

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18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 楠 進

平成21年(2009年)4月

目 次

I. 総合研究報告

糖鎖の関連するニューロバチーの分子病態の解析	1
楠 進	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	11
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	13
------------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総合研究報告書

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。原因不明のニューロパチーについて、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) 遺伝子の塩基配列を解析したところ、2例において、1箇所ずつアミノ酸置換を伴う塩基変異が見出され、それらは酵素活性の消失を伴うことが確認された。抗 GD1b 抗体を伴うニューロパチーの動物モデルである「GD1b 感作ウサギ感覚障害性失調性ニューロパチー」において、深部感覚を伝える一次感覚ニューロンの apoptosis が病理学的に示された。Guillain-Barré 症候群 (GBS) 抗 GD1b 抗体のうち、失調をきたす例にみられるものは GD1b 自体への特異性がきわめて高いことが明らかとなった。MFS および眼球運動麻痺を伴う GBS では、GQ1b および GT1a に対する抗体が発症因子として重要であるが、ガングリオシド複合体 (GSCs) を抗原として用いることにより、その反応性は3群に大別されることが明らかになった。また GQ1b に対する特異性のきわめて高い抗体の上昇が Bickerstaff 型脳幹脳炎の発症には必要であること、GQ1b、GT1a に対する抗体はフォスファチジン酸添加抗原に対する抗体を含めて臨床的意義はほぼ同等と考えられることが示された。GM1 と GalNAc-GD1a の複合体に対する抗体が GBS の一部の例でみられ、陽性例は伝導ブロックを高頻度に伴う純粋運動型であることがわかった。レプトスピラ感染後に血清中抗ガングリオシド抗体がしばしばみられることが明らかになり、神経症状との関連が示唆された。糖鎖とニューロパチーの病態に関する上記成果は、診断や予後判定の指標として有用性の高いものであり、また新規治療法開発への手がかりとなると考えられる。

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

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。

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

1) 糖転移酵素遺伝子異常の解析

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。さらに、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。

2) 免疫性ニューロパチーにおける抗糖鎖抗体の解析

抗 GD1b 抗体を伴うニューロパチーの動物モデルである「GD1b 感作ウサギ感覚障害性失調性ニューロパチーにおいて、病理学的には炎症所見に乏しいことから、抗 GD1b 抗体の深部感覚を伝える一次感覚ニューロンへの結合に引き続いて apoptosis をきたすという仮説の検証を行った。

抗 GD1b 抗体陽性の GBS においてかなり失調を伴わないことから、抗 GD1b 抗体の反応特異性が多様である可能性を考え、GD1b に他のガングリオシドを加えた混合抗原（ガングリオシド複合体）に対する抗体活性を検討して、失調例と非失調例における抗体の反応性の違いについて解析した。

抗 GQ1b 抗体が高頻度に見られる疾患である Miller Fisher 症候群(MFS)および眼球運動麻痺を伴う GBS (GBS-OP+)について、抗ガングリオシド複合体 (GSCs) 抗体に関する検討を多数例を対象として行った。

また、同じく抗 GQ1b 抗体関連疾患である Bickerstaff 型脳幹脳炎について、MFS や GBS-OP+ と異なり中枢神経障害をきたす要因として血清学的に何らかの特徴があるかどうかを検討した。

Miller Fisher 症候群(MFS), Guillain-Barré 症候群(GBS), Bickerstaff 型脳幹脳炎(BBE)において高頻度に見られる抗 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係がみられるかを解析した。

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。

レプトスピラ感染に伴うニューロパチーと糖鎖に対する抗体の関連を検討した。

糖鎖遺伝子の異常ならびに抗糖鎖抗体の解析により、ニューロパチーの詳細な病態が明らかになれば、新規の治療法あるいは効率的な治療法開発につながり、医療経済的にも有用と考えられる。

B. 研究方法

1) 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シング法にて塩基配列を決定した。

また変異のみられた遺伝子を COS-1 細胞に発現させ酵素活性を検討、さらに HeLa 細胞に過剰発現させコンドロイチン硫酸鎖を解析した。

2) 6羽のウサギを、既報(Kusunoki et al. Ann Neurol 1996;39:424-431)に従い GD1b で感作し、経時的に抗 GD1b 抗体を測定した。神経症状を発症したウサギから、組織を採取し、病理学的検討および TUNEL 法による apoptosis の有無の検討を行った。

スクリーニング検査にて、抗 GD1b 抗体単独陽性の血清について、GD1b に他のガングリオシドを混合した抗原に対する抗体活性を測定し、GD1b 単独に対する抗体活性と比較した。また失調をきたした例とそうでない例に分けて、他のガングリオシドを混合した影響に差があるかどうか比べた。

