

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07403

研究課題名(和文)ギラン・バレー症候群を中心とした免疫性神経疾患の新規タンパク抗原と病的意義の解明

研究課題名(英文) Study of novel antigens and their pathogenic roles of autoimmune neurological disorders including Guillain-Barre syndrome.

研究代表者

小牟田 縁 (Komuta, Yukari)

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、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学研究センター 生体情報・治療システム研究部門・助教)

研究者番号：60566850

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)：自己免疫性神経疾患は、患者のQOLを大きく損ない、慢性化すると一生の負担となる。発症した場合の治療は対処療法が殆どで、根本的な治療には自己抗原の解明が必要である。本研究は代表的な自己免疫性神経疾患であるギランバレー症候群やCIDPの患者を対象として、自己抗原の同定を行い、新しい治療法確立を目指す事が目的である。対象となる患者500名以上の血清を解析し、抗原が特徴的な局在を示した血清から抗体を精製した。この抗体による免疫沈降で抗原を取得し、質量分析法により解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫性神経疾患において、不可逆的な障害を負いやすい神経は、障害を負うと回復に時間がかかる。よって早期治療により予防が可能ならば患者への負担はかなり軽減できる。自己免疫疾患においては、患者の血清中に自己抗体があるかが診断の決定的な要因となるため、自己抗原の解明は早期治療を可能とする。更に発症機構の解明にも繋がり、新しい治療法の開発に発展できる。本研究では、代表的な自己免疫性神経疾患のGBSやCIDP患者の自己抗体を発見することができた。この抗原への陽性率は約8%と比較的高く、陽性者には脱髄型の患者が多かった。今後は病的意義の解明を行い、治療法の開発に繋げることが必要である。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune neurological diseases significantly impair patients' quality of life and, if chronic, become a lifelong burden. Most treatments at the onset of the disease are coping therapies, and fundamental treatment requires the elucidation of autoantigens. The purpose of this study was to elucidate autoantigens in patients with Guillain-Barre syndrome or CIDP, two typical autoimmune neurological diseases, and to establish a new therapeutic approach. Serum from more than 500 patients was analyzed and antibodies showing characteristic localization of the antigen were purified. Immunoprecipitation was performed with these antibodies to obtain their antigen, which was analyzed by mass spectrometry.

研究分野：神経科学

キーワード：自己免疫性神経疾患 自己抗原 ギランバレー症候群 CIDP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性神経疾患は、神経の機能に関連する物質を標的としうる自己抗体が、細菌感染など何らかの原因で生成され、神経やその関連細胞の正常な機能が障害されることで発症する。もっとも頻度が高く、代表的な末梢神経性の自己免疫性神経疾患である Guillain-Barré syndrome (GBS) では、ある種の細菌感染などで生成された抗ガングリオシド抗体によって古典的経路が活性化され、発症から2週間で症状はピークとなるが、多くは自己抗体の低下とともに完治する。しかし重症化して後遺症が残る場合も20%程度存在し、中には死亡する例もある。これらは早期治療によって軽減できるものの、これまでの解析により、GBSでは標的抗原によって主要な臨床症状が異なることが解っている。GBSの自己抗体は6割程度がガングリオシドを標的とするが、残りの多くは標的抗原が判明していない。同様に自己免疫性神経疾患である chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) は慢性で再発を繰り返す、脱髄を特徴とする点がGBSと異なる。CIDPの自己抗原に関しても、近年 Contactin1 や Neurofascin155 が近年報告されたが全体での頻度は非常に低く、やはり標的抗原は十分解明されているとは言えない。Contactin1 や Neurofascin155 はGBSでも標的抗原となるという報告があるが、やはり頻度は低い(Ng JK et al., 2012; Querol L et al., 2013)。CIDPに対する現行の治療はいずれも効果的であるものの、一部に難治症例もある。しかし、その多くの場合でも早期治療によって症状を軽減させることができる。

この様に、自己免疫性神経疾患では早期治療は非常に効果的である。特に不可逆的な障害を負いやすい神経は、障害を負うと回復に時間がかかるため、早期治療により予防が可能ならば患者への負担はかなり軽減できる。早期治療を実現するためには、早期に疾患の診断ができる事が望ましい。特に自己免疫疾患においては、患者の血清中に自己抗体が認められるかが診断の決定的な要因となる。前述した様に、代表的な疾患であるGBSやCIDPでさえも、依然として抗原の解明は不十分であり、患者の状態によって症状にばらつきも多く、初期に他の疾患と誤診され、早期治療の機会を逃す場合も実際には多いのが現状である。自己抗原の解明は早期治療の役に立つ他に、治療法の研究においても発症機構の解明にも繋がり、新しい治療法のアイデアや開発にも発展できるというメリットがある。患者の予後や治療中のQOL (Quality of Life) 向上のためにも、同定されていない抗原の解明は急務である。

