

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07513

研究課題名(和文) 各種神経疾患に出現する抗体を用いたラフト病の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathophysiology of raft disease using antibodies that appear in various neurological diseases

研究代表者

植田 晃広 (Ueda, Akihiro)

藤田医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20600703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：PC12細胞にTrkを高発現させた培養細胞に抗GM1抗体を作用させると、細胞膜画分の中性スフィンゴミエリナーゼ(nSMase)蛋白量と活性が減少した、その結果、細胞膜画分でスフィンゴミエリン(SM)が増加したが、ガングリオシド(Gg)量に影響しなかった、lipid raft画分ではnSMase活性が有意に低下していた。これらの結果は、抗体や薬剤など各種方法で細胞膜上やlipid raftsの脂質成分を変化させ、疾患の標的分子を減少させる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体や薬剤など各種方法で細胞膜上やlipid raftsの脂質成分を変化させることで、疾患の標的分子を減少させる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：When anti-GM1 antibody was allowed to act on cultured cells in which PC12 cells were highly expressed with Trk, the amount and activity of neutral sphingomyelinase (nSMase) protein in the cell membrane fraction decreased and sphingomyelin (SM) in the cell membrane fraction increased. anti-GM1 antibody did not affect the amount of cell membrane gangliosides. These results showed that nSMase activity was significantly reduced in the lipid raft fraction, and it is possible that the target molecules of the disease could be reduced by changing the lipid components on the cell membrane and lipid rafts by various methods such as antibodies and drugs.

研究分野：脳神経内科

キーワード：抗GM1抗体 lipid rafts neutral sphingomyelinase

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜上には lipid rafts というシグナル伝達分子や糖脂質が局在するマイクロドメインが存在する。我々は、軸索障害型ギラン・バレー症候群患者血清中に認められる抗 GM1 抗体が、神経細胞の生存・分化に必須の神経成長因子( NGF : Nerve growth factor ) の高親和性受容体である Trk ( tropomyosin-related kinase ) を介するシグナル伝達系を傷害し、その傷害が通常 lipid rafts 上に存在している Trk が非 rafts 画分へ移動させられてしまうことによることを報告した ( A. Ueda et al. *Mol Cell Neurosci.* 2010 )。また、希な疾患とされてきた自己免疫性神経疾患である脳脊髄根末梢神経炎 ( EMRN: encephalomyelorradiculoneuropathy ) の患者血清・髄液中に抗中性糖脂質抗体が存在し、鋭敏なバイオマーカーとなる事を見出している ( *Neurology* 2014 )。中性スフィンゴミエリナーゼ ( nSMase: neutral sphingomyelinase ) は lipid rafts の重要な構成分子であるスフィンゴミエリン ( Sphingomyelin: SM ) を分解し、ガングリオシドや中性糖脂質抗体の基質となるセラミド ( Ceramide: Cer ) を産生する。抗中性糖脂質抗体による、nSMase 分子の局在と活性の変化、lipid rafts を含めた細胞膜の構造への影響、エキソソームの変化などを明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

我々は lipid raft と神経疾患の研究を継続して行っており、前述のように lipid rafts に存在する GM1 に対する抗体により、lipid rafts の組成の変化が生じ、Trk などのシグナル伝達蛋白など lipid rafts に局在する物質が移動させられてしまうことを見出していた。また、新たにその作用が nSMase 活性や蛋白量の変化を介して lipid rafts の SM や Cer 量の変化から惹起されていること、またその影響は lipid rafts 上の蛋白に留まらず、エキソソームの作用にも影響し、1細胞だけでなく他の神経系細胞やグリア細胞あるいはその他の細胞との相互作用にも関与していることを発見している。

細胞膜は一様ではなく、lipid rafts や caveola と呼ばれるシグナリングドメインがあることが知られている。神経細胞やグリア細胞に存在するこれらの構造に、神経免疫疾患で出現する抗体の抗原である、GBS の GM1、中枢末梢連合脱髄症の NF-155、視神経脊髄炎の AQP4、NMDAR 脳炎の NMDAR などが存在する。神経変性疾患ではアルツハイマー病のアミロイドβ、パーキンソン病のαシヌクレイン、プリオン病のプリオンなども lipid rafts に存在することが報告されてきた。さらに近年、エキソソームの研究は急速に発展し、神経変性疾患の伝播に軸索輸送だけでなくエキソソームが重要な役割を果たしている可能性が報告されてきている。このように種々の神経疾患の病変の主座である

lipid raftsの研究を中心に、神経疾患をDNAや蛋白質のみならず、神経系の脂質異常としての観点から捉える本研究は独創的で重要であると考えられた。

### 3 . 研究の方法

nSMase 活性の変化は、whole cell と、subcellular protein fractionation 法とシヨ糖密度勾配超遠心法で得られた各画分の活性を測定した( Amplex® Red Sphingomyelinase Assay Kit, Invitrogen )。

