

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390225

研究課題名(和文)免疫性神経疾患における糖鎖へのBリンパ球応答のネガティブレギュレーターの解析

研究課題名(英文) Analysis of negative regulators of B lymphocyte responses to glycoconjugates 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：糖脂質抗体陽性の免疫性神経疾患症例について、糖鎖への免疫反応を制御する分子の遺伝子解析を行ったところ、糖脂質抗体陽性のギラン・バレー症候群(GBS)の一部で特有の遺伝子変異がみられた。また各種糖脂質抗体陽性疾患の臨床特徴を調べたところ、ヒトの末梢神経のミエリンに局在するLM1関連抗原に対する抗体陽性の慢性ニューロパチー(CIDP)では脳神経障害が少なく運動失調が多いこと、ミエリンの抗原であるGal-Cに対する抗体陽性のGBSは脱髄型が多いことがわかった。IgM paraproteinemiaを伴う末梢神経障害では、IgM M蛋白の反応特異性と臨床病型が関連することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Gene analysis of the molecules regulating immunological reactions to glycoconjugates were investigated in neuroimmunological diseases with anti-glycolipid antibodies. Mutations were detected in such molecules specifically in some cases of Guillain-Barre syndrome (GBS). Patients with CIDP having antibodies to LM1-associated antigens rarely had cranial neuropathies and frequently had ataxia. GBS cases with antibodies to Gal-C, a myelin antigen, more frequently were classified as demyelinating type. In IgM paraproteinemic neuropathies, specificities of IgM M-proteins were associated with the clinical features.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖鎖 自己免疫 神経疾患 糖脂質 ガングリオシド

## 1. 研究開始当初の背景

ギラン・バレー症候群 (GBS)・慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー (CIDP) や IgM パラプロテイン血症を伴うニューロパチー (IgM-N) などの末梢神経障害や、中枢脱髄疾患である多発性硬化症などは自己免疫機序により発症し免疫性神経疾患とよばれる。多発性硬化症では、陽性率と特異性がそれほど高くはないが、ミエリンに局在する硫酸化糖脂質であるスルファチドに対する抗体の存在が報告されている。一方 GBS では、約 60% に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抗体の上昇がみられ、特異的な液性因子として知られる。われわれは、GBS のひとつの亜型であるフィッシャー症候群 (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、GQ1b 抗原がヒトの眼球運動を司る動眼神経・外転神経・滑車神経の Ranvier 絞輪部周囲のミエリンや一部の後根神経節細胞に局在することを示した。これらの部位への抗体の特異的結合がフィッシャー症候群を引き起こすと考えられる。また IgM-N も高率に糖鎖に対する抗体活性をみとめ、約半数では硫酸化糖脂質である SGPG や同じ硫酸化糖鎖を共有するミエリン関連糖タンパク (MAG) が IgM M 蛋白の標的抗原となっており、脱髄性の末梢神経障害をきたす。さらに GD1b などのガングリオシドのジシアロシル基を認識する抗体は、深部感覚障害による運動失調性の末梢神経障害に特異的にみられる。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る。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、世界で初めての抗ガングリオシド抗体による神経障害動物モデルであるウサギ運動失調性末梢神経障害の作成に成功し、抗体結合がアポトーシスを引き起こすことを示した。糖鎖に対する抗体は、糖鎖の局在部位に特異的に結合して特有の臨床病型をきたす因子として、免疫性神経疾患の病態に重要な役割を果たすと考えられる。

一方、抗体の産生機序としては、細菌やウイルスなどの病原体の糖鎖に対する免疫反応によるとする「分子相同性機序」が提唱されているが、なぜ一部のみにのみそのような抗体産生が引き起こされるかは不明である。自己抗原である。これらの糖鎖抗原に対する免疫反応は、B 細胞の表面に存在する糖鎖認識分子により抑制されることが知られており、CD22 や Siglec はシアル酸含有糖鎖を認識して抑制的に作用することが報告されている。また硫酸化糖鎖に対しては CD72 がそうした分子として知られる。そこで、自己抗原である硫酸化糖鎖抗原やシアル酸を含むガングリオシドに対する抗体が産生される免疫性神経疾患患者では、それらの抑制性分

