

2008330/2A

厚生労働科学研究研究費補助金
こころの健康科学研究事業

糖鎖の関連するニューロパチーの 分子病態の解析

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 楠 進

平成21年(2009年)4月

目 次

I. 総括研究報告

糖鎖の関連するニューロパチーの分子病態の解析	1
楠 進	

II. 分担研究報告

1. ニューロパチーにおけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン糖鎖遺伝子の分析	4
楠 進	
2. GQ1b 抗体、GT1a 抗体陽性症例における抗体反応特異性と臨床像の検討	7
楠 進	
3. 純粋運動型 Guillain-Barré 症候群と抗 GM1/GalNAc-GD1a 複合体抗体	12
鎌 倉 恵 子	
4. ニューロパチーに関連する糖鎖遺伝子異常の解析	15
北 川 裕 之	
5. レプトスピラ感染と血清中の抗ガングリオシド抗体出現の関連性および	17
病態機序に関する検討	
清 水 潤	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	21
-----------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

糖鎖の関連するニューロパチーの分子病態の解析

研究代表者 楠 進 近畿大学医学部教授

研究要旨

ニューロパチーの病態と糖鎖合成酵素遺伝子の異常および糖鎖に対する抗体上昇との関連を解析した。原因不明のニューロパチー症例を中心に、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの糖鎖合成酵素の一つであるコンドロイチン *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素-1 遺伝子の解析を行った。その結果、2 症例においてアミノ酸置換を伴う一塩基変異を見出した。それぞれの変異は酵素活性を著明に低下させることがわかり、コンドロイチン硫酸鎖の合成不全とニューロパチーとの関連が示唆された。Guillain-Barré 症候群(GBS)、Miller Fisher 症候群や Bickerstaff 型脳幹脳炎の血中抗体の反応性と臨床病型の関連を検討した。その結果 GQ1b と比較した GT1a に対する相対的な反応の強さや、PA を添加することによる抗 GQ1b 抗体や抗 GT1a 抗体活性の変化にもとづく抗体の反応性と臨床像には、基本的には有意な関連がないことがわかった。しかし一部の臨床像には抗体の反応性との相関がみられ、病態との関連について今後の検討が必要である。GBS224 例中 10 例の急性期血中に抗 GM1/GalNAc-GD1a 複合体抗体を検出した。陽性例は純粋運動型であり、高頻度に伝導ブロックがみられた。GM1 と GalNAc-GD1a が Ranvier 絞輪軸索膜上で複合体を形成し、それを認識する抗体が伝導障害を引き起こす可能性が考えられた。レプトスピラ菌体を接種したウサギ 2 羽のうち 1 羽で、一過性の動作緩慢がみられ、GA1 に対する IgG 抗体の軽度上昇がみられた。レプトスピラ症におけるニューロパチーの病態解明のため、今後動物の数を増やし、さらに摂取量を増やして検討する必要がある。

研究分担者

清水潤・東京大学医学部講師

鎌倉恵子・防衛医科大学校准教授

北川裕之・神戸薬科大学教授

楠班員は、原因不明のニューロパチー症例を中心に、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)の合成に関わる糖転移酵素の一つであるコンドロイチン *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素-1 (ChGn-1) 遺伝子の解析を行った。北川班員は、前記の解析により見出された変異が酵素活性を変化させるか否かを検討した。

楠班員は、Miller Fisher 症候群(MFS)、Guillain-Barré 症候群(GBS)、Bickerstaff 型脳幹脳炎(BBE)において高頻度にみられ

A. 研究目的

ニューロパチーの病態にかかわる分子として、糖タンパクや糖脂質などの複合糖質に着目し、糖鎖を合成する糖転移酵素遺伝子異常および糖鎖を標的とする免疫反応について検討を行った。

る抗 GQ1b および抗 GT1a 抗体について、反応性の違いと臨床病型の間に関連がみられるかを解析した。

鎌倉班員は、GM1/GalNAc-GD1a 複合体に対する抗体を一部の GBS 患者血清に見出し、その臨床型との関連を検討した。

清水班員は、従来レプトスピラ感染と血中抗ガングリオシド抗体について報告していたが、本年度レプトスピラ菌体をウサギに接種して抗体上昇や症状の出現の有無を検討した。

B. 研究方法

(1)近畿大学神経内科および東京大学神経内科において、遺伝子解析の同意の得られた原因不明のニューロパチー126例について、ヘパリン採血後 DNA を精製し、ChGn-1 遺伝子の7つのエクソンについて、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。

ChGn-1 と(His)₆-tag との融合タンパクを発現させ、酵素活性を測定した。また HeLa 細胞に様々な変異を含む ChGn-1 を過剰発現させ、コンドロイチン硫酸鎖の組成を解析した。

(2)近畿大学神経内科に抗体測定依頼のあった血清のなかから、GQ1b, GT1a, GQ1b あるいは GT1a とフォスファチジン酸(PA)の混合抗原(GQ1b+PA, GT1a+PA)のいずれかに対する IgG 抗体が陽性の症例を抽出した。任意に設定した抗体活性(+, ++, +++, +++)にもとづき、GQ1b に対する活性が GQ1b+PA よりも2段階以上高い場合を GQ1b>GQ1b+PA 群とした。同じ基準で、GQ1b<GQ1b+PA 群、GT1a>GT1a+PA 群、GT1a<GT1a+PA 群、GQ1b>GT1a 群、

