

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390273

研究課題名（和文） 抗ガングリオシド抗体による神経細胞障害機序の解析：細胞内シグナル伝達への作用

研究課題名（英文） Analysis of the neuropathogenic mechanisms induced by the antiganglioside antibodies: the effect on signal transduction in neurons

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（和文）：感覚障害性運動失調性ニューロパチーを発症したウサギの抗 GD1b 抗体を、培養ウサギ後根神経節細胞に作用させると神経突起の形態異常がみられた。PC12 細胞を用いて、軸索障害型のギラン・バレー症候群にみられる抗 GM1 抗体が、細胞膜のラフトの構造や細胞内シグナル伝達を変化させることを示した。ヒト末梢神経ミエリンに局在する LM1 および LM1/GM1, LM1/GD1b 複合体に対する抗体を、脱髄型ギラン・バレー症候群と慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーで認めた。

研究成果の概要（英文）：Addition of the anti-GD1b antibodies from rabbits affected with sensory ataxic neuropathy to cultured rabbit dorsal root ganglia neurons caused morphological changes in the neuritis. Anti-GM1 antibodies from patients with axonal type of Guillain-Barré syndrome (GBS) directly influence the integrity of the lipid rafts and alter the signal transduction in the cells. Antibodies against LM1, a glycolipid localized in human peripheral nerve myelin, and such ganglioside complexes as LM1/GM1 and LM1/GD1b were detected in sera from patients with demyelinating type of GBS and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

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：糖鎖、脳神経疾患、神経科学、脳・神経、免疫学

1. 研究開始当初の背景

われわれは、これまでに免疫性ニューロパチーと抗ガングリオシド抗体について、さまざまな研究成果を報告してきた。とくにわれわれがみだしたフィッシャー症候群（眼球

運動麻痺と小脳性失調をきたす）の抗 GQ1b IgG 抗体は、特異性と陽性率が高く、有用な検査として日常診療のレベルで用いられるに至っている。また深部感覚を伝える一次感覚ニューロン（後根神経節の大型神経細胞）に局

在するガングリオシド GD1b でウサギを感作して、失調性ニューロパチー (GD1b-induced sensory ataxic neuropathy, GD1b-SAN) の作成に成功した。これは抗 GD1b 抗体を伴うヒトの失調性ニューロパチーを再現し、抗ガングリオシド抗体が神経障害の発症因子となることをはじめて証明するものであった。

さらに近年、ギラン・バレー症候群 (GBS) 血中に単独のガングリオシドではなく複数のガングリオシドの糖鎖が形成するエピトープ (ガングリオシド複合体) を認識する抗体の存在をはじめて示した。ラフトではガングリオシドがクラスターを形成しており、抗ガングリオシド複合体抗体はラフトのガングリオシドに効率よく結合してシグナル伝達に影響する可能性がある。

抗ガングリオシド抗体が神経障害をきたすメカニズムについては、他のグループから補体介在性の膜障害や運動神経終末からの伝達物質放出障害が報告されている。一方われわれは、GD1b-SAN の急性期のウサギ後根神経節に大型神経細胞のアポトーシスを見出した。抗 GD1b 抗体の GD1b をもつ大型神経細胞への結合がアポトーシスを誘導するという全く新しいメカニズムが示唆される。また GD1b-SAN の急性期に、大型神経細胞の栄養因子 neurotrophin-3 (NT-3) のレセプターである *trkC* の発現抑制を見出し、*trkC* が病態機序に関わっていることを示した。

一方、他のグループにより抗ガングリオシド抗体の結合が、細胞内シグナル伝達系に作用することが報告されている。例えば抗 GD3 抗体処理によりラット小脳顆粒細胞の *Src* family tyrosine kinase である *Lyn* が活性化されること、また肺小細胞癌の細胞を抗 GD2 抗体で処理すると focal adhesion kinase のリン酸化が抑制されアポトーシスをきたすこと、などである。

以上より、免疫性ニューロパチーにおける抗ガングリオシド抗体あるいは抗ガングリオシド複合体抗体がどのように神経障害をきたすかのメカニズムについて、いくつかの手がかりが得られていることから、細胞内シグナル伝達系に及ぼす作用を含めてさらに詳細な解析をする必要があると考え本研究を立案した。

