

令和 3 年 8 月 17 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02745

研究課題名(和文) 免疫性神経疾患における脂質2分子の複合体に対する自己抗体の解析と病因的意義の解明

研究課題名(英文) Investigation of the autoantibodies against complex antigens formed by two lipid molecules in neuroimmunological diseases

研究代表者

楠 進 (KUSUNOKI, Susumu)

近畿大学・医学部・客員教授

研究者番号：90195438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫性神経疾患の自己抗体の標的抗原として、リン脂質やコレステロールと糖脂質の組み合わせを網羅的に検討した。慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーで、Gal-CやSulfatideなどミエリン局在性の糖脂質と脂質の混合抗原に対する特異的なIgM抗体反応が多く検出され、病態との関連が示唆された。多巣性運動ニューロパチーでは約半数でIgM抗GM1抗体が陽性となるが、フォスファチジン酸をGM1に添加することで陽性率が高まることがわかった。IgG抗GD1a抗体は予後不良なギラン・バレー症候群と関連すること、ビッカーstaff脳幹脳炎でGQ1b関連抗体陽性例は均一な臨床特徴を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチーや多巣性運動ニューロパチーなど、自己免疫によっておこる末梢神経障害で、病気を引き起こす原因となる自己抗体の候補が見いだされた。回復の遅いギラン・バレー症候群に関連する因子が見いだされ、予後予測に使用できる可能性が示された。ビッカーstaff脳幹脳炎におけるGQ1b関連抗体の臨床的意義が示された。

研究成果の概要(英文)：Autoantibodies in neuroimmunological diseases against complex antigens formed by glycolipids and phospholipids or cholesterol were investigated. IgM antibodies to complex antigens including such myelin antigens as Gal-C and sulfatide were frequently detected in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. Those antibodies may be involved in the pathogenetic mechanism of demyelination. In multifocal motor neuropathy, the positive rate of IgM anti-GM1 antibodies was increased when phosphatidic acid was added to the GM1 antigen. IgG anti-GD1a antibodies were found to be associated with Guillain-Barre syndrome with poor prognosis. Patients with Bickerstaff brainstem encephalitis having GQ1b-related antibodies showed relatively uniform clinical features.

研究分野：神経内科学

キーワード：免疫性神経疾患 自己抗体 糖脂質 脂質複合体 ガングリオシド

1. 研究開始当初の背景

病態に自己免疫が関与する神経疾患(免疫性神経疾患)には、自己抗体の存在が確認されているものがある。とくにギラン・バレー症候群(GBS)やIgMパラプロテイン血症を伴うニューロパチー(IgM-N)などの免疫性末梢神経障害では、ガングリオシドなどの糖脂質が標的抗原であることが多い。一方、同じく免疫性末梢神経障害である慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)では、多くは標的抗原が不明である。またGBSでも脱髄型(AIDP)ではガングリオシド抗体の陽性率は低い。

われわれは、GBSの亜型であるMiller Fisher症候群(MFS、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た(Chiba et al. Ann Neurol 1992, Chiba et al. Neurology 1993)。この発見は糖脂質抗体が疾患の発症に関わる特異的因子であることを明確に示したものである。さらにわれわれはウサギをGD1bで感作して、ウサギ運動失調性末梢神経障害の作成に成功したが、これは世界で初めてのガングリオシド抗体による神経障害動物モデルであり、ガングリオシド抗体が病因となることを明らかに示したものである(Kusunoki et al. Ann Neurol 1996)。さらにGD1b特異的抗体は後根神経節の大型神経細胞に結合して、同細胞のアポトーシスをきたすことも示した(Takada et al. Exp Neurol 2008)。

さらに近年われわれは、単独の糖脂質ではなく二種類の糖脂質の混合抗原を特異的に認識する抗体をGBS血中に見出した(Kaida et al. Ann Neurol 2004)。このような抗体は、二種類の異なる糖脂質の糖鎖同士の間相互作用により形成されるエピトープを認識すると考えられ、糖脂質複合体抗体として報告した。これは海外を含めて他のグループからも追試確認された。またリン脂質がGBSの糖脂質抗体の結合に影響を与えることをはじめて報告した。さらにミラノ大学のSonnino教授から提供されたGM1-GD1a hybrid dimerに対するGBS血中抗体の反応性を検討して、GM1-GD1a hybrid dimerがGM1/GD1a複合体抗体のエピトープをほぼ再現したものであることを示した(Mauri et al. Glycobiology 2012)。またGM1のhomodimer(GM1-dimer)と通常のGM1に対する抗体活性の比較から、GM1-dimerにより反応性の強い抗体が存在することもわかった。これらのデータより、二分子のシス相互作用で作られるエピトープが免疫性神経疾患の標的抗原として重要であると考えられた。

われわれの見出した糖脂質複合体抗体を検出することを目的として、イギリスのグループからリピッドアレイ法が報告された(Rinaldi S et al. PloS One 2013; 8: e82337)。これは、薄層クロマトグラム(TLC)オートサンプラーを用いた方法で、糖脂質複合体をより網羅的にかつ少量のサンプルで検出することが可能である。この方法を用いると糖脂質とリン脂質やコレステロール(Cho)の脂質複合体を認識する抗体についての網羅的検討も可能となる。

以上より、本研究を着想した。

2. 研究の目的

(1) 上記リピッドアレイ法を用いて、各種の免疫性神経疾患(GBS、CIDP、各種免疫性中枢神経疾患など)の自己抗体と、糖脂質同志あるいはリン脂質やChoと糖脂質の組み合わせとの反応性を網羅的に検討して臨床的意義を検討する。

(2) GD1bのmonomerに対する反応と比較し、homodimerに特異的な抗体陽性の症例の特徴を検討する。Homodimerは、共同研究者のミラノ大学のSonnino教授から供与いただく。

(3) リピッドアレイ法を用いて、ピッカースタッフ脳幹脳炎(BBE)におけるGQ1b抗体およびGQ1bを含む複合体に対する抗体の病因的意義について検討する。

(4) 糖脂質抗体の臨床的意義解明の一環として、インフルエンザ後のGBSやGBS関連疾患における抗体反応性や臨床的特徴を明らかにする。また糖脂質抗体とGBSの予後との関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) 当科に保存されている各種免疫性神経疾患(GBS、MFS、IgM-N、CIDP、多発性硬化症、視神経脊髄炎、自己免疫性脳炎等)の患者血清を対象として、各種ガングリオシド(GM1、GM2、GM3、GD1a、GD1b、GD3、GalNAc-GD1a、GT1b、GQ1b等)、ガラクトセレブロシド(Gal-C)、スルファチド(Sulfatide)、ラクトシルセラミドなどの糖脂質、各種リン脂質(スフィンゴミエリン、フォスファチジルコリン、フォスファチジン酸(PA)、カルジオリピン等)およびChoに対する抗体活性を、単独抗原およびそれらの混合物を抗原としてリピッドアレイ法にて検討した。

(2) GD1b単独抗原に対する抗体陽性の血清について、GD1bのmonomerに対する反応と比較し、homodimerにより強く反応してhomodimer特異的と考えられる抗体陽性症例を抽出して、その臨床的特徴を検討した。

(3) 当科に抗体測定依頼のあったBBE症例について、GQ1b抗体およびGQ1bを含む複合体に対する抗体をELISA法およびリピッドアレイ法を用いて測定し、陽性例と陰性例の臨床的特

徴を検討した。

(4) 当科に抗体測定依頼のあった GBS および GBS 関連疾患 (GBSRD) のうち、インフルエンザ感染後のもの (GBS-I および GBSRD-I) の糖脂質抗体測定結果と臨床的特徴を検討した。また多施設共同研究で集めた GBS 症例の予後について、既報告の臨床的予後予測マーカーである mEGOS および糖脂質抗体の測定結果との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) 免疫性脱髄性ニューロパチーのうち急性の AIDP16 例、慢性の CIDP16 例、および正常対照 7 例で、10 種の糖脂質(各種ガングリオシド, Gal-C, Sulfatide 等)と 7 種の脂質(Cho と各種リン脂質)の複合体に対する抗体を調べた。その結果、Cho と Gal-C の複合体に対する IgM 抗体が AIDP7 例 (44%)、CIDP 7 例 (44%)、正常対照 1 例 (14%)、Cho と Sulfatide の複合体に対する IgM 抗体が AIDP12 例 (75%)、CIDP6 例 (38%)、正常対照 2 例 (29%) でみられた。従来標的抗原が不明であった免疫性脱髄性ニューロパチーで、Gal-C や Sulfatide などミエリン局在性の糖脂質と脂質の混合抗原に対する特異的な IgM 抗体反応が多く検出され、病態との関連が示唆された。一方、CIDP の亜型である多巣性運動ニューロパチー (MMN) では約半数で IgM 抗 GM1 抗体が陽性となるが、GBS における IgG 抗 GM1 抗体と同様に PA を GM1 に添加することで陽性率が上がるかを検討した。その結果 MMN37 例のうち GM1 単独に対する IgM 抗体は 20 例 (54%) にみられたが PA 添加 GM1 抗原を含めて検討すると 26 例 (70%) が陽性となり陽性率が向上した。

(2) GD1b に対する IgG 抗体陽性の GBS 血清について GD1b homodimer に対する抗体活性を検討したところ、GD1b homodimer に対して GD1b 単独に対するよりも強く反応し GD1b homodimer 特異的と考えられる抗体陽性の症例は、消化器感染後が多く運動失調は少なかった。これらは従来 GD1b 特異的抗体陽性例の特徴とは異なるものであった。また homodimer 特異的抗体陽性例では GM1 との交差反応がみられる場合が多かった。これらの結果から、homodimer を形成することによる GD1b 糖鎖の立体構造の変化が示唆された。

(3) BBE における、GQ1b および GQ1b を含む複合体に対する抗体陽性例は、抗体陰性例と比較して、呼吸器感染が先行することが多く、感覚障害を伴う頻度が高く、脳脊髄液の細胞数や蛋白レベルが低値であり、頭部 MRI 等での異常を認める頻度が低く、意識障害の改善が早いという特徴を有し、比較的均一な病態であることが示唆された。

(4) GBSRD-I では MFS の頻度が高く、GQ1b 抗体の陽性率が高かった。また GBS-I では脱髄型の頻度が高く、脳神経障害や運動失調の頻度が高いことがわかった。IgG 抗 GD1a 抗体は GBS の予後不良と関連し、臨床的マーカーである mEGOS と併用することで、mEGOS だけを用いた場合よりも的確に予後不良の予測が可能なが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kusunoki Susumu, Willison Hugh J, Jacobs Bart C | 4. 巻 92 |
| 2. 論文標題 Antiglycolipid antibodies in Guillain-Barre and Fisher syndromes: discovery, current status and future perspective | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry | 6. 最初と最後の頁 311 ~ 318 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jnnp-2020-325053 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamagishi Yuko, Kuwahara Motoi, Suzuki Hidekazu, Sonoo Masahiro, Kuwabara Satoshi, Yokota Takanori, Nomura Kyoichi, Chiba Atsuro, Kaji Ryuji, Kanda Takashi, Kaida Ken-ichi, Mutoh Tatsuro, Yamasaki Ryo, Takashima Hiroshi, Matsui Makoto, Nishiyama Kazutoshi, Sobue Gen, Kusunoki Susumu | 4. 巻 91 |
| 2. 論文標題 Serum IgG anti-GD1a antibody and mEGOS predict outcome in Guillain-Barre syndrome | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry | 6. 最初と最後の頁 1339 ~ 1342 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jnnp-2020-323960 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Yoshikawa Keisuke, Kuwahara Motoi, Morikawa Miyuki, Kusunoki Susumu | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Bickerstaff brainstem encephalitis with or without anti-GQ1b antibody | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation | 6. 最初と最後の頁 e889 ~ e889 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.0000000000000889 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamana Masaki, Kuwahara Motoi, Fukumoto Yuta, Yoshikawa Keisuke, Takada Kazuo, Kusunoki Susumu | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Guillain-Barre syndrome and related diseases after influenza virus infection | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation | 6. 最初と最後の頁 e575 ~ e575 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.0000000000000575 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Kuwahara Motoi, Numoto Isao, Kusunoki Susumu | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Multifocal nodular hypertrophy of trigeminal nerve in multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation | 6. 最初と最後の頁 e553 ~ e553 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.0000000000000553 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Koike Haruki, Ikeda Shohei, Fukami Yuki, Nishi Ryoji, Kawagashira Yuichi, Iijima Masahiro, Nakamura Tomohiko, Kuwahara Motoi, Kusunoki Susumu, Katsuno Masahisa, Sobue Gen | 4. 巻 408 |
| 2. 論文標題 Complement deposition and macrophage-induced demyelination in CIDP with anti-LM1 antibodies | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences | 6. 最初と最後の頁 116509 ~ 116509 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2019.116509 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Matsui Taro, Hamada Yukihiro, Kuwahara Motoi, Morise Jyoji, Oka Shogo, Kaida Kenichi, Kusunoki Susumu | 4. 巻 339 |
| 2. 論文標題 Association of variability in antibody binding affinity with a clinical course of anti-MAG neuropathy | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology | 6. 最初と最後の頁 577127 ~ 577127 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2019.577127 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Yoshikawa Keisuke, Kuwahara Motoi, Morikawa Miyuki, Fukumoto Yuta, Yamana Masaki, Yamagishi Yuko, Kusunoki Susumu | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Varied antibody reactivities and clinical relevance in anti-GQ1b antibody-related diseases | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation | 6. 最初と最後の頁 e501 ~ e501 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.0000000000000501 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Moriguchi Kota, Miyamoto Katsuichi, Fukumoto Yuta, Kusunoki Susumu | 4. 巻 323 |
| 2. 論文標題 4-Aminopyridine ameliorates relapsing remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology | 6. 最初と最後の頁 131 ~ 135 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2018.08.007 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 8件)