GQ1b<GT1a 群を定義した。

GQ1b>GQ1b+PA 群と GQ1b<GQ1b+PA 群、GT1a>GT1a+PA 群と GT1a<GT1a+PA 群、および GQ1b>GT1a 群と GQ1b<GT1a 群の臨床病型を比較した。

防衛医大第三内科および近畿大学神経内科に抗体検査依頼のあった GBS 血清について、GM1/GalNAc-GD1a 複合体抗体に対する抗体活性をしらべ、陽性例の臨床的・電気生理学的特徴を解析した。

(3)レプトスピラ菌の破砕菌体タンパクをウサギ2羽にアジュバントとともに接種し、臨床的観察および病理学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

研究は各施設の倫理委員会において承認を受けた。遺伝子解析および血中抗体測定については患者本人へ十分に説明を行い、文書で同意を得ている。プライバシーの保護には十分に配慮した。

C. 研究結果と D. 考察

(1)ニューロパチー126例中2例において、ChGn-1 遺伝子にアミノ酸置換を伴う一塩基変異をそれぞれ1箇所ずつ見出した。疾患対照の91例にはこの変異はみられなかった。これらの2箇所の一塩基変異は、アミノ酸置換を伴っており、変異タンパクを発現させて酵素活性を測定したところ、活性は検出できなかった。また HeLa 細胞に変異を含む ChGn-1 を過剰発現させ検討したところ、コンドロイチン硫酸鎖量は、それぞれの ChGn-1 mutant の mRNA 発現量に相関せず、mock の HeLa 細胞が産生するコンドロイチン硫酸鎖量よりも減少していた。

今回見出された遺伝子変異は

heterozygote 変異であり、患者において糖転移酵素活性は低下しているものの残存していると考えられる。しかし minor trauma にさらされやすい末梢神経においては、今回見出されたような CSPG の糖鎖合成系の異常が存在すると、傷害からの修復や再生が十分にできなくなる可能性があり、病態への関与も考えられる。今後症例数を増やしてさらに詳細な解析を行う必要がある。

(2)GQ1b>GQ1b+PA 群では

GQ1b<GQ1b+PA 群に比べて有意に球症状が多くみられた。また GQ1b<GT1a 群では GQ1b>GT1a 群と比較して MMT 3 以下の筋力低下の頻度が有意に高かった。その他は臨床的に有意の差はみられなかった。

GQ1b と比較した GT1a に対する相対的な反応の強さや、PA を添加することによる抗 GQ1b 抗体や抗 GT1a 抗体活性の変化にもとづく抗体の反応性と臨床像には、基本的には有意な関連がないことがわかった。しかし一部の臨床像には抗体の反応性との相関がみられ、病態との関連について今後の検討が必要である。

抗 GM1/GalNAc-GD1a 複合体抗体は GBS224 例中 10 例にみられ、陽性例は病初期から運動神経幹中間部に伝導ブロックがみられる症例が多かった。GM1 と GalNAc-GD1a が Ranvier 絞輪軸索膜上で複合体を形成し、それを認識する抗体が可逆性伝導障害を引き起こしている可能性が考えられた。

(3)レプトスピラ菌体を接種したウサギ 2羽のうち 1羽で、一過性の動作緩慢がみられたが、その後改善した。GA1 に対する IgG 抗体のみが軽度上昇した。病理学的にはとくに所見はみられなかった。今後動物の数を増やし、さらに摂取量を増やして検討する必要があると考えられる。

E. 結論

コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの糖転移酵素遺伝子に酵素活性の著明な低下をきたす一塩基変異が存在し、ニューロパチーの病態に関連する可能性がある。

GQ1b, GT1a に対する抗体は PA 添加抗原に対する抗体を含めて、その臨床的意義はほぼ同等と考えられる。

抗 GM1/GalNAc-GD1a 複合体抗体は、純粋運動型 GBS と関連する。

レプトスピラ菌体成分に対する免疫反応が、神経症状をきたす可能性があり、今後の検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

各分担報告参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし

研究要旨

ニューロパチーと複合糖質の糖鎖合成異常の関連を検討する目的で、126例のニューロパチー症例についてコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)の合成に関与する糖転移酵素の一つであるコンドロイチン *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素-1 (ChGn-1) 遺伝子の解析を行った。その結果、2症例においてアミノ酸置換を伴う一塩基変異を見出した。91例の疾患対照にはこれらの一塩基変異はみられなかった。遺伝子変異のみられた2例のうち1例は自律発汗障害と顔面神経ニューロパチーをきたした38歳の男性であり、もう1例は四肢の運動感覚性ニューロパチーをきたした25歳の男性であった。2症例の変異ともに、ChGn-1の酵素活性の著明な低下を伴っていた。CSPGの糖鎖合成不全とニューロパチーの病態との関連が示唆された。

A. 研究目的

我々はこれまで、Guillain-Barré 症候群 (GBS)などの免疫性ニューロパチーにおいて、糖鎖に対する抗体が高頻度に上昇し、診断に有用であり病態解明の手がかりともなることを報告してきた。一方、糖鎖を合成する遺伝子の異常と末梢神経障害の関連については、実験動物において他のグループから報告されているが、ヒトのニューロパチー患者において糖鎖合成酵素遺伝子の異常を示した報告はない。そこで本研究においては、ニューロパチーの病態と糖鎖合成酵素遺伝子の異常の関連を解明することを目的として、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)にとくに焦点を当てて検討した。

