

博士学位論文

IgG anti-GM1 monoclonal antibody の

運動神経・筋接合部における

免疫組織化学的・電気生理学的研究

平成 26 年度

堀田 紗綾子

目次

	頁
序論	
本論	1
第 1 章 mouse IgG anti-GM1 monoclonal antibody の神経伝導に及ぼす 影響および運動神経・筋接合部における結合性の検討	
1. 緒言	7
2. 実験材料及び実験方法	9
3. 結果	21
4. 考察	34
第 2 章 mouse anti-GM1 monoclonal antibody が 電位依存性 Ca ²⁺ channel を介して神経伝導へ及ぼす影響	
1. 緒言	38
2. 実験材料及び実験方法	40
3. 結果	43
4. 考察	49
総括	51
謝辞	53
参考文献	54
学位論文で雑誌に投稿した論文	61

序 論

Guillain-Barré Syndrome (GBS) は、四肢麻痺や腱反射消失などの急性運動麻痺を特徴とする末梢神経障害であり、呼吸器感染や下痢症状に続いて生じることが多い炎症性多発神経炎である¹⁻³⁾。GBS は 1916 年に 3 人の神経内科医により、「Sur un syndrome de radiculonévrite avec hyperalbuminose du liquid céphalorachidien sans réaction cellulaire : remarques sur les caractères cliniques et graphiques de réflexes tendineux (細胞反応がなく脳脊髄液の蛋白増加を伴った根神経炎の症候群について—腱反射の臨床的並びに描写上の特性に関する考察—)」と題した根神経炎の 2 例として初めて報告され、脳脊髄液中のタンパク濃度の上昇が細胞増多を伴っていないという特徴(タンパク細胞解離)も報告された⁴⁾。発症率は年間で人口 10 万人あたり 1.2~1.9 人とされ、男女比は 3 : 2 でやや男性の方が多いとされている^{4,5)}。

GBS は急性に四肢筋力低下をきたす神経・筋疾患の中で最も頻度の高い疾患であり、単相性の経過を示すため予後は比較的良好だが、6~15% は後遺症を残すといわれている⁵⁻⁷⁾。

かつて GBS は、末梢神経の髄鞘が一次的に傷害される脱髄性疾患と考えられていたことから、急性炎症性脱髄性多発神経炎 (acute inflammatory demyelinating polyneuropathy : AIDP) と捉えられていたが、現在では軸索が一次的に傷害される軸索型 GBS の存在も確認されている⁸⁾。現在では、GBS は電気生理学的、病理学的、免疫学的にいくつかのサブタイプに分類されている⁹⁾。髄鞘が傷害される GBS は AIDP であるが、軸索が傷害されるタイプとしては運動神経の軸索のみが傷害される急性運動軸索神経炎 (acute motor axonal neuropathy : AMAN) と、運動神経に加え感覚神経の軸索も傷害される急性運動感覚軸索神経炎 (acute motor-sensory axonal neuropathy : AMSAN) の存在が知られている¹⁰⁻¹⁵⁾。米国および欧州においては、末梢神経への顕著なリンパ球浸潤・ミエリン鞘やシュワン細胞へのマクロファージの浸潤を伴う AIDP が多く軸索型は 5% 程度だが、中国や日本といった東アジア

においては GBS 患者の 30~47% が AMAN であるとする報告がなされている (8,16-18)。GBS 患者の約 50~60% において、急性期血清中にヒト末梢神経に存在する様々な ganglioside に対する抗体が検出されており、これが末梢神経障害の一因とも考えられている (19-22)。

特に高い頻度で検出される anti-ganglioside antibody として GM1, GM1b, GD1a, *N*-acetylgalactosaminyl-GD1a (GalNAc-GD1a) に対する抗体があり、それぞれ陽性率は GM1 (40~65%), GM1b (60~65%), GD1a (30~45%), GalNAc-GD1a (33%) となっている (18,23)。そのため、これらの anti-ganglioside antibody は、軸索型 GBS でみられる自己抗体の標的分子になることが推測されている (18,24,25)。Ganglioside はシアル酸を有する酸性スフィンゴ糖脂質であり、脂肪酸を有し疎水性を示すセラミドと、親水性を示すオリゴ糖から成る。Ganglioside は糖鎖構造の多様性により数多くの分子種があり、現在約 40 種が発見されている (26)。また、それらの ganglioside は主に中枢神経および末梢神経細胞膜表面に豊富に存在しており、主に生理活性を有するのは細胞膜表面に露出した形で存在するオリゴ糖の部分で、細胞間認識、細胞間接着および細胞分化などの調節に関与していると考えられている (26)。

成人においては、GBS 患者の約 70% が発症前 4 週間以内に何らかの感染症症状を有している。複数の感染症を併発するケースもあり、全患者のうち約 50% は上気道感染、約 25% は消化器感染が先行していたとする報告がある (27)。GBS との関連性が確認されている病原体として *Campylobacter jejuni* (*C.jejuni*, 32%), Cytomegalovirus (13%), Epstein-Barr Virus (10%), *Mycoplasma pneumonia* (5%) などがある (28)。特に AMAN では *C.jejuni* 感染の 1~2 週間後に発症することが多いことから (29), *C.jejuni* のリポオリゴ糖 (Lipooligosaccharide : LOS) と GM1 との関係について調査が進んだ結果、*C.jejuni* の LOS と GM1 の末端の糖鎖において共通する構造が存在していることが明らかとなった (29)(図 1.)。

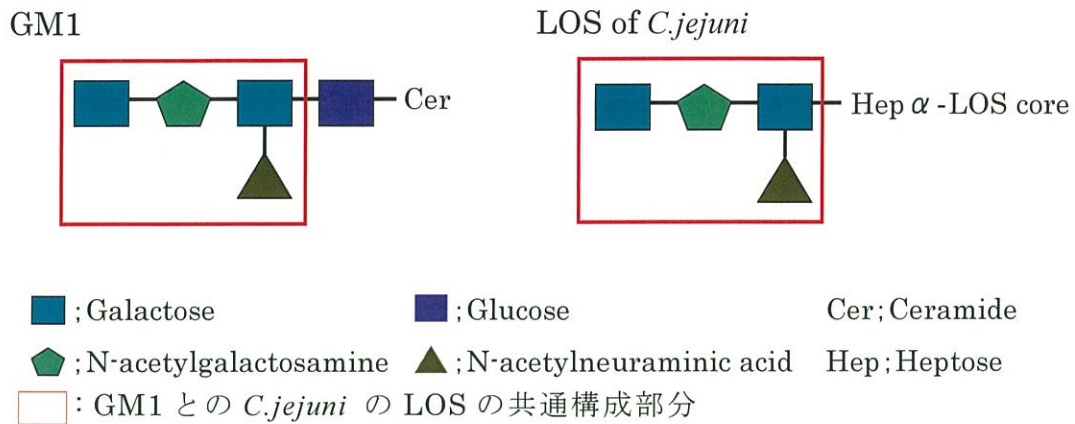


図 1. GM1 との *C.jejuni* の LOS (Lipooligosaccharide) の構成

そのため、GBS 発症の一因として「分子相同性仮説」が提唱されている。分子相同性仮説とは、GM1 エピトープを有する *C.jejuni* に感染することで anti-GM1 antibody が産生され、運動神経軸索上の GM1 に交叉反応することによって神経伝導障害が引き起こされるとするものである^{26,30,31)}(図 2.)。

