

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19500

研究課題名(和文)rafts病としてのギランバレー症候群の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathology of Guillain-Barre syndrome as rafts's disease

研究代表者

植田 晃広(Ueda, Akihiro)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：20600703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：軸索障害型Guillain-Barre症候群(GBS)の患者血清中に抗GM1抗体が検出されることがある。しかし、抗GM1抗体の出現とGBSの病態の関連は、完全には解明されていない。我々は、抗GM1抗体が、神経系培養細胞の細胞膜上の、中性スフィンゴミエリナーゼ(nSMase)の活性と量を減少させ、神経細胞膜のスフィンゴミエリンが増加することを見出した。また、神経系培養細胞からのエキソソームの分泌も減少していた。抗GM1抗体が、神経系培養細胞の細胞膜の脂質組成を変化させ、エキソソーム分泌量を減少させるという観点から、GBSの病態に新たな知見を加え、今後の治療法に示唆を与える研究成果である。

研究成果の概要(英文)： Previous studies have shown that patients with Guillain-Barre syndrome express autoantibodies against GM1, although its pathogenic significance for the development of the disease remains to be elucidated.

nSMase2 is the best characterized neutral sphingomyelinase (nSMase) found in neuronal cells. We have explored the effects of anti-GM1 antibodies on sphingomyelin metabolism of PC12 cells stably transfected with human trk cDNA (PCtrk cells) by determining their effects on nSMase2 activity. The data we present here strongly suggest that anti-GM1 caused a significant change in ceramide and sphingomyelin content of the membrane fraction in PCtrk cells. Both nSMase2 activity and the level of nSMase2 protein were significantly decreased by anti-GM1 treatment of PCtrk cells, while acidic SMase activities remained unchanged. Our results indicate, for the first time, that anti-GM1 may produce profound impacts on lipid metabolism in neuronal cell membranes.

研究分野：神経内科学

キーワード：Guillain-Barre syndrome anti-GM1 antibody neutral sphingomyelinase sphingomyelin lipid rafts

1. 研究開始当初の背景

軸索障害型 GBS (Guillain-Barré syndrome) 患者の多くに ganglioside GM1 (GM1) に対する自己抗体が認められることは以前から知られている。細胞膜 lipid rafts はガングリオシド (Gg: ganglioside) などの糖脂質、中性糖脂質、sphingomyelin (SM)、コレステロールで形成される細胞膜の微小領域で、“筏”のように細胞膜上に存在している。そして、このマイクロドメイン中には種々例えば Trk、Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) などの受容体型チロシンキナーゼ、GPI-anchored protein などのシグナル伝達分子も共局在しており、細胞の外部刺激への交流の窓口の役割を果たす極めて重要な構造物である。我々はこれまで神経成長因子 (NGF: nerve growth factor) の高親和性受容体である Trk がこの lipid rafts に局在すること、また同様にこの lipid rafts に存在する GM1 が Trk と直接の分子関係を持ち positive にその機能を制御している事実を見出し報告してきた¹⁾⁻⁴⁾。

一方、近年他の神経疾患例えばアルツハイマー病やパーキンソン病、プリオン病などでは、異常蛋白が lipid rafts 上に存在あるいは lipid rafts で産生されることが示唆され、これら疾患の病態発現にこの lipid rafts が重要な役割を果たしている事が報告されてきている。しかし、GBS においてはこの構造物の重要な構成物質 (GM1) に対する抗体が発見されているにも関わらず、lipid rafts を標的とした研究は文献上見当たらなかった。

そこで、我々は軸索障害型 GBS 患者 9 例と age-matched control 10 例の血清を用いて、これら血清が lipid rafts を介する細胞内情報伝達系に及ぼす影響を調べた。PC12 細胞に *Trk* の cDNA を導入し *Trk* を高発現させた PC12 細胞を使用し、軸索障害型 GBS 患者血清中の抗 GM1 抗体が、NGF の *Trk* 受容体を介する分化・生存への重要なシグナル伝達系を障害することを証明し、本症が lipid rafts を target とした“rafts 病”である可能性を世界で初めて報告した⁵⁾。