子の遺伝子およびその発現に異常がある可能性が考えられるが、検討はされていなかった。

また GBS には、大別するとミエリンを傷害する脱髄型と軸索をプライマリーに傷害する軸索型があるが、日本における脱髄型と軸索型の頻度については、全国調査が行われていなかった。また脱髄型の GBS や CIDP の標的抗原は確立されていなかったが、近年シアル酸をもち末梢神経ミエリンに局在する糖脂質である LM1 および LM1 を含む糖脂質複合体が標的抗原のひとつであることをわれわれは明らかにした。しかし LM1 関連抗原に対する抗体陽性の CIDP の臨床病型は不明であった。またミエリンに局在する糖脂質である Galactocerebroside (Gal-C) に対する抗体も脱髄因子と考えられるが、Gal-C 抗体陽性 GBS の臨床的特徴は明確ではなかった。さらに MAG 抗体陽性の IgM-N では臨床経過が多様であるが、その多様性の機序は不明であった。また MAG 抗体陰性の IgM-N について詳細は不明であった。

本研究は、上記のような免疫性神経疾患についての疑問を検討するために立案された。

## 2. 研究の目的

- (1) 糖鎖に対する B リンパ球応答の制御因子の遺伝子解析を行い、免疫性神経疾患との関連を調べる。
- (2) LM1 および LM1 を含む糖脂質複合体 (LM1/GM1, LM1/GD1b) に対する抗体陽性の CIDP の臨床的特徴を解析する。
- (3) Gal-C 抗体陽性の GBS の臨床的特徴を検討する。
- (4) MAG 抗体陽性の IgM-N の臨床経過を規定する因子として抗体の反応特異性の違いに着目して検討する。
- (5) MAG 抗体陰性の IgM-N の臨床病型と抗体活性を検討する。
- (6) わが国の GBS における軸索型と脱髄型の頻度を検討する。

## 3. 研究の方法

- (1) GBS、フィッシャー症候群、および抗 MAG 抗体陽性 IgM-N 症例について、常法に基づいて CD22, CD72, Siglec の遺伝子解析を行った。
- (2) LM1、LM1/GM1 複合体、および LM1/GD1b 複合体に対する抗体陽性の CIDP 症例について、担当医からアンケートにより情報を収集して解析した。
- (3) Gal-C 抗体陽性の GBS について、担当医からアンケートにより情報を収集して、その臨床的特徴を解析した。
- (4) MAG 抗体陽性の IgM-N 患者血清について、MAG と同じ HNK-1 エピトープをもつプロテオグリカン的一种である phosphacan に対する抗体活性を測定し、MAG に対する抗体活性との比 (phosphacan/MAG, P/M 比) と臨床経過の関連をしらべた。

(5) MAG 抗体陰性の IgM-N 患者血清について、担当医からアンケートにより情報を収集するとともに、MAG や SGPG 以外の糖脂質に対する抗体活性を測定した。

(6) GBS の電気診断について豊富な経験をもつ施設を対象に、prospective に GBS 症例を集め、Hadden および Ho の診断基準で脱髄型および軸索型の症例数を調べて、日本における両タイプの頻度を検討した。また同時期におけるフィッシャー症候群の患者数を調べて、わが国における GBS におけるフィッシャー症候群の頻度を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 免疫性ニューロパチーについて、CD22, CD72, Siglec の遺伝子解析を行ったところ、CD22 と CD72 については、対象と比較して有意の結果は得られなかった。一方 Siglec 10 については GBS の一部で遺伝子変異の存在が見出された。GBS 発症機序との関連が示唆され、今後さらに症例数を増やして検討する必要がある。

2) LM1、LM1/GM1 複合体、および LM1/GD1b 複合体に対する抗体陽性の CIDP は、脳神経障害を伴わず感覚障害性運動失調を高頻度に来たことが明らかとなった。われわれのグループからの既報告で、LM1 は脳神経に少なく脊髄神経根に多いことが明らかとなっており、上記臨床特徴はそのような LM1 の分布に関連していると考えられた。

(3) Gal-C 抗体陽性 GBS の 47 例の解析により、同抗体陽性例は脱髄型 GBS が多いこと、感覚障害と自律神経障害を伴うことが多いことが明らかとなった。またマイコプラズマ肺炎後の症例で、Gal-C 抗体陽性例が有意に多いことも再確認された。

(4) MAG 抗体陽性の IgM-N について、HNK-1 エピトープをもつ Phosphacan に対する抗体活性と MAG に対する抗体活性との比 (phosphacan/MAG, P/M 比) と臨床経過の関連をしらべたところ、P/M 比が高い症例は症状増悪の程度が強いことが明らかとなった。P/M 比は IgM-N の予後判定マーカーとなる可能性がある。