lipid rafts 構造への影響と同定 : PC12 細胞に Trk 高発現させた PCtrk 細胞を用いた。市販の抗 GM1 抗体で時系列を振り PCtrk 細胞を処理した。細胞 homogenate と、それをシヨ糖密度勾配超遠心法で処理し lipid rafts 画分を調整したものにわけ、それぞれの GM1 をはじめとする酸性糖脂質、中性糖脂質、SM、Cer、コレステロールの量、また lipid rafts のマーカー蛋白である Ras 蛋白 ( 低分子量 GTP 結合蛋白 )、プリオン蛋白などの量的な変化を解明し、lipid rafts で引き起こされる構造の変化を解析した。

エキソームとの関係で、抗 GM1 抗体による細胞刺激で誘導されるエキソソームの分泌動態を細胞中のそれとを比較し、細胞外への分泌制御機構への影響を同定した。

### 4 . 研究成果

PCtrk 細胞を抗 GM1 抗体で処理すると、細胞膜画分の nSMase 蛋白量と活性が減少した、その結果、細胞膜画分で SM が増加したが、Cer の量には影響を及ぼさなかった。また細胞膜画分の GM1 をはじめとするガングリオシドの量に影響しなかった。全細胞では SM や Gg の量に変化はなく、酸性 SMase 活性にも変化を及ぼさなかった。lipid raft 画分では nSMase 活性が有意に低下していた。培養液中のエキソソームの分泌量は減少していた。これらの結果は、抗体や薬剤など各種方法で細胞膜上や lipid rafts の脂質成分を変化させ、疾患の標的分子を減少させる可能性があることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Niimi Yoshiki, Ito Shinji, Mizutani Yasuaki, Murate Kenichiro, Shima Sayuri, Ueda Akihiro, Satake Wataru, Hattori Nobutaka, Toda Tatsushi, Mutoh Tatsuro	4. 巻 61
2. 論文標題 Altered regulation of serum lysosomal acid hydrolase activities in Parkinson's disease: A potential peripheral biomarker?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parkinsonism & Related Disorders	6. 最初と最後の頁 132 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parkreldis.2018.10.032	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 Niimi Y, Shima S, Mizutani Y, Ueda A, Ito S, Mutoh T	4. 巻 5
2. 論文標題 Fatigue evaluated using the 16-item Parkinson Fatigue Scale (PFS-16) predicts Parkinson's disease prognosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fujita Medical Journal	6. 最初と最後の頁 45-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Harada Masaya, Miura Shiroh, Kida Hiroshi, Moritaka Taiga, Irie Ken-ichi, Kamada Takashi, Uchiyama Yusuke, Shima Sayuri, Mutoh Tatsuro, Hoshino Tomoaki, Taniwaki Takayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Reversible Conduction Failure in Anti-lactosylceramide-antibody-positive Combined Central and Peripheral Demyelination	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2019.00600	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 Hamano Tadanori, Mutoh Tatsuro, Naiki Hironobu, Shirafuji Norimichi, Ikawa Masamichi, Yamamura Osamu, Dickson Dennis W., Aiki Shichiryomon, Kuriyama Masaru, Nakamoto Yasunari	4. 巻 17
2. 論文標題 Subventricular glial nodules in neurofibromatosis 1 with craniofacial dysmorphism and occipital meningoencephalocele	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eNeurologicalSci	6. 最初と最後の頁 100213 ~ 100213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ensci.2019.100213	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 Nishii Kazuya, Shimogawa Ritsuko, Kurita Hisaka, Inden Masatoshi, Kobayashi Michio, Toyoshima Itaru, Taguchi Yoshiharu, Ueda Akihiro, Tamune Hidetaka, Hozumi Isao	4. 巻 9
2. 論文標題 Partial reduced Pi transport function of PiT-2 might not be sufficient to induce brain calcification of idiopathic basal ganglia calcification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53401-0	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 渡辺 宏久, 植田 晃広, 島 さゆり, 水谷 泰彰, 新美 芳樹	4. 巻 9