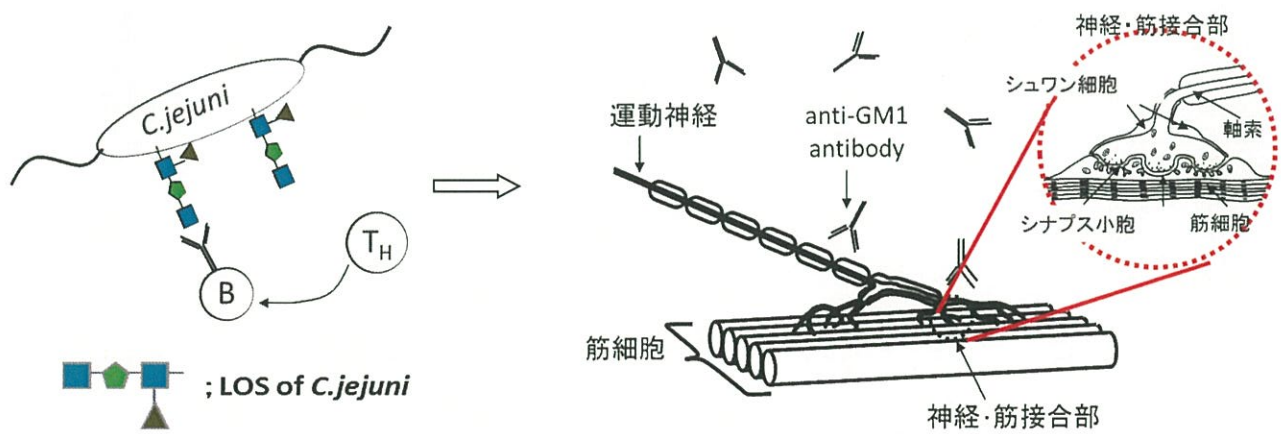


図 2. 分子相同性仮説

GBS の初期には末梢神経障害がみられることが多いが、この末梢神経障害は末梢神経のどこにでも発生しうるのではなく、血液-神経関門の脆弱な神経

根や神経終末部などに限局している³²⁾。特に、運動神経終末での神経伝達物質であるアセチルコリン遊離は、電位依存性 Ca^{2+} channels (Voltage Gated Calcium Channels : VGCCs) を通して Ca^{2+} が流入することにより生じる。

VGCCs が anti-ganglioside antibody の標的となることはすでに報告されている^{33,34)}。また、GBS 患者血清が軸索末端に存在する Ca^{2+} channels を阻害する可能性も報告されている³⁴⁾。GBS 患者の約 50~60% において、急性期血清中にヒト末梢神経に存在する様々な ganglioside に対する抗体が検出されており、これが末梢神経障害の一因とも考えられている³⁴⁾。一方、GBS には GM1, GM1b, GD1a, GD1b, Gal-NAc-GD1a, GQ1 といった多くの ganglioside に対する抗体の関与が報告されているが³⁰⁻³⁷⁾ (表 1), これらが VGCCs の機能へ及ぼす影響については未だ不明な点も多い。

表 1. 急性期の GBS 患者血清中の anti-ganglioside antibody 抗体価

	ELISA					
	GA1	GM1	GM2	GalNAc-GD1a	GD1a	GD1b
患者1	16000	16000	NT	NT	NT	4000
患者2	>64000	4000	4000	32000	2000	0
患者3	0	>32000	0	0	0	0
患者4	400	6000	400	3000	400	0
患者5	1000	0	0	16000	0	0
患者6	1000	500	0	2000	500	1000
患者7	0	0	0	32000	NT	0
患者8	16000	16000	0	4000	16000	16000

その中で、AMAN で顕著な増加のみられる anti-GM1 antibody は、神経伝達物質の放出や Ca^{2+} channels の活性化を阻害する可能性が考えられている^{35,36)} が、神経終末における VGCCs に及ぼす影響については依然として明らかになっていない。

そこで本研究では、マウスより作製した anti-GM1 monoclonal antibody (anti-GM1 mAb) を用い、運動神経・筋接合部における結合性および VGCCs を介した神経伝導に及ぼす影響について、電気生理学的および免疫組織化学的

に検討した。

なお、本論文において anti-GM1 antibody は一般的な抗体の名称として、anit-GM1 mAb は本研究のために作成した抗体を表す。

第 1 章

Mouse IgG anti-GM1 monoclonal antibody の
神経伝導に及ぼす影響および
運動神経・筋接合部における結合性の検討

緒 言

Guillain-Barré Syndrome (GBS) は四肢麻痺や腱反射消失を特徴とする炎症性多発神経炎である。臨床経過は单相性で 4 週以内にピークに達し、急性期を過ぎると病勢はおさまり回復に向かうとされているが、まれに再発の報告もあり、後遺症を残す症例や死に至る症例もある⁵⁻⁷⁾。発症機序としては、細胞性免疫と液性免疫の様々な因子の関与が示唆されている³⁸⁾。

細胞性免疫の関与する機序としては、P2 タンパクなどの髄鞘タンパクに感作された活性化 T 細胞から IFN- γ や IFN- α などのサイトカインが分泌され、これにより末梢神経へ多巣性に浸潤した単核球が刺激されてマクロファージとなり、髄鞘を傷害することで脱髄性病変が生じると考えられている^{8,39,40)}。しかし、その詳細はまだ明らかにされていない。

一方、多くの GBS 患者では発症前 4 週以内に先行感染を伴うことや、血漿交換療法 (プラズマフェレーシス) が有効であることから、その病態形成には自己抗体をはじめとする液性因子が重要な役割を果たす可能性も考えられている¹⁸⁾。特に高い頻度で検出される自己抗体として anti-ganglioside antibody があり、その中でも GM1 に対する抗体陽性率は 40~65% と高くなっている²³⁾。GM1 は末梢神経、特にランビエ絞輪、軸索鞘の外表面、有髄線維、シュワン細胞の表面などの末梢運動神経軸索膜上に発現しており、免疫応答の交差反応の標的となっていると考えられている⁴¹⁻⁴³⁾。

ヒト脊髄神経根における免疫組織化学的研究において、GBS 患者からの anti-GM1 antibody が有髄線維のミエリン鞘や、運動神経軸索に結合するという報告がある³¹⁾。以前我々が実施した研究では、ラット脊髄前根においてランビエ絞輪より侵入した anti-GM1 antibody は、軸索鞘と髄鞘の間の空間にあたる periaxonal space へと拡散し、さらに軸索の膜に相当する軸索鞘表面上にある GM1 糖鎖を認識して、軸索に結合することを明らかにした⁴⁴⁾。一方、ラット脊髄後根においては、anti-GM1 antibody はランビエ絞輪もしくはシュワン細胞表面より侵入するが、paranodal region に留まり、compact

myelin に結合することを示した⁴⁵⁾。このように、anti-GM1 antibody の GM1 に対する反応性は脊髄前根と脊髄後根で異なり、前根神経においてより広範囲で結合性を示すことにより、GBS では運動神経優位の障害が生じると考えられる。

