

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591282

研究課題名(和文) 抗ガングリオシド抗体の神経障害機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Research on antiganglioside antibody-associated nerve injury: pathophysiology and novel treatment

研究代表者

海田 賢一 (Kaida, Kenichi)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・准教授)

研究者番号：40531190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ギラン・バレー症候群(Guillain-Barre syndrome, GBS)の補体介在性神経障害に関わる抗糖脂質抗体(抗ガングリオシド複合体抗体を含む)の病的意義を検討し、抗体力価と補体活性化能に正の相関を認めた。自律神経障害を呈するGBSは脳神経障害、重症例、人工呼吸器装着例が高頻度で、脱髄型に多い特徴があった。抗糖脂質抗体陰性GBSの10%に抗neurofascin (NF) 155抗体を認めたがそのIgGサブクラスはIgG2であった。慢性炎症性脱髄性多発根神経炎の10%にIgG4抗NF155抗体が陽性であり、若年、振戦、髄液蛋白の著明高値を示したが抗糖脂質抗体との関連はなかった。

研究成果の概要(英文)：We studied pathogenic roles of anti-glycolipid antibodies in Guillain-Barre; syndrome (GBS), which showed a positive correlation between the antibody activities and complement-activation capacity. Clinical analyses of GBS with autonomic dysfunction revealed that patients with dysautonomia were characterized by cranial nerve deficits, severe disability with frequent artificial ventilation, and electrodiagnostic findings indicative of demyelination. Fluctuating hypertension and vesicorectal disturbance were most frequent autonomic symptoms. Antibodies to neurofascin (NF) 155 were positive in 10% of GBS patients without anti-glycolipid antibodies, although the IgG subclass of anti-NF155 was IgG2. Ten percent of patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy had IgG4 anti-NF155 antibodies, who were featured by younger onset, tremor, prominent high levels of cerebrospinal fluid protein, and negative results of anti-glycolipid antibodies.

研究分野：神経免疫学

キーワード：antibody neuropathy ganglioside ganglioside complex complement Guillain-Barre syndrome

### 1. 研究開始当初の背景

免疫性末梢神経疾患の中で最も頻度の高いギラン・バレー症候群(Guillain-Barré syndrome; GBS)の約60%に抗ガングリオシド抗体が認められ、慢性自己免疫性ニューロパチーの一部にも同抗体が見出されている。これまで抗ガングリオシド抗体は標的ガングリオシド抗原の分布に応じて特定の神経症候を発現することを申請者らは明らかにしてきた。ガングリオシドは生体膜上でクラスターを形成して存在する性質をもち、コレステロールや様々な機能蛋白分子とともにlipid raftとよばれる細胞膜マイクロドメインを形成する。我々はGBS血清に単独のガングリオシド抗原には反応せず2種類のガングリオシドの混合により生じるガングリオシド複合体(ganglioside complex, GSC)に特異的に反応する抗体を見出したが、これは生体膜上で実際にガングリオシドが複合体を形成していることを示唆している。Raft上で集簇したガングリオシド内にはGSCが形成され単独ガングリオシドよりも細胞機能に重要な役割を果たしている可能性があり、抗GSC抗体はraft上のGSCに対する抗原抗体反応を通じて神経細胞機能異常を引き起こす可能性がある。抗ガングリオシド抗体の神経障害作用については動物モデル、神経筋共培養系において補体介在性神経障害が示されているが、raftを通じて直接神経細胞の機能異常を引き起こす可能性もある。我々は抗GSC抗体の神経障害機序について、一部の抗GSC抗体は神経筋接合部でブロック作用を示すことをマウス神経筋共培養系において示した。さらに世界で初めてGSCを人工的に合成することに成功した。この人工試料は細胞膜抗原としてのGSCの意義を解析するのに極めて有用なツールである。また、抗GSC抗体陽性動物モデルおよびモノクローナル抗GSC抗体の作製など抗GSC抗体の神経障害作用、GSCの生理的意義を研究するのにも極めて有用である。