2. 研究の目的

(1) 抗 GD1b 抗体の後根神経節細胞に対する作用の解析

抗 GD1b 抗体は深部感覚障害による運動失調性ニューロパチーにみられる。われわれは、ウサギモデルにおいて GD1b 特異的抗体が発症因子であることを示し、運動失調症状をともなう GBS で GD1b にきわめて特異性の高い抗体がみられることを報告した。また GD1b-SAN では急性期に後根神経節の大型神経細胞のアポトーシスがみられる (前述)。そこで本研究では、後根神経節大型細胞に対する抗 GD1b 抗体の作用メカニズムを培養系および運動失調を呈したウサギの神経節細胞を用いて解析する。

(2) PC12 細胞を用いた解析

PC12 細胞を用いて、抗 GM1 抗体の *Trk* に対する作用が報告されていることから、同じ系を用いて GBS 患者血中の抗 GM1 抗体の作用を検討する。

(3) ガングリオシド複合体に対する抗体活性の検討

これまでに GD1a/GD1b, GM1/GalNAc-GD1a などの複合体に対する抗体を見出してきたが、まだ検討されていない組み合わせが数多くある。それらに対する抗体活性を検討する。とくに特異的抗体がみられることの少ない脱髄性ニューロパチーにおける抗体を検討する。またガングリオシド複合体に対する抗体が神経障害をきたすかを解析する。

3. 研究の方法

(1) 感覚障害性運動失調性ニューロパチーにみられる抗 GD1b 抗体の後根神経節細胞に対する作用を検討するため、正常のウサギから後根神経節を採取し、常法に従い (Sango K et al, *Exp Neurol* 2003; 182:1-11 など) 細胞培養を行った。培養系に運動失調性ニューロパチーをきたしたウサギ血清から精製した抗 GD1b 抗体を入れて、形態学的変化を検討した。

(2) GD1b 感作によるウサギ運動失調性ニューロパチーモデルを作成し、発症したウサギから後根神経節を採取して mRNA の発現を

解析した。アジュバントのみを投与したウサギおよび感作なしのウサギを対照とした。

(3) PC12 細胞に対して、軸索障害型ギラン・バレー症候群(GBS)患者急性期血清中の抗 GM1 抗体を作用させて検討した。

(4) 新しいガングリオシド複合体に対する抗体活性の検討として、Fisher 症候群あるいは眼球運動麻痺を伴う GBS における GQ1b や GT1a 関連の複合体、および GBS や慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)における末梢神経ミエリンの糖脂質である LM1 および LM1 関連の複合体に対する抗体活性を検討した。

(5) 抗ガングリオシド複合体抗体の神経障害性を検討するため、抗 GM1/GD1a 抗体や抗 GM1/GQ1b 抗体などのマウス横隔膜標本に対する作用を検討した。

(6) イタリアのグループが GM1 と GD1a を結合して作成した GM1-GD1a hybrid に対する反応性を、GBS の抗 GM1/GD1a 複合体抗体について検討した。

4. 研究成果

(1) 培養早期の神経細胞を抗 GD1b 抗体で処理した場合に、神経突起に形態的異常が観察された。対照のウサギ IgG ではそのような所見はみられず、GD1b に対する抗体活性によると考えられ、抗 GD1b 抗体による神経障害が示された。

(2) GD1b 感作によるウサギ運動失調性ニューロパチーモデル後根神経節における mRNA の発現を、深部感覚を伝える後根神経節の大型細胞の生存に関わる NT-3 のレセプターである TrkC やその上流の Runx について調べたが、明らかな差は見出されなかった。抗 GD1b 抗体の作用は後根神経節大型細胞に特異的に起こるため、今後大型細胞を選択的に集めてさらに検討する予定である。

(3) 抗 GM1 抗体を作用させた細胞では、NGF による Trk のリン酸化が阻害され、細胞膜のラフトの構造にも変化がみられることが明らかとなった。従って、免疫性ニューロパチーの病態における抗ガングリオシド抗体の作用として、抗体結合に引き続き補体系が関与して膜障害を引き起こすというメカニズム以外に、細胞内のシグナル伝達に対