一方で、我々は、脳脊髄根末梢神経炎 (EMRN: encephalomyelorradiculoneuropathy) の患者血清・髄液中に中性糖脂質に対する抗体を見出し、それが病態発生に関与することを報告した⁶⁾。

GBS 患者血清中で抗体が検出される GM1 を含む Gg (酸性糖脂質) も、EMRN 患者血清中で抗体が検出される中性糖脂質も、コレステロールや SM とともに lipid rafts を構成する重要な分子である。重要な点は、これらの抗体が存在すると lipid rafts に作用し、lipid rafts 構造の変化を来す可能性があること、*Trk* では既に証明されているがその他の lipid rafts 上に存在する重要な分子の局在や機能にも影響が及ぶのではないかということである。lipid rafts という細胞膜上の“筏”の材料に対する抗体が存在すると、“筏”が壊れてしまい“筏の乗組員”である重要な分子が居なくなったり、働けなくなったりすることが想定される。この分子機構を研究することは、極めて独創的であり本疾患

の本態に迫れるブレークスルーとなる研究と思われた。

2. 研究の目的

本研究では、lipid rafts に局在する中性スフィンゴミエリナーゼ (nSMase: neutral sphingomyelinase) を標的とした。nSMase は、やはり lipid rafts の構成物質である SM を分解し、セラミドとフォスフォコリンを産生する。セラミドはそれ自体が細胞内情報伝達の分子として働くだけでなく、セラミドから中性糖脂質が産生され、シアル酸が結合し酸性糖脂質である種々の Gg が合成される。主にライゾソーム内で作用する酸性スフィンゴミエリナーゼ (aSMase: acid sphingomyelinase) は長く研究されてきたが、近年 nSMase に関する知見も散見されるようになってきた。既に、PC12 細胞や小脳顆粒細胞を用いた研究により、nSMase の基礎活性が NGF や脳由来神経栄養因子 (BDNF: Brain-derived neurotrophic factor) などの神経成長因子の働きに影響を及ぼすことが報告をされた^{7),8)}。また nSMase はエンドソームの産生に関与し細胞膜と細胞内の物質輸送に関与していることも報告された⁹⁾。

このように、nSMase は、lipid rafts の構成分子の SM 分解とセラミド産生、それに引き続く中性・酸性糖脂質酸性の合成を介して、細胞内外の情報伝達を担う *Trk* などの受容体型チロシンキナーゼなど lipid rafts 上の重要シグナル伝達分子の働きにも影響し、細胞膜と細胞内の物質郵送にもエンドソームを介して関与することで、lipid rafts を含む細胞膜のダイナミックな変化に重要な働きをしている。

本研究の目的は、抗 GM1 抗体が作用した時に、nSMase 活性にどのような変化が起きるかを明らかにすること、lipid rafts を含めた細胞膜の構造への影響を明らかにすること、lipid rafts 上の重要分子の局在と機能変化を明らかにすることである。これらの結果から GBS の病態のさらなる解明、ひいては他の lipid rafts を target とする“rafts 病”の病態解明と、新たな治療法開発をめざした。

3. 研究の方法

(1) 実験細胞 ラット褐色細胞腫由来の PC12 細胞にヒト *Trk* cDNA を導入し、*Trk* を高発現させた PC12 細胞を実験に使用した。Serum free とした後に、抗 GM1 抗体で最終濃度 1000 倍となるようにして 24 時間処理した細胞と、未処理の細胞を比較した。

(2) 細胞画分法 細胞をホモジェナイズし、適当な緩衝液を用いて 700g で遠心し、未破碎細胞と核の画分を回収した。その上清を、 $\times 305400g$ で超遠心し、上清を可溶性細胞質画分、ペレットを回収し膜画分とした。

(3) nSMase 活性測定 膜画分と細胞質画分の nSMase 活性は Amplex[®] Red Sphingomyelinase Assay Kit (Invitrogen) を用いて測定した。

(4) Western blot 法 膜画分の nSMase 量は、蛋白を SDS-Page し、PVDF 膜に転写、一次抗体として anti-nSMase2 antibodies (anti-nSMase2) (Santa Cruz Biotechnology)

を用いバンドを検出し、定量した。

(5) 脂質分析 細胞の凍結融解を繰り返した後に、テトラヒドロフランで total lipid extracts (TLEs) として脂質を回収した。

TLEs をアルカリ化し、メタノールとヘキサンの精製し、中性糖脂質を多く含む neutral glycosphingolipid fraction (NGL) を得た。NGL は high performance thin-layer chromatography plate (HPTLC) で展開し、アニサルデートで発色させ定量した。

TLEs の ganglioside を含む水溶性の画分は、aqueous fraction (AF) とし、アルカリ化し、透析膜を用いて 4 日間透析した。それを HPTLC で展開し、レゾルシノールで発色させ定量した。

(6) lipid rafts 画分の回収 細胞をホモジエネートし、 $\times 3300g$ で遠心し上清を得た。その上清を、 $\times 55000g$ で 18 時間遠心するショ糖密度勾配超遠心法を用いて、lipid rafts 画分を回収した。

(7) エキソソームの回収 エキソソームは、細胞培養液から Invitrogen のキットを用いて回収した。

(8) 統計解析 Graph Pad Prism version5 (GraphPad Software) を用いた。各グループの有意差検定は、Wilcoxon signed rank test を用いた。

4. 研究成果

(1) PCtrk 細胞に最終濃度 $\times 1000$ となるように抗 GM1 抗体を加え 24 時間処理した細胞群では、未処理のものに比べて、有意に nSMase 活性が膜画分で低下していた。細胞質画分では有意な変化は認められなかった。また、fucosyl-GM1 では変化を認めなかった。

(2) 膜画分の蛋白を Western blot し、nSMase 量を検討した。結果、膜画分では抗 GM1 抗体で 24 時間処理すると、有意に nSMase 蛋白量が減少していた。

(3) 脂質分析では、抗 GM1 抗体 $\times 1000$ で 24 時間処理した細胞の膜画分では、SM 量が有意に増加していた。Ganglioside の量には変化を認めなかった。

全細胞での脂質分析では、抗 GM1 抗体処理した細胞と、未処理の細胞で、有意な変化を認めなかった。

(4) lipid rafts の画分でも、抗 GM1 抗体 nSMase 活性は有意に低下していた。

(5) 細胞培養液中のエキソソーム量は、抗 GM1 抗体で 24 時間処理した細胞培養液で有意に減少していた。

これらの結果は、抗 GM1 抗体が細胞膜上の nSMase 活性と量に影響を及ぼし、細胞膜の脂質の組成を変化させ得ることを新たに示した。さらに、nSMase がエキソソームの分泌に関与しているという既報告¹⁰⁾⁻¹²⁾に矛盾せず、抗 GM1 抗体の影響で培養液中のエキソソーム量が減少していた。これらの新発見は、GBS の新たな病態を明らかにし、今後の治療法の開発に寄与すると考えられた。

<引用文献>

1 Mutoh T, Tokuda A, Guroff G et al. The effect

of the B subunit of cholera toxin on the action of nerve growth factor on PC12 cells. *J Neurochem.* 1993 Apr;60:1540-7.

2 Mutoh T, Tokuda A, Miyadai T et al. Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(11):5087-91.

3 Mutoh T1, Tokuda A, Inokuchi J et al. Glucosylceramide synthase inhibitor inhibits the action of nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem.* 1998;273(40):26001-7.

4 Mutoh T1, Hamano T, Tokuda A et al. Unglycosylated Trk protein does not co-localize nor associate with ganglioside GM1 in stable clone of PC12 cells overexpressing Trk (PCtrk cells). *Glycoconj J.* 2000;17:233-7.

5 Ueda A1, Shima S, Miyashita T et al. Anti-GM1 antibodies affect the integrity of lipid rafts. *Mol Cell Neurosci.* 2010 ;45(4):355-62.

6 Shima S1, Kawamura N, Ishikawa T et al. Anti-neutral glycolipid antibodies in encephalomyeloradiculoneuropathy. *Neurology.* 2014;82(2):114-8.

7 Candalija A, Cubí R, Ortega A et al. Trk receptors need neutral sphingomyelinase activity to promote cell viability. *FEBS Lett.* 2014 Jan 3;588(1):167-74.

8 Milhas D, Clarke CJ, Hannun YA. Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids. *FEBS Lett.* 2010 ;584(9):1887-94

9 Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science.* 2008 Feb 29;319(5867):1244-7.

10 Dinkins, M.B., Dasgupta, S., Wang, G., Zhu, G., Bieberich, E., 2014. Exosome reduction in vivo is associated with lower amyloid plaque load in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 35, 1792-800.

11 Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M.Á., Bernad, A., Sánchez-Madrid, F., 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun.* 20, 282.

12 Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., Ochiya, T., 2010. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.* 285, 17442-17452.

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4件)

- (1) Ueda A, Shima S, Murate K, Kikuchi K, Nagao R, Maeda T, Muto E, Niimi Y, Mizutani Y, Mutoh T. Anti-GM1 ganglioside antibodies modulate membrane-associated sphingomyelin metabolism by altering neutral sphingomyelinase activity. *Mol Cell Neurosci*. 2018, 89, 42-48. 査読有.
- (2) Ueda A, Nagao R, Maeda T, Kikuchi K, Murate K, Niimi Y, Shima S, Mutoh T. Absence of serum anti-NMDAR antibodies in anti-NMDAR encephalitis mother predicts having healthy newborn. *Clin Neurol Neurosurg*. 2017, 161, 14-16. 査読有.
- (3) Niimi Y, Ito S, Murate K, Hirota S, Hikichi C, Ishikawa T, Maeda T, Nagao R, Shima S, Mizutani Y, Ueda A, Mutoh T. Usefulness of combining 123I-FP-CIT-SPECT striatal asymmetry index and cardiac 123I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy examinations for diagnosis of parkinsonisms. *J Neurol Sci*. 2017, 15;377, 174-178. 査読有.
- (4) Ishikawa T, Asakura K, Mizutani Y, Ueda A, Murate K, Hikichi C, Shima S, Kizawa M, Komori M, Murayama K, Toyama H, Ito S, Mutoh T. MR neurography for the evaluation of CIDP. *Muscle Nerve*. 2017, 55(4), 483-489. 査読有.

〔学会発表〕(計25件)

- (1) 武藤多津郎、水谷泰彰、新美芳樹、植田晃広、島さゆり、村手健一郎.

Clioquinol の培養 astrocyte に及ぼす作用の解明. 平成 29 年度 スモンに関する調査研究班 研究報告会. 2018.2.2.

- (2) 武藤多津郎、島さゆり、新美芳樹、水谷泰彰、村手健一郎、植田晃広、伊藤信二. 多数例から見た脳脊髄根末梢神経炎 (EMRN) の病像と抗糖脂質抗体. 平成 29 年度 神経免疫疾患研究班 班会議. 2018.1.19.
- (3) 武藤多津郎、石川等真、植田晃広、島さゆり、村手健一郎、伊藤信二. CIDP 患者末梢神経組織の画像化と定量の試み. 平成 28 年度免疫性ニューロパチー班班会議, 2017.1.19.
- (4) 武藤多津郎、村手健一郎、新美芳樹、水谷泰彰、島さゆり、植田晃広、伊藤信二. Clioquinol の神経系細胞に及ぼす影響の解明. 平成 28 年度スモンに関する調査研究班班会議, 2017.02.03.
- (5) 廣田政古、伊藤信二、植田晃広、長尾龍之介、前田利樹、村手健一郎、引地智加、石川等真、島さゆり、新美芳樹、武藤多津郎. 視神経炎を合併した抗 NMDA 受容体 (NMDAR) 脳炎の 1 例. 第 147 回神経学会地方会, 2017.3.11.
- (6) 菊池洸一、村手健一郎、植田晃広、長尾龍之介、前田利樹、廣田政古、石川等真、新美芳樹、水谷泰彰、島さゆり、伊藤信二、武藤多津郎. 変動する意識障害が診断の契機となった門脈-大循環シャントの 1 例. 第 232 回日本内科学会東海地方会 2017.6.11.
- (7) 長尾龍之介、前田利樹、伊藤信二、菊池洸一、村手健一郎、廣田政古、引地智加、石川等真、島さゆり、水谷泰彰、

- 新美芳樹、植田晃広、武藤多津郎. 下肢筋痛が主症状となったビタミンB1欠乏症の1例 第148回日本神経学会東海北陸地方会 2017.7.15.
- (8) Ito S, Ueda A, Kikuchi K, Nagao R, Maeda T, Murate K, Hirota S, Hikichi C, Ishikawa T, Shima S, Mizutani Y, Niimi Y, Mutoh T. The serial D-dimer measurements predicts the prognoses of Trousseau's syndrome patients. XX World Congress of Neurology, Kyoto 2017.9.18.
- (9) Niimi Y, Ito S, Murate K, Hirota S, Hikichi C, Ishikawa T, Maeda T, Nagao R, Kikuchi K, Shima S, Mizutani Y, Ueda A, Mutoh T. Combinatory use of 123I-FP-CIT-SPECT and cardiac 123I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy for the diagnosis of Parkinsonisms. XX World Congress of Neurology, Kyoto 2017.9.18.
- (10) Ueda A, Kikuchi K, Nagao R, Maeda T, Murate K, Hirota S, Hikichi C, Ishikawa T, Niimi Y, Mizutani Y, Shima S, Ito S, Mutoh T. ANTI-GM1 GANGLIOSIDE ANTIBODIES IMPAIR MEMBRANE AND RAFTS GLYCOLIPIDS METABOLISM IN PC12 CELLS. XX World Congress of Neurology, Kyoto 2017.9.18.
- (11) Shima S, Kikuchi K, Nagao R, Maeda T, Murate K, Hirota S, Hikichi C, Ishikawa T, Niimi Y, Mizutani Y, Ueda A, Ito S, Mutoh T. CLINICAL DETAILS OF 20 ENCEPHALOMYELORADICULONEUROPATHY CASES. XX World Congress of Neurology, Kyoto 2017.9.20.
- (12) 村手健一郎、植田晃広、菊池洸一、長尾龍之介、前田利樹、廣田政古、引地智加、石川等真、新美芳樹、島さゆり、水谷泰彰、伊藤信二、武藤多津郎. 正常児を得た妊娠合併NMDAR脳炎患者治療法と免疫学的特徴の解明. 第29回日本神経免疫学会学術集会 2017.10.6.
- (13) 新美芳樹、菊池洸一、長尾龍之介、前田利樹、村手健一郎、廣田政古、引地智加、石川等真、島さゆり、植田晃広、伊藤信二、吉川哲史、武藤多津郎. 薬剤性過敏症候群(DIHS)の経過中HHV6脳炎を発症した成人男性例. 第22回日本神経感染症学会総会・学術集会, 2017.10.13.
- (14) 石川等真、水谷泰彰、菊池洸一、長尾龍之介、前田利樹、村手健一郎、廣田政古、引地智加、島さゆり、新美芳樹、植田晃広、伊藤信二、武藤多津郎. 抗TNF抗体製剤導入後に複視が出現し、脱髄性病変を認めた一例. 第149回日本神経学会東海北陸地方会. 2017.11.3.
- (15) 前田利樹、新美芳樹、菊池洸一、長尾龍之介、村手健一郎、廣田政古、引地智加、石川等真、島さゆり、水谷泰彰、植田晃広、伊藤信二、武藤多津郎. 食道癌治療中に出現した抗gephyrin抗体陽性stiff-person症候群と考えられた1例. 第35回神経治療学会総. 2017.11.21.
- (16) Mutoh T, Shima S, Ueda A, Asakura K, Ito S. Clinical and Biochemical pictures of anti-neutral glycolipids antibody-positive central and peripheral nervous system-involving disorders. AAN 2016, 2016.4.21.

- (17) 石川等真、水谷泰彰、引地智加、島さゆり、植田晃広、木澤真努香、伊藤信二、武藤多津郎。CIDP患者における末梢神経の volume 解析。第 57 回 日本神経学会学術集会，2016.5.18.
- (18) 朝倉邦彦、石川等真、島さゆり、植田晃広、伊藤信二、武藤多津郎。Clloquinol induces apoptosis in PC12 cells via caspase 9 and 3 Activation. 第 57 回 日本神経学会学術集会，2016.5.18.
- (19) 伊藤信二、村手健一郎、廣田政古、引地智加、石川等真、島さゆり、水谷泰彰、植田晃広、木澤真努香、武藤多津郎。The significance of serial D-dimer measurements on Trousseau's syndrome. 第 57 回 日本神経学会学術集会，2016.5.19.
- (20) 島さゆり、植田晃広、水谷泰彰、村手健一郎、廣田政古、引地智加、石川等真、新美芳樹、木澤真努香、伊藤信二、武藤多津郎。自験 16 例から分析した脳脊髄根末梢神経炎 (EMRN) の臨床像と抗体活性。第 57 回 日本神経学会学術集会，2016.5.21.
- (21) 村手健一郎、前田利樹、長尾龍之介、廣田政古、引地智加、石川等真、島さゆり、新美芳樹、植田晃広、伊藤信二、武藤多津郎。言語障害で発症し、脳内に MRI 異常信号が多発した 51 歳女性例。第 145 回 日本神経学会東海北陸地方会，2016.6.25.
- (22) 植田晃広、村手健一郎、廣田政古、引地智加、石川等真、島さゆり、新美芳樹、伊藤信二、武藤多津郎。抗 GM1 抗体の中性スフィンゴミエリナーゼに及ぼす影響の解明。第 28 回 神経免疫学会学術集会，2016.9.30.
- (23) 石川等真、伊藤信二、長尾龍之介、前田利樹、村手健一郎、廣田政古、引地智加、島さゆり、新美芳樹、植田晃広、武藤多津郎。反復する一過性複視を呈し神経梅毒と考えられた 1 例。第 21 回 日本神経感染症学会総会・学術大会，2016.10.21.
- (24) 引地智加、伊藤信二、長尾龍之介、前田利樹、村手健一郎、廣田政古、石川等真、島さゆり、新美芳樹、植田晃広、武藤多津郎。抗 Th/To 抗体、抗 SRP 抗体陽性壊死性筋炎の 1 例。第 146 回 日本神経学会東海北陸地方会，2016.10.29.
- (25) 植田晃広、長尾龍之介、前田利樹、村手健一郎、廣田政古、引地智加、石川等真、新美芳樹、伊藤信二、武藤多津郎。妊娠中に発症し免疫治療と帝王切開により健康な児を得て母体も回復し得た NMDAR 脳炎の 1 症例。第 34 回 日本神経治療学会総会，2016.11.26.
- 〔図書〕(計 0 件)
 〔産業財産権〕
 出願状況 (計 0 件) 取得状況 (計 0 件)
 〔その他〕 ホームページ等
 ・藤田保健衛生大学病院神経内科紹介 http://www.fujita-hu.ac.jp/HOSPITAL1/section/department/neurology_54f403b0ba061/index.html
 ・藤田保健衛生大学医学部 脳神経内科学教室 <http://www.fujita-hu.ac.jp/~sinkei/index.html>
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 植田 晃広 (UEDA, Akihiro)
 藤田保健衛生大学医学部・脳神経内科学・准教授
 研究者番号：20600703
 (2) 研究分担者 なし
 (3) 連携研究者 なし
 (4) 研究協力者 なし