GBSは必ずしも予後良好ではなく、数%の患者が死亡し、20%に日常生活に支障をきたす後遺症を生じ、約30%の患者は社会活動の制限を余儀なくされる。GBSには様々な予後関連因子が報告されているが、予後予測、治療方針決定に役立つものではなかった。我々はGBSの人工呼吸器装着および重症化と関連する因子として抗GD1a/GD1b複合体抗体を報告したが、このような重症化と関連する因子、予後不良関連因子を明らかにすることは重症GBSの予後改善に大きく寄与すると考えられる。また病態に基づいた補体活性化阻害剤のような新規治療法の開発が望まれている。

脱髄型GBS、慢性炎症性脱髄性多発神経根炎(CIDP)ではいまだに病原性を持つ自己抗体、標的抗原が明らかになっていない。これらの疾患における関連自己抗体の同定は病態解明、さらに有効な治療法の開発にとって急務とされる。

### 2. 研究の目的

(1) GBSにおける抗糖脂質抗体の病的作用に関する研究：抗ガングリオシド複合体抗体を中心に抗ガングリオシド抗体の補体介在性神経障害作用をはじめとする神経障害作用を検討し、重症度、予後との関連を解析する。

(2) 自律神経障害を呈するGBSの臨床的特徴と抗糖脂質抗体の解析：自律神経障害はGBSの死因ともなる重要な症候である。GBSにおける自律神経障害の病態を明らかにするため、自律神経障害をもつGBSの臨床的特徴と抗糖脂質抗体の相関を解析する。

(3) GBSおよびその亜型であるFisher症候群(FS)以外の抗GalNAc-GD1a抗体陽性ニューロパチーの臨床像の検討：抗糖脂質抗体はGBS/FS以外の他の免疫性神経疾患でも低頻度ながら確認されている。中でも運動神経軸索膜に局在するとされるGalNAc-GD1aに対する抗体に焦点を当ててその病的意義を検討する。

(4) 免疫性ニューロパチーにおける抗神経蛋白抗体の病的意義に関する研究：髄鞘蛋白であるneurofascin(NF)155がGBSにおける標的抗原である可能性を検証する。また、代表的慢性炎症性ニューロパチーであるCIDPにおいても抗NF155抗体を検索し、その病的意義を検証する。

(5) GBSにおける合成GM1 dimer抗原に対する抗GM1抗体の反応特異性と臨床像の相関：抗糖脂質抗体の神経障害活性を評価するには、実際の細胞膜に似た糖鎖環境において同抗体の結合活性を解析することが重要である。GBSにおける抗GM1抗体の神経障害活性を評価することを目的に、細胞膜上での糖鎖分子の集簇性を模倣した合成GM1 dimerを用いて、抗GM1抗体の反応性と臨床像の相関を検討する。

これらの研究を通じて免疫性ニューロパチーにおける有効な治療法を開発するための研究基盤を確立し、臨床応用に繋げることが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) 抗糖脂質抗体の補体活性化作用の検討と臨床症状との相関に関する研究：GBS患者血清からIgGを精製し、ELISAプレート上で抗原抗体反応を生じさせた後、補体源として正常ヒト血清を加えて、抗C5b-9抗体の形成を評価した。同一血清に複数の抗糖脂質抗体がみられる場合は最も力価の高い抗体について検討した。各抗糖脂質抗体ごと、IgGサブクラスごとに分類し、臨床所見、電気生理所見、重症度を比較検討した。対象はGBS 57例、FS 35例である。

(2) 自律神経障害を呈するGuillain-Barré症候群の臨床的特徴と抗糖脂質抗体の解析：自律神経症状が認められたGBS 49例を対象とし、先行感染、functional score(FS)、脳神経障害、感覚障害、運動麻痺、自律神経

障害を評価・解析した。各患者血清についてガングリオシド単独抗原、ガングリオシド複合体抗原(GSC)に対する抗体を ELISA 法で測定し、臨床症状との相関を解析した。これらを自律神経症状を認めなかった GBS50 例と比較検討した。

(3) GBS およびその亜型である Fisher 症候群以外の抗 GaINAc-GD1a 抗体陽性ニューロパチーの臨床像の検討：2004 年から 2013 年までの 9 年間に抗ガングリオシド抗体測定依頼のあった 390 症例の患者血清を対象とし、抗糖脂質抗体を ELISA 法で測定し、GBS もしくは FS 以外で抗 GaINAc-GD1a 抗体陽性となったニューロパチーの臨床像を解析した。

(4) 免疫性ニューロパチーにおける抗神経蛋白抗体の病的意義に関する研究：抗糖脂質抗体陰性 GBS39 例を対象に IgG 抗 NF155 抗体を、recombinant ヒトおよびラット NF155 を抗原として ELISA 法、Western blot 法により検索し、抗体の IgG サブクラス、陽性例の臨床像を解析した。同様に、CIDP60 例を対象に IgG 抗 NF155 抗体を測定した。抗 NF155 抗体陽性例について IgG サブクラス解析および臨床像の解析も行った。

(5) GBS における合成 GM1 dimer 抗原に対する抗 GM1 抗体の反応特異性と臨床像の相関：1 つのセラミドに 2 つの GM1 糖鎖を人工的に結合させ細胞膜での集簇性を模倣した合成 GM1 dimer を抗原として用いた。GBS40 例の IgG 抗 GM1 抗体陽性血清を対象に、ELISA 法により合成 GM1 dimer、天然 GM1(牛脳より精製:nGM1)に対する IgG 抗体活性を測定した。抗 GM1 dimer 抗体活性が抗 nGM1 抗体活性よりも高い症例を Dimer 群、低い症例を nGM1 群と定義し 2 群間で臨床像、電気生理所見を後方視的に比較した。

#### 4. 研究成果

(1) GBS における抗糖脂質抗体の病的作用に関する研究：抗 GS 抗体価は補体活性化能(抗 C5b-9 抗体活性)と正の相関関係を GBS で認めたが ( $p<0.01$ 、図 1)、FS では認めなかった ( $p=0.069$ )。補体活性化能と GBS の臨床的重症度(F-score)は相関関係を認めず( $p=0.68$ )、サブクラスごとの解析でも相関はみられなかった。

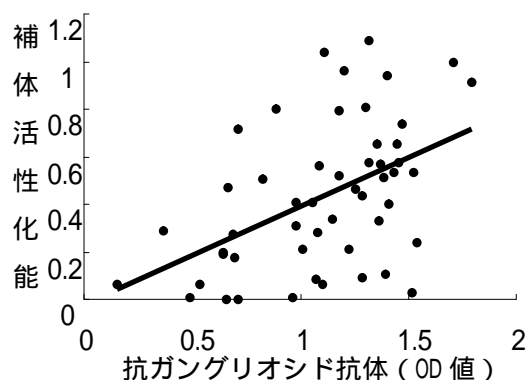


図 1 抗ガングリオシド抗体活性と補体活性化能の相関( $n=51$ 、 $P<0.01$ 、相関係数 $=0.49$ )

GBS で抗 GS 抗体価と補体活性化能に正の相関を認めるが、重症度と補体活性化能は相関しなかった。これは臨床的重症度には高齢、治療開始遅延、抗 GS 抗体毎の標的部位、補体非介在性神経障害といった多様な因子が影響しているためと考えられた。少数例で抗糖脂質抗体価が同程度でも補体活性化能に明らかな差がみられる場合があり、神経障害に最も関与する抗体は抗体価のみでは同定できない可能性が示唆された。