する影響も考慮する必要があるが示唆された。

(4) 眼球運動麻痺を伴う GBS あるいは Fisher 症候群で、GQ1b や GT1a 単独に対するよりも GA1 との混合抗原 (GA1/GQ1b や GA1/GT1a) により強い反応性をもつ抗体の存在を見出した。単独抗原には全く反応せず、GA1 との混合抗原にのみ反応を示す場合もあることから、GA1 との混合抗原に対する抗体も検討項目に入れることが Fisher 症候群および関連疾患の診断に有用と考えられた。また GA1/GQ1b や GA1/GT1a に強く反応するが、GM1 との混合抗原では反応が増強しない例もあり、基本糖鎖の内側に結合するシアル酸の存在が、エピトープの認識に重要と考えられた。

(5) 末梢神経のミエリンに局在する糖脂質である LM1 に焦点を当て、GBS および従来標的分子についての情報の少ない CIDP における血中抗体の検討を行った。その結果、CIDP および GBS の急性期の一部の症例で、LM1 あるいは GM1 や GD1b と LM1 の複合体に対する IgG 抗体が上昇していることがわかった。GBS の陽性例は脱髄型であった。LM1 および LM1 を含むガングリオシド複合体は、脱髄型の免疫性ニューロパチーの重要な標的と考えられた。

(6) 抗ガングリオシド複合体抗体 (抗 GM1/GD1a 抗体と抗 GM1/GQ1b 抗体) が、マウス横隔膜標本における神経筋伝達を阻害することがわかった。この結果は、ガングリオシド複合体が神経細胞膜上に形成されており、抗ガングリオシド複合体抗体が神経細胞膜上で障害性に働くことをはじめて明らかにしたものである。

(7) GBS でみられる抗 GM1/GD1a 抗体は、GM1-GD1a hybrid に強く反応し、GM1-GD1a hybrid がガングリオシド複合体と同様の糖鎖構造をもつことが示された。従来抗ガングリオシド複合体抗体は、ELISA プレート上で、あるいは薄層クロマトグラム上で形成された抗原エピトープに対する反応によってしか解析できなかった。今回開発された hybrid は、ガングリオシド複合体の詳細な構造解析や神経系における分布の解析にきわめて有用と考えられる。

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9件)

Mauri L, Casellato R, Ciampa MG, Uekusa Y, Kato K, Kaida K, Motoyama M, Kusunoki S, Sonnino S. Anti-GM1/GD1a complex antibodies in GBS sera specifically recognize the hybrid dimer of GM1-GD1a. *Glycobiology* 2012; 22: 352-360. 査読あり DOI:10.1093/glycob/cwr139

Zitman FMP, Greenshields KN, Kuijff ML, Ueda M, Kaida K, Broos LAM, Tio-Gillen AP, Jacobs BC, Kusunoki S, Willison HJ, Plomp JJ. Neuropathophysiological potential of Guillain-Barré syndrome anti-ganglioside-complex antibodies at mouse motor nerve terminals. *Clin Exp Neuroimmunol* 2011; 2: 59-67. 査読あり DOI: 10.1111/j.1759-1961.2011.00022.x

Kuwahara M, Suzuki S, Takada K, Kusunoki S. Antibodies to LM1 and LM1-containing ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol* 2011; 239: 87-90. 査読あり DOI:10.1016/j.jneuroim.2011.08.016

Moriguchi K, Miyamoto K, Takada K, Kusunoki S. Four cases of anti-ganglioside antibody-positive neuralgic amyotrophy with good response to intravenous immunoglobulin infusion therapy. *J Neuroimmunol* 2011; 238: 107-109. 査読あり DOI:10.1016/j.jneuroim.2011.08.005

Kusunoki S, Kaida K. Antibodies against ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and related disorders. *J Neurochem*, 2011; 116: 828-832 査読あり DOI:10.1111/j.1471-4159.2010.07029.x