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 桑原基 |
| 2. 発表標題 ガングリオシド抗体陽性ニューロパチー |
| 3. 学会等名 第38回日本神経治療学会学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 桑原基 |
| 2. 発表標題 CIDPにおける臨床病型と自己抗体 |
| 3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 楠 進 |
| 2. 発表標題 免疫性ニューロパチー抗糖脂質抗体 ; これまでとこれから |
| 3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉川恵輔、桑原基、森川みゆき、楠 進 |
| 2. 発表標題 抗GQ1b関連抗体陽性Bickerstaff脳幹脳炎の臨床的特徴 |
| 3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yamana M, Kuwahara M, Kusunoki S |
| 2. 発表標題 Guillain-Barre syndrome and related diseases after influenza virus infection |
| 3. 学会等名 PNS Annual Meeting 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kuwahara M, Matsui T, Yoshikawa K, Yamana M, Fukumoto Y, Kaida K, Kusunoki S |
| 2. 発表標題 Clinical subtypes and anti-glycolipid antibodies in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy |
| 3. 学会等名 PNS Annual Meeting 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yamagishi Y, Kuwahara M, Sonoo M, Kuwabara S, Yokota T, Nomura K, Chiba A, Kaji R, Kanda T, Kaida K, Ikeda S, Mutoh T, Yamasaki R, Takashima H, Matsui M, Nishiyama K, Sobue G, Kusunoki S |
| 2. 発表標題 Association between anti-ganglioside antibodies and prognostic markers in Guillain-Barre syndrome |
| 3. 学会等名 PNS Annual Meeting 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoshikawa K, Morikawa M, Kuwahara M, Kusunoki S |
| 2. 発表標題 Different clinical findings between anti-GQ1b antibody-positive and -negative Bickerstaff Brainstem Encephalitis |
| 3. 学会等名 PNS Annual Meeting 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 桑原 基、松井太郎、吉川恵輔、山名正樹、福本雄太、海田賢一、楠 進 |
| 2. 発表標題 慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチーにおける臨床病型と自己抗体 |
| 3. 学会等名 第31回日本神経免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kusunoki S. |
| 2. 発表標題 Autoimmune neuropathies associated with anti-glycolipid antibodies. |
| 3. 学会等名 16th Asian Oceanian Congress of Neurology (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kusunoki S, Matsui T, Hamada Y, Kuwahara M, Morise J, Oka S. |
| 2. 発表標題 Variability of the binding specificity of IgM M-proteins in anti-MAG neuropathy; possible clinical relevance. |
| 3. 学会等名 143rd Annual Meeting of the American Neurological Association (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kusunoki S. |
| 2. 発表標題 Autoantibodies in chronic autoimmune neuropathies. |
| 3. 学会等名 International Symposium of Peripheral Neuropathy Research Center (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kusunoki S |
| 2. 発表標題 Autoantibodies and treatments in autoimmune neuropathies. |
| 3. 学会等名 14th ISNI Congress (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yoshikawa K, Morikawa M, Kuwahara M, Kusunoki S. |
| 2. 発表標題 Differences of antibody reactivities against glycolipid complexes among GBS, MFS and BBE. |
| 3. 学会等名 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kusunoki S |
| 2. 発表標題 Bickerstaff Brainstem Encephalitis. |
| 3. 学会等名 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 楠 進 |
| 2. 発表標題 免疫性末梢神経障害の病態と治療 |
| 3. 学会等名 日本内科学会生涯教育講演会Aセッション（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|-----------------------------|----|
| 研究分担者 | 桑原 基 (KUWAHARA Motoi) (40460860) | 近畿大学・医学部・講師 (34419) | |
| 研究分担者 | 宮本 勝一 (MIYAMOTO Katsuichi) (50388526) | 近畿大学・医学部・准教授 (34419) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | |
|---------|---------------------|--|--|
| イタリア | University of Milan | | |