2. 論文標題 【さまざまな神経筋疾患を理解する】多系統萎縮症の病態生理、診断基準、臨床経過(総説/特集)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ディスアリースリア研究	6. 最初と最後の頁 23-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Niimi Yoshiki, Ito Shinji, Mizutani Yasuaki, Murate Kenichiro, Shima Sayuri, Ueda Akihiro, Satake Wataru, Hattori Nobutaka, Toda Tatsushi, Mutoh Tatsuro	4. 巻 61
2. 論文標題 Altered regulation of serum lysosomal acid hydrolase activities in Parkinson's disease: A potential peripheral biomarker?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parkinsonism & Related Disorders	6. 最初と最後の頁 132 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parkreldis.2018.10.032	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 Ueda Akihiro, Shima Sayuri, Murate Kenitiroh, Kikuchi Kouichi, Nagao Ryunosuke, Maeda Toshiki, Muto Eri, Niimi Yoshiki, Mizutani Yasuaki, Mutoh Tatsuro	4. 巻 89
2. 論文標題 Anti-GM1 ganglioside antibodies modulate membrane-associated sphingomyelin metabolism by altering neutral sphingomyelinase activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 42 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mcn.2018.03.012	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 Ito Shinji, Kikuchi Koichi, Ueda Akihiro, Nagao Ryunosuke, Maeda Toshiki, Murate Kenichiro, Shima Sayuri, Mizutani Yasuaki, Niimi Yoshiki, Mutoh Tatsuro	4. 巻 9
2. 論文標題 Changes in Serial D-Dimer Levels Predict the Prognoses of Trousseau's Syndrome Patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 1083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2018.00528	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 Murate Kenichiro, Mizutani Yasuaki, Maeda Toshiki, Nagao Ryunosuke, Kikuchi Kouichi, Shima Sayuri, Niimi Yoshiki, Ueda Akihiro, Ito Shinji, Mutoh Tatsuro	4. 巻 9
2. 論文標題 A Patient With Thiamine Deficiency Exhibiting Muscle Edema Suggested by MRI	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2018.01083	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 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 植田晃広
2. 発表標題 MSの鑑別診断やRed Flagsについて～症候、画像、検査～
3. 学会等名 MS Forum in Kyoto
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植田晃広、菊池洸一、長尾龍之介、前田利樹 村手健一郎、新美芳樹、水谷泰彰、島さゆり、伊藤信二 武藤多津郎、渡辺宏久
2. 発表標題 中咽頭後壁から内頸動脈周囲のアスペルギルス感染症から多発脳神経麻痺を来した1例
3. 学会等名 第24回日本神経感染症学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植田晃広、保住 功、山田 恵、安西将大、 加藤邦尚、長尾龍之介、石川等真、村手健一郎、 新美芳樹、水谷泰彰、鳥さゆり、下畑享良、武藤多津郎、犬塚貴、渡辺宏久
2. 発表標題 運動・感覚障害を伴った家族性特発性基底核石灰化症の親子2例
3. 学会等名 AMED 特発性大脳基底核石灰化症（IBGC）合同班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植田晃広、加藤邦尚、長尾龍之介、石川等真、植田高弘、 新美芳樹、水谷泰彰、鳥さゆり、村山和宏、武藤多津郎、渡辺宏久
2. 発表標題 明瞭な両耳側半盲と視力低下を呈し速やかな病変の特定と治療により視野・視力共に回復したNMOの一例
3. 学会等名 東海MS研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植田晃広、長尾龍之介、前田利樹、菊池洗一、坂野文彦 加藤邦尚、東篤宏、村手健一郎、廣田政古、石川等真、新美芳樹、水谷泰彰、鳥さゆり、伊藤信二、武藤多津郎、渡辺宏久
2. 発表標題 心肺停止を伴った高度の乳酸アシドーシスを透析療法で救命し得たMELASの1例
3. 学会等名 第37回 日本神経治療学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植田晃広、加藤邦尚、長尾龍之介、石川等真、植田高弘、新美芳樹、水谷泰彰、鳥さゆり、村山和宏、武藤多津郎、渡辺宏久
2. 発表標題 明瞭な両耳側半盲と視力低下を呈し 速やかな病変の特定と治療により 視野・視力共に回復したNMOの一例
