

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590509

研究課題名(和文)細菌感染後性末梢神経疾患における菌体シアル化の関与の証明

研究課題名(英文)Contribution of bacterial sialylation in the development of postinfectious autoimmune peripheral neuropathy

研究代表者

古賀 道明(KOGA, Michiaki)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60383014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ギラン・バレー症候群(GBS)は、カンピロバクター・ジェジュニ感染などが契機となって発症する自己免疫性末梢神経疾患である。シアル酸がGBSの標的分子であるガングリオシドの主要な成分であることから、高いシアル酸修飾能を有するカンピロバクターがGBSを惹き起こしやすいか検証した。その結果、GBSおよび腸炎患者由来株の間で(=対照)のシアル酸含量に差はなかった。GBSの高リスクであることが明らかにされているGM1エピトープやリポオリゴ糖合成関連遺伝子座クラスAを有する菌株に限定した解析でもシアル酸含量に差はなかった。分子相同性を示す自己抗原の「量」より「質」の方が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Guillain-Barre syndrome (GBS) is an autoimmune-mediated peripheral neuropathy and most GBS patients have infectious symptoms 1-3 weeks before neurological onset. *Campylobacter jejuni*, a leading cause of acute enteritis in developed countries, is the most frequent antecedent infectious agent in GBS. Gangliosides (glycosphingolipids with sialic acids) have been identified as a target molecule of GBS after *C. jejuni* enteritis. In this study, previous these findings lead to examine whether high sialic acid modification ability of *C. jejuni* is a risk factor for development of GBS. Disappointedly, there was no difference in sialic acid content between the GBS and enteritis (as control) isolates. This was the same when only the strains with ganglioside epitopes or GBS-related LOS biosynthesis locus were analyzed. These results suggest that the quality of the sialylation is more important than the quantity for the development of this syndrome.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：カンピロバクター ギラン・バレー症候群 シアル酸 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) は各種感染症が契機となって発症する自己免疫性末梢神経疾患である。グラム陰性桿菌 *Campylobacter jejuni* が最も高頻度の原因病原体であるが、*C. jejuni* 腸炎を生じて GBS を続発するのは千人に一人とされ、GBS 発症を規定する細菌側・宿主側因子が存在すると考えられている。われわれは、GBS を惹起しやすい菌側因子として、特定の遺伝子群 (リポオリゴ糖 [LOS] 合成関連遺伝子座 Class A) を報告した (Koga et al. *J Infect Dis* 2006; 193: 547-555)。この遺伝子座を有する菌株は、GBS の標的抗原である GM1 や GD1a エピトープを発現することが多く、そのことが GBS 発症と関連していると考えられる。しかし、(神経疾患を合併していない) 腸炎患者からの分離株も一定の割合でこの遺伝子座を有し、GM1 エピトープの発現も稀ではなく、GBS 惹起に他の因子が関与することは明らかである。

GBS の標的分子であるガングリオシドは、シアル酸を有するスフィンゴ糖脂質の総称であり、*C. jejuni* でも複数のシアル酸合成酵素やシアル酸転移酵素がクローニングされている。本菌における菌体表面抗原のシアル酸修飾は、抗血清への抵抗性を増強するなど感染成立・維持に非常に重要で、かつ容易に表面抗原を変化しやすくすることで、感染免疫の標的から攻撃をそらす、“隠れ蓑”的な役割があるものと考えられる。実験動物に対する感作実験で、感作抗原が少ないと、抗体産生や自己免疫疾患惹起能が弱くなることをしばしば経験する。これをヒントに、高いシアル酸修飾能を有する *C. jejuni* が GBS を惹き起こしやすいという仮説が想定された。

2. 研究の目的

神経難病である GBS を惹き起こしやすい菌の特徴を同定することは非常に重要であり、*C. jejuni* 腸炎後 GBS の病態解明にも必要である。本研究では、作業仮説「高いシアル酸修飾能を有する *C. jejuni* が GBS 続発の高リスク要因である」を検証することを目的に行った。

3. 研究の方法

(1) 対象: GBS 患者から分離された *C. jejuni* 株 49 株、Fisher 症候群 (FS) 分離株 19 株、腸炎分離株 46 株を用いた。

(2) シアル酸定量: 既報 (Koga et al. *Neurology* 2005; 64: 1605-1611) と同様に Proteinase 処理した菌液を粗 LOS として用いた。シアリダーゼ (*Arthrobacter ureafaciens* 由来) リコンビナント蛋白 (Sialidase ATM: ProZyme, CA) による処理で LOS 上のシアル酸を遊離させた後、酵素法で遊離シアル酸を定量した。

(3) ガングリオシド・エピトープの検出: 菌体 LOS 上の GM1, GD1a, GQ1b エピトープの有無について、モノクローナル抗体を用いて薄層クロマトグラフィー免疫染色で検討した。

(4) LOS 合成関連遺伝子座: 各遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR 法 (Koga et al. *J Infect Dis* 2006; 193: 547-555) により、菌の LOS 合成関連遺伝子のクラス (A、B、C、E、F: Gilbert et al. *Campylobacter*. 3rd Ed. Edited by Nachamkin et al. 2008) を決定した。

(5) 統計解析: 二群間の比較は Mann-Whitney *U* 検定で、多群間の比較は Kruskal-Wallis 検定で行い、両側 *P* 値 < 0.05 の場合を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

シアル酸含有量は、FS 株が最も高い傾向であったが、GBS 株、FS 株、腸炎株の三群間で有意差はなかった ($P=0.16$: **Figure 1**)。Class A の LOS 合成関連遺伝子座を有する菌に限定した解析でも、腸炎株と比べ GBS ないし FS 株でのシアル酸含有量は多くなかった。Class B 遺伝子座を有している菌株はシアル酸を多く含んでいる傾向にあり、これはシアル酸含有割合の高い GQ1b エピトープを Class B の菌が高頻度に発現しているためと考えられた。GM1 を発現する菌株の中での解析でも、GBS 株、FS 株、腸炎株の間でシアル酸含有量に差はなく、GD1a や GQ1b エピトープを有する株

に関しても同様の結果であった。

今回の検討では、*C. jejuni* におけるシアル酸修飾の程度が、GBS や FS の発症に関与することを証明できなかった。GBS 株や腸炎株いずれにおいても GM1 エピトープを高頻度に発現しているものの、GBS 株は GM1 と GD1a エピトープを両方発現しているのに対し、腸炎株では GM1 エピトープのみ単独で発現していることが多い。つまり、複数のガングリオシド・エピトープが菌体上で複合体を形成することで、新たなエピトープを作り出し、それによって GBS の発症リスクが高くなっていることが予想される。今回の検討で、分子相同性を示す自己抗原の「量」より「質」の方が重要であることが示唆された。

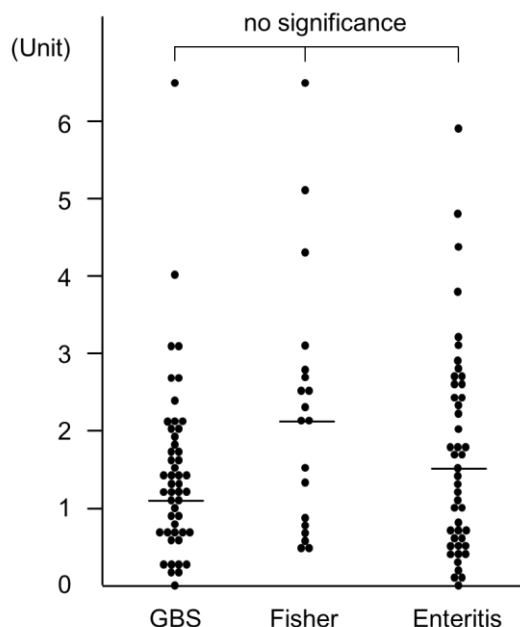


Figure 1 *Campylobacter jejuni* 菌体上のシアル酸含量

GBS: ギラン・バレー症候群分離株 (N=49)

Fisher: フィッシャー症候群分離株 (N=19)

Enteritis: 腸炎患者分離株 (N=46)

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 38 件)

- ①. Koga M. Another CNS phenotype of anti-GQ1b antibody syndrome. *J Neurol*

Neurosurg Psychiatry 2013; 84: 1185 (査読なし)

- ②. Koga M., Gilbert M, Takahashi M, Li J, Hirata K, Kanda T, Yuki N. GQ1b-seronegative Fisher syndrome: Clinical features and new serological markers. *J Neurol* 2012; 252: 1366-1374 (査読あり)
- ③. Koga M., Kusunoki S, Kaida K, Uehara R, Nakamura Y, Kohriyama T, Kanda T. Nationwide survey of patients in Japan with Bickerstaff brainstem encephalitis: epidemiological and clinical characteristics. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 1210-1215 (査読あり)

[学会発表] (計 14 件)

- ①. 古賀道明, 高橋正樹, 神田 隆. ギラン・バレー症候群における IgM 型抗ガングリオシド抗体の意義. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会 2013 年 11 月 27-29 日、下関 (海峡メッセ下関)
- ②. Koga M., Kanda T, Yuki N. GQ1b-seronegative Fisher syndrome: serological study. Biennial Meeting of the Peripheral Nerve Society. June 25-29, 2011. Potomac, Maryland, USA.
- ③. 古賀道明, 高橋正樹, 結城伸泰, 神田隆. ギラン・バレー症候群発症におけるカンピロバクター・シアル化の意義. 第 52 回日本神経学会学術大会 2011 年 5 月 18-20 日、名古屋 (名古屋国際会議場)

[図書] (計 6 件)

- ①. 古賀道明. 医学書院、東京. ギラン・バレー症候群. *今日の治療指針 2015 年版* (山田 徹、他編集). 2015 (印刷中)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 道明 (KOGA, Michiaki)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60383014

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし