

## 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 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590087

研究課題名（和文）ギラン・バレー症候群で上昇するモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体の神経・組織学研究

研究課題名（英文）Neurophysiological and immunohistochemical studies of IgG anti-GM1 monoclonal antibody on neuromuscular transmission

研究代表者

田口 恭治 (TAGUCHI KYOJI)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70171593

研究成果の概要（和文）：モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体は運動神経終末においてシナプス前部、特にシュワン細胞や神経軸索に結合していることが示唆された。モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体は神経終末の  $Ca^{2+}$  channel に結合し、 $Ca^{2+}$  の流入を阻害して神経伝導障害を誘発することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We suggest that the inhibitory effect of IgG anti-GM1 mAb on spontaneous muscle action potentials is related to the GM1 epitope in presynaptic motor nerve terminals at the neuromuscular junctions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	300,000	90,000	390,000
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ギラン・バレー症候群、モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体、カルシウムチャネル

### 1. 研究開始当初の背景

ギラン・バレー症候群は人口 10 万人当たり年間 1-2 名の発症を数え、ポリオが減少した今日、急性に筋弛緩性の運動麻痺を呈する疾患の中で最も発症頻度が高い疾患である。日本でのギラン・バレー症候群患者における *Campylobacter jejuni* の先行感染の頻度は約 30% を占め、他のギラン・バレー症候群よりも転帰が不良であり、従って発症機序の解明に基づいた新しい治療法の導入が待たれている。治療には血漿交換、免疫グロブリン大量静注療法（免疫グロブリン製剤）が行われているが、これらは血液製剤の使用を減少させようとする時代の流れに逆行する治療であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、ギラン・バレー症候群患者で誘発される運動神経疾患に注目し、特に患者で特異的に上昇する抗ガングリオシド抗体の抗 GM1 抗体に着目した。抗ガングリオシド抗体の抗 GM1 抗体が運動神経終末のアセチルコリン遊離に重要な役割を担っている電位依存性カルシウムチャネルを阻害して神経伝導障害を引き起こすことが考えられる。すなわち、ギラン・バレー症候群患者の血清中で上昇した抗 GM1 抗体は運動神経終末の電位依存性カルシウムチャネルを阻害して運動神経疾患を起こすことが予測される。そこで、モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体の神経・筋活動電位に対する電気生理学検討と神経・筋接合部での免疫組織学検討を行う

た。

### 3. 研究の方法

#### (1) モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体による神経・筋接合部での自発性筋活動電位に対するの検討

ラット神経・筋接合部の培養方法：Wistar 系雌性ラット(妊娠 17 日齢)の胎児ラットの脊髄と大腿筋を共培養し神経・筋接合部が形成され、筋細胞の自発性の収縮を確認する。培養神経・筋接合部モデルの自発性筋活動電位は、筋細胞の収縮時に、神経終末からのアセチルコリンの遊離に伴って発生する。培養筋細胞からの自発性筋活動電位の測定には、微小電極法を用いて、3 M KCl を満たした先端抵抗値が 30~40M $\Omega$  になる微小ガラス管電極を筋細胞に挿入することによって測定した。培養神経・筋細胞の神経と筋の接合を確認するために脊髄前角に微小ガラス管電極を挿入し電気刺激 (duration 100 ms、1 Hz) を加え、筋細胞で誘発筋活動電位を記録した。

#### (2) GM2 合成酵素と GD3 合成酵素のノックダウン時のモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体投与による自発性筋活動電位への検討

GM2 synthase の sense oligodeoxynucleotides (GM2 sense) 及び antisense oligodeoxynucleotides (GM2 antisense), GD3 synthase の sense oligodeoxynucleotides (GD3 sense) 及び antisense oligodeoxynucleotides (GD3 antisense) を用いた。GM2 sense、GM2 antisense、GD3 sense 及び GD3 antisense は 1mM になるように調製し、Lipofectamine (Invitrogen, CA) 20 $\mu$ L とともに、培養液 1mL の入ったシャーレにそれぞれ 10 $\mu$ L ずつ投与した。モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体の投与は、神経・筋接合部の筋細胞を使用する 2 日前から 2 日間連続して投与し、その後 1 日置いてから実験に用いた。