64例のMFS、53例のGBS-OP+、53例の眼球運動麻痺を伴わないGBS

(GBS-OP-)を対象とした。上記対象血清に対して10種のガングリオシドに対するIgG抗体を測定した。また7種のガングリオシド(GM1, GM2, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, GQ1b)についてはそのうち2種を1:1の割合で混合したGSCsに関してもIgG抗体活性を測定した。

抗GQ1b IgG抗体が陽性であったBBE25例MFS39例GBS29例を検討の対象とした。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。PAとGQ1bの混合抗原に対する抗体測定を行い、その活性をGQ1b単独抗原に対する抗体活性と比較した。GSCsに対する抗体測定も既法に基づき(Kaida K, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 77: 1043-1046, 2006)行なった。BBE, GBS, MFSの3群間で、抗GQ1b抗体価、他の抗体の陽性率、抗GQ1b抗体と抗GT1a抗体の活性の比較、GQ1b抗原にPA添加した場合の抗体活性の変化、抗GSC抗体の陽性率を比較検討した。

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。

レプトスピラ症における抗ガングリオシド抗体の上昇を検討し、また抗ガングリオシド抗体陽性のGBS血清について、レプトスピラ感染診断用のマイクロカプセル凝集試験(MCAT法)および顕微鏡下凝集試験(MAT法)で検討した。

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)

本研究は近畿大学、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。個人の情報は決して表に出ることがないように細心の注意を払い、プライバシーの保護には十分に配慮した。動物実験については、動物愛護の観点より、近畿大学の動物実験指針の範囲内で行われた。

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いた。COS-1細胞で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) GD1b で感作した6羽のウサギでは、抗 GD1b 抗体の上昇がみられ、そのうち3羽に感覚障害性失調性ニューロパチーの発症をみた。発症したウサギでは、3羽全てに、脊髄後索に既報と同様の病理所見がみられた。また一切片に 0.5-1 個の TUNEL 法にて核の染色される細胞がみられた。アジュバントのみの接種および何も接種しなかったウサギでは、神経症状は出現しなかった。GD1b を接種したが発症しなかったウサギ、アジュバントのみ接種および何も接種しなかったウサギでは、TUNEL 法での陽性所見はみられなかった。GD1b 感作による感覚障害性失調性ニューロパチーは、一次感覚ニューロンの apoptosis によることがわかった。今後抗 GD1b 抗体の後根神経節への結合が apoptosis を引き起こす機序について、以前報告した trkC の発現抑制の関与を含めて検討する必要がある。ヒト

の抗 GD1b 抗体陽性の失調性ニューロパチーにおいても、一次感覚ニューロンの apoptosis の関与が強く示唆された。

IgG 抗 GD1b 抗体単独陽性 GBS15 例では、GD1a, GT1a, GT1b, GQ1b, GalNAc-GD1a と GD1b との混合抗原 (GSCs) に対して、GD1b 単独に対するものと比べて 50%以上の低下を示した。失調例9例と、非失調例6例を比較すると、GD1a, GT1b, GQ1b, GalNAc-GD1a との複合体に対する抗体活性の減少の程度が、失調群において有意により大きかった。GD1b 単独に反応する抗体の活性が、GD1b にある種のガングリオシドを加えた混合抗原に対しては著明に減弱することがわかった。GD1b はある種のガングリオシドとの混合により GSCs を形成し、その三次元構造を変化させると考えられる。失調群の抗 GD1b 抗体はこのような GSCs に対する活性の減弱が非失調群のものに比べてより著明であることから、糖鎖の三次元構造の変化に影響を受けやすく GD1b 自体への特異性がきわめて高いものと考えられた。

MFS および GBS-OP+とも 47%の症例が GSCs に特異性をもつ抗体を有していた。MFS および GBS-OP+は、抗体活性にもとづき、(1)GQ1b あるいは GT1a 単独に特異性をもつ抗体陽性、(2)GQ1b/GM1, GQ1b/GD1b, GT1a/GM1, GT1a/GD1b などの複合体 (糖鎖末端のシアル酸が2個となる組み合わせ) に対する抗体陽性、(3)GQ1b/GD1a, GQ1b/GT1b, GT1a/GD1a, GT1a/GT1b などの複合体 (糖鎖末端のシアル酸が3個となる組み合わせ) に対する抗体陽性、の3群に分類することができた。また GQ1b 単独には反応しないが GSCs に

反応する抗体を有する症例が存在した。MFS の(2)群の症例では、感覚障害の頻度が低く、球麻痺をきたす率が低かった。GBS の(3)群では失調の率が低かった。GBS-OP+の(1)群では深部感覚障害の頻度が高かった。MFS および GBS-OP+は、抗体の反応性にもとづき 3 群に分類できることが明らかとなった。また抗体の反応特異性が臨床症状とも関連することが示唆された。GQ1b や GT1a、およびそれらを含む GSCs の神経系内分布に違いがある可能性があり、今後の検討が必要である。MFS や GBS-OP+の血清診断にあたっては、抗 GSCs 抗体を測定することで陽性率が上昇し、診断的意義が向上すると考えられる。また新規治療法の開発などにおいても念頭におく必要があると考えられる。

抗 GQ1b IgG 抗体活性に 3 群間で差はなかった。GBS に比し BBE と MFS では抗 GQ1b 活性が抗 GT1a 活性より高いものが多かった。GBS では GQ1b,GT1a 抗体以外の抗体陽性率は BBE と MFS に比し高かった。BBE では PA 添加での抗体活性の増強がみられる症例の比率が、GBS や MFS と比較して低かった。抗 GSCs 抗体陽性率は、BBE では GBS や MFS に比べて有意に低かった。抗 GSC 抗体の検討により、BBE では GSCs に対する特異性をもつ抗体のみられる頻度は有意に低かった。このことから BBE における抗 GQ1b 抗体は、他のガングリオシドの共存下に立体構造の変化した抗原には反応が弱く、GQ1b そのものの糖鎖構造に強く反応することがわかる。すなわち、GQ1b の糖鎖に対する特異性がより強い抗体であると考えられた。MFS や GBS でも、同様の抗体は認められることが

ら、こうした反応性をもつ抗体上昇が中枢神経障害をきたす十分条件ではない。また中枢神経障害をきたす要因については、抗体の反応性以外にも様々なメカニズムが考えられる。しかし、抗体の反応性の観点から、中枢神経障害をきたす必要条件が明らかになったことは、BBE の病態解明にとって意義のあることである。

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。

GBS20 例中の 5 例が、レプトスピラ感染診断用マイクロカプセル凝集試験(MCAT)法にて陽性であったが、顕微鏡下凝集試験(MAT)法では陰性であった。レプトスピラ症 11 例中 6 例で抗ガングリオシド抗体が陽性であった。とくに重症型のワイル病で

4/5 例が陽性であった。抗ガングリオシド抗体陽性の GBS 血清で MCAT 法で陽性例が多かったことと、レプトスピラ感染で抗ガングリオシド抗体が高率に検出されたことから、レプトスピラ菌体内に抗ガングリオシド抗体と交差反応しやすい抗原が存在することが示唆された。

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

- 1) 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。
- 2) 抗 GD1b 抗体による感覚障害性失調性ニューロパチーの病態は、一次感覚ニューロンの apoptosis である。
- 3) GD1b はある種のガングリオシドとの混合で、その三次元構造を変化させた複合体を形成する。GD1b 自体に対する特異性が高い抗 GD1b 抗体は ataxia の発症に関連する。
- 4) MFS および GBS-OP+ では、GQ1b および GT1a に対する抗体が発症因子として重要であるが、GSCs を抗原として用いることにより、その反応性は 3 群に大別される。
- 5) GQ1b に対する特異性のきわめて高い抗体の上昇が、BBE の発症には必要である。
- 6) 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。

- 7) 抗 GM1/GalNAc-GD1a 複合体抗体は、純粹運動型 GBS と関連する。
- 8) レプトスピラ感染に伴うニューロパチーの病態に抗ガングリオシド抗体が関与する可能性が考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kaida K, Kanzaki M, Morita D, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77: 1043-1046, 2006.
2. Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies associated with severe disability in GBS. *J Neuroimmunol* 182:212-8, 2007.
3. Kusunoki S, van Doorn P. Predictors of respiratory failure in Guillain-Barré syndrome. *Nat Clin Pract Neurol* 3: 430-431, 2007.
4. Takada K, Shimizu J, Kusunoki S. Apoptosis of primary sensory neurons in GD1b-induced sensory ataxic neuropathy. *Exp Neurol* 209: 279-283, 2008
5. 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
6. 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
 7. 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.
 8. 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
 9. 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.
 10. 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. 楠 進。GBSにおける自律神経障害。第47回日本神経学会総会（2006年5月11日～13日、東京）
 2. Kusunoki S, Kaida K. Anti-GD1a/GD1b complex antibody is associated with severe Guillain-Barré syndrome. 131st Annual Meeting of the American Neurological Association, Chicago, USA, October 8-11, 2006. *Ann Neurol* 60 (suppl): S20, 2006.
 3. Kusunoki S. Going solo or in need of a friend: Ganglioside and lipid clusters form novel antigenic determinations in GBS. Eighth International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Japan, October 15-19, 2006. *J Neuroimmunol* 178(Suppl 1): 30, 2006.
 4. Kusunoki S. Antibodies against ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome: New aspects of research. *Glycobiology and Sphingobiology 2007 - Hakomori Commemorative Forum*, Tokushima, Japan, February 27-March 1, 2007.
 5. Kusunoki S, Kaida K. IgG antibody highly specific to GD1b is specifically associated with ataxia in Guillain-Barré syndrome. 2007 Meeting of the Peripheral Nerve Society, Snowbird, Utah, USA, July 14-18, 2007. *J Periph Nerv Syst* 12(Suppl): 47, 2007.
 6. Kaida K, Kanzaki M, Sada M, Hirakawa M, Motoyoshi K, Kamakura K, Kusunoki S.

- Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome with ophthalmoplegia. 2007 Meeting of the Peripheral Nerve Society, Snowbird, Utah, USA, July 14-18, 2007. *J Periph Nerv Syst* 12(Suppl): 42, 2007.
7. 長谷川路子、橋本明子、杉本泉、清水潤、辻 省次、太田康男、小泉信夫
レプトスピラ症に下肢筋力低下と振動覚低下を伴い、抗ガングリオシド抗体陽性を認めた1症例 第19回日本神経免疫学会学術集会 2007、金沢(神経免疫学 15:128,2007)
 8. Kusunoki S, Kaida K. IgG antibodies highly specific to GD1b in Guillain-Barré syndrome with ataxia. 132nd Annual Meeting of American Neurological Association, Washington DC, USA, October 7-10, 2007. *Ann Neurol* 62(Suppl): S7, 2007.
 9. Kaida K, Kanzaki M, Sada M, Motoyoshi K, Kamakura K, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome with ophthalmoplegia. 132nd Annual Meeting of American Neurological Association, Washington DC, USA, October 7-10, 2007. *Ann Neurol* 62(Suppl): S62, 2007.
 10. 楠 進. Fisher症候群および関連疾患の病態、診断と治療。第45回日本神経眼科学会総会 (2007年12月1日、大阪)
 11. 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)
 12. 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
 13. 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。(PU-305)第49回日本神経学会総会 (2008年5月15日~17日、横浜)
 14. 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。(3-6-1)第49回日本神経学会総会 (2008年5月15日~17日、横浜)
 15. 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.
 16. Kusunoki S. Antibodies to gangliosides and ganglioside complexes in autoimmune neuropathies. Ninth International Congress of Neuroimmunology.

October 26-30, 2008, Fort Worth,
Texas, USA.

17. 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.
18. 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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Kaida K, Kamakura K, <u>Kusunoki S.</u>	Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome	Tabira T, Yamamura T, Kira J.	Current Topics in Neuroimmunology	Medimond	Bologna, Italy.	2006	223-228
<u>Kusunoki S.</u>	Antiglycolipid antibodies in autoimmune neuropathies; new aspects of research.	Broglia PV	Neuroimmunology Research Focus	Nova Science Publishers, Inc.	New York, USA	2007	85-99

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kuzumoto Y, Shioyama M, Kihara M, <u>Kusunoki S.</u>	Abnormal sudomotor axon reflex and antiganglioside antibodies.	Muscle Nerve	33	828-829	2006
Kaida K, Kanzaki M, Morita D, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, <u>Kusunoki S.</u>	Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	77	1043-1046	2006
Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, <u>Kusunoki S.</u>	Anti-ganglioside complex antibodies associated with severe disability in GBS.	J Neuroimmunol	182	212-218	2007
Hamaguchi T, Sakajiri K, Sakai K, Okino S, Sada M, <u>Kusunoki S.</u>	Guillain-Barré syndrome with antibodies to GD1a/GD1b complex. Psychiatry	J Neurol Neurosurg Psychiatry	78	548-549	2007
Fujita A, Cheng J, Hirakawa M, Furukawa K, <u>Kusunoki S.</u> , Fujimoto T.	Gangliosides GM1 and GM3 in the living cell membrane form clusters susceptible to cholesterol depletion and chilling.	Mol Biol Cell	18	2112-2122	2007
<u>Kusunoki S.</u> , van Doorn P.	Predictors of respiratory failure in Guillain-Barré syndrome.	Nat Clin Pract Neurol	3	430-431	2007
Takada K, Shimizu J, <u>Kusunoki S.</u>	Apoptosis of primary sensory neurons in GD1b-induced sensory ataxic neuropathy.	Exp Neurol	209	279-283	2008
Miyamoto K, Takada K, Furukawa K, Furukawa K, <u>Kusunoki S.</u>	Roles of complex gangliosides in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis.	Glycobiology	18	408-413	2008
Kanzaki M, Kaida K, Ueda M, Morita D, Hirakawa M, Motoyoshi K, Kamakura K, <u>Kusunoki S.</u>	Ganglioside complexes containing GQ1b as targets in Miller Fisher and Guillain-Barré syndromes.	J Neurol Neurosurg Psychiatry	79	1148-1152	2008

Kaida K, Kamakura K, Ogawa G, Ueda M, Motoyoshi K, Arita M, <u>Kusunoki S</u> .	GD1b-specific antibody induces ataxia in Guillain-Barré syndrome.	Neurology	71	196-201	2008
Furiya Y, Hirano M, <u>Kusunoki S</u> , 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	38	1630-1633.	2008
Kaida K, Sonoo M, Ogawa G, Kamakura K, Ueda M, Arita M, Motoyoshi K, <u>Kusunoki S</u> .	GM1/GalNAc-GD1a complex: a target for pure motor Guillain-Barré syndrome.	Neurology	71	1683-1690.	2008
<u>Kusunoki S</u> , Kaida K, Ueda M.	Antibodies against gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome: New aspects of research.	Bioch Biophys Acta	1780	441-444	2008
Kaida K, <u>Kusunoki S</u> .	Ganglioside complexes as target antigens in Guillain-Barré syndrome and related disorders.	Future Lipidol	3	425-434	2008

Anti-ganglioside Complex Antibodies in Miller Fisher Syndrome

K. Kaida¹, K. Kamakura¹ and S. Kusunoki²

¹The 3rd of Internal Medicine, National Defense Medical College, Tokorozawa, Japan

²Department of Neurology,

Kinki University School of Medicine, Osaka-sayama, Osaka, Japan

Corresponding Author: Ken-ichi Kaida

E-mail address: adiak901@ndmc.ac.jp

Abstract

Ganglioside complexes (GSCs) are target antigens for serum antibodies in some patients with Guillain-Barré syndrome. Here, we investigated anti-GSC antibodies in sera of 12 patients with Miller Fisher syndrome (MFS). Seven patients (58%) had IgG antibodies to GSCs containing GQ1b, five with antibodies to the GQ1b-GM1 complex (GQ1b/GM1) and two with antibodies to GQ1b/GD1a. We suggest that patients with anti-GQ1b/GM1-positive MFS have less sensory disturbance, and that MFS-associated antibodies can be classified into at least three types: GQ1b-specific, anti-GQ1b/GM1-reactive, and anti-GQ1b/GD1a-reactive. Not only GQ1b itself but also clustered epitopes of GSCs containing GQ1b may be prime target antigens in MFS.

Introduction

Gangliosides are considered to be target antigens in Guillain-Barré syndrome (GBS), since conventional ELISA screening for single ganglioside antigens has shown that approximately 60% of GBS patients have anti-ganglioside antibodies. We recently showed that some ganglioside complexes (GSCs) are target antigens for serum antibodies in patients with GBS (7), and in an ELISA using the GD1a-GD1b complex (GD1a/GD1b) the optimum ratio of GD1a/GD1b was found to be 50:50 for antibody activity (7). Moreover, we pointed out that antibodies to GD1a/GD1b and GD1b/GT1b are associated with severe disability, and especially with a requirement for artificial

ventilation (9). Since glycolipids, including gangliosides, tend to form clustered complexes in lipid rafts in the plasma membrane (11), anti-GSC antibodies may cause nerve dysfunction through binding to GSCs in lipid rafts.

Miller Fisher syndrome (MFS) is characterized by a clinical triad of ophthalmoplegia, ataxia and areflexia, and by the presence of the serum IgG anti-GQ1b antibody, which is considered to be a variant of GBS (1, 2). Thus, MFS is a clinically and serologically well-defined syndrome with a pathophysiological mechanism similar to that of GBS, which suggests that MFS patients may also have anti-GSC antibodies. Here, we examined MFS sera and found antibodies specific to a mixture of two gangliosides, including GQ1b or GT1a.

Materials and Methods

Antibodies to GSC were investigated in acute phase serum samples collected from 12 consecutive patients who were diagnosed with MFS at the National Defense Medical College Hospital. Diagnosis of MFS was based on acute self-limited ophthalmoplegia, ataxia and areflexia without significant limb weakness, CNS involvement, or other neurological diseases. ELISAs were performed for antibodies to the gangliosides GM1, GM2, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b and GQ1b, as described elsewhere (5, 6), and for anti-GSC antibodies (7). GSCs used in the ELISAs contained two of the seven ganglioside antigens. Anti-GSC antibody-positive samples were subjected to TLC immunostaining (7) and the clinical features of anti-GSC antibody-positive patients with MFS were analyzed.

Anti-GSC antibodies were absorbed in antigen-coated ELISA wells, as described previously (2, 6). The ganglioside antigens used in the absorption test were GSCs, a mixture of two gangliosides (250 ng each), or 500 ng of each ganglioside, with uncoated wells used as controls. Anti-GSC antibody-positive serum diluted 1:40 with 1% BSA in PBS was used in each ELISA and the residual activity of the supernatant against a particular GSC was determined. The percentage absorption of anti-GSC antibody activity was calculated as described elsewhere (6). Antibody specificities to GSCs containing GQ1b and 0 to 600 ng of a second ganglioside (GM1 or GD1a) were examined.

Results

Seven of 12 patients with MFS (58%) had antibodies to GSCs containing GQ1b or GT1a (Table 1), but not to GSCs without GQ1b or GT1a. Ten of the 12 patients (83%) had IgG anti-GQ1b antibodies. In contrast to anti-GSC antibodies in GBS, no antibodies to GSCs consisting of two of the four major gangliosides (GM1, GD1a, GD1b and GT1b) were found in patients with MFS.

An ELISA using a representative serum sample (patient 10) showed IgG antibody activities for GQ1b/GM1, GT1a/GM1, GQ1b/GD1b and GT1a/GD1b, but little activity against GQ1b and GT1a (Fig. 1A). TLC studies showed specific immunoreactivity against the overlapping portion of two gangliosides,

Table 1 Antiganglioside antibodies and clinical features in 12 patients with MFS

Patient number	Age/sex	Sensory signs	Corrected OD								
			Anti-GQ1b	Anti-GT1a	Anti-GQ1b/GM1	Anti-GQ1b/GD1b	Anti-GT1a/GM1	Anti-GT1a/GD1b	Anti-GQ1b/GD1a	Anti-GT1a/GD1a	Anti-GQ1b/GT1b
1	32/M	(+)	1+	3+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	65/F	(+)	1+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	38/M	(+)	3+	2+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	68/F	(+)	3+	3+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	27/M	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	56/F	(+)	2+	(-)	3+	(-)	1+	1+	(-)	(-)	(-)
7	12/F	(-)	(-)	(-)	1+	(-)	2+	(-)	(-)	(-)	(-)
8	64/M	(-)	2+	(-)	3+	(-)	3+	2+	(-)	(-)	(-)
9	69/M	(-)	3+	(-)	4+	(-)	4+	2+	(-)	(-)	(-)
10	38/F	(-)	1+	(-)	3+	3+	3+	3+	(-)	(-)	(-)
11	35/M	(+)	1+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	2+	1+	2+
12	52/F	(+)	4+	5+	(-)	(-)	(-)	(-)	5+	(-)	5+

OD, optical density, (-) = antibody negative, (1+) = 0.1 - 0.3, (2+) = 0.3 - 0.6, (3+) = 0.6 - 1.0

(4+) = 1.0 - 1.3, (5+) \geq 1.3

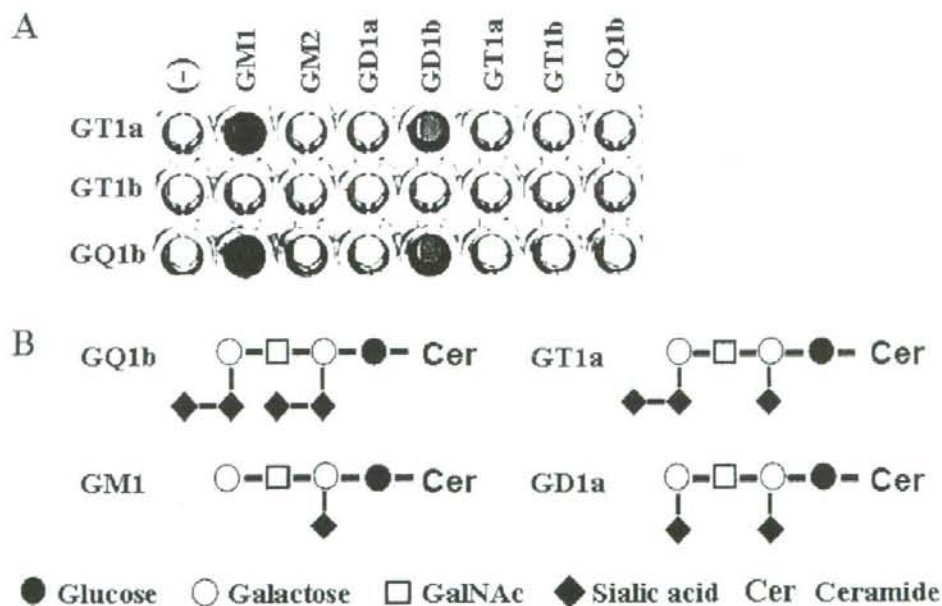


Figure 1 (A) An ELISA using serum from patient 10 showed strong reactions in wells containing GQ1b/GM1, GT1a/GM1, GQ1b/GD1b, and GT1a/GD1b. (B) Carbohydrate structures of GQ1b, GT1a, GM1, and GD1a.

including GT1a/GM1 and GQ1b/GM1 (data not shown). An immunoabsorption study using serum from patient 10 gave percentage absorptions of anti-GQ1b/GM1 antibody activity of 1.8%, 43%, 8.8%, 96% and 83% by the GM1, GQ1b, GT1a, GQ1b/GM1 and GT1a/GM1 antigens, respectively. A similar study gave absorption rates of anti-GT1a/GM1 antibody activity of 7.6%, 47%, 8.5%, 94%, and 70% by the same respective antigens, indicating that the serum antibodies were specifically reactive with GQ1b/GM1 and GT1a/GM1.

The ELISA data indicated that MFS-associated antibodies can be classified into three groups based on their fine specificity of reactivity; anti-GQ1b-, anti-GQ1b/GM1-, and anti-GQ1b/GD1a-reactive (Table 1). Studies of reactivity to GQ1b/GM1 or GQ1b/GD1a showed that the anti-GQ1b activity of anti-GSC (-) sera decreased with increasing concentrations of GM1 and GD1a. In anti-GQ1b/GM1 antibody-positive sera the antibody activity increased with increasing concentrations of GM1 and decreased with increasing concentrations of GD1a. In contrast, in anti-GQ1b/GD1a-positive sera the antibody activity increased with increasing concentrations of GD1a and decreased with increasing concentrations of GM1.

Sensory signs were infrequent in anti-GQ1b/GM1-positive MFS patients, but otherwise there were no remarkable differences in clinical features between anti-GSC antibody-positive and -negative MFS patients. All the patients had antecedent respiratory infections: *Haemophilus influenzae* was identified from a throat swab of patient 4 and influenza B virus was serologically proven to be a pathogen in the antecedent infection of patient 7.

Discussion

The study showed that 58% of patients with MFS had antibodies to GSCs containing GQ1b or GT1a. The fine specificity of anti-ganglioside antibodies in MFS was more diverse than expected and this suggests that anti-GSCs antibodies as well as anti-GQ1b antibodies may be critical for development of MFS. Furthermore, antecedent respiratory infection in patients with MFS may be associated with production of antibodies to GSCs containing GQ1b or GT1a.

ELISA results showed that a combination of [Gal β 1-3GalNAc] and [NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc] in the terminal residues of gangliotetraose structures may be an antigenic epitope for anti-GQ1b/GM1 antibodies. In anti-GQ1b/GD1a-positive sera, a combination of [NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc] and [NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc] in the terminal residues may be a target antigen for serum antibodies. In contrast, in anti-GSC-negative sera, the anti-GQ1b activity was attenuated by addition of another ganglioside antigen, suggesting that the serum antibodies had monospecific reactivity with GQ1b. Thus, there are at least three different specificities of MFS-associated antibodies. Such differences in antibody specificity appear to influence the clinical features in MFS, because anti-GQ1b/GM1-positive patients infrequently presented with sensory signs compared with other patients. We plan to investigate the clinical relevance of the anti-GSC antibodies in a larger number of

MFS patients to draw firmer conclusions.

There is considerable evidence of a pathophysiological role for the IgG anti-GQ1b antibody in the development of MFS. Experimental studies using monoclonal anti-GQ1b antibody have shown a specific localization of GQ1b in the human peripheral nerves and also a neuroparalytic action of anti-GQ1b antibody, including conduction block at motor nerve terminals (2, 3, 4, 10, 12). It will be interesting to determine whether similar results occur in studies using anti-GQ1b/GM1 or anti-GQ1b/GD1a antibodies.

Since gangliosides tend to form clusters in the plasma membrane, anti-GSC antibodies may have stronger affinity to target epitopes and cause nerve dysfunction more efficiently than monospecific anti-GQ1b antibodies. Whether anti-GSC and anti-GQ1b antibodies bind to identical sites in neuronal membranes remains unclear, and future investigations on the localization and possible roles of GSCs in the plasma membrane are required to address this issue.

In conclusion, our results show that (1) 58% of patients with MFS had IgG antibodies to GSCs containing GQ1b or GT1a; (2) MFS-associated antibodies can be classified into (i) GQ1b-specific, (ii) anti-GQ1b/GM1-reactive, and (iii) anti-GQ1b/GD1a-reactive; and (3) sensory loss was infrequent in anti-GQ1b/GM1-positive patients.

Acknowledgments

We thank Ms. Miwako Suemura for her assistance with the ELISAs and TLC immunostaining and Ms. Masami Sada for data collection. This research was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research (14570581 and 16590854) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and by a Research Grant for Neuroimmunological Diseases and a Health Sciences Research Grant (Research on Psychiatric and Neurological Diseases and Mental Health) from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

References

1. Chiba A, Kusunoki S, Shimizu T, et al. Serum IgG antibody to ganglioside GQ1b is a possible marker of Miller Fisher syndrome. *Ann Neurol* 1992; 31:677-79.
2. Chiba A, Kusunoki S, Obata H, et al. Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with ophthalmoplegia in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome: clinical and immunohistochemical studies. *Neurology* 1993; 43:1911-7.
3. Goodyear CS, O'Hanlon GM, Plomp JJ, et al. Monoclonal antibodies raised against Guillain-Barre' syndrome-associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides react with neuronal gangliosides and paralyze muscle nerve preparations. *J Clin Invest* 1999; 104:697-708.
4. Halstead SK, O'Hanlon GM, Humphreys PD, et al. Anti-disialoside antibodies kill perisynaptic Schwann cells and damage motor nerve terminals via membrane attack complex in a murine model of neuropathy. *Brain* 2004; 127:2109-23.
5. Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, et al. Guillain-Barre' syndrome with antibody to a ganglioside, N-acetylgalactosaminyl GD1a. *Brain* 2000; 123:116-24.
6. Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, et al. Guillain-Barré syndrome with IgM

- antibody to the ganglioside GalNAc-GD1a. *J Neuroimmunol* 2001; 113:260-7.
7. Kaida K, Morita D, Kanzaki M, et al. Ganglioside complexes: as new target antigens in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 2004; 56:567-71.
 8. Kaida K, Kanzaki M, Morita D, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies in Miller Fisher syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77; 1043-1046, 2006.
 9. Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies associated with severe disability in GBS. *J Neuroimmunology* (in press)
 10. O'Hanlon GM, Plomp JJ, Chakrabarti M, et al. Anti-GQ1b ganglioside antibodies mediate complement-dependent destruction of the motor nerve terminal. *Brain* 2001; 124:893-906.
 11. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387:569-72.
 12. Willison HJ, O'Hanlon GM, Paterson G, et al. A somatically mutated human antiganglioside IgM antibody that induces experimental neuropathy in mice is encoded by the variable region heavy chain gene, V1-18. *J Clin Invest* 1996; 97:1155-64.

Chapter III

Antiglycolipid Antibodies in Autoimmune Neuropathies; New Aspects of Research

*Susumu Kusunoki**

Department of Neurology, Kinki University School of Medicine, Japan

ABSTRACT

In autoimmune neuropathies such as Guillain-Barré syndrome (GBS) and IgM paraproteinemic neuropathy, serum antiglycolipid antibodies are frequently elevated in titer. Those antibodies are useful diagnostic markers and some of them may be directly involved in the pathogenetic mechanisms. In GBS, the carbohydrate structures of the microorganisms of the antecedent infections that mimic those of human glycolipids may induce production of the antiglycolipid antibodies. "Molecular mimicry" mechanism has been shown in the production of antiganglioside antibodies after *Campylobacter jejuni* infection and antigalactocerebroside antibodies after *Mycoplasma pneumoniae* infection. The antibodies may specifically bind to the regions where the respective antigens are located (for example, the antibodies against the ganglioside GQ1b may cause ophthalmoplegia by binding to the paranodal regions of the oculomotor, trochlear, and abducens nerves, where GQ1b is densely localized). We have proved this hypothesis by inducing sensory ataxic neuropathy in rabbits sensitized with the ganglioside GD1b, which is localized in the primary sensory neurons conveying deep sensation. We have recently found that the antibodies that specifically recognize a new conformational epitope formed by two gangliosides are sometimes present in the acute-phase sera of GBS patients. In particular, the antibodies against GD1a-GD1b complex are associated with severe GBS requiring artificial ventilation. Gangliosides are preferentially packaged with cholesterol to form lipid rafts, in which the carbohydrate portions of two different gangliosides may form a new conformational epitope. Within the rafts, gangliosides are considered to interact with important receptors or signal transducers. The antibodies

* Corresponding Author: Susumu Kusunoki; 377-2 Ohno-Higashi, Osaka-Sayama, Osaka 589-8511, Japan; Tel: +81-72-366-0221; Fax: +81-72-368-4846; e-mail: kusunoki-ky@umin.ac.jp