CSPG は、神経系のマトリックスに豊富に存在することが知られ、神経回路網の形

成に重要な役割を果たしていると考えられている。特に近年 CSPG の1種であるホスファカン は神経突起進展作用のあることが見出された。一方、成熟した神経系では損傷部位に形成される瘢痕組織に由来する CSPG がその軸索進展阻害作用があることが明らかになっている。すなわち CSPG は神経再生促進、阻害といった両面の性質を持つことから、神経疾患の病態や治療を考える上できわめて重要と考えられる。

今回我々は、CSPG の糖転移酵素の一つであるコンドロイチン *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素-1 (ChGn-1) に注目して、原因不明のニューロパチー例を中心に遺伝子変異解析を行い、対照症例と比較検討した。

B. 研究方法

当院並びに共同研究施設を受診したニューロパチー症例 126 例、疾患対照 91 例において検討した。

遺伝子解析の同意を得た患者からへパリン採血を行い、DNA の精製を行った。

ChGn-1 遺伝子は人染色体の 8 番 8p21.3 に位置しており、276 個のアミノ酸をコードしている。アミノ酸をコードしているエクソンは 7 つから構成されている。その、エクソンを含むイントロンの部位でのプライマーを設計しヒト DNA ゲノムをテンプレートとして PCR を行い、精製後ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究は厚生労働省ヒト遺伝子解析研究に関する倫理指針に準拠し、近畿大学医学部倫理委員会において承認を受けた。遺伝子解析については、患者本人へ十分に説明を行い、文書で同意を得た。プライバシーの保護には十分に配慮した。

C. 研究結果

ニューロパチー 126 例中 2 例において、ChGn-1 遺伝子にアミノ酸置換を伴う一塩基変異を、それぞれ 1 箇所ずつ (H234R, M509R) 見出した。一方疾患対照の 91 例にはこの変異はみられなかった。

1 症例目は自律発汗障害と顔面神経ニューロパチーをきたした 38 歳の男性症例であり、H234R の変異を認めた。男性は汗がでないことを主訴で来院。精査にて全身の

発汗機能の低下がみられ、34 歳時に発症した右末梢性顔面神経麻痺を認めていた。入院を含め精査したが、その他に神経学的異常をみとめなかった。

2 症例目は 25 歳の男性で、M509R 変異を伴っていた。患者は小学校高学年の頃より手の震えを指摘されて近医を受診するも精神的反応として放置されていた。神経伝導速度検査では運動神経は正中神経、尺骨神経、後腓骨神経で振幅、速度とも著明に低下していた。また感覚神経では正中神経、尺骨神経、腓腹神経とも導出困難であった。

D. 考察

今回のニューロパチー患者における ChGn-1 遺伝子の解析により、アミノ酸置換を伴う一塩基変異を新しく 2 種類 (H234R, M509R) 発見した。

神戸薬大との共同研究では、*in vitro* における組換え型酵素による糖転移活性測定の結果、ChGn-1 mutant H234R、あるいは M509R と (His)₆-tag との融合タンパク質は発現しているにもかかわらず、コンドロイチン硫酸鎖の合成に関与する糖転移活性を欠失していることが確認された。

今回見出された遺伝子変異は heterozygote 変異であり、本 2 症例の患者では、糖転移酵素活性は低下しているものの残存していると考えられる。したがって、今回の解析で見出された変異が、直ちに 2 症例の病態を引き起こした可能性は少ない。しかし minor trauma にさらされやすい末梢神経においては、今回見出されたような

CSPG の糖鎖合成系の異常が存在すると、
傷害からの修復や再生が十分にできなくな
る可能性があり、病態への関与も考えられ
る。また同様の検討を続けることで、
homozygote が見出される可能性もあるこ
とから、今後症例数を増やしてさらに詳細
な解析を行う必要がある。

E. 結論

コンドロイチン硫酸鎖の合成不全とニュー
ーロバチーとの関連が疑われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表:なし
2. 学会発表:なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:なし
2. 実用新案登録:なし

研究要旨

Miller Fisher 症候群(MFS), Guillain-Barré 症候群(GBS), Bickerstaff 型脳幹脳炎(BBE) の患者血清では、ガングリオシドに対する抗体が高頻度に認められる。なかでも、抗 GQ1b 抗体は 3 疾患共通に認められる。GQ1b 抗体陽性患者血清では、GQ1b に対する単独抗原にリン脂質であるフォスファチジン酸(PA)を加えることにより、抗体の反応性が変化することが知られている。また、抗 GQ1b 抗体陽性患者血清では抗 GQ1b 抗体とともに抗 GT1a 抗体も上昇することが多いことが報告されている。PA を添加することによる GQ1b 抗体活性の変化や GQ1b と比較した GT1a に対する相対的な反応の強さは、症例ごとに異なっている。これらの抗体反応特異性の違いによって臨床像に違いがでるものかを検討した。結果、GQ1b, GT1a に対する抗体は、PA 添加抗原に対する抗体を含めて、その臨床的意義はほぼ同等と考えられたが、球症状の出現率や筋力低下の程度など臨床症状の一部では、抗体の反応性との関連を認めた。

A. 研究目的

Miller Fisher 症候群 (MFS)、Guillain-Barré 症候群 (GBS) および Bickerstaff 型脳幹脳炎(BBE)患者血清では、ガングリオシドに対する抗体が高頻度に認められる。眼球運動を支配する脳神経である動眼神経、滑車神経、外転神経や Ranvier 絞輪周囲 (傍絞輪部) のミエリンや一部の後根神経節細胞に高濃度に局在する GQ1b に対する IgG 抗体は、3 疾患共通に認められ、同抗体が前記の GQ1b の局在部に特異的に結合して外眼筋麻痺や失調をきたすことが示唆されている。

GQ1b にリン脂質であるフォスファチジン酸(PA)を加えることにより、抗体の反応性が変化することをわれわれは報告してい

る。また、抗 GQ1b 抗体陽性血清の多くは GQ1b と同様に gangliotetraosyl 基の末端にジシアロシル基を有する GT1a に対する IgG 抗体も上昇する。

PA を添加することによる GQ1b 抗体活性の変化や GQ1b と比較した GT1a に対する相対的な反応の強さは、症例ごとに異なっている。このような抗体の反応特異性の違いによって臨床像に違いがでるものかを検討した。

B. 研究方法

1) 対象

2006 年 9 月から 2008 年 8 月までに当施設に抗体測定依頼のあった症例のなかから、GQ1b、GT1a、GQ1b あるいは GT1a と

PA(フォスファチジン酸)の混合抗原(GQ1b+PA、GT1a+PA)に対するいずれかのIgG抗体が陽性の症例を抽出した。

2) 抗体測定

単独のガングリオシドに対する抗体測定は、通常の方法で行った。得られた吸光度(OD)値を抗体活性の指標とした。

PA 添加は既法に基づき(Hirakawa et al. J Neuroimmunol 159: 129-132, 2005) ELISA 用マイクロタイタープレート上にGQ1bもしくはGT1aとPA各0.1 μ gの混合抗原を固相化し、上記同様にELISA法にて抗体測定した。

3)比較方法

抗体値は補正 OD 値によって任意にグレードを設定した(補正 OD 値が0.1-0.3を+, 0.3-0.5++, 0.5-0.9+++, 1.0以上++++)。

(1)GQ1b 抗体と GQ1b/PA 抗体の抗体値を比較し、任意に設定したグレードで2以上の違いがある場合に、それぞれGQ1b>GQ1b+PA 群あるいはGQ1b<GQ1b+PA 群とした。

(2)GT1a>GT1a+PA 群と GT1a<GT1a+PA 群、(3)GQ1b>GT1a 群と GQ1b<GT1a 群も同様の基準とした。(1)、(2)、(3)のそれぞれについて、臨床像(球症状、呼吸障害、意識障害、眼球運動障害、自律神経障害の有無、筋力低下の程度)を比較検討した。またGQ1b、GT1a、GQ1b+PA、GT1a+PAに、それぞれ単独陽性の症例の臨床像も検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は近畿大学の倫理委員会において承認を受けた。血中抗体測定については患者本人へ十分に説明を行い、文書で同意を得ている。プライバシーの保護には十分に配慮した。

C. 研究結果

(1)GQ1b>GQ1b+PA 群は 32 例、GQ1b<GQ1b+PA 群は 100 例あった。GQ1b>GQ1b+PA 群では球症状 40.6%、呼吸障害 13.3%、MMT3 以下の筋力低下を 8.7%、意識障害を 6.7%、自律神経障害を 6.7%、眼球運動障害を 75%で認めた。GQ1b<GQ1b+PA 群では、球症状 16%、呼吸障害 8.0%、MMT3 以下の筋力低下を 13.8%、意識障害を 6.8%、自律神経障害を 8.3%、眼球運動障害を 82%で認めた。GQ1b>GQ1b+PA 群では GQ1b<GQ1b+PA 群と比較して球症状が有意に多くみられた。(2)GT1a>GT1a+PA 群は 19 例、GT1a<GT1a+PA 群は 81 例あった。GT1a>GT1a+PA 群では球症状 21.1%、呼吸障害 15.8%、MMT3 以下の筋力低下を 14.3%、意識障害を 13.3%、自律神経障害を 5.6%、眼球運動障害を 89.5%で認めた。一方 GT1a<GT1a+PA 群では球症状 14.8%、呼吸障害 10.7%、MMT3 以下の筋力低下を 15.4%、意識障害を 9.0%、自律神経障害 10.5%、眼球運動障害を 85.2%で認めた。両者の間には有意な症状の差は認めなかった。(3)GQ1b>GT1a 群は 104 例、GQ1b<GT1a

群は 27 例あった。GQ1b>GT1a 群では球症状 17.3%、呼吸障害 7.8%、MMT3 以下の筋力低下を 12.9%、意識障害を 5.7%、自律神経障害を 13.4%、眼球運動障害を 86.6%で認めた。一方 GQ1b<GT1a では球症状 15.4%、呼吸障害 18.5%、MMT3 以下の筋力低下を 40.9%、意識障害を 8.3%、自律神経障害を 11.5%、眼球運動障害を 69.2%で認めた。GQ1b<GT1a 群では GQ1b>GT1a 群と比較して MMT3 以下の筋力低下を認める例が有意に多かった。

(4)GQ1b 抗体のみが陽性の症例(GQ1b-specific)は 9 例、GQ1b/PA 抗体のみ陽性の症例は 39 例、GT1a 抗体のみが陽性の症例(GT1a-specific)3 例、GT1a/PA 抗体のみが陽性の症例は 3 例であった。GQ1b-specific 症例では、球症状 44.4%、呼吸障害 22.2%、自律神経障害 12.5%、眼球運動障害が 77.8%あった。MMT3 以下の筋力低下と意識障害を認める症例はなかった。GQ1b/PA 抗体のみ陽性の症例では球症状 17.9%、呼吸障害 2.9%、MMT3 以下の筋力低下を 8.3%、意識障害を 2.7%、自律神経障害を 7.9%、眼球運動障害を 87.2%で認めた。GT1a-specific 症例では球症状、意識障害、自律神経障害を認める症例はなく、呼吸障害 33.3%、MMT3 以下の筋力低下、眼球運動障害をともに 66.6%で認めた。GT1a/PA 抗体のみが陽性の症例では球症状 66.6%、眼球運動障害が 66.6%あった。呼吸障害、MMT3 以下の筋力低下、意識障害、自律神経障害を認める症例はなかった。

D. 考察

抗 GQ1b 抗体および抗 GT1a 抗体の反応特異性と臨床像に関して検討した。その結果、GQ1b と比較した GT1a に対する相対的な反応の強さや、PA を添加することによる抗 GQ1b あるいは抗 GT1a 抗体活性の変化にもとづく反応特異性と臨床像には基本的には有意な相関がないことがわかった。GQ1b、GT1a に対する抗体が陰性であっても、PA を加えることによって初めて陽性となる症例群が存在するが、それらの群でも特別な臨床像は見出せなかった。しかし PA の添加で抗体活性が減弱する抗 GQ1b 抗体陽性例に球症状が多く、GQ1b よりも GT1a に強い反応のみられる例に MMT3 以下の筋力低下が多いなど、抗体の反応性と一部の臨床像には相関がみられた。

IgG 抗 GT1a 抗体は球症状との関連が報告されているが、今回の検討では、その傾向は確認できなかった。

われわれは本研究事業において、MFS や GBS 血清中の、GQ1b を含むガングリオンド複合体に対する抗体の存在と臨床的特徴との関連を報告した。また BBE と MFS や GBS との抗体の反応性の違いも見出した。さらに、GD1b にきわめて特異的な抗体を有する GBS と失調の関連、GM1/GalNAc-GD1a 複合体に対する抗体と伝導ブロックを伴う純粋運動型 GBS との関連も報告した。糖鎖に対する抗体の解析によって、GBS および関連疾患の病態解析は大きく進歩しているが、まだ十分解明されていない部分もあることから今後さらに詳細な検討が必要と考

えられる。

E. 結論

GQ1b, GT1a に対する抗体は、PA 添加抗原に対する抗体を含めて、その臨床的意義はほぼ同等と考えられる。球症状の出現率や筋力低下の程度など臨床症状の一部では、抗体の反応性との関連を認めた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kanzaki M, Kaida K, Ueda M, Morita D, Hirakawa M, Motoyoshi K, Kamakura K, Kusunoki S. Ganglioside complexes containing GQ1b as targets in Miller Fisher and Guillain-Barré syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 1148-1152
2. Kaida K, Kamakura K, Ogawa G, Ueda M, Motoyoshi K, Arita M, Kusunoki S. GD1b-specific antibody induces ataxia in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 2008; 71: 196-201
3. Kaida K, Sonoo M, Ogawa G, Kamakura K, Ueda M, Arita M, Motoyoshi K, Kusunoki S. GM1/GalNAc-GD1a complex: a target for pure motor Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 2008; 71: 1683-1690.
4. Miyamoto K, Takada K, Furukawa K, Furukawa K, Kusunoki S. Roles of complex gangliosides in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glycobiology* 2008; 18:408-413
5. Furiya Y, Hirano M, Kusunoki S, Ueda M, Nishiwaki T, Ueno S. Complete recovery of an aged patient with Guillain-Barré syndrome associated with multiple IgM anti-ganglioside antibodies. *Muscle Nerve* 2008; 38: 1630-1633.
6. Kusunoki S, Kaida K, Ueda M. Antibodies against gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome: New aspects of research. *Bioch Biophys Acta* 2008; 1780: 441-444

2. 学会発表

1. Kusunoki S. Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in autoimmune neuropathies. Ninth International Congress of Neuroimmunology. October 26-30, 2008, Fort Worth, Texas, USA.
2. Kusunoki S, Ueda M, Kaida K. Serological characteristics of Bickerstaff's brainstem encephalitis: Comparison with Miller Fisher and

Guillain-Barré syndromes,
Inflammatory Neuropathy
Consortium (INC) Meeting, Paris,
France July 4-5, 2008.

3. 楠 進。シンポジウム「末梢神経障害の研究-最近の進歩-」:免疫関連性ニューロパチー。第49回日本神経学会総会(2008年5月15日~17日、横浜)
4. 楠 進。シンポジウム1 免疫関連療法の新しい展開、免疫グロブリン大量療法。第26回日本神経治療学会総会(2008年6月26日~27日、横浜)。神経治療学 25: 256, 2008
5. 神崎真実、海田賢一、佐田昌美、元吉

和夫、鎌倉恵子、楠 進。眼球運動障害を伴う急性炎症性脱髄神経炎における抗ガングリオシド複合体抗体。第49回日本神経学会総会(2008年5月15日~17日、横浜)

6. 上田昌美、三井良之、楠 進、Bickerstaff。型脳幹脳炎における抗ガングリオシド抗体の反応特異性の検討。第49回日本神経学会総会(2008年5月15日~17日、横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし

純粋運動型 Guillain-Barré 症候群と抗 GM1/GalNAc-GD1a 複合体抗体

研究分担者 鎌倉恵子 防衛医科大学校准教授

研究要旨

純粋運動型 Guillain-Barré 症候群(GBS)の標的抗原である GM1、GalNAc-GD1a を混合した複合抗原、GM1/GalNAc-GD1a に対する抗体活性を GBS 血清で検討した。GBS224 例中 10 例に IgG 抗 GM1/GalNAc-GD1a 抗体を認め、10 例とも純粋運動型 GBS であり、5 例に病初期から運動神経幹中間部に伝導ブロックがみられた。Hadden の電気生理分類で 10 例中 4 例が脱髄型、2 例が軸索型であった。この伝導ブロックは速やかに改善し再髄鞘化を示す所見に乏しいことから、一次的な脱髄によるものではなく Ranvier 絞輪部における可逆性伝導障害であると考えられた。GM1 と GalNAc-GD1a は Ranvier 絞輪軸索膜上で複合体を形成し、GM1 と GalNAc-GD1a とは立体構造の異なるエピトープを発現して純粋運動型 GBS の標的抗原となっている可能性がある。

A. 研究目的

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)に対する抗体が Guillain-Barré 症候群(GBS)血清中に存在することを我々は見出した(1)。ガングリオシドは細胞膜上で cluster を形成してコレステロールや機能蛋白分子とともに機能的複合体(lipid raft)を構成すると考えられており、GSC は lipid raft 上で形成されている可能性がある。GM1、GalNAc-GD1a は純粋運動型 GBS の標的抗原であり、運動神経 Ranvier 絞輪軸索膜に密に存在することが知られている。今回、これらが絞輪部で共局在し GSC を形成している可能性を考え、GM1/GalNAc-GD1a 複合体に対する IgG 抗体を GBS 多数例で検索し、その病的意義を検討した。

B. 研究方法

- (1) 対象および抗ガングリオシド抗体測定：1994 年から 2005 年の間に防衛医大に入院した GBS 患者 35 例の急性期血清、および 2005 年 10 月から 2006 年 4 月の間に近畿大学に集められた GBS189 例の急性期血清を用いて、9 種の糖脂質抗原(GM1, GM2, GD1a, GD1b, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b, GalNAc-GD1a)に対する IgG 抗体を ELISA 法で測定した。補正 OD 値が 0.1 以上の場合、陽性とした。
- (2) GSC に対する IgG 抗体の測定：上記 9 種のガングリオシド抗原のうち 2 種を重量比 1:1 で混合して作成した GSC 抗原に対する IgG 抗体活性を ELISA 法で測定した。
- (3) 抗 GM1/GalNAc-GD1a 抗体陽性の代表的症例の検討：代表的症例について神経伝

導検査(NCS)を経時的に解析した。

Thin-layer chromatography (TLC) 免疫染色、および GM1、GalNAc-GD1a 抗原を用いた吸収試験を行ない、抗 GM1/GalNAc-GD1a 抗体の反応特異性を検討した。

(4) IgG 抗 GM1/GalNAc-GD1a 抗体陽性例の臨床的、電気生理的所見を集積し、解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は近畿大学の倫理委員会において承認を受けた。プライバシーの保護には十分に配慮した。

C. 研究結果

(1) GBS224 例中 10 例(防衛医大例 4 例、近畿大 6 例)が IgG 抗 GM1/GalNAc-GD1a 抗体陽性であった。10 例中 3 例は抗 GM1 および抗 GalNAc-GD1a 抗体とも陰性であった。

(2) 代表的症例の検討：血清 IgG 抗 GM1/GalNAc-GD1a 抗体活性は 1:1280 であった。TLC 免疫染色では GM1、GalNAc-GD1a 単独抗原には反応せず、GM1 と GalNAc-GD1a のオーバーラップする箇所には強い反応がみられた。吸収試験では同抗体は GM1/GalNAc-GD1a に特異的に吸収された。経時的 NCS では病初期から運動神経幹中間部に伝導ブロックを認めたが、IVIg 投与後速やかに回復した。急性期以降、遠位潜時の延長、伝導速度低下、時間的分散はみられなかった。

(3) IgG 抗 GM1/GalNAc-GD1a 抗体陽性 GBS の臨床的、電気生理学的解析：先行感染は

10 例中 6 例が呼吸器感染、2 例が消化器感染であった。8 例に感覚障害がなく、3 例で腱反射が保たれていた。7 例は遠位優位の筋力低下を示した。NCS では 5 例に病初期から運動神経幹中間部に伝導ブロックを認めた。Hadden の分類で 10 例中 4 例が脱髓型、2 例が軸索型、Ho の分類で脱髓型が 4 例、軸索型が 3 例であった。

D. 考察

GM1/GalNAc-GD1a 複合体に対する IgG 抗体を GBS 急性期血清に見出した。抗 GM1/GalNAc-GD1a 抗体陽性例は純粋運動型 GBS であり、病初期から運動神経幹中間部に伝導ブロックがみられることが特徴であった。この伝導ブロックは、速やかに改善し再髓鞘化を示す所見に乏しいことから、一次的な脱髓によるものではなく Ranvier 絞輪部における可逆性伝導障害であると考えられた。Ranvier 絞輪軸索膜に豊富に存在するとされる GM1 と GalNAc-GD1a が同部位で複合体を形成し、GM1、GalNAc-GD1a とは立体構造の異なるエピトープを発現している可能性がある。抗 GM1/GalNAc-GD1a 抗体陽性 GBS の伝導ブロックの機序として、Ranvier 絞輪軸索膜上の抗原抗体反応が同部位に集簇している Na チャネルの機能に何らかの作用を及ぼした可能性、およびその近傍の傍絞輪部の構造に変化をもたらした可能性が考えられる。

E. 結論

1. GBS224 例中 10 例(4.5%)に IgG 抗 GM1/

GalNAc-GD1a 抗体が陽性で、全例純粋運動型であった。

2. GM1 と GalNAc-GD1a は Ranvier 絞輪軸索膜上で複合体 GM1/GalNAc-GD1a を形成し、純粋運動型 GBS の標的抗原となっている可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kanzaki M, Kaida K, Ueda M, Morita D, Hirakawa M, Motoyoshi K, Kamakura K, Kusunoki S. Ganglioside complexes containing GQ1b as targets in Miller Fisher and Guillain-Barré syndromes. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 79:1148-1152, 2008.
2. Kaida K, Kamakura K, Ogawa G, Ueda M, Motoyoshi K, Arita M, Kusunoki S. GD1b-specific antibody induces ataxia in Guillain-Barré syndrome. Neurology 71:196-201, 2008.
3. Kaida K, Kusunoki S. Ganglioside complexes as target antigens in Guillain-Barré syndrome and related disorders. (Review) Future

lipidology 3: 425-434, 2008.

4. K. Kaida, M. Sonoo, G. Ogawa, K. Kamakura, M. Ueda-Sada, M. Arita, K. Motoyoshi, S. Kusunoki. GM1/GalNAc-GD1a complex: a target for pure motor Guillain-Barré syndrome. Neurology 71:1683-1690, 2008.

2. 学会発表

1. K Kaida, M Sonoo, G Ogawa, K Kamakura, M Ueda-Sada, M Arita, K Motoyoshi, S Kusunoki. GM1/GalNAc-GD1a complex: a target for pure motor Guillain-Barré syndrome. 9th INTERNATIONAL CONGRESS OF NEUROIMMUNOLOGY, TEXAS, USA, October, 26-30, 2008. J Neuroimmunol 203: 182, 2008.
2. 汐崎 祐、小川 剛、海田賢一、園生雅弘、鎌倉恵子。抗 GM1/GalNAcGD1a 抗体陽性で電気生理検査では伝導ブロックを呈した、Guillain-Barré 症候群の男性 2 例。第 187 回日本神経学会関東地方会、11月29日、2008年。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし

研究要旨

最近、近畿大学の楠らのグループは、コンドロイチン硫酸の合成に関与する糖転移酵素の一つであるコンドロイチン *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素-1 (ChGn-1) に、アミノ酸置換を伴う一塩基多型を2種類見いだしている。そこで本研究では、それらアミノ酸置換を伴う一塩基多型をもつ変異 ChGn-1 を組換え型酵素として発現させ、それらが持つ酵素活性やコンドロイチン硫酸鎖合成能を検討した。その結果、それら変異体はすべて糖転移酵素活性を欠いており、コンドロイチン硫酸鎖合成能も失っていた。コンドロイチン硫酸鎖の合成不全とニューロパチーとの関連が示唆された。

A. 研究目的

コンドロイチン硫酸鎖は、硫酸化グリコサミノグリカン多糖鎖のひとつであり、コアタンパク質に共有結合したコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして、ほとんど全ての細胞表面や細胞外マトリックスに存在している。コンドロイチン硫酸鎖は、グルクロン酸と *N*-アセチルガラクトサミンが交互に繰り返した構造を基本糖鎖骨格にもち、その様々な部位が基質特異性の異なる硫酸基転移酵素群によって硫酸化修飾を受けて構造多様性を獲得する。これまでの研究から、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、中枢神経系のマトリックスに豊富に存在することが知られ、神経回路網の形成に重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では、コンドロイチン硫酸の合成に関与する糖転移酵素の一つであるコンドロイチン *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素-1 (ChGn-1) に最近見いださ

れた、ニューロパチー例で対照と比較して頻度が高い一塩基多型が、コンドロイチン硫酸鎖の合成にどのように影響を与えるのかを検討した。

B. 研究方法

ChGn-1 の膜貫通ドメインに対応すると考えられる N 末端側から 41 アミノ酸を細胞外分泌シグナルである insulin leader と (His)₆-tag のシークエンスと組換えることにより、COS-1 細胞で (His)₆-tag と融合した様々な変異体を含む ChGn-1 分泌型組換えタンパク質を発現させた。培養上清を Ni-NTA-agarose と 4°C で 1 時間混合し、(His)₆-tag との融合タンパク質を結合させ、酵素活性測定およびウエスタンブロッティングに用いた。

さらに、HeLa 細胞で様々な変異体を含む ChGn-1 を過剰発現する細胞を構築した。ネオマイシン耐性遺伝子をもつ

pCMV-Script ベクターに ChGn-1 を組み込み、HeLa 細胞に導入し、Geneticin を含む培地で培養することで遺伝子導入されていない細胞を死滅させ、様々な変異体を含む ChGn-1 を過剰発現する細胞を構築し、これらが示すコンドロイチン硫酸鎖の二糖組成を解析した。

C. 研究結果

ChGn-1 mutant H234R、あるいは ChGn-1 mutant M509R と(His)₆-tag との融合タンパク質の発現をウエスタンブロッティングにより確認後、これらの融合タンパク質を酵素源に、GalNAcT-II 活性(コンドロイチン硫酸の合成活性)を測定したが活性は検出できなかった。また、ChGn-1 を過剰発現した HeLa 細胞が産生したコンドロイチン硫酸鎖の分析を行った結果、野生型の ChGn-1 を安定導入した HeLa 細胞では、ChGn-1 の発現量に相関して、コンドロイチン硫酸鎖の総量が mock の HeLa 細胞と比較し、1.5 倍に増加した。しかし、ChGn-1 mutant H234R、あるいは ChGn-1 mutant M509R を過剰発現する HeLa 細胞が産生したコンドロイチン硫酸鎖量は、それぞれの ChGn-1 mutant の mRNA 発現量に相関せず、mock の HeLa 細胞が産生するコンドロイチン硫酸鎖量よりも約 10% 程度減少していた。

D. 考察

In vitro における組換え型酵素による糖

転移活性測定の結果、ChGn-1 mutant H234R、あるいは ChGn-1 mutant M509R と(His)₆-tag との融合タンパク質は発現しているにもかかわらず、コンドロイチン硫酸鎖の合成に関与する糖転移活性を欠失していた。さらに、ChGn-1 mutant H234R、あるいは ChGn-1 mutant M509R を過剰発現した HeLa 細胞が産生するコンドロイチン硫酸鎖量が、それぞれの ChGn-1 mutant の mRNA 発現量に相関せず、mock の HeLa 細胞の産生するコンドロイチン硫酸鎖量よりも減少していた結果より、細胞内においても ChGn-1 mutant H234R、あるいは ChGn-1 mutant M509R は、糖転移酵素として機能できず、コンドロイチン硫酸鎖の生合成に関与することができないと考えられる。

E. 結論

コンドロイチン硫酸鎖の合成不全とニューロパチーとの関連が疑われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表: なし
2. 学会発表: なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし

研究分担者 清水 潤 東京大学神経内科 講師

研究要旨

レプトスピラ症の血清中の抗ガングリオシド抗体の上昇意義を明らかにする目的で、臨床的な前向き検討とレプトスピラ菌体成分蛋白の動物接種実験を開始した。東京大学と国立感染症研究所の倫理委員会で、新規にレプトスピラ症を発症した患者の血清中の抗ガングリオシド抗体の上昇と臨床像や神経症状と関連を検討する臨床的前向き検討の承認を受けた。本年度、新規に発症したレプトスピラ症患者について、質問票での臨床像の把握と血清中の抗ガングリオシド抗体の測定を開始した。現在までに、ワイル病(重症)3例、秋やみ1例の登録があり解析中である。接種実験では、ウサギ2羽に接種。1羽で接種5週後に一過性の脱力症状を認めた。11週後に解剖して末梢神経、神経節、脊髄、骨格筋を採取し組織検討をおこなったが明らかな変化はなかった。現在、接種蛋白量を増やしての再検討の準備が完了した。

A. 研究目的

レプトスピラ症の血清中には広範に複数の抗ガングリオシド抗体が出現すること、抗ガングリオシド抗体の出現はレプトスピラ症の臨床重症度や神経症状と関連している可能性があることを明らかになった。この関連性を確認するために、本年度は以下の2点を目的とした。

検討1) 症例数を増やした臨床的前向き検討をおこない、レプトスピラ症の臨床像や神経症状とガングリオシド抗体との関連の解析をする。検討2) レプトスピラの菌体成分蛋白の動物接種をおこない実験系動物の作製を試みる。

B. 研究方法

検討1) 国立感染症研究所・細菌第一部に検査依頼があり、同部で顕微鏡下凝集試験

(MAT)によりレプトスピラ症が確定診断された症例について、質問票を送付して臨床像を把握する一方、血清中の抗ガングリオシド抗体を測定。臨床像と血清中の抗ガングリオシド抗体陽性度との関連を検討。

検討2) レプトスピラ菌の破碎菌体蛋白をウサギ2羽にアジュバントともに(1羽あたり10mgを3回にわけて接種)接種。接種後、臨床像の観察と定期的に血清中の抗ガングリオシド抗体を測定。免疫ウサギは11週後に麻酔下で末梢神経、後根神経節、脊髄、骨格筋を採取し組織検討をおこなった。骨格筋は凍結標本、末梢神経、神経節および脊髄はハーフカルノフスキー液とオスミウムで後固定後にエボン包埋ブロックを作成し、切片作成後に観察した。

(倫理面への配慮)

臨床的前向き検討に関しては、東京大学および国立感染症研究所の倫理委員会において

承認を受けた。血中抗体測定および質問票での臨床像の把握については患者本人へ十分に説明を行い、文書で同意を得ている。プライバシーの保護には十分に配慮した。

C. 研究結果

検討1) ワイル病(重症)3例、秋やみ1例の登録があり、臨床情報の解析と血清中の抗ガングリオシド抗体測定を実施中。検討2) 接種をおこなった2羽のうち1羽において5週頃をピークとして、動作の緩慢な状況が観察されたが10週の時点では改善。抗ガングリオシド抗体は、GA1に対するIgG抗体のみ軽度上昇。接種後11週目に、坐骨神経、後脛骨神経、神経根、後根神経節、筋肉、脊髄、硬膜を採取して観察したが、明らかな軸索障害、脱髄所見、炎症細胞浸潤を含む異常病理所見は認めなかった。

D. 考察

検討1) 過去に、レプトスピラ症と抗ガングリオシド抗体の関連を指摘した報告はなく、レプトスピラ症における臨床像および神経症状の発現における抗ガングリオシド抗体の役割を明らかにできる。今季の新規感染例の検体数が増えており現在解析中。検討2) 今回は1羽あたり10mgの菌体摂取をおこない実験系の作製を試みた。一過性の症状の出現が疑われ、GA1に対するIgG抗体の軽度上昇が見られたが組織学的変化はなかった。摂取量が少ない可能性があり今後摂取量をふやして再検討する。

E. 結論

レプトスピラ症の血清中の抗ガングリオシド抗体の上昇と臨床重症度や神経症状と関連解析が抗ガングリオシド抗体の病態への関与の意義を明らかにするために必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし