

平成21年 3月21日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390264
 研究課題名（和文） 免疫性神経疾患における「ジシアロシル基をもつ糖タンパク」に対する免疫反応の解析
 研究課題名（英文） Analysis of immunoreactivity against glycoproteins with disialosyl residue in neuroimmunological diseases
 研究代表者
 楠 進 (KUSUNOKI SUSUMU)
 近畿大学・医学部・教授
 研究者番号：90195438

研究成果の概要：ジシアロシル基をもつ GD1b 感作によるウサギ失調性ニューロパチーモデルにおいて、後根神経節細胞のアポトーシスを確認した。GD1b にきわめて特異的な抗体が失調の病態に関連することを示した。Fisher 症候群および関連疾患で、GQ1b を含むガングリオシド複合体に特異的抗体の存在を見出した。ジシアロシル基に反応する抗体と神経組織のタンパク成分の反応を Western blotting で認めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,200,000	0	5,200,000
2007年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	2,940,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：免疫性神経疾患、末梢神経障害、運動失調、糖鎖、ガングリオシド、自己免疫

1. 研究開始当初の背景

われわれは、Guillain-Barré症候群(GBS)などの免疫性ニューロパチーにおいて、シアル酸を糖鎖に含む糖脂質であるガングリオシドに対する自己抗体が高頻度にみられ、診断マーカーおよび病態解明の手がかりとなることを報告してきた。とくに、ジシアロシル基をもつガングリオシドに反応する抗体は、失調性ニューロパチー(sensory ataxic neuropathy, SAN)に特異的に関連することを見出し、ジシアロシル基をもつGD1bでウサギを感作する

ことにより失調性ニューロパチーの動物モデル(GD1b-SAN)作成に成功していた。しかし、抗体結合後の神経障害のメカニズムの詳細な解明はまだなされていなかった。またGD1bに対する抗体をもつ症例でも運動失調のみられない症例もあり、失調を伴う例と伴わない例の抗体にどのような違いがあるかもわかっていなかった。同じくジシアロシル基をもつガングリオシドのGQ1bに対する抗体は、われわれが世界に先駆けて発見した抗体であり、Fisher症候群や眼球運動麻痺を伴うGBSにみ

られることはよく知られている。一方われわれはGBSにおいて、単独のガングリオシドではなく、二つのガングリオシドの糖鎖同士が相互作用して形成する新たなエピトープ（ガングリオシド複合体）に対する抗体の存在も報告していた。さらに抗ガングリオシド抗体は糖タンパクの糖鎖をも標的として結合するのではないかと考えられてきたが、証明はされていなかった。

2. 研究の目的

(1) 抗 GD1b 抗体を伴うニューロパチーの動物モデルである GD1b-SAN では、病理学的には炎症所見に乏しいことに着目し、抗 GD1b 抗体の深部感覚を伝える一次感覚ニューロンへの結合が引き金となり apoptosis をきたすという仮説の検証を行った。

(2) 抗 GD1b 抗体陽性の GBS では、失調を伴わない例も多いことから、抗 GD1b 抗体の反応特異性が多様である可能性を考え、GD1b に他のガングリオシドを加えた混合抗原（ガングリオシド複合体）に対する抗体活性を検討して、失調例と非失調例における抗体の反応性の違いについて解析した。

(3) 抗 GQ1b 抗体が高頻度にみられる疾患である Fisher 症候群および眼球運動麻痺を伴う GBS (GBS-OP+) について、抗ガングリオシド複合体抗体に関する検討を多数例を対象として行った。

(4) ジシアロシル基に反応する IgM 抗体陽性血清の、糖タンパクに対する反応性の有無を検討した。

3. 研究の方法

(1) 6羽のウサギを、既報(Kusunoki et al. *Ann Neurol* 1996;39:424-431)の方法により GD1b で感作し、GD1b-SAN を作成した。神経症状を発症したウサギおよび対照ウサギから組織を採取し、病理学的検討を行うとともに TUNEL 法および抗 caspase 3 抗体による染色で apoptosis の有無の検討を行った。

(2) スクリーニング検査において、IgG 抗 GD1b 抗体のみが陽性であった血清について、GD1b に他の各種ガングリオシドを混合した抗原に対する抗体活性(OD 値)を測定し、GD1b 単独に対する抗体活性と比較した。ま

た失調をきたした例とそうでない例に分けて、他のガングリオシドを混合した影響に差があるかどうか比べた。

(3) 全国の各施設から抗体検査以来のあった血清のうち、64 例の Fisher 症候群、53 例の GBS-OP+、53 例の眼球運動麻痺を伴わない GBS (GBS-OP-)を対象として、10 種のガングリオシドに対する IgG 抗体を測定した。また 7 種のガングリオシド(GM1, GM2, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, GQ1b)について、そのうち 2 種を 1:1 の割合で混合した複合体抗原に対する IgG 抗体活性を測定した。

(4) ヒトおよびマウスの神経組織のタンパク成分に対する、ジシアロシル基をもつガングリオシドに反応する患者血清 IgM 抗体の反応性を、Western blotting で検討した。