2. 研究の目的

本研究では、GBSやCIDPを中心とした抗原不明の自己免疫性神経疾患患者に関して、当研究室で多数保存されている該当の患者の血清から抗原を同定し、発症機序の解明を行う事を主要な目的とする。そして新たな治療法の確立に結び付けるために、得られた結果を臨床情報と関連付け、重症例や難治症例の治療法に役立てるかを検証する。

3. 研究の方法

解析対象となる血清の選出

当研究室で保存されている、解析対象となる疾患 GBS、CIDP (疑い含む) の患者の血清に対し、ELISA法によって既知の自己抗原 (各種ガングリオシド、Neurofascin、Contactin-1) に関して陰性となった血清を選出した。

ウサギ神経組織の免疫染色によるスクリーニング解析

糖鎖の影響も考慮し、ヒトと糖鎖が近いといわれているウサギの神経組織切片を使用した免疫染色スクリーニングを行った。で選別した患者の血清を使用し、ウサギの脊髄、前根神経、後根神経節、後根神経、坐骨神経組織に対して免疫染色を行った。抗原のシグナルが十分確認できた血清を、抗原の局在から14グループに分けた。各グループの局在の外にはできるだけ抗原が存在しない、かつ抗核抗体や抗血管抗体ができるだけ含まれず、抗原のシグナルが強い血清を各グループから複数名選出した。

ウェスタンブロット法による解析

豊富に取得できるラットの各種神経組織ライセートに対し、で選別した血清中の抗体の抗原が、免疫沈降法で取得できる程豊富に存在するか、ウェスタンブロット法によって確認した。明瞭なバンドが検出できた血清から、免疫沈降法のために抗体 (IgG) を精製した。

シュワン細胞の初代培養

との結果より、まずシュワン細胞に抗原が存在するグループの抗原を精製する事にした。IgGのコンタミネーションが後の解析に支障をきたすことから、IgGを多く含む動物組織で

なく、培養細胞から抗原を取り出す事を試みた。3頭のラットから取り出した坐骨神経をコラゲナーゼとトリプシンで分解し、分散された細胞を培養し、接着力の弱い細胞を取得した。これらの細胞がシュワン細胞のマーカ―遺伝子を発現している事が、逆転写 PCR にて確認した。更に、これらのシュワン細胞を継代培養し、患者の抗体が反応する抗原がある事をウェスタンブロット法にて確認した。

免疫沈降法による抗原の取得

免疫沈降法では、抗体を結合するタンパク（プロテイン G）を共有結合した磁気ビーズを使用した。患者の抗体が貴重である事と IgG のコンタミネーションを避けるため、プロテイン G と患者の IgG を共有結合できる処理を行って使用した。取得したサンプルをカラムで濃縮し、このサンプルに患者の血清が反応する抗原が含まれる事をウェスタンブロット法にて確認した。

取得した抗原の液体クロマトグラフィー-質量分析（LC/MS）による解析

取得したサンプルを SDS-PAGE で泳動した後、銀染色を行った。で確認した抗原の分子量と同じ分子量にあるバンドを切り出し、LC/MS によって解析を行った。判明した複数抗原候補に対し、ウェスタンブロット法と免疫染色法によって、患者の抗体が認識する抗原であるかを解析した。

ELISA 法による陽性率の解析

で抗原である可能性が高いと判明したタンパク 2 種に対して、市販のリコンビナントタンパクを購入し、ELISA 法によって陽性率を調べた。

陽性となった患者群の解析

陽性となった患者群の臨床情報を調べた。

4 . 研究成果

解析対象患者の選別と組織免疫染色のスクリーニング解析（2025 年に追記予定）

解析対象となる患者は、疑いを含め GBS や CIDP、Fisher 症候群と診断された患者のうち、GBS や CIDP において自己抗原として知られている各種ガングリオシド、Neurofascin、Contactin に陰性の患者とした。587 名の患者の血清が選別された。

これらの患者血清を使用し、ウサギの神経組織切片の免疫染色を行い、抗原の局在によって 14 のグループに分類した。ほとんどが複数のグループに属していたが、4 個以上のグループに属する患者や抗血管抗体や抗核抗体を持つ患者は免疫沈降法に用いる血清から除外した。免疫染色の結果から、比較的シグナルが強い血清が複数存在したため、まずは末梢神経の髄鞘が陽性となったグループに着目して、抗原取得を行うことにした。

ウェスタンブロット法による抗原の確認（2025 年に追記予定）

末梢神経の髄鞘が陽性となったグループのうち、免疫染色で特にシグナルが強かった患者を 1 名選び（A とする）、A の血清を使用したウェスタンブロット法を行った。ラットの眼球、坐骨神経、脊髄、肝臓等のライセートのいずれでも反応があったが、眼球、坐骨神経、脊髄などの神経組織ライセートと肝臓ライセートのバンドのパターンが異なっている事が判った。

一方、今後行う免疫沈降法や LC/MS 解析に際して、組織ライセートや患者由来の IgG のコンタミネーションが問題になるため、組織ライセートからの抗原の抽出を避ける事が望ましい。このため坐骨神経の髄鞘を形成するシュワン細胞の初代培養を試みた。3頭のラット坐骨神経を酵素処理し、1週間後に紡錘型の細胞が出現した（図 1）。この細胞に関して、逆転写 PCR にて発現解析を行った（表 1）。結果、取得した細胞はシュワン細胞と思われた。しかし、ミクログリアのマーカ―も確認されたため、ミクログリアとマーカ―が類似しているマクロファージ等の細胞の混入の可能性も示唆された。

また、この細胞のライセート中に、A の抗体が認識する抗原の存在をウェスタンブロット法にて確認する事ができたため、このライセートから免疫沈降法によって抗原を抽出する事となった。

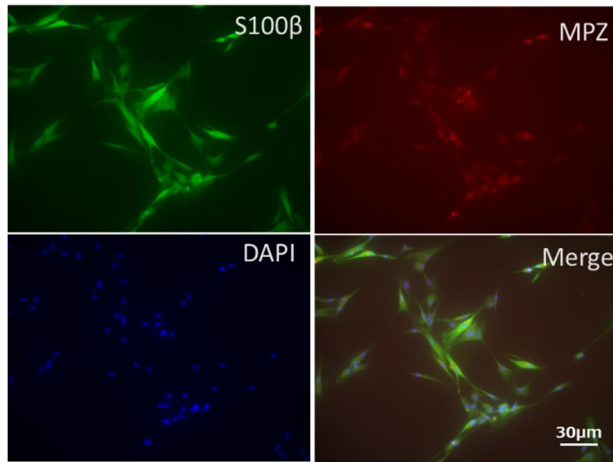


図1. 取得した初代培養細胞の免疫染色
S100、MPZ (いずれもシュワン細胞マーカー)、DAPI (細胞核)

	CNP	GST	GFAP	Iba1	iNOS	MPZ	Sox10	S100	ALDH1L	ErbB3	GLAST	CD68	Arg1	GLT1	P75NTR	CD206	Sox9	PMP22	Dhh	GAP43	MAG	MBP	Olig2	Krox20
C	+	+	+	+	±	+	?	+	-	+	-	-	?	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	?
i	+	+	±	+	+	+	?	+	+	±	-	+	?	±	+	-	+	+	+	+	+	+	-	?
細胞	+	±	+	±	+	+	+	+	±	-	+	±	+	+	±	-	+	+	+	+	-	+	+	+

表1. 逆転写 PCR による発現解析の結果

SPC: 脊髄、Sci: 坐骨神経、細胞: 本実験で取得した細胞 ? : 偽陽性の可能性があるもの
 シュワン細胞マーカー: CNP、MPZ、Sox9、Sox10、S100、MAG、MBP、p75NTR、GAP43、ErbB3、Krox20
 アストロサイトマーカー: GFAP、S100、Sox9、GLAST
 ミクログリアマーカー: CD68、CD86、CD206、Iba1、Arg1

免疫沈降法による抗原の取得と LC/MS 解析 (2025 年に追記予定)

A の血清より IgG を精製し、プロテイン G 磁気ビーズに IgG を共有結合し免疫沈降を行った。前処理した細胞ライセートと IgG 結合ビーズを数時間反応させ、抗原を溶出する作業を複数回行った。取得したサンプルをカラムで濃縮し、ウェスタンブロット法にて抗原の存在を確認した (図2)。取得したサンプルを SDS-PAGE で泳動後、銀染色で検出したバンドに対して LC/MS 解析を行った。

LC/MS の解析の結果、5 つのタンパクが抗原候補となった。

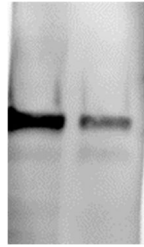


図2. 免疫沈降で得られたサンプルのウェスタンブロット法の結果
(A の血清で検出)
左: 細胞のライセート、右: 免疫沈降で得られたサンプル

候補 1、2 は相動性の高い同じファミリーで分子量も近いため、交差反応をする可能性が高い。実際にウェスタンブロット法にて免疫沈降したサンプルに反応し、分子量も近い事が判った。また、組織免疫染色の結果、A の抗体のシグナルと共局在する事が判った。また、候補 1、2 の市販のリコンビナントタンパクに患者 A の抗体が反応する事が判った。他の 3 候補に関してウェスタンブロット法にて解析を行った結果、免疫沈降したサンプルに反応するが、分子量が異なることが判った。これらは抗原である可能性が低いことが判った。

以上より、候補 1、2 に関してリコンビナントタンパクを使用し、ELISA 法にて患者の陽性率を解析する事となった。

ELISA 法によるスクリーニングと陽性者の傾向（2025 年に追記予定）

健常者 30 名のスクリーニングを行い最も高い吸光度の健常者を選出し、この健常者以上の吸光度値を陽性とする事になった。本研究で解析対象となった 587 名をスクリーニング解析した結果、候補 1 に対しては 8.18%、候補 2 に関しては 8.0% が陽性となり、両方に陽性である患者が大半を占めた。健常者の吸光度値で各患者の候補 1、2 の吸光度値を Normalize した場合、候補 1、2 の吸光度比が近くなる傾向がみられ、患者の抗体が候補 1、2 に交差反応する事が示唆された（図 3）。これら陽性となった患者の臨床情報を解析した結果、脱髄型を示す患者が大半であることが判った。

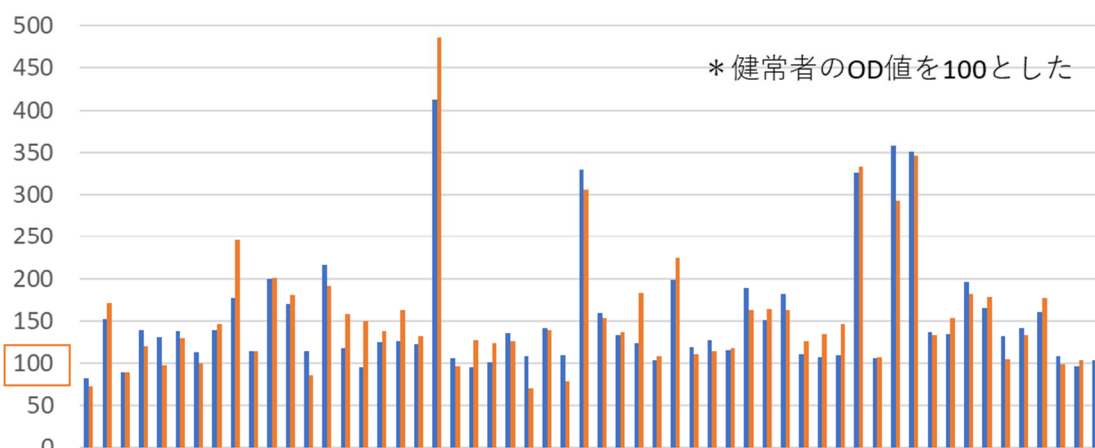


図 3 . 候補 1 , 2 の吸光度の比較 (ELISA 法)

青 : 候補 1、橙 : 候補 2

考察

本研究では対象者は 587 名であり、全て組織免疫染色スクリーニングを行い、抗原の解析の最初の糸口とした。免疫染色はウェスタンブロット法等に比べてタンパクの変性が弱く抗原性が保持されているため、シグナルが検出しやすい。ELISA 法に比べ、安価に網羅的な抗原の局在の解析ができるため、将来的には診断の一助となる可能性がある。この 587 名の免疫染色の結果は、臨床情報と結び付けたデータにすることが可能か検討し、可能ならばいずれデータ化を行いたい。

本研究で解明された抗原候補 1、2 への抗体に病的意義があるかは不明である。抗原候補 1、2 は成果 で述べた様に、肝臓でも発現があるタンパクで、細胞質内にユビキタスに発現する事が判っている。しかし、免疫染色で解析した結果、髄鞘では表面に局在している事が判っている。陽性率が比較的高い上に、陽性者は脱髄型が多く、髄鞘膜上に抗原が認められる事から、病的意義がある可能性は高い。病的意義の解析には in vivo による詳細な解析が必要と思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hongo Yu, Kaida Kenichi, Komuta Yukari, Takazaki Hiroshi, Yamazaki Keishi, Suzuki Kazushi	4. 巻 356
2. 論文標題 Cholesterol-added antigens can enhance antiglycolipid antibody activity: Application to antibody testing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 577580 ~ 577580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneuroim.2021.577580	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 Horiuchi Midori, Hongo Yu, Yamazaki Keishi, Komuta Yukari, Kadoya Masato, Takazaki Hiroshi, Furuya Yuichiro, Matsui Taro, Sakamoto Naohiro, Ikwaki Katsunori, Suzuki Kazushi, Kaida Kenichi	4. 巻 61
2. 論文標題 An Atypical Phenotype of Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy Associated with Ocular Palsy, IgM-anti Ganglioside Antibody, and Fever-induced Recurrence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1247 ~ 1252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.7526-21	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本郷悠、高崎寛、山崎啓史、小牟田縁、海田賢一
2. 発表標題 Cholesterol付加抗原における抗糖脂質抗体結合活性増強作用の検証 Guillain-Barrey症候群とその関連疾患における検討
3. 学会等名 第61回神経学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本郷悠、高崎寛、山崎啓史、小牟田縁、古屋佑一郎、松井太郎、阪本直広、池脇克則、海田賢一
2. 発表標題 ガングリオシド抗原へのcholesterol付加による抗原抗体反応増強作用の解析：ギラン・バレー症候群と関連疾患の検討
3. 学会等名 第31回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本郷悠、高崎寛、山崎啓史、小牟田縁、古屋佑一郎、松井太郎、阪本直広、池脇克則、海田賢一
2. 発表標題 Cholesterol付加によるIgG抗GM1抗体活性増強作用：ギラン・バレー症候群と関連疾患の検討
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高崎 寛, 中川 慶一, 古屋 佑一郎, 松井 太郎, 堀内 碧, 和田 大司, 山崎 啓史, 角谷 真人, 小牟田 縁, 池脇 克則, 海田 賢一
2. 発表標題 免疫性ニューロパチーに対するIVIg維持療法の効果判定に握力連日測定が有用である
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 山崎 啓史, 角谷 真人, 高崎 寛, 堀内 碧, 古屋 佑一郎, 松井 太郎, 小牟田 縁, 池脇 克則, 海田 賢一
2. 発表標題 抗Neurofascin155抗体陽性CIDPにおけるIgGサブクラス、髄液中抗体活性の臨床的意義
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 角谷 真人, 松井 太郎, 古屋 佑一郎, 堀内 碧, 山崎 啓史, 高崎 寛, 小牟田 縁, 清水 潤, 池脇 克則, 海田 賢一
2. 発表標題 筋炎症状のない担癌患者血清における抗HMGR抗体の検索
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 角谷真人、中川慶一、堀内碧、小牟田縁、清水潤、池脇克則、海田賢一
2. 発表標題 筋炎症状のない担癌患者血清における抗HMGCR抗体の検索
3. 学会等名 第30回日本神経免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀内碧、中川慶一、角谷真人、山崎啓史、和田大司、小牟田縁、池脇克則、海田賢一
2. 発表標題 ステロイド長期投与が奏効したfacial-onset sensory and motor neuropathyの47 歳男性例
3. 学会等名 第36回日本神経治療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角谷真人、古屋佑一郎、堀内碧、山崎啓史、高崎寛、小牟田縁、清水潤、池脇克則、海田賢一
2. 発表標題 筋炎症状のない担癌患者血清における抗HMGCR抗体の検索
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 山崎啓史、角谷真人、高崎寛、堀内碧、古屋佑一郎、松井太郎、小牟田縁、池脇克則、海田賢一
2. 発表標題 抗Neurofascin155抗体陽性CIDP症例の抗体IgGサブクラス、髄液中抗体について の検討
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 高崎寛、中川慶一、古屋佑一郎、松井太郎、堀内碧、和田大司、山崎啓史、角谷真人、小牟田縁、池脇克則、海田賢一
2. 発表標題 免疫性ニューロパチーに対するIVIg維持療法の効果判定に握力連日測定が有用 である
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019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	海田 賢一 (Kaida Ken-ichi) (40531190)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	
研究 分担者	本郷 悠 (Hongo Yu) (60813798)	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、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科学・助教 (82406)	

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
---------	---------