そこで本研究では、ラット胎児から採取した細胞を培養した神経・筋接合部モデルを用い、anti-GM1 mAb が神経伝導に与える影響を電気生理学的に検討するとともに、ラット横隔膜を用い、運動神経末端での anti-GM1 mAb の結合性を免疫組織化学的手法を用いて検討した。

実験材料および実験方法

1. Anti-GM1 mAb の作製

本研究では, mouse に *C.jejuni* の LOS を免疫して得られた anti-GM1 mAb を使用した。

2. Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) 法による anti-GM1 mAb の抗体価の測定

2.1. 実験材料, 使用機器

Multi Well Plate : 96 穴, 住友ベークライト

Ganglioside 標準品 (GM1, GM2, GD1a, GD1b) : Sigma Aldrich (Sigma)

Ganglioside 標準品 (GalNAc-GD1a) : 有賀博士より提供

Casein : 和光純薬

Microplate Autowasher : EL404, BIO-TEK instrument

Tween20 : 関東化学

Peroxidase labeled anti-mouse IgG antibody : Sigma

o-phenylenediamine (OPD) tablet : dihydrochloride salt, Sigma

MICROPLATE READER : MODEL 550, BIO-RAD

以下の試薬はすべて和光純薬の試薬特級品を使用した。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaOH, CH_3COOH , NaCl

2.2. 試薬の調製

2.2.1. 希釈液

Methanol : water = 100 : 1 の割合で調製した。

2.2.2. Ganglioside 標準品溶液

各 ganglioside 標準品を, 希釈液を用いて 10 pmol / 100 μL となるように調製した。

2.2.3. Phosphate buffer (PB)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14.35 g と $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.65 g を精製水 500 mL に溶解し、1 M NaOH または CH_3COOH で pH7.4 に調整した。

2.2.4. Phosphate buffered saline (PBS)

NaCl 8.5 g を精製水 900 mL に溶解し、0.1 M PB 100 mL を加えて、1 M NaOH または CH_3COOH で pH7.4 に調整した。

2.2.5. 一次抗体の希釈

Anti-GM1 mAb を 0.5% casein / PBS を用いて 1,000 倍希釈し、それを順次 2 倍希釈して 64,000 倍まで希釈した。

2.2.6. 基質溶液

OPD tablet 1 錠を、遮光容器内で蒸留水 20 mL に溶解した。

2.3. Anti-GM1 mAb の抗体価の測定

Multi Well Plate に、ganglioside 標準品溶液 (GM1, GM2, GD1a, GD1b, GalNAc-GD1a) を 100 μL / well ずつ注入し、ドラフト内で自然乾燥させた。1,000~64,000 倍まで希釈した Anti-GM1 mAb を 100 μL / well ずつ注入し、4 $^\circ\text{C}$ で一晩反応させた。

Microplate Autowasher を用い、0.05% Tween20 / PBS で 2 回洗浄後、二次抗体として 1,000 倍希釈した peroxidase labeled anti-mouse IgG antibody を、ブランクをのぞいた全ての well に 100 μL ずつ注入し、室温で 2 時間反応させた。反応終了後、再び Microplate Autowasher を用い、0.05% Tween20 / PBS で 2 回洗浄後、暗所にて基質溶液を各 well に 100 μL ずつ注入し、室温で 15 分間反応させ発色させた。

2 N HCl を 50 μL / well ずつ注入して反応を停止し、MICROPLATE READER にて 280 nm における吸光度を測定した。吸光度 0.1 以上となる一

次抗体の最大希釈倍率を，その抗体の抗体価とした。

3. Anti-GM1 mAb の自発性筋活動電位 (spontaneous muscle action potential : AP) に及ぼす影響

3.1. 実験材料，使用機器

NaH₂PO₄·H₂O : MERCK

penicillin : 明治製菓

Streptomycin : 明治製菓

メンブランフィルター : Minisart, pore size 0.2 μm, Sartorius

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) : GIBCO

Medium199 : GIBCO

Fatal Calf Serum (FCS) : Sigma

Fibroblast Growth Factor (FGF) : 0.25 μg / L, Sigma

Insulin : 10 mg / mL, Sigma

collagenase : 和光純薬

セルストレーナー : pore size 100 μm, BD Falcon

Lipofectamine : Invitrogen

芯入りガラス管 : GD-1, NARISHIGE

微小電極作製機 : PN - 30, NARISHIGE

Microelectrode Amplifier : MEZ - 8301, 日本光電

Memory Oscilloscope : VC - 11, 日本光電

pCLAMP6 : Axon Instruments

以下の試薬は，すべて和光純薬の試薬特級品を使用した。

NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂·6H₂O, NaHCO₃, D(+)-Glucose

3.2. 溶液の組成と調製

3.2.1. Tyrode 液

NaCl 8 g, KCl 0.2 g, CaCl₂ 0.2 g, MgCl₂·6H₂O 0.1 g, NaHCO₃ 1.0 g,

D(+)-Glucose 1.0 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, Penicillin 0.1 g, Streptomycin 0.1 g を精製水に溶解して全量を 1,000 mL とし、メンブランフィルターを用いて滅菌処理した。

3.2.2. Ca^{2+} / Mg^{2+} free (CMF) -Tyrode 液

Tyrode 液の組成から CaCl_2 および $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を除き、無菌的に調製した。

3.2.3. 培養液

67% DMEM 67 mL, 23% Medium199 23 mL, 10% FCS 10 mL, 10% FGF 0.12 mL, Insulin 0.12 mL を用いて無菌操作により調製した。

3.2.4. 測定用外液

培養液の組成から 10% FCS, 10% FGF および Insulin を除いて調製した。

3.3. 神経・筋接合部モデルの作製

Wistar 系雌性ラット（妊娠 17 日齢）を diethylether で深麻酔し、0.1% benzalkonium chloride 溶液で消毒した。クリーンベンチ内で無菌的に開腹して胎児を取り出し、Tyrode 液を満たしたシャーレに移した。実体顕微鏡下で胎児の大腿筋および脊髄を採取した。

採取した大腿筋はシャーレ内で細断して、CMF-Tyrode 液で遠心洗浄 (1,000 rpm, 2 分) した。その後、0.1% collagenase / CMF-Tyrode 液 4 mL を加え、37°C の温浴内で 23 分間振とうしながらインキュベートした。再び CMF-Tyrode 液で遠心洗浄し、ピペッティング操作を行った後、セルストレーナーを用いて濾過精製した。また、採取した脊髄は顕微鏡下で輪切りにし、CMF-Tyrode 液中で遠心洗浄 (500 rpm, 1 分 ; 3 回) した。ここで得られた筋細胞と脊髄片を、培養液約 2 mL の入った 35 mm 径の collagen coated シャーレに入れ、 CO_2 インキュベーター (37°C, 95% O_2 , 5% CO_2) で約 1 週間 co-culture した。培養液は 1 日おきに交換した。