(2) 自律神経障害を呈する GBS の臨床的特徴と抗糖脂質抗体の解析：自律神経障害を呈した GBS(GBS-DA 群)の平均年齢は  $45.8 \pm 23.3$  歳で、ピーク時の FS の平均は  $4.1 \pm 0.9$  で自律神経障害のない GBS(GBS-C 群) ( $3 \pm 1.4$ ) より有意に高く ( $p<0.001$ )、人工呼吸器装着率も GBS-DA 群(35%)が GBS-C 群(10%)より有意に高かった ( $p=0.003$ )。先行感染は GBS-DA 群で呼吸器感染が多かった(47% v.s. GBS-C 群 22%) ( $p=0.009$ )。GBS-DA 群では脳神経障害は 71%にみられ、特に外眼筋麻痺 47%、球麻痺 43%の頻度が高く、GBS-C 群より有意に高頻度であった。GBS-DA 群の自律神経障害の内訳は血圧変動 61%、直腸膀胱障害 51%、不整脈 29%、発汗障害 13%であった。GBS-DA 群では抗糖脂質抗体は 19 例(39%)で陽性で、抗 GQ1b 抗体や抗 GT1a 抗体に関連する抗体の頻度が高かったが GBS-C 群と比較して有意差はなかった。運動軸索型 GBS に関連する抗糖脂質抗体 (GM1, GD1a, GaINAc-GD1a, GA1) の頻度は、GBS-DA 群 20%、GBS-C 群 56%であり、GBS-C 群で有意に高頻度であった ( $p=0.00027$ )。抗糖脂質抗体陽性群の中で比較すると、GQ1b, GT1a 抗原に関連する抗体の出現頻度は GBS-DA 群(68%)で GBS-C 群(44%)よりも高い傾向があった ( $p=0.11$ )。自律神経障害の種類と抗糖脂質抗体の種類に相関はなかった。

自律神経症状を呈する GBS は外眼筋麻痺や球麻痺が高頻度で、重症度が高く人工呼吸器を要する症例が有意に多いことが特徴であったことから、明らかな自律神経障害の存在は GBS の重症度や予後不良の予測因子になる可能性が示唆された。自律神経症状の内容については交感神経・副交感神経症状に関して特定の傾向を認めなかった。抗ガングリオシド抗体の解析から自律神経障害は脱髄と関連があることが推測され、一部の症例では抗 GQ1b 抗体が自律神経障害に関連した可能性がある。

(3) GBS およびその亜型である Fisher 症候群以外の抗 GaINAc-GD1a 抗体陽性ニューロパチーの臨床像の検討：390 症例の内訳は、GBS 114 例、FS 45 例、ビッカースタッフ脳幹脳炎 (BBE) 6 例、その他の神経疾患 225 例であった。抗 GaINAc-GD1a 抗体陽性例は 58 例、内訳は、GBS 32 例 (全 GBS 中 28%)、FS 8 例 (18%)、BBE 1 例 (17%)、その他の神経疾患 17 例 (7.5%)

で陽性であった。その他の神経疾患は、慢性運動感覚ニューロパチー6例、急性自律神経ニューロパチー2例、筋萎縮性側索硬化症(ALS)/運動ニューロン疾患(MND)2例、傍腫瘍性ニューロパチー2例、多巣性運動ニューロパチー(MMN)1例、ganglionopathy 1例、神経根症1例、腕神経叢障害1例、サイトメガロウイルス感染症(CMV)関連脊髄炎1例であった。1)慢性運動感覚ニューロパチー：運動感覚ニューロパチー2例、CIDP 2例、運動感覚軸索ニューロパチー1例で抗GalNAc-GD1a抗体陽性であり、うちCIDPはtypical CIDP1例、Lewis-Sumner1例であった。抗体サブクラスはIgGが4例、IgMが3例であった。2)急性自律神経ニューロパチー：Acute autonomic ganglionopathy 1例とacute sensory motor autonomic neuropathy 1例であった。サブクラスはIgM2例、IgG1例であった。3)傍腫瘍性ニューロパチー：上咽頭癌関連1例、縦隔原発肺小細胞がん関連1例であった。抗GalNAc-GD1a抗体は両者ともIgMであった。4)その他：MMN 1例、ganglionopathy 1例、神経根症1例、腕神経叢障害1例であった。感覚障害は2例で認められた。同抗体サブクラスはIgM 3例、IgG 1例であった。以上から、GBS以外の抗GalNAc-GD1a抗体陽性 neuropathy 14例では、高力価例は少なく、MMN 1例、自律神経ニューロパチー1例を除く12例(86%)で感覚障害を認めた。これはGBS以外のneuropathyでは抗GalNAc-GD1a抗体の病的役割、標的抗原が異なっていることを示唆している。また、MMN、傍腫瘍性ニューロパチー、腕神経叢障害ではIgMクラス抗体のみ上昇しており、IgG抗体とは病態における作用が異なる可能性が考えられた。

(4)免疫性ニューロパチーにおける抗神経蛋白抗体の病的意義に関する研究：ELISA法で対照群における抗NF155抗体の最大補正吸光度をcut offとしOD値>0.5を陽性とした。ELISA陽性例をWestern blot法を用いて確認した。GBS群は4/39(10%)で陽性であり、脱髄型3例、軸索型1例であった。重症度は平均F-score 4.0、呼吸筋障害による人工呼吸器装着例が1例であった。全例IgG2抗体であった。NF155は抗糖脂質抗体陰性GBSにおいて標的抗原である可能性は否定できないが、さらに検討を要すると考えられた。

CIDP60例では、recombinantヒトNF155に対するIgG抗体陽性例は6例(10%)で、全例IgG4であり抗糖脂質抗体は陰性だった。発症年齢は31±15歳(4例が30歳以下)。初発症状は下肢の感覚障害が5例(しびれ感3例、異常感覚2例)。2例がtypical CIDP、4例が遠位優位型であった。感覚性運動失調を4例、振戦を3例に認めた。全例2ヶ月以上の経過で増悪し、診断時modified Rankin scaleは2が4例、3が1例、4が1例だった。髄液蛋白は全例高値(307±248 mg/dl)で、頭部MRIで大脳白質病変を1例に、SEPでの中樞伝導

時間遅延を1例に認めた。神経生検が施行された1例では神経周膜下の浮腫に加え、急性軸索障害が散見された。IVIgは2例で有効、3例で無効であり、ステロイド治療は4例中3例で有効であった。以上から、抗NF155抗体(IgG4)陽性例は若年・下肢感覚障害での発症、感覚性運動失調、遠位優位の筋力低下、髄液蛋白の著明高値、ステロイド有効性を示したが、臨床像は必ずしも均一ではない可能性が示唆された。

(5)GBSにおける合成GM1 dimer抗原に対する抗GM1抗体の反応特異性と臨床像の相関：IgG抗GM1 dimer抗体活性(補正OD値)はDimer群(19例)で0.77±0.27(mean±SD)、nGM1群(21例)で0.41±0.38であった(p=0.02)。2群間で抗nGM1抗体活性に差はなかった。臨床所見では、Dimer群では女性(13例vs.nGM1群5例、p=0.01)及び消化器先行感染(15例vs.nGM1群7例、p=0.02)が有意に多かった。ピーク時の重症度(F-score)の平均Dimer群3.35±1.54vs.nGM1群4.00±0.58、p=0.46)及び治療選択は両群間で差を認めなかった。電気生理学的所見では、Hoの診断基準では運動軸索型(AMAN)がDimer群で多い傾向を認め(7例vs.nGM1群2例、p=0.06)、消化器先行感染後のAMANは全例でDimer群(5例、p=0.02)であった。Haddenの診断基準ではaxonalが全例でDimer群(5例、p=0.02)であった。他の糖脂質抗体の比較においては、抗GM1抗体以外の他の糖脂質抗体の陽性数は差を認めなかったが(Dimer群8例vs.nGM1群12例、p=0.53)、抗GD1b抗体陽性例はDimer群(4例：21%)に比べnGM1群(11例：52%)に多い傾向であった(p=0.06)。GD1bによる抗GM1抗体吸収試験では、抗GM1抗体活性の吸収率はDimer群(平均9.6±10.7%：3例)がnGM1群(平均59.6±22.7%：4例)に比し有意に低かった(p=0.03)。

以上から、GM1 dimerに対してより強く反応する抗GM1抗体は消化器先行感染後の軸索型GBSと相関し、GM1特異的であることが示された。消化器感染後AMANで見られる抗GM1抗体はGM1特異的であり、運動神経絞輪部軸索膜上でクラスターを形成するGM1に対してより強い結合活性を持つ可能性がある。今後、他部位に比して運動神経絞輪部軸索ではGM1がより集簇して存在する可能性、dimer形成を生じている可能性について生体組織等を用いて検証する必要がある。合成GM1 dimerは抗ガングリオシド抗体の結合活性の解析に有用であると考えられた。

## 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7件)

Kaida K. Antibodies to glycoconjugates in autoimmune neuropathies. Clinical and

Experimental Neuroimmunology. 査読有, 2015, 6, 387-394. doi:10.1111/cen3.12267.

Moriguchi K, Kaida K, Togashi N, Onoue H, Ikewaki K. Neuromyelitis optica overlapping systemic sclerosis with anti-centromere antibodies. Journal of the Neurological Sciences. 査読有, 2015, 353, 191-192. doi: 10.1016/j.jns.2015. 04. 027.

Kaida K. Pathogenic roles of antiganglioside antibodies in immune-mediated neuropathies. Clinical and Experimental Neuroimmunology. 査読有, 2013, 4, 60-69. doi: 10.1111/cen3.12007.

Ogawa G, Kaida K, Kuwahara M, Kimura F, Kamakura K, Kusunoki S. An antibody to the GM1/GalNAc-GD1a complex correlates with development of pure motor Guillain-Barré syndrome with reversible conduction failure. J Neuroimmunol. 査読有, 2013, 254, 141-145. doi: 10.1016/j.jneuroim. 2012.09.005.

〔学会発表〕(計 32 件)

海田賢一。ギラン・バレー症候群の病態と自律神経障害。第 68 回日本自律神経学会総会, 2015 年 10 月 29 日, 愛知県産業労働センター ウィンクあいち, 名古屋。

高崎寛, 角谷真人, 尾上祐行, 池脇克則, 海田賢一。発症時から感覚性運動失調が著明であった acute motor and sensory axonal neuropathy の 49 歳女性例。第 26 回日本末梢神経学会学術集会, 平成 27 年 9 月 18 日 ホテルブエナビスタ, 松本

角谷真人, 高崎寛, 中川慶一, 森口幸太, 尾上祐行, 池脇克則, 海田賢一。当院で収集したニューロパチー連続症例における抗 neurofascin155 抗体の検討。第 27 回日本神経免疫学会学術集会。2015 年 9 月 15-16 日, 長良川国際会議場, 岐阜

海田賢一。ギラン・バレー症候群と自己抗体。シンポジウム 1 「免疫性神経疾患における診断マーカーとしての自己抗体の役割」第 27 回日本神経免疫学会学術集会 2015 年 9 月 15 日(火), 長良川国際会議場, 岐阜

Kaida K. Antibodies to glycoconjugates in autoimmune neuropathies. Hot Topics-3, session 4: Roles of autoantibodies in neuroimmunological disease. The Inaugural Asia-Pacific School of Neuroimmunology Meeting (第一回アジア太平洋神経免疫学国際シンポジウム). August 30, 2015, The University of Tokyo, 東京

Nakagawa K, Kaida K, et al. The reactivity of anti GM1 antibody to the dimeric GM1: comparison with reactivity to bovine GM1 and its clinical relevance. Peripheral Nerve Society, Biennial Meeting, June 28, 2015. Quebec, Canada.

Takasaki H, Kaida K, et al. Clinical

features and anti-ganglioside antibodies in Guillain-Barré syndrome with dysautonomia. 2014 inflammatory neuropathy consortium, Peripheral Nerve Society Meeting, 13-16 July, 2014, Düsseldorf, Germany.

Shiozaki Y, Kaida K, et al. Anti-ganglioside antibody subclass and complement activation. Peripheral nerve society, biennial meeting, June 29-July 3, 2013, San-Malo, France.

Kaida K, Shiozaki Y, et al. Complement-activating capacity of antiganglioside IgG antibodies in Guillain-Barré and Fisher syndromes. Inflammatory Neuropathy Consortium, Peripheral nerve society, June 24-27, 2012, Rotterdam, The Netherlands.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

海田 賢一 (KAIDA, Kenichi)  
防衛医科大学校・その他部局等・准教授  
研究者番号: 40531190

### (2) 研究分担者

尾上 祐行 (ONOUE, Hiroyuki)  
防衛医科大学校・その他部局等・助教  
研究者番号: 10392440

### (3) 連携研究者

鎌倉 恵子 (KAMAKURA, Keiko)  
東京工科大学・医療保険学部・教授  
研究者番号: 30092183

楠 進 (KUSUNOKI, Susumu)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号: 90195438