4. 研究成果

(1) GD1b で感作した 6羽のウサギでは、全てで抗 GD1b 抗体の上昇がみられ、そのうち 3羽に SAN の発症がみられた。発症したウサギ全てに、脊髄後索における軸索変性が認められた。そして後根神経節細胞の約 4%において TUNEL 法にて核の染色をみとめた。また抗 caspase 3 抗体によっても染色がみられた。アジュバントのみを接種したウサギや何も接種しなかったウサギでは、神経症状は出現しなかった。GD1b を接種したが発症しなかったウサギ、アジュバントのみを接種したウサギ、および何も接種しなかったウサギでは、TUNEL 法や抗 caspase 3 抗体による染色での陽性所見はみられなかった。以上より GD1b 感作による感覚障害性失調性ニューロパチーでは、一次感覚ニューロンの apoptosis をきたしていることがわかった。今後抗 GD1b 抗体の後根神経節への結合が apoptosis を引き起こすメカニズムについて、以前に報告した trkC の発現抑制の関与を含めて検討する必要がある。抗体の結合によるアポトーシスは、神経障害の新たな病態メカニズムであり、今後の解析により新規治療法開発につながる成果と考えられる。

(2) スクリーニング検査で IgG 抗 GD1b 抗体単独陽性 GBS は 15 例であった。それらの血中抗体の、他のガングリオシドを GD1b に混合した抗原に対する抗体活性をしらべ

ると、GD1a, GT1a, GT1b, GQ1b, GalNAc-GD1a との混合抗原に対して、GD1b 単独に対するものと比べて 50%以上の低下を示した。失調のみられた 9 例と、失調のみられなかった 6 例を比較すると、GD1a, GT1b, GQ1b, GalNAc-GD1a との複合体に対する抗体活性の減少の程度が、失調のみられた群において有意により大きかった。以上より、GD1b 単独に反応する抗体の活性が、GD1b にある種のガングリオシドを加えた混合抗原に対しては著明に減弱することがわかった。GD1b はある種のガングリオシドとの混合により糖鎖同士が複合体を形成し、その三次元構造を変化させると考えられる。失調のみられた例における抗 GD1b 抗体はこのような複合体に対する活性の減弱が非失調群のものとは比べてより著明であることから、糖鎖の三次元構造の変化に影響を受けやすく GD1b 自体への特異性がきわめて高いものと考えられた。

(3) Fisher 症候群および GBS-OP+ とともに 47%の症例が GQ1b と GM1 あるいは GQ1b と GD1a の複合体に特異性をもつ抗体を有していた。Fisher 症候群および GBS-OP+ は、抗体活性にもとづき、(1)GQ1b あるいは GT1a 単独に特異性をもつ抗体陽性、(2) 糖鎖末端のシアル酸が 2 個となる GQ1b/GM1, GQ1b/GD1b, GT1a/GM1, GT1a/GD1b などの複合体に対する抗体陽性、(3) 糖鎖末端のシアル酸が 3 個となる GQ1b/GD1a, GQ1b/GT1b, GT1a/GD1a, GT1a/GT1b などの複合体に対する抗体陽性、の 3 群に分類することができた。また GQ1b 単独には反応しないが複合体に反応する抗体を有する症例も存在した。Fisher 症候群の(2)群の症例では、感覚障害の頻度が低く、球麻痺をきたす率が低かった。GBS-OP+の(3)群では失調の率が低かった。GBS-OP+の(1)群では深部感覚障害の頻度が高かった。Fisher 症候群および GBS-OP+の抗体は、反応性にもとづき 3 群に分類できることが明らかとなった。また抗体の反応特異性は臨床症状とも関連することが示唆されたが、これは GQ1b や GT1a、およびそれらを含む複合体の神経系内分布の違いによる可能性があり、今後の検討が必要である。Fisher 症候群や GBS-OP+の血清

診断にあたっては、複合体に対する抗体を測定することで陽性率が上昇し、診断的意義が向上すると考えられる。また今回の結果は、吸着カラムを用いる治療法開発などにおいても念頭におく必要があると考えられる。

(4) ジシアロシル基に対する抗体活性をもつ失調性ニューロパチー患者血清 IgM 抗体を用いた Western blotting により、ヒト神経組織ホモジェネート中に陽性抗原がみられ、失調性ニューロパチーの標的抗原である可能性が考えられた。

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 14 件)

1. Takada K, Shimizu J, Kusunoki S. Apoptosis of primary sensory neurons in GD1b-induced sensory ataxic neuropathy. *Exp Neurol* 2008;209: 279-283 査読あり
2. Miyamoto K, Takada K, Furukawa K, Furukawa K, Kusunoki S. Roles of complex gangliosides in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glycobiology* 2008; 18:408-413 査読あり
3. Kanzaki M, Kaida K, Ueda M, Morita D, Hirakawa M, Motoyoshi K, Kamakura K, Kusunoki S. Ganglioside complexes containing GQ1b as targets in Miller Fisher and Guillain-Barré syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 1148-1152 査読あり
4. Kaida K, Kamakura K, Ogawa G, Ueda M, Motoyoshi K, Arita M, Kusunoki S. GD1b-specific antibody induces ataxia in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 2008; 71: 196-201 査読あり
5. Furiya Y, Hirano M, Kusunoki S, Ueda M, Nishiwaki T, Ueno S. Complete recovery of an aged patient with