3.4. GM2 synthase および GD3 synthase knockdown モデルの作製

GM2 synthase あるいは GD3 synthase を knockdown した神経・筋接合部モデルを作製した。

GM2 あるいは GD3 synthase の sense (それぞれ GM2 sense および GD3 sense) および antisense oligodeoxynucleotides (それぞれ GM2 antisense および GD3 antisense) は, phosphorothioate で化学修飾されたものを Sigma より購入した。各 synthase の sense および antisense oligodeoxynucleotides の塩基配列を表 1 に示す⁴⁴⁾。各 sense および antisense は培養液を用いて 1 mM に調製し, Lipofectamine 20 μ L とともに, 培養液 1 mL の入ったシャーレにそれぞれ 10 μ L ずつ添加した。Sense および antisense の添加は, 筋細胞を AP の測定に使用する 2 および 3 日前に, 2 日間連続して実施した。Ganglioside の生合成経路と ganglioside synthase の反応部位を図 3. に示した。

表 1 GM2 および GD3 の sense, antisense の塩基配列

GM2 sense	gacaggatgtggctgggcccgc
GM2 antisense	gcggcccagccacatcctgtc
GD3 sense	agaggggcatggctgtactg
GD3 antisense	cagtacagccatggcccctct

3.5. 記録用電極の作製

記録用電極は, 芯入りガラス管を用いて, 微小電極作製機により作製した。電極は, 先端内径が 1 μ m 以下のものを使用した。

3.6. AP の測定

AP の電位測定は, 微小電極法で行った。始めに, シャーレ内を 95% O₂ + 5% CO₂ で飽和した測定用外用液で 1 mL / min の速度で 2 分間灌流し, 培養液を除去した。3.5. に準じて作製した記録用電極に 3 M KCl を満たし, 図 4.

に示す測定装置にセットした。神経・筋培養細胞に顕微鏡下で電極の先端を刺入し、APを測定した。なお測定時には、Microwarm Plateを用いて測定用外用液を $34 \pm 1^\circ\text{C}$ に保温した。

3.7. 神経・筋接合部モデルに対する anti-GM1 mAb の添加

神経・筋培養細胞より約4分間安定したAPを確認後、anti-GM1 mAb (1:100または1:200)を100 μL 添加した。抗体の添加にはマイクロピペットを用い、筋細胞に直接触れないように注意しながらシャーレ内に添加した。添加後にAPの減少がみられた場合は、95% O_2 + 5% CO_2 で飽和した測定用外用液を1 mL/minの速度で2分間灌流することにより抗体をwash outした。

3.8. 統計処理

振幅40mV以上の波形をAPとした。発生したAPは、電極内に挿入した白金線を通してMicroelectrode Amplifierで増幅し、Memory Oscilloscopeを介して記録した。また、pCLAMP6によりデータ収集および解析を行った。測定結果は、1分間あたりに発生したAPの頻度として表現した。

