これらの神経細胞への抗体の特異的結合が運動失調をきたすと考えられた。われわれはヒトと同様の GD1b の分布を示すウサギを GD1b で感作して、ウサギ運動失調性末梢神経障害の作成に成功したが、これは世界で初めてのガングリオシド抗体による神経障害動物モデルであり、ガングリオシド抗体が病因となることを明らかに示したものである。しかし標的の明らかでない GBS 症例も存在し、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (CIDP) では抗体が検出されない例が多い。

一方、中枢神経疾患では、視神経脊髄炎で高率に Aquaporin 4 抗体が陽性であり、その他の自己免疫性脳炎では、NMDA 受容体、LG11、CASPR2 などに対する抗体が報告されているが、標的の明らかでない症例も多数存在する。多発性硬化症では、myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) などに対する抗体上昇が報告されているが、陽性率と特異性がそれほど高くはない。

近年われわれは、単独の糖脂質ではなく二種類の糖脂質の糖鎖が相互作用で形作るエピトープを認識する抗体を、GBS 血清に見出し、糖脂質複合体抗体として報告した。これは海外を含めて他のグループからも追試確認されている。

糖脂質に対する抗体測定法として、薄層クロマトグラム (TLC) オートサンプラーを用いたグライコアレイ法が報告されている。グライコアレイ法は、われわれの見出した糖脂質複合体抗体を、より網羅的にかつ少量のサンプルで検出することを目的として、イギリスの Willison 博士らのグループにより開発された抗体測定法である。彼らは多発性硬化症の脳脊髄液、GBS や MMN の血清について、グライコアレイ法を用いた検討を報告している。しかし GBS では欧米と我が国を含む東アジアでは、サブタイプの頻度が異なることが知られており、軸索障害型や Fisher 症候群の多い我が国での検討はきわめて重要である。CIDP は糖脂質抗体の検出率が低い、糖脂質複合体の網羅的解析により新たな標的抗原が同定できる可能性が十分に考えられ

る。また、従来糖脂質抗体は、免疫性末梢神経障害に多くみられてきたが、糖脂質複合体を網羅的に検討することで、中枢神経の免疫性疾患の新たな標的を見出せる可能性がある。さらに従来の方法では抗体の反応性が同一であっても臨床的特徴が異なる場合があるが、グライコアレイ法を用いることにより、反応性の違いを見出すことができる可能性もある。

ミエリンに局在する糖脂質の中の主要な成分である Galactocerebroside (Gal-C) に対する抗体について、従来われわれはマイコプラズマ肺炎後にみられる免疫性神経疾患で検出されること、同抗体陽性の GBS は脱髄型に多いことを報告してきたが、ガングリオシドなど他の糖脂質に対する抗体も同時に陽性である例の臨床病型や、マイコプラズマ肺炎後の神経疾患全体における同抗体陽性例の特徴などについて、多数例の解析は行われていなかった。また最近、CIDP の一部において傍紋輪部の蛋白である neurofascin 155 (NF155) に対する抗体が検出されることが報告されているが、陽性例の臨床的特徴については、さらに症例を集積して検討する必要がある。

本研究は、上記のような免疫性神経疾患における自己抗体についての未解決の問題点を検討するために立案された。

## 2. 研究の目的

- (1) グライコアレイ法と ELISA 法での抗体測定結果の比較を行う。
- (2) GBS、CIDP、多発性運動ニューロパチー (MMN) などの血中抗体をグライコアレイ法で検討する。
- (3) 抗 GQ1b 抗体関連疾患における抗体反応性と臨床特徴の関連を検討する。
- (4) 他の抗糖脂質抗体も同時に陽性である抗 Gal-C 抗体陽性 GBS のサブタイプを検討する。
- (5) マイコプラズマ肺炎後の神経障害について臨床特徴と自己抗体を検討する。
- (6) 抗 NF155 抗体陽性 CIDP の臨床的特徴を検討する。