3. 学会等名 日本神経免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村手 健一郎, 坂野 文彦, 加藤 邦尚, 東 篤宏, 長尾 龍之介, 前田 利樹, 菊池 洸一, 廣田 政古, 石川 等真, 島 さゆり, 新美 芳樹, 水谷 泰彰, 植田 晃広, 武藤 多津郎
2. 発表標題 特異な臨床像を呈したSpinocerebellar ataxia type 6(SCA6)の1例
3. 学会等名 神経学会東海北陸地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植田晃広、武藤多津郎
2. 発表標題 膜ラフトと神経疾患 神経免疫疾患と膜ラフト
3. 学会等名 第60回 神経学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石丸 聡一郎, 河村 吉紀, 小澤 慶, 三浦 浩樹, 吉川 哲史, 島 さゆり, 植田 晃広, 武藤 多津郎
2. 発表標題 中枢神経感染症疑いに対するReal-time PCRを用いたヒトヘルペスウイルスの検討
3. 学会等名 日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiki Niimi, Yasuaki Mizutani, Shinji Ito, Sayuri Shima, Akihiro Ueda, Tatsuro Mutoh.
2. 発表標題 Altered Serum Lysosomal Hydrolase Activities in Parkinson's Disease.
3. 学会等名 American Academy of Neurology annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Yasuaki Mizutani, Toshiki Maeda, Yoshiki Niimi, Ryunosuke Nagao, Sayuri Shima, Akihiro Ueda, Tatsuro Mutoh.
2. 発表標題 Effects of clioquinol on autophagy-lysosome system in cultured astrocytes.
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiki Niimi, Toshiki Maeda, Kouichi Kikuchi, Ryunosuke Nagao, Kenichiro Murate, Seiko Hirota, Chika Hikichi, Tomomasa Ishikawa, Yasuaki Mizutani, Sayuri Shima, Akihiro Ueda, Shinji Ito, Wataru Satake, Nobutaka Hattori, Tatsushi Toda and Tatsuro Mutoh.
2. 発表標題 Altered regulation of serum lysosomal hydrolase activity in Parkinson's disease.
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田利樹、伊藤信二、坂野文彦、加藤邦尚、東篤宏、菊池洗一、長尾龍之介、村手健一郎、廣田政古、引地智加、石川等真、新美芳樹、水谷泰彰、島さゆり、植田晃広、武藤多津郎.
2. 発表標題 髄液中の抗中性糖脂質抗体が経過中に陽性になったEMRN（脳脊髄根末梢神経炎）の1例.
3. 学会等名 第151回日本神経学会東海北陸地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣田政古、伊藤信二、植田晃広、坂野文彦、加藤邦尚、東篤宏、菊池洗一、長尾龍之介、前田利樹、村手健一郎、引地智加、石川等真、島さゆり、水谷泰彰、新美芳樹、中根俊成、安東由喜雄、武藤多津郎.
2. 発表標題 肺小細胞癌への化学療法が自律神経症状に有効であった、抗ganglionicアセチルコリン受容体抗体陽性の自己免疫性自律神経節障害の1例.
3. 学会等名 第30回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田利樹、坂野文彦、加藤邦尚、東篤宏、菊池洸一、長尾龍之介、村手健一郎、廣田政古、石川等真、新美芳樹、水谷泰彰、島さゆり、植田晃広、伊藤信二、武藤多津郎。
2. 発表標題 左真菌性中耳炎・錐体骨炎から両側の肥厚性硬膜炎と脳神経麻痺を来した1例感染症
3. 学会等名 第23回日本神経感染症学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊池洸一、坂野文彦、加藤邦尚、東篤宏、前田利樹、長尾龍之介、村手健一郎、廣田政古、石川等真、新美芳樹、水谷泰彰、島さゆり、植田晃広、伊藤信二、武藤多津郎。
2. 発表標題 大腸菌性髄膜炎に下垂体膿瘍を合併し、汎下垂体機能低下症を呈した成人例。
3. 学会等名 第23回日本神経感染症学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東篤宏、水谷泰彰、坂野文彦、加藤邦尚、菊池洸一、長尾龍之介、前田利樹、村手健一郎、廣田政古、引地智加、石川等真、島さゆり、新美芳樹、植田晃広、伊藤信二、海田賢一、武藤多津郎。
2. 発表標題 血清抗体価がステロイド療法により経時的に減少した抗NF155抗体陽性CIDP の1例。
3. 学会等名 第152回日本神経学会東海北陸地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 島さゆり、水谷泰彰、植田晃広、村手健一郎、前田利樹、長尾龍之介、菊池洸一、加藤邦尚、坂野文彦、東篤宏、廣田政古、石川等真、引地智加、新美芳樹、伊藤信二、武藤多津郎。
2. 発表標題 経過中抗中性糖脂質抗体の抗体価が変動した脳脊髄根末梢神経炎。
3. 学会等名 第36回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武藤多津郎、植田晃広、水谷泰彰、鳥さゆり.
2. 発表標題 抗GM1抗体が及ぼす神経系培養細胞の細胞膜への影響の解明.
3. 学会等名 平成30年度 神経免疫疾患のエビデンスによる診断基準・重要度分類・ガイドラインの妥当性と患者QOLの検証班 研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武藤多津郎、水谷泰彰、新美芳樹、植田晃広、鳥さゆり、村手健一郎.
2. 発表標題 Clioquinolの培養astrocyteに及ぼす作用の解明
3. 学会等名 平成30年度 スモンに関する調査研究班.研究報告会
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	武藤 多津郎  (Mutoh Tatsuro)  (60190857)	藤田医科大学・医学部・教授    (33916)	

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