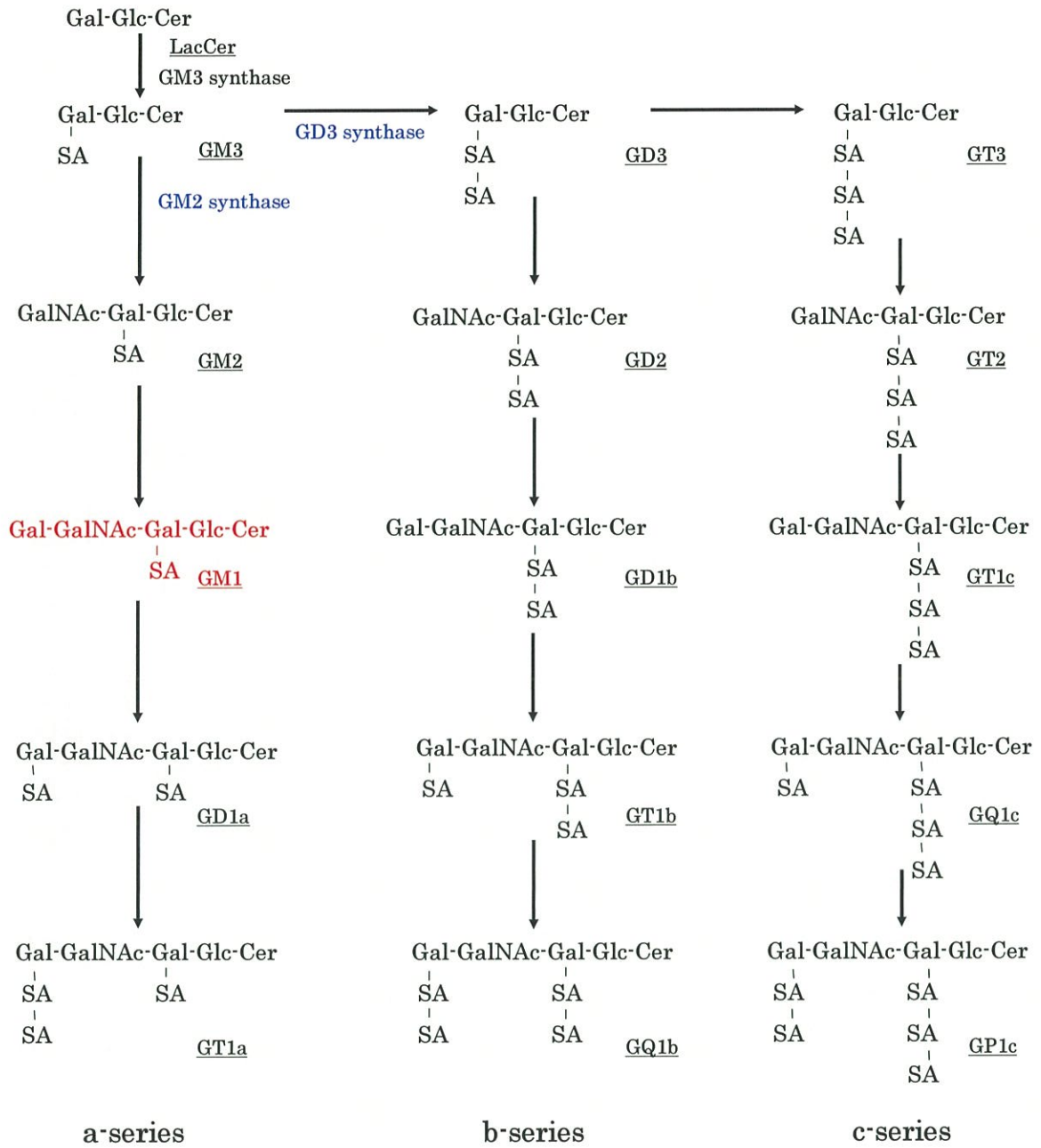


図 3. Ganglioside の生合成経路および ganglioside synthase の反応部位

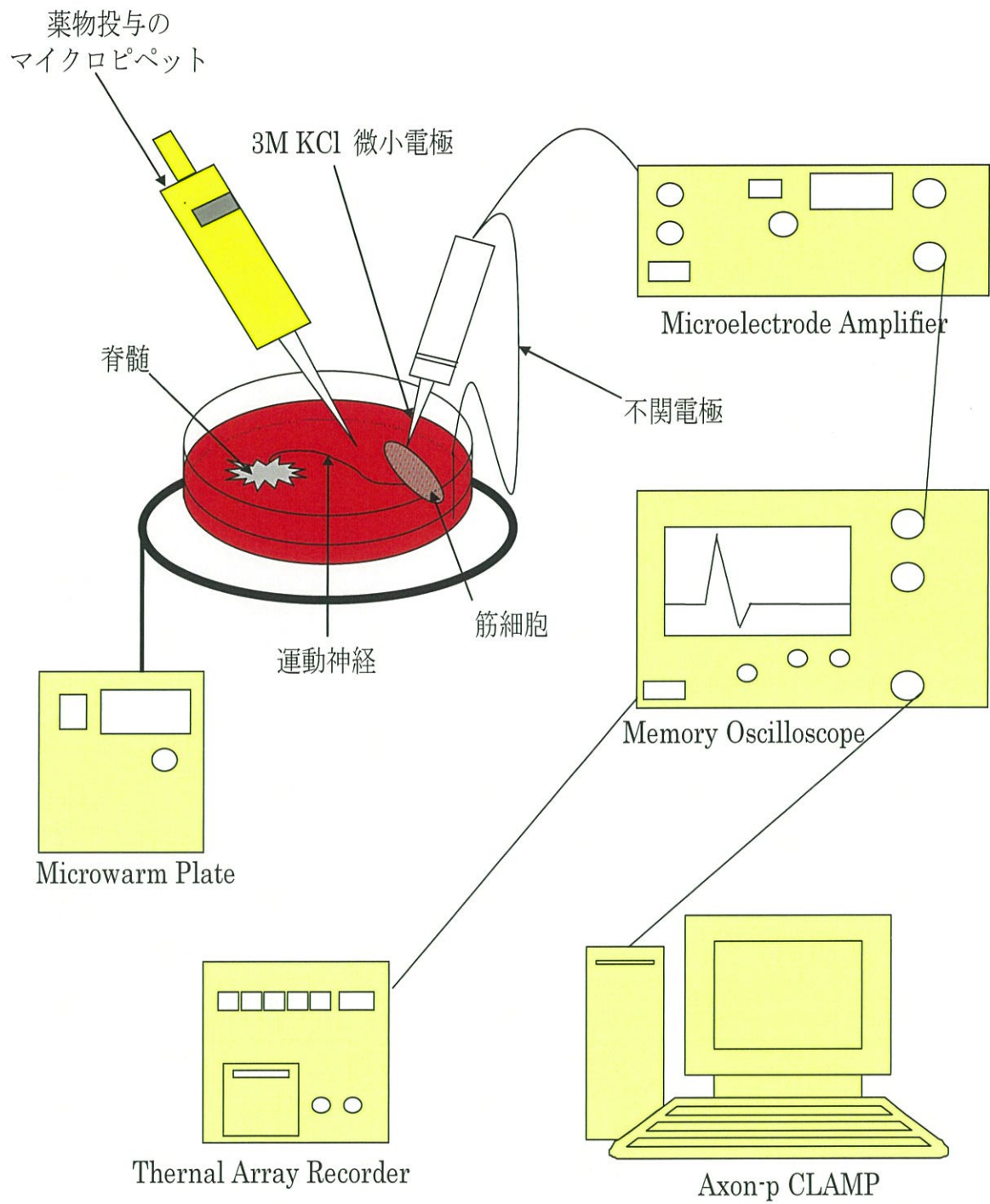


図 4. AP 測定の様式図

4. 神経・筋培養細胞を用いた anti-GM1 mAb の結合部位に関する検討

4.1. 実験材料, 使用機器

Normal Goat Serum (NGS) : Vector Laboratories

Block Ace : 大日本製薬

Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate - anti mouse IgG antibody :
Sigma

Rhodamine - α - Bungarotoxin (α -BuTx) : Molecular Probes

Aqua / Poly Mount : Polysciences

共焦点レーザー蛍光顕微鏡 : FLUOVIEW FV300, Olympus

以下の試薬は, すべて和光純薬の試薬特級品を用いた

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, NaOH, CH_3COOH , Paraformaldehyde (PFA)

4.2. 溶液の組成と調製

4.2.1. 0.1 M phosphate buffer (PB)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14.35 g と $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.65 g を精製水 500 mL に溶解し, 1 M NaOH または CH_3COOH で pH7.4 に調整した。

4.2.2. 0.01 M phosphate buffered saline (PBS)

NaCl 8.5 g を精製水 900 mL に溶解し, 1 M NaOH または CH_3COOH で pH7.4 に調整した後, 0.1 M PB を加えて全量 1,000 mL とした。

4.2.3. 4% PFA

PFA 20 g を秤量し, 0.1 M PB 500 mL を加えて 60 °C で溶解させ, 濾紙を用いて濾過した。また, 4% PFA : 0.01 M PBS = 1 : 1 の割合で調製したものを 2% PFA とした。

4.2.4. Blocking 液

Block Ace : NGS = 9 : 1 の割合で調製した。

4.2.5. 希釈液 (working buffer)

0.01 M PBS : Block Ace : NGS = 8 : 1 : 1 の割合で調製した。

4.3. 免疫蛍光二重染色による anti-GM1 mAb の結合部位に関する検討

3.3. および 3.4. に準じた方法で 1 週間培養した神経・筋接合部モデルを 2% PFA で 20 分間固定処理し, 10% NGS / Block Ace で 30 分間室温にて blocking した。抗体の希釈にはすべて working buffer を用いた。一次抗体として anti-GM1 mAb (1 : 100) を 4°C で一晩反応させ, 0.01 M PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。二次抗体として FITC - anti mouse IgG antibody (1 : 30) を 4°C で 1 時間反応させ, 0.01 M PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。その後 α -BuTx (1 : 300) を 4°C で 1 時間反応させ, 0.01 M PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄後, Aqua / Poly Mount にて封入した。封入剤の乾燥後, immersion oil をカバーガラス上に薄くのせ, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡で FITC は励起波長 488 nm, 蛍光波長 522 nm で緑色, Rhodamine は励起波長 543 nm, 蛍光波長 568 nm で赤色に発色させて観察した。

5. ラット横隔膜神経・筋接合部標本を用いた anti-GM1 mAb の結合部位に関する検討

5.1. 実験材料, 使用機器

包埋剤 : O.C.T. Compound, SAKURA Finetek

包埋皿 : Tissue-Tek 3 号, SAKURA Finetek

Chloroform : 和光純薬

methanol : 和光純薬

Collagenase Type II : 和光純薬

クリオスタット : Cold tome, SAKURA Finetek

Micro slide glass : 松浪硝子工業

anti-Neurofilament 200 kDa antibody (anti-NF) : Chemicon

anti-Syntaxin antibody (anti-Syntaxin) : Sigma

anti-S100 protein antibody (anti-S100) : Sigma

Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate - anti mouse IgG antibody :
Sigma

Cy5 conjugate anti-mouse IgG antibody (Cy5) : Chemicon

Rhodamine · α · Bungarotoxin (α -BuTx) : Molecular Probes

5.2. 溶液の組成と調製

本項目で使用する溶液は、4.2. に準じて調製した。

5.3. 横隔膜の採取および凍結ブロックの作製

Diethylether で深麻酔した Wistar 系雄性ラット (8 週齢) を、横隔膜を傷つけないように開腹開胸し、下大静脈を切断した。その後、左心室より 0.01 M PBS 200 mL および 2% PFA 200 mL を注入し、灌流固定を行った。左右の横隔神経 - 横隔膜を採取し、0.01 M PBS で洗浄後、包埋剤を満たした包埋皿に包埋し、液体窒素中で急速凍結して凍結ブロックを作製した。

5.4. 免疫蛍光三重染色による anti-GM1 mAb 結合部位の検討

凍結ブロックをクリオスタット内で 10 μ m の厚さにスライスして切片を作製し、アルブミンコーティングした Micro slide glass に貼付後、室温で約 3 分間乾燥させた。その後、4°C の cold acetone に 3 分間浸して固定処理を行い、0.01 M PBS で 5 分間、4 回洗浄し、10% NGS / Block Ace で 30 分間室温にて blocking した。抗体の希釈には全て working buffer を用いた。一次抗体として anti-GM1 mAb (1 : 100), anti-NF (1 : 1000), anti-Syntaxin (1 : 1000), あるいは anti-S100 (1 : 100) をそれぞれ 4°C で一晩反応させ、0.01 M PBS で 5 分間ずつ 4 回洗浄した。二次抗体として FITC -anti mouse IgG antibody (1 : 30) および Cy5 (1 : 100) を 4°C で 1 時間反応させ、0.01 M PBS で 5 分間ずつ 4 回洗浄した。次いで α -BuTx (1 : 300) を 4°C で 1 時間反応させ、0.01

M PBS で 5 分間ずつ 4 回洗浄後，Aqua / Poly Mount にて封入した。封入剤の乾燥後，immersion oil をカバーガラス上に薄くのせ，共焦点レーザー蛍光顕微鏡で FITC は励起波長 488 nm，蛍光波長 522 nm で緑色，Cy5 は励起波長 650 nm，蛍光波長 667 nm で青色，Rhodamine は励起波長 543 nm，蛍光波長 568 nm で赤色に発色させて観察した。

5.5. 糖脂質除去標本を用いた検討

凍結ブロックから作製した横隔膜切片を 4°C の cold acetone で固定し，0.01 M PBS で 5 分間 4 回洗浄後，chloroform : methanol = 1 : 1 の混合液に 10 分間浸漬した。0.01 M PBS で 5 分間ずつ 4 回洗浄した後，5.4.の方法に準じて染色操作を行った。

5.6. 神経線維除去標本を用いた検討

Collagenase Type II を 0.01 M PBS で 1% に希釈した。5.3.の方法で採取したラット横隔膜を，1% collagenase に浸し 37°C で 40 分間インキュベートした。その後，2% PFA で 20 分間固定し，0.01 M PBS で洗浄後包埋剤を満たした包埋皿に包埋し，液体窒素中で急速凍結して凍結ブロックを作製した。その後，5.4.の方法に準じて染色操作を行った。

結 果

1. ELISA 法による anti-GM1 mAb の抗体価の測定

Anti-GM1 mAb の ganglioside への抗体価は, GM1 で上昇がみられ, 64,000 倍であった。GM2, GD1a, GD1b に対する抗体価は検出されず, GalNAc-GD1a に対する抗体価も 1,000 倍と低かった (図 5.)。

2. Anti-GM1 mAb の AP へ及ぼす影響

2.1. Anti-GM1 mAb のラット培養神経・筋接合部モデルにおける AP へ及ぼす影響

ラット培養神経・筋接合部モデルに対して anti-GM1 mAb (1 : 200) を添加したところ, control (抗体添加前 4 分間の AP 頻度の平均) と比較して AP の明らかな変化は認められなかった (図 6.A)。しかし, より高濃度である anti-GM1 mAb (1 : 100) を添加したところ, AP は急激な減少を経て完全に抑制されたが, 抗体の wash out により control 値と同程度まで回復した (図 6.A)。control (抗体添加前), anti-GM1 mAb (1 : 100) 添加 100 秒後および抗体の wash out 後 7 分目における AP の波形を図 6.B に示す。

2.2. GM2 あるいは GD3 synthase knockdown モデルにおける anti-GM1 mAb の AP に及ぼす影響

Anti-GM1 mAb が ganglioside GM1 を認識しているかを確認するため, GM2 あるいは GD3 synthase antisense を添加して神経・筋接合部を培養し, anti-GM1 mAb が AP へ及ぼす影響を検討した。

GM2 synthase を knockdown した神経・筋接合部モデルの AP に対して anti-GM1 mAb (1 : 100) を添加したところ, AP の変化はほとんど認められなかった (図 7)。一方, GD3 synthase を knockdown した神経・筋接合部モデルの AP に対して anti-GM1 mAb (1 : 100) を添加したところ, AP は急激な減少を経て完全に抑制されたが, 抗体の wash out により control 値と同程

度まで回復した (図 8.)。

3. ラット神経・筋培養細胞を用いた免疫蛍光二重染色

ラット培養神経・筋接合部モデルを用いて免疫蛍光二重染色を行った。GM2 synthase を knockdown していない培養神経・筋接合部モデルでは, anti-GM1 mAb (図 9.A) はニコチン性アセチルコリン受容体を標識する α -BuTx (図 9.B) と同様の部位に結合が認められた (図 9.C)。

GM2 synthase knockdown 神経・筋接合部モデルでは, anti-GM1 mAb の結合はみられなかった (図 10.)。

4. ラット横隔膜神経・筋接合部標本を用いた anti-GM1 mAb 結合部位の検討

4.1. Anti-GM1 mAb および anti-NF による染色

Anti-GM1 mAb (図 11.A) は, 横隔神経・横隔膜の神経・筋接合部標本において, anti-NF (図 11.B) の発色部位と同様の部位に結合が認められた。一方, Anti-GM1 mAb と α -BuTx (図 11.C) の発色部位の一致は一部であり, anti-NF との重なりよりも狭い範囲であった (図 11.D)。

4.2. Anti-GM1 mAb および anti-Syntaxin による染色

Anti-GM1 mAb (図 12.A) と anti-Syntaxin (図 12.B) の結合部位は, ほぼ同部位であった。一方, α -BuTx (図 12C) の発色部位とは一部重なっていたのみであった (図 12.D)。

4.3. Anti-GM1 mAb および anti-S100 による染色

Anti-GM1 mAb (図 13.A) の結合部位の中に, anti-S100 (図 13.B) の結合部位が重複する染色像が得られた。また, α -BuTx (図 13C) の発色部位と Anti-GM1 mAb との重なりは一部であった (図 13D)。

4.4. 糖脂質除去標本を用いた検討

Chloroform / Methanol 処理により糖脂質を除去した横隔膜切片を用いた検討では、anti-GM1 mAb による結合部位は確認されなかった (図 14.)。

4.5. 神経線維除去標本を用いた検討

Collagenase 処理により神経線維を除去した横隔膜切片を用いた染色では、anti-GM1 mAb の結合部位は確認されなかった (図 15.A)。なお、anti-NF 陽性となる部位も確認されず (図 15.B), α -BuTx のみが陽性像を示した (図 15.C,D)。

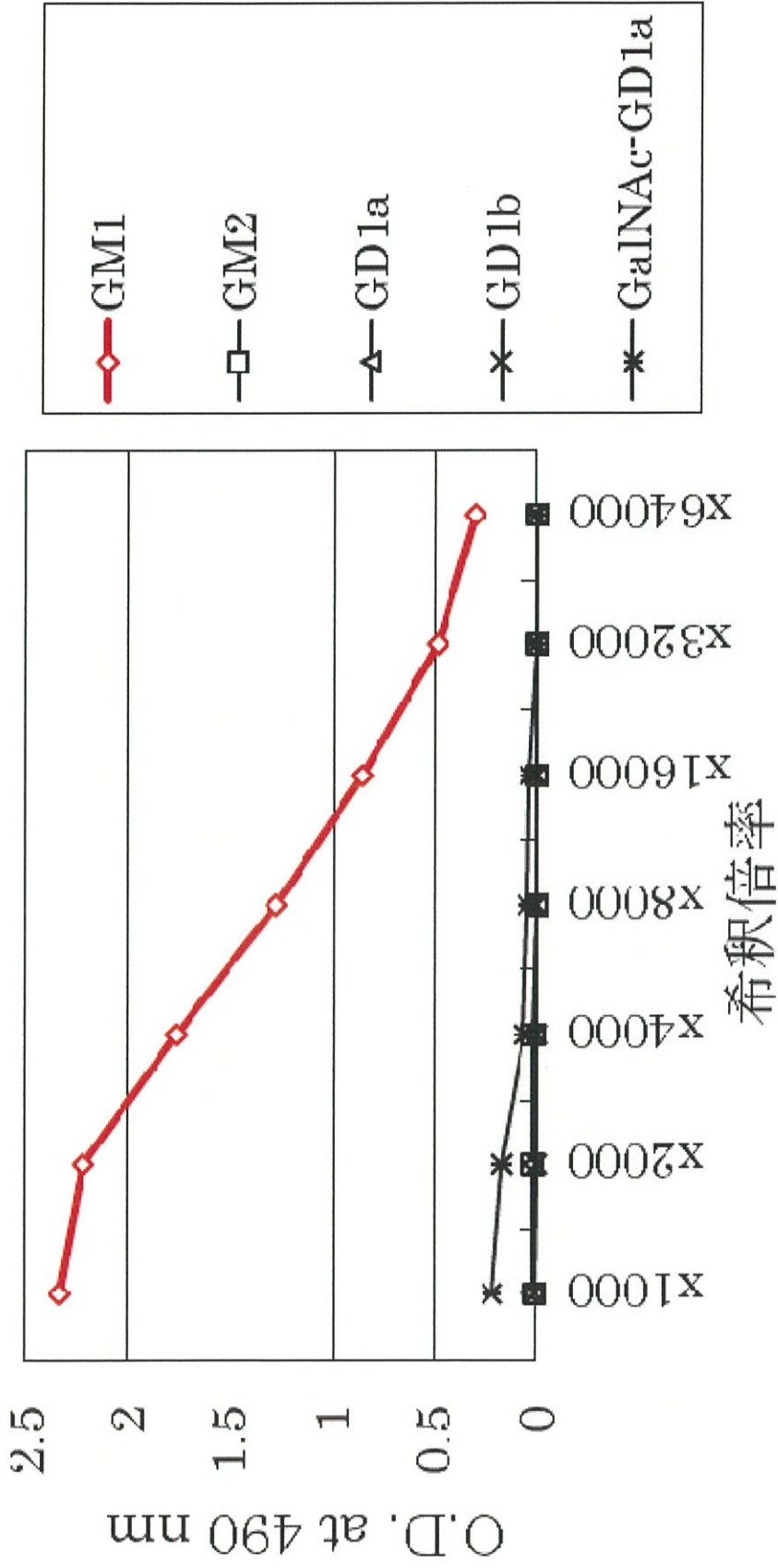
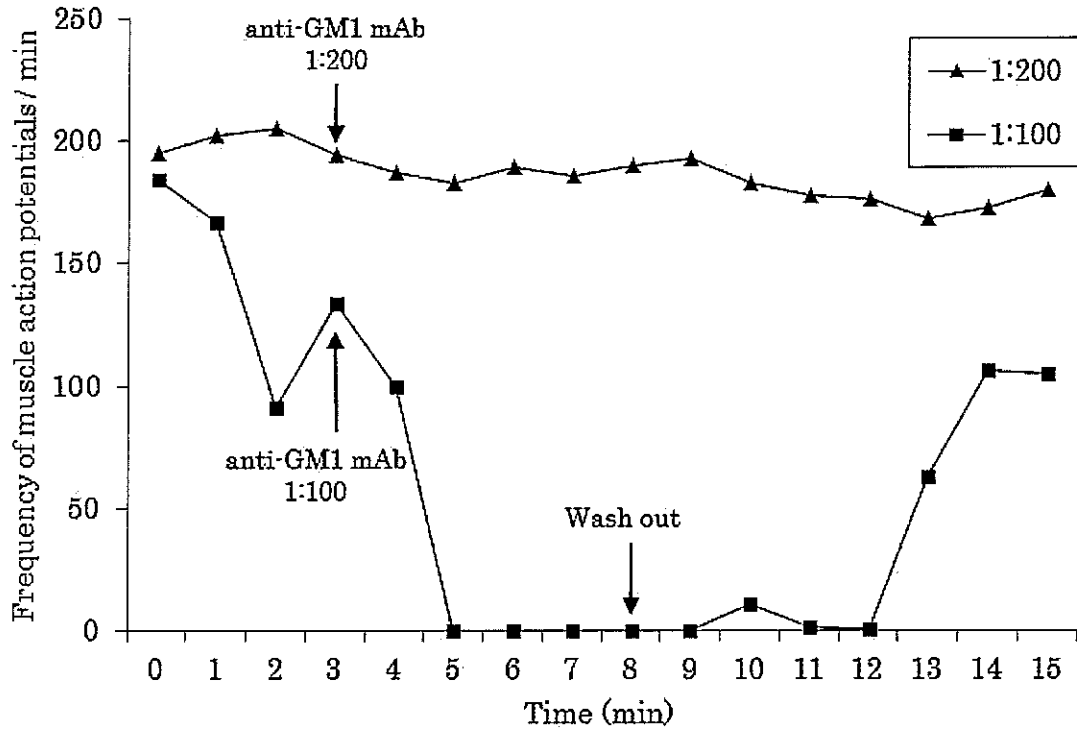


図5. Anti-GM1 mAb の各種 ganglioside に対する抗体価

A



B

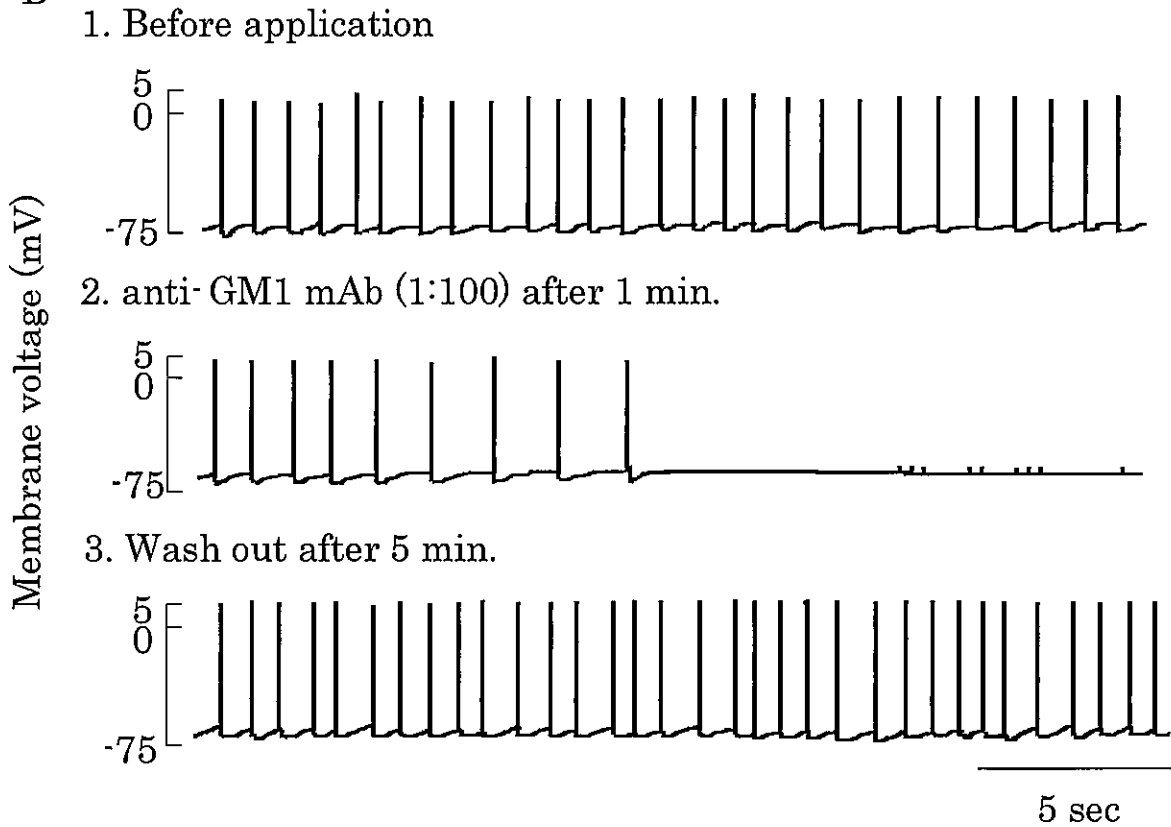
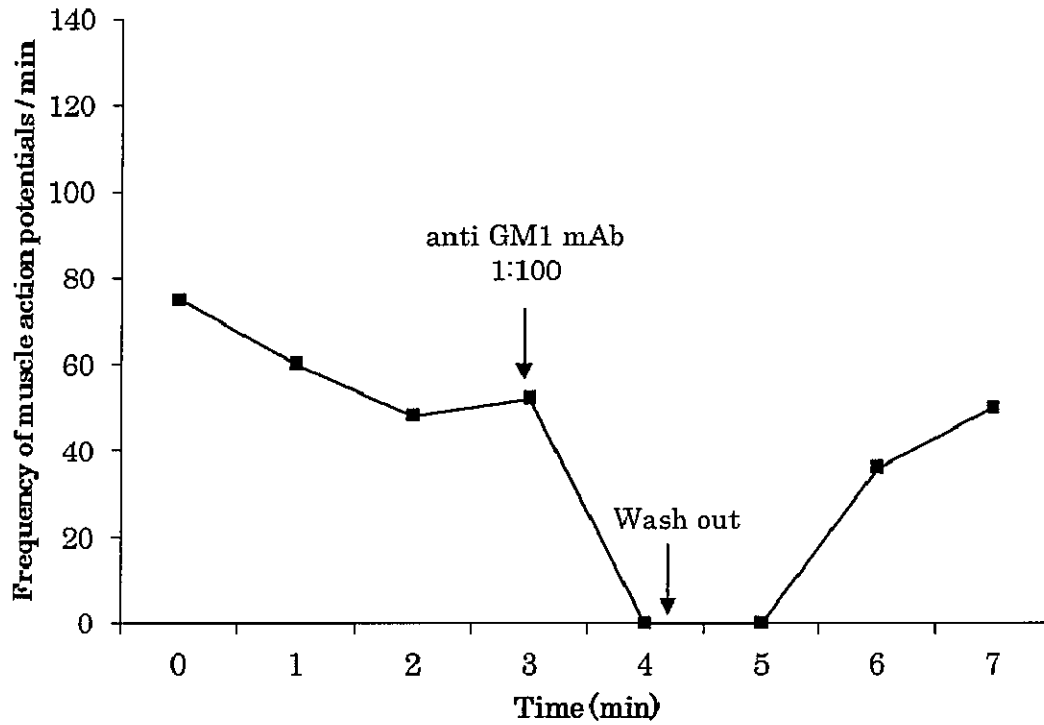


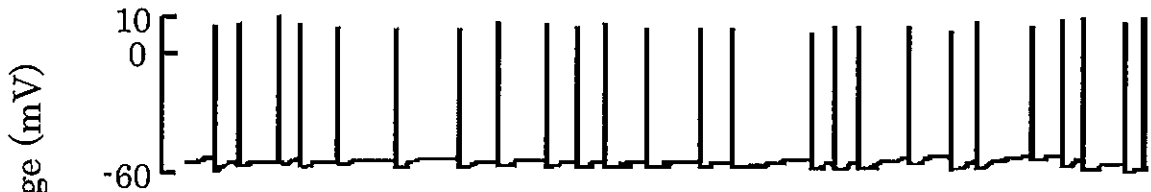
図 6. ラット培養神経・筋接合部モデルにおける anti-GM1 mAb の AP へ及ぼす影響

A

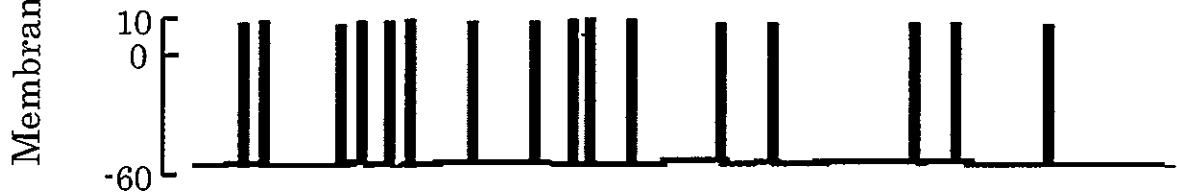


B

1. Before application