(5) MAG 抗体陰性の IgM-N 全体としてみた場合には臨床的に有意な特徴は見いだされなかった。一方陰性例の血中糖脂質抗体を検討したところ、一部の症例でガングリオシドに対する IgM 抗体反応がみられた。最も多かったのは GM1 抗体であり約 4 割でみられた、一方 GD1b などのジシアロシル基をもつガングリオシドに対する抗体活性も約 4 分の 1 の症例にみられた。GM1 抗体は血清を希釈すると反応性は低下したが、ジシアロシル基に対する抗体は希釈することで抗体活性の上昇がみられた。また GM1 抗体軽鎖は M 蛋白の軽鎖と必ずしも一致しなかったが、ジシアロシル基に対する抗体の軽鎖は M 蛋白のものと一致していた。以上より IgM M 蛋白そ

のものがジシアロシル基を認識すると考えられた。ジシアロシル基に対する抗体陽性例では、運動失調が高頻度であり IVIg による治療に反応する例が多く、比較的均質な特徴を示した。

(6) わが国の GBS の特徴について全国調査をして検討した。その結果、全体としては脱髄型が多いが、欧米と比べると軸索型の頻度が高いこと、抗 GQ1b 抗体がほとんどの例で陽性となる垂型であるフィッシャー症候群の頻度が、GBS 全体の 26% であり欧米の頻度と比べて高いことが明らかとなった。また軸索型と抗 GM1 抗体陽性が関連することも確認された。わが国の GBS の特徴が、全国レベルの多施設共同研究で確認された意義は大きく、今後そのような特徴をもたらず遺伝的要因についての検討が必要と考えられる。

#### 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 6 件)

Mitsui Y, Kusunoki S, Arimura K, Kaji R, Kanda T, Kuwabara S, Sonoo M, Takada K, the Japanese GBS Study Group. A multicenter prospective study of Guillain-Barré syndrome in Japan: a focus on the incidence of subtypes. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2015; 86: 110-114 査読あり DOI: 10.1136/jnnp-2013-306509

Hamada Y, Hirano M, Kuwahara M, Samukawa M, Takada K, Morise J, Yabuno K, Oka S, Kusunoki S. Binding specificity of anti-HNK-1 IgM M-protein in anti-MAG neuropathy: Possible clinical relevance. Neurosci Res 2015; 91: 63-68. 査読あり DOI: 10.1016/j.neures.2014.09.010

Samukawa M, Hamada Y, Kuwahara M, Takada K, Hirano M, Mitsui Y, Sonoo M, Kusunoki S, the Japanese GBS Study Group. Clinical features in Guillain-Barré syndrome with anti-Gal-C antibody. J Neurol Sci 2014; 337:55-60. 査読あり DOI: 10.1016/j.jns.2013.11.016

Ogawa G, Kaida K-I, Kuwabara M, Kimura F, Kamakura K, Kusunoki S. Antibody to the GM1/GalNAc-GD1a complex correlates with development of pure motor Guillain-Barré syndrome with reversible conduction failure. J Neuroimmunol 2013; 254:141-145 査読あり DOI: 10.1016/j.jneuroim.2012.09.005

Kuwahara M, Suzuki H, Samukawa M, Hamada Y, Takada K, Kusunoki S.

Clinical features of CIDP with LM1-associated antibodies. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013; 84: 573-575. 査読あり DOI: 10.1136/jnnp-2012-303440  
Yamada M, Masami U, Tsuji S, Kusunoki S. Effects of acidic phospholipids on antiganglioside antibodies in GBS: role of the disialosyl residue. Clin Exp Neuroimmunol 2013; 4: 70-74 査読あり

〔学会発表〕(計 17件)

Kusunoki S. Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in autoimmune neuropathies. 13th Surugadai International Symposium & Joint Usage/Research Program of Medical Research Institute International Symposium, Tokyo, November 28, 2014

楠 進. 病原微生物とギラン・バレー症候群。第19回日本神経感染症学会総会学術集会・第26回日本神経免疫学会学術集会(2014年9月4日~6日、金沢歌劇座、金沢)

Kusunoki S, Samukawa M, Hamada Y, Kuwahara M, Takada K, Hirano M, Mitsui Y. Electrophysiological subtypes of GBS with anti-Gal-C antibodies and other anti-glycolipid antibodies. Inflammatory Neuropathy Consortium, Dusseldorf, Germany, July 12-16, 2014

楠 進. 免疫性神経疾患と糖脂質に対する自己抗体。第56回日本脂質生化学会(2014年6月6日~7日、近畿大学、東大阪)

楠 進. 免疫と内科疾患 - その病態と治療最前線 免疫性ニューロパチーの病態と治療の最前線。第111回日本内科学会講演会(2014年4月11日~13日、東京フォーラム、東京)

寒川真、濱田征宏、桑原基、高田和男、三井良之、楠 進。抗Gal-C抗体かつ他の抗糖脂質抗体も陽性であった

Guillain-Barré症候群の電気生理学的検討。第25回日本神経免疫学会学術集会(2013年11月27日~29日、海峡メッセ、下関)

楠 進. 免疫性末梢神経疾患の病態と自己抗体。第41回日本臨床免疫学会総会(2013年11月27日~29日、海峡メッセ、下関)

楠 進. シンポジウム1 免疫介在性ニューロパチー: 免疫性ニューロパチーと抗糖脂質抗体。第18回日本神経感染症学会総会(2013年10月11日~12日、シーガイアコンベンションセンター、宮崎)

Samukawa M, Hirano M, Tsugawa J, Sakamoto H, Tabata E, Takada K, Kuwahara M, Suzuki S, Kato M, Yamada T, Hara H, Tsuboi Y, Nakamura Y, Kusunoki S. Effectiveness of repeated intravenous immunoglobulin therapy for refractory acute disseminated encephalomyelitis associated with anti-galactocerebroside antibody. 2013 Annual Meeting of the American Neurological Association, New Orleans, USA, October 13-15, 2013.

Kusunoki S, Mitsui Y, Arimura K, Kaji R, Kanda T, Kuwabara S, Sonoo M, Takada K, the Japanese GBS Study Group. The incidence of subtypes of Guillain-Barré syndrome in Japan: A multi-center prospective study. 2013 Meeting of the Peripheral Nerve Society, Saint-Malo, France, June 29-July 3, 2013

桑原 基、Laura Mauri, 濱田征宏、寒川 真、高田和男、Sandro Sonnino、楠 進。Guillain-Barré症候群及びFisher症候群におけるGQ1bと交差反応を示す抗GM1/GD1a抗体。第54回日本神経学会学術大会。(2013年5月29日~6月1日、東京フォーラム、東京)

寒川 真、濱田征宏、桑原 基、鈴木秀和、高田和男、三井良之、楠 進。抗galactocerebroside抗体陽性 Guillain-Barré症候群の臨床的、電気生理学的検討。第54回日本神経学会学術大会。(2013年5月29日~6月1日、東京フォーラム、東京)

濱田征宏、寒川 真、桑原 基、藪野景子、森瀬譲二、高田和男、宮本勝二、岡昌吾、楠 進。IgMパラプロテイン血症を伴うニューロパチーにおけるHNK-1抗体活性と臨床特徴の関連。第54回日本神経学会学術大会。(2013年5月29日~6月1日、東京フォーラム、東京)

Kusunoki S, Kuwahara M, Suzuki H, Samukawa M, Hamada Y, Takada K. Clinical features of CIDP with antibodies to LM1 and LM1 containing ganglioside complexes. 11th International Congress of Neuroimmunology, November 5-8, 2012, Boston, USA

楠 進. 教育講演: 感染症と免疫性神経疾患。第17回日本神経感染症学会総会。(2012年10月19日~10月20日、ホテルルピノ京都堀川、京都)

楠 進. 「なぜそこが障害されるのか: 末梢神経障害部位を決める分子メカニズム」- 免疫学の視点から: ギラン・バレー症候群とフィッシャー症候群において抗ガングリオシド抗体の結合を規定する因子は何か。第23回日本末梢神

経学会学術集会 (2012年8月31日~9月1日、九州大学医学部百年講堂、福岡)  
Kusunoki S. Anti-ganglioside antibodies in inflammatory neuropathies. PNS/Inflammatory Neuropathy Consortium, June 24-27, 2012, LantarenVenster, Rotterdam, The Netherlands

〔図書〕(計 2件)

楠 進。ニューロパチーとプロテオグリカン。Annual Review 神経 2014 (鈴木則宏 他、編、中外医学社、東京) pp240-244, 2014

楠 進。マイコプラズマ肺炎と神経合併症。Annual Review 神経 2013 (鈴木則宏 他、編、中外医学社、東京) pp123-128, 2013

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

西郷 和真 (SAIGOH Kazumasa)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号：50319688

(2) 研究分担者

平野 牧人 (HIRANO Makito)  
近畿大学・医学部・附属病院・准教授

研究者番号：50347548

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

鏑田 武志 (TSUBATA Takeshi)  
東京医科歯科大学・大学院・疾患生命科学  
研究部・教授  
研究者番号：80197756