- Guillain-Barré syndrome associated with multiple IgM anti-ganglioside antibodies. *Muscle Nerve* 2008; 38: 1630-1633. 査読あり
6. Kaida K, Sonoo M, Ogawa G, Kamakura K, Ueda M, Arita M, Motoyoshi K, Kusunoki S. GM1/GalNAc-GD1a complex: a target for pure motor Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 2008; 71: 1683-1690. 査読あり
 7. Kusunoki S, Kaida K, Ueda M. Antibodies against gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome: New aspects of research. *Bioch Biophys Acta* 2008; 1780: 441-444 査読あり
 8. Kaida K, Kusunoki S. Ganglioside complexes as target antigens in Guillain-Barré syndrome and related disorders. *Future Lipidol* 2008; 3: 425-434 査読あり
 9. Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies associated with severe disability in GBS. *J Neuroimmunol* 2007;182:212-8 査読あり
 10. Hamaguchi T, Sakajiri K, Sakai K, Okino S, Sada M, Kusunoki S. Guillain-Barré syndrome with antibodies to GD1a/GD1b complex. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78: 548-549 査読あり
 11. Fujita A, Cheng J, Hirakawa M, Furukawa K, Kusunoki S, Fujimoto T. Gangliosides GM1 and GM3 in the living cell membrane form clusters susceptible to cholesterol depletion and chilling. *Mol Biol Cell*, 2007;18: 2112-2122 査読あり
 12. Kusunoki S, van Doorn P. Predictors of respiratory failure in Guillain-Barré syndrome. *Nat Clin Pract Neurol* 2007;3: 430-431 査読あり
 13. Kuzumoto Y, Shioyama M, Kihara M, Kusunoki S. Abnormal sudomotor axon reflex and antiganglioside antibodies. *Muscle Nerve*, 2006;33:828-829 査読あり
 14. Kaida K, Kanzaki M, Morita D, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77: 1043-1046 査読あり
- [学会発表] (計 11件)
1. Kusunoki S. Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in autoimmune neuropathies. Ninth International Congress of Neuroimmunology. October 26-30, 2008, Fort Worth, Texas, USA.
 2. Kusunoki S. Serological characteristics of Bickerstaff's brainstem encephalitis: Comparison with Miller Fisher and Guillain-Barré syndromes. Inflammatory Neuropathy Consortium (INC) Meeting, Paris, France July 4-5, 2008.
 3. 楠 進。シンポジウム「末梢神経障害の研究－最近の進歩－」:免疫関連性ニューロパチー。第49回日本神経学会総会(2008年5月15日～17日、横浜)
 4. Kusunoki S. IgG antibodies highly specific to GD1b in Guillain-Barré syndrome with ataxia. 132nd Annual Meeting of American Neurological Association, Washington DC, USA, October 7-10, 2007.
 5. Kaida K. Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome with ophthalmoplegia. 132nd Annual Meeting of American Neurological Association, Washington DC, USA, October 7-10, 2007.
 6. Kusunoki S. IgG antibody highly specific to GD1b is specifically

associated with ataxia in Guillain-Barré syndrome. 2007 Meeting of the Peripheral Nerve Society, Snowbird, Utah, USA, July 14-18, 2007.

7. Kaida K. Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome with ophthalmoplegia. 2007 Meeting of the Peripheral Nerve Society, Snowbird, Utah, USA, July 14-18, 2007.
8. Kusunoki S. Antibodies against ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome; New aspects of research. Glycobiology and Sphingobiology 2007 - Hakomori Commemorative Forum -, Tokushima, Japan, February 27-March 1, 2007.
9. 楠 進. 炎症と末梢神経疾患。日本内科学会学術集会：第 35 回内科学の展望「慢性炎症と内科疾患」(2007年11月18日、神戸)
10. Kusunoki S. Going solo or in need of a friend: Ganglioside and lipid clusters form novel antigenic determinations in GBS. Eighth International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Japan, October 15-19, 2006. J Neuroimmunol 178(Suppl 1): 30, 2006.
11. Kusunoki S. Anti-GD1a/GD1b complex antibody is associated with severe Guillain-Barré syndrome. 131st Annual Meeting of the American Neurological Association, Chicago, USA, October 8-11, 2006. Ann Neurol 60 (suppl): S20, 2006.

[図書] (計 2 件)

1. Kaida K, Kamakura K, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome. In, Current Topics in Neuroimmunology (ed. by Tabira T, Yamamura T, Kira J. Medimond) pp223-228, 2006.
2. Kusunoki S. Antiglycolipid antibodies in autoimmune neuropathies; new

aspects of research. In, Neuroimmunology Research Focus (ed. by Broglio PV), Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, pp 85-99, 2007.

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

宮本 勝一(MIYAMOTO KATSUICHI)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号 50388526

(3) 連携研究者

なし