Ueda A, Shima S, Miyashita T, Ito S, Ueda M, Kusunoki S, Asakura K, Mutoh T. Anti-GM1 antibodies in axonal form of Guillain-Barré syndrome affect the integrity of lipid rafts. *Mol Cell Neurosci* 2010; 45: 355-362. 査読あり DOI:10.1016/j.mcn.2010.07.008

Kaida K, Kusunoki S. Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: Mini-review. *J Neuroimmunol*, 2010; 223: 5-12. 査読あり DOI:10.1016/j.jneuroim.2010.02.001

Ogawa G, Kaida K, Kusunoki S, Ueda M, Motoyoshi K, Kamakura K. Antibodies to ganglioside complexes consisting of asialo-GM1 and GQ1b or GT1a in Fisher and Guillain-Barré syndromes. *J Neuroimmunol* 2009; 214: 125-127. 査読あり DOI:10.1016/j.jneuroim.2009.06.017

Kaida K, Kusunoki S. Guillain-Barré syndrome: update on immunology and treatment. *Expert Rev Neurother* 2009; 9: 1307-1319 査読あり DOI:10.1586/ern.09.77

[学会発表](計17件)

Kusunoki S. Clinical relevance of the fine specificity of IgG anti-GQ1b antibodies. 2011 Meeting of the Peripheral Nerve Society, The Bolger Center, Potomac, MD, USA, June 25-29, 2011.

Kaida K. Clinical and immunological features of anti-GM1/GalNAc-GD1a-positive Guillain-Barré syndrome. 2011 Meeting of the Peripheral Nerve Society, The Bolger Center, Potomac, MD, USA, June 25-29, 2011.

楠 進. シンポジウム「機能性糖鎖:基礎から疾患まで」 免疫性末梢神経障害と糖鎖に対する抗体. 第84回日本生化学

会大会(2011年9月21日~24日、京都国際会館、京都)

Kusunoki S. Antibodies to glycoconjugates in autoimmune neuropathies. 42nd Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry, the Manchester Grand Hyatt, St. Louis, USA, March 19-23, 2011

桑原基。免疫性ニューロパチーにおけるLM1に対する抗体の検討について。第52回日本神経学会学術大会(2011年5月18日~20日、名古屋国際会議場、名古屋)

楠 進。ホットトピックス：自己抗体からみたニューロパチー。第52回日本神経学会学術大会(2011年5月18日~20日、名古屋国際会議場、名古屋)

Kusunoki S. Antiganglioside complexes antibodies in Guillain-Barré syndrome. Neuroimmunology Kyoto Conference 2010, Hotel Kyoto Garden Place, Kyoto, Japan, August 18-21, 2010
Kusunoki S. Gangliosides and ganglioside complexes as targets for Guillain-Barré syndrome. The Fourth ISN Special Neurochemistry Conference "Membrane Domains in CNS Physiology and Pathology", Ettore Majorana Center, Erice, Italy, May 22-26, 2010

楠 進。レビュートーク「神経免疫と臨床免疫：現在の到達点」：免疫性末梢神経疾患の基礎と臨床。第22回日本神経免疫学会学術集会(2010年3月17日~19日、日経ホール、東京)

Kusunoki S. Gangliosides and ganglioside complexes as targets for neuroimmunological diseases. Second German-Japanese Neuroimmunology Symposium. the Eibsee hotel, Eibsee, Germany, July 9-12, 2009

Kusunoki S. Clinical features of Guillain-Barré syndrome with anti-GD1a/GD1b IgG antibodies. 2009 Meeting of Peripheral Nerve Society.

the Eibsee hotel, Wurzburg, Germany, July 4-8, 2009

楠 進。シンポジウム「末梢神経疾患研究の現在」：免疫介在性ニューロパチー。第50回日本神経学会総会(2009年5月20日~22日、仙台国際センター、仙台)

〔図書〕(計1件)

楠 進。GBS とガングリオシド複合体抗体 - 最近の知見 - 。Annual Review 神経 2011 (鈴木則宏 他、編、中外医学社、東京) pp293-299, 2011

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

河原 佐智代 (KAWAHARA SACHIYO)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：60297629

(3)連携研究者

なし