## 3. 研究の方法

- (1) 従来 ELISA 法で 10 種類の単独の糖脂質と 4 種類の糖脂質複合体に対する抗体測定を行い、いずれかの抗原に対する反応が陽性であった GBS 患者血清を用いて、グライコアレイで 10 種類の単独の糖脂質およびそれらを混合した抗原 45 種類 (計 55 種類) に対する抗体反応を測定した。
- (2) GBS、CIDP、MMN、および疾患対照について、前記の (1) と同様にグライコアレイで血中抗体の反応を測定した。
- (3) 抗 GQ1b IgG 抗体の関連する、Fisher 症候群、眼球運動麻痺を伴う GBS (GBS-OP)、Bickerstaff 脳幹脳炎 (BBE) について、抗体の反応性と臨床的特徴との関連をしらべた。

(4) 抗 GM1 抗体が同時に陽性である抗 Gal-C 抗体陽性 GBS について電気生理学的特徴を検討した。

(5) マイコプラズマ肺炎後の神経障害をきたした症例の臨床特徴と自己抗体を検討した。

(6) 自験の抗 NF155 抗体陽性 CIDP の臨床的特徴を検討し、病理学的解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 従来の ELISA で弱い反応を示した抗体がグライコアレイでは検出できないケースがあったが、中等度以上の反応があった抗体は全例グライコアレイでも検出された。またグライコアレイによりこれまで未検討であった各種の糖脂質複合体に対する反応が検出された。グライコアレイは ELISA と比較して、少量の抗原と血清で多くの糖脂質複合体に対する抗体を検出可能であることが確認できた。

(2) グライコアレイによる検討で、IgG 抗体は GBS にほぼ特異的に、IgM 抗体は GBS と MMN で比較的高頻度に陽性所見が得られた。また sulfatide を含む複合体に対する抗体が GBS でしばしばみられた。眼球運動麻痺を伴う GBS では GQ1b を含む複合体抗体陽性例が多く、その中には GQ1b/sulfatide に特異的な抗体をもつ症例が認められた。また MMN では、GM1 を含む複合体だけでなく GalNAc-GD1a を含む複合体に対する抗体もみられることがわかった。

(3) Fisher 症候群、GBS-OP、BBE のいずれにおいても GQ1b を含む複合体に対する抗体活性が高率に確認された。また GBS-OP では、GD1b を含む複合体に対する抗体活性が同時にみられることが多く、Fisher 症候群、BBE と比較して有意に高率であった。さらに GBS-OP において、GD1b を含む複合体に対する抗体活性のみみられる症例では、同抗体陰性の症例と比べて、人工呼吸器が必要になる頻度が有意に高く、また重篤な四肢麻痺を呈する頻度も有意に高かった。抗 GQ1b 抗体の関連する疾患において、GD1b を含む複合体に対する抗体活性は、呼吸筋麻痺や重篤な四肢麻痺の病態に関連する可能性が示された。一方、MFS と BBE では有意な抗体活性の違いが認められず、意識障害の病態については今後のさらなる検討が必要と考えられた。

(4) 抗 GM1 抗体と抗 Gal-C 抗体が同時に陽性の GBS の電気生理学的特徴を検討したところ、軸索型はみられず脱髄型が高頻度であり、抗 Gal-C 抗体と脱髄の関連が確認された。一方で脱髄型に分類されるが同時に M 波の振幅の低下がみられる例もあり、軸索障害の併存も示唆された。

(5) マイコプラズマ肺炎後の神経障害の症例の抗糖脂質抗体を検討したところ、Gal-C に対する抗体の陽性例が有意に多く、われわれの既報告と合致する結果であった。また抗 Gal-C IgM 抗体は年齢が若く中枢神経

障害に罹患した症例に多く、抗 Gal-C IgG 抗体は成人で GBS などの末梢神経障害をきたした症例に多くみられた。

(6) 抗 NF155 抗体陽性 CIDP は比較的若年の発症で、震えや運動失調がみられ、脳脊髄液蛋白は著明に高値であり、IVIg 療法の有効性が低かった。また血漿交換やステロイドは概ね有効であったが、長期経過例では効果は限定的で、早期治療が重要と考えられた。病理学的には傍絞輪部ミエリンの軸索からの分離がみられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Kuwahara M, Suzuki H, Oka N, Ogata H, Yanagimoto S, Sadakane S, Fukumoto Y, Yamana M, Yuhara Y, Yoshikawa K, Morikawa M, Kawai S, Okazaki M, Tsujimoto T, Kira JI, Kusunoki S. Electron microscopic abnormality and therapeutic efficacy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-neurofascin155 immunoglobulin G4 antibody. Muscle Nerve 2018; 57: 498-502 査読あり DOI: 10.1002/mus.25757

Fukumoto Y, Kuwahara M, Kawai S, Nakahama K, Kusunoki S. Acute demyelinating polyneuropathy induced by nivolumab. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2018; 89: 435-437 査読あり DOI: 10.1136/jnnp-2017-316510  
Kuwahara M, Kusunoki S. Mechanism and spectrum of anti-glycolipid antibody-mediated chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. Clin Exp Neuroimmunol 2018; 9: 65-74 査読あり DOI: 10.1111/cen3.12452

Kuwahara M, Samukawa M, Ikeda T, Morikawa M, Ueno R, Hamada Y, Kusunoki S. Characterization of the neurological diseases associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection and anti-glycolipid antibodies. J Neurol 2017 264:467-475 査読あり DOI: 10.1007/s00415-016-8371-1

Morikawa M, Kuwahara M, Ueno R, Samukawa M, Hamada Y, Kusunoki S. Serological study using glycoarray for detecting antibodies to glycolipids and glycolipid complexes in immune-mediated neuropathies. J Neuroimmunol 2016; 301: 35-40. 査読あり DOI: 10.1016/j.jneuroim.2016.10.010

Samukawa M, Kuwahara M, Morikawa M, Ueno R, Hamada Y, Takada K, Hirano M, Mitsui Y, Sonoo M, Kusunoki S. Electrophysiological assessment of Guillain-Barré syndrome with both Gal-C and ganglioside antibodies; tendency for demyelinating type. J Neuroimmunol 2016; 301: 61-64 査読あり DOI: 10.1016/j.jneuroim.2016.10.006

〔学会発表〕(計 18 件)

楠 進。免疫性神経疾患と自己抗体：Update。第 35 回日本神経治療学会総会（2017 年 11 月 16 日～18 日、大宮）  
Kusunoki S. CIDP and associated antibodies. 142nd Annual Meeting of the American Neurological Association, San Diego, USA, Oct 15-17, 2017  
吉川恵輔、森川みゆき、桑原基、楠 進。MFS, GBS, BBE におけるグライコアレイを用いた血清学的検討。第 29 回日本神経免疫学会学術集会（2017 年 10 月 6 日～7 日、札幌）  
Kusunoki S. Antibody associated inflammatory neuropathies. XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, Japan, Sept 16-21, 2017  
Kusunoki S. Autoimmune neuropathy. XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, Japan, Sept 16-21, 2017  
Morikawa M, Kuwahara M, Kusunoki S. Detection of antibodies to glycolipids and glycolipid complexes in immune-mediated neuropathies using glycoarray. XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, Japan, Sept 16-21, 2017  
Kuwahara M, Oka N, Ogata H, Suzuki H, Yanagimoto S, Sadakane S, Fukumoto Y, Yamana M, Yuhara Y, Yoshikawa K, Morikawa M, Kawai S, Okazaki M, Kira J, Kusunoki S. Clinical and pathological features in four patients with anti-neurofascin 155 IgG4 antibody-positive chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. 2017 PNS Annual Meeting, Sitges, Spain, July 8-12, 2017  
Yoshikawa K, Morikawa M, Kuwahara M, Kusunoki S. Differences of antibody reactivities against glycolipid complexes among Guillain-Barre syndrome, Miller Fisher syndrome and Bickerstaff brainstem encephalitis. 2017 PNS Annual Meeting, Sitges, Spain, July 8-12, 2017  
Kusunoki S, Morikawa M, Kuwahara M,

Ueno R, Samukawa M, Hamada Y. Investigation of serum antibodies against glycolipids and glycolipid complexes in immune-mediated neuropathies by combinatorial glycoarray. 2017 PNS Annual Meeting, Sitges, Spain, July 8-12, 2017  
Kusunoki S, Kuwahara M, Samukawa M, Morikawa M, Ueno R, Hamada Y. Antiglycolipid antibodies in neurological diseases subsequent to Mycoplasma pneumoniae infection. 141st Annual Meeting of American Neurological Association, Baltimore, USA, Oct 16-18, 2016  
楠 進。GBS の研究および診療における課題。第 28 回日本神経免疫学会学術集会（2016 年 9 月 29 日～30 日、長崎）  
桑原基、寒川真、池田妙、森川みゆき、上野莉乃、濱田征宏、楠 進。マイコプラズマ感染に伴う神経疾患と抗糖脂質抗体の特徴。第 28 回日本神経免疫学会学術集会（2016 年 9 月 29 日～30 日、長崎）  
Samukawa M, Kuwahara M, Ueno R, Hamada Y, Takada K, Hirano M, Mitsui Y, Sonoo M, Kusunoki S. Electrophysiological assessment in Guillain-Barré syndrome with both anti-Gal-C and other ganglioside antibodies. Inflammatory Neuropathy Consortium 2016, Glasgow University, Glasgow, UK, June 21-24, 2016  
Kuwahara M, Samukawa M, Hamada Y, Kusunoki S. The spectrum of neurological diseases associated with Mycoplasma pneumoniae infection and anti-glycolipid antibodies. Inflammatory Neuropathy Consortium 2016, Glasgow University, Glasgow, UK, June 21-24, 2016  
Kusunoki S. Gangliosides and anti-ganglioside antibodies. Inflammatory Neuropathy Consortium 2016, Glasgow University, Glasgow, UK, June 21-24, 2016  
寒川真、上野莉乃、濱田征宏、桑原基、平野牧人、三井良之、楠 進。他の抗糖脂質抗体を伴った Gal-C 抗体陽性 GBS の臨床的・電気生理学的検討。第 57 回日本神経学会学術大会（2016 年 5 月 18 日～21 日、神戸）  
楠 進。免疫性末梢神経障害。第 57 回日本神経学会学術大会（2016 年 5 月 18 日～21 日、神戸）  
桑原 基、森川みゆき、上野莉乃、寒川 真、濱田 征宏、楠 進。Combinatorial Glycoarray による網羅的抗糖脂質抗体の検出-ELISA との比較-第 56 回日本神経学会学術大会（2015

年 5 月 20 日 ~ 23 日, 新潟)

〔図書〕(計 2 件)

Kusunoki S. Guillain-Barré syndrome: epidemiology, diagnosis and treatment. In, Neuroimmunological Diseases (ed. by Kusunoki S), Springer Japan, Tokyo, pp153-164, 2016

Kusunoki S. Animal models: Anti-ganglioside antibodies as causative factor for GBS. In GBS100 (ed. by Willison HJ and Goodfellow JA), Peripheral Nerve Society, San Diego, USA, pp 365-371, 2016

6. 研究組織

(1)研究代表者

楠 進 (KUSUNOKI Susumu)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号: 90195438

(2)研究分担者

桑原 基 (KUWAHARA Motoi )  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号: 40460860

西郷 和真 (SAIGOH Kazumasa)  
近畿大学・理工学部・准教授  
研究者番号: 50319688

宮本 勝一 (MIYAMOTO Katsuichi)  
近畿大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50388526