#### (3) モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体による横隔膜運動神経終末の神経・筋接合部での免疫組織学的検討

Wistar 系雄性ラットの横隔膜を立体顕微鏡下で取出し、マウスモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体、rabbit- Syntaxin 抗体、neurofilament 200 抗体あるいは Rho- $\alpha$ -Bungarotoxin の三重染色を行った。これらの組織は共焦点レーザー蛍光顕微鏡で FITC は蛍光波長 488nm で緑色、Rho は蛍光波長 543nm で赤色に発色させて観察した。

#### (4) モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体の小脳プルキンエ細胞の電位依存性カルシウム電流に対する検討

パッチクランプ・ホールセル(whole-cell)

法を用いて電位依存性カルシウム電流を測定した。プルキンエ細胞の電流の測定には、External Solution; 143 mM TEA-Cl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, and 10 mM glucose, 20% TEA-OH で pH7.4 に調製、Internal Solution; 135 mM CsCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgC, 114 mM triphosphocreatinin, 3.6 mM ATP、1 M CsOH で pH7.2 を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) ラット神経・筋接合部でのモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体の自発性筋活動電位に対する影響

ラットの培養筋細胞から自発性筋活動電位 (SMAP) はモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体 (1:200) を投与しても MAP の頻度に影響を与えなかったが、モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体 (1:100) を投与すると 1 分後で SMAP 頻度が減少した。また、SMAP は洗浄することにより徐々に回復した (Fig.1)。モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体は SMAP の頻度を抑制したが、振幅には影響を与えなかった。

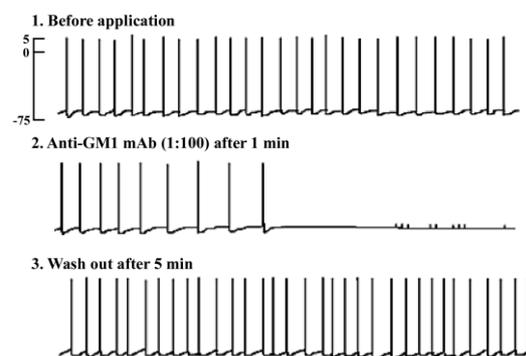


Fig.1 ラットの自発性筋活動電位に対するモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体の抑制作用

#### (2) GM2 合成酵素の antisense、GD3 合成酵素の antisense を添加培養時のモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体投与による自発性筋活動電位への影響

GM2 antisense を添加して培養した神経・筋接合部の SMAP に対してモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体 (1:100) を投与したところ、MAP 頻度の変化はほとんど認められなかった。一方、GD3 antisense を添加して培養した神経・筋接合部の SMAP に対してモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体 (1:100) を投与したところ、SMAP 頻度は control に比べて 85.4% 抑制した。マウスモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体が運動神経終末の ganglioside GM1 に結合することにより SMAP 頻度を抑制することが明らかとなった。

#### (3) モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体の自発性

### 筋活動電位に対する P/Q-type、N-type、L-type のカルシウムチャンネル拮抗薬の影響

モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体のカルシウムチャンネルへの作用を検討するために、培養神経・筋接合部にカルシウムチャンネル拮抗薬を前投与し、モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体の自発性筋活動電位に及ぼす影響について検討した。

P/Q-type、N-type、L-type のカルシウムチャンネル拮抗薬である  $\omega$ -agatoxinIVA、 $\omega$ -conotoxin GVIA、nicardipine を前投与した SMAP に対してモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体(1:100) を投与したところ、モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体の抑制作用は認められなかった。

### (4) 運動神経と神経終末の神経・筋接合部でのモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体の局在

① ラット横隔膜の運動神経・筋接合部における免疫組織染色では、モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体は神経軸索のマーカーである Neurofilament 200 抗体 (NF200 抗体) や神経前部のシナプス小胞の膜タンパクのマーカーである Syntaxin (Syn) 抗体と同様の部位を染色したが (Fig.2)、神経後部にあるアセチルコリン受容体のマーカーである  $\alpha$ -Bungarotoxin と同様の部位は染色しなかった。以上の結果から、モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体は NF200 抗体や Syn 抗体と同様の部位を染色することから神経・筋接合部の神経前部に結合して運動麻痺に関与していることが示唆された。

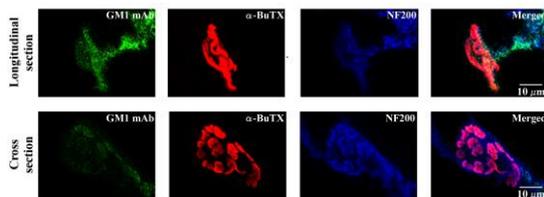


Fig.2 ラット横隔膜の運動神経・筋接合部でのモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体、NF200 抗体と  $\alpha$ -Bungarotoxin の免疫組織染色

### ② Chloroform / Methanol 処理

Chloroform / Methanol 処理により、脂質である ganglioside は消失する。Chloroform / Methanol 処理した横隔膜切片を用いた染色では、モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体は染色されなかった。

### ③ Collagenase 処理

Collagenase 処理により、運動神経終末のシナプス前部が消失することが知られている。Collagenase 処理した横隔膜切片を用いた染色では、シナプス前部の要素である運動神経軸索に存在する細線維タンパクである

neurofilament を標識する NF200 抗体は染色されなかった。また、モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体も染色されなかった (Fig.3)。モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体が運動神経終末のシナプス前部で結合する事を示した。

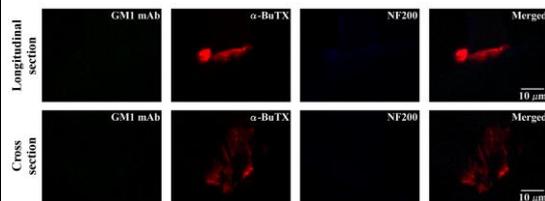


Fig.3 Collagenase 処理による IgG anti-GM1 mAb の免疫組織染色

### (5) 小脳プルキンエ細胞の電位依存性カルシウム電流でのモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体の影響

小脳 Purkinje 細胞の P 型の VGCCs 電流を測定した結果、-40mV から活性化し、0mV でピークとなる P 型 VGCCs 電流が観察された。このとき、External solution 中にモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体を投与し、P 型 VGCCs に対する GBS 患者血清の影響を検討した。VGCCs 電流は anti-GM1 mAbs(1:20) 投与により、31.2%まで抑制された。これに対して、モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体(1:50) の投与で変化は見られなかった(Fig. 4)。この結果からモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体は P/Q-型 VGCCs 電流を抑制することが明らかになった。

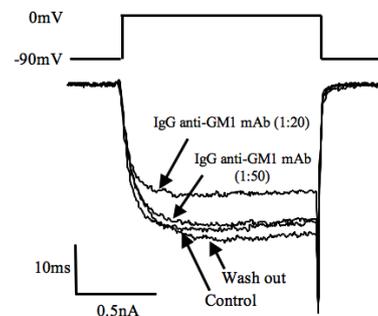


Fig. 4 小脳プルキンエ細胞の P/Q-型電位依存性カルシウム電流でのモノクローナル IgG 抗 GM1 抗体影響

以上の結果から、モノクローナル IgG 抗 GM1 抗体が神経終末の電位依存性カルシウムチャンネルに結合することにより、 $Ca^{2+}$  チャンネルの主要な働きである  $Ca^{2+}$  の流入を阻害し、活動電位の発生を抑制するために、四肢麻痺や腱反射低下・消失といった GBS 特有の運動神経症状が発症すると考えられた。

### 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 1 件)

- ① Takumi Nagaoka, Sayako Hotta, Terumasa Chiba, Iku Utsunomiya, Kenji Abe, Hiide Yoshino, Chiaki Koshikawa,  
Kyoji Taguchi : IgG ANTI-GalNAc-GD1a ANTIBODIES BIND TO NEUROMUSCULAR JUNCTIONS OF RAT HEMI-DIAPHRAGM  
Muscle and Nerve、査読有、46 卷、2012、505-710、  
DOI:10.1002/mus.23385

[学会発表] (計 1 件)

堀田紗綾子、長岡 匠、千葉輝正、宇都宮郁、阿部賢志、○田口恭治 : GalNAc-GD1a 及び GM1 のラット横隔膜における免疫組織化学的検討、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田口 恭治 (TAGUCHI KYOJI)  
昭和薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号 : 70171593

### (2) 連携研究者

堀口 よし江 (HORIGUCHI YOSHIE)  
昭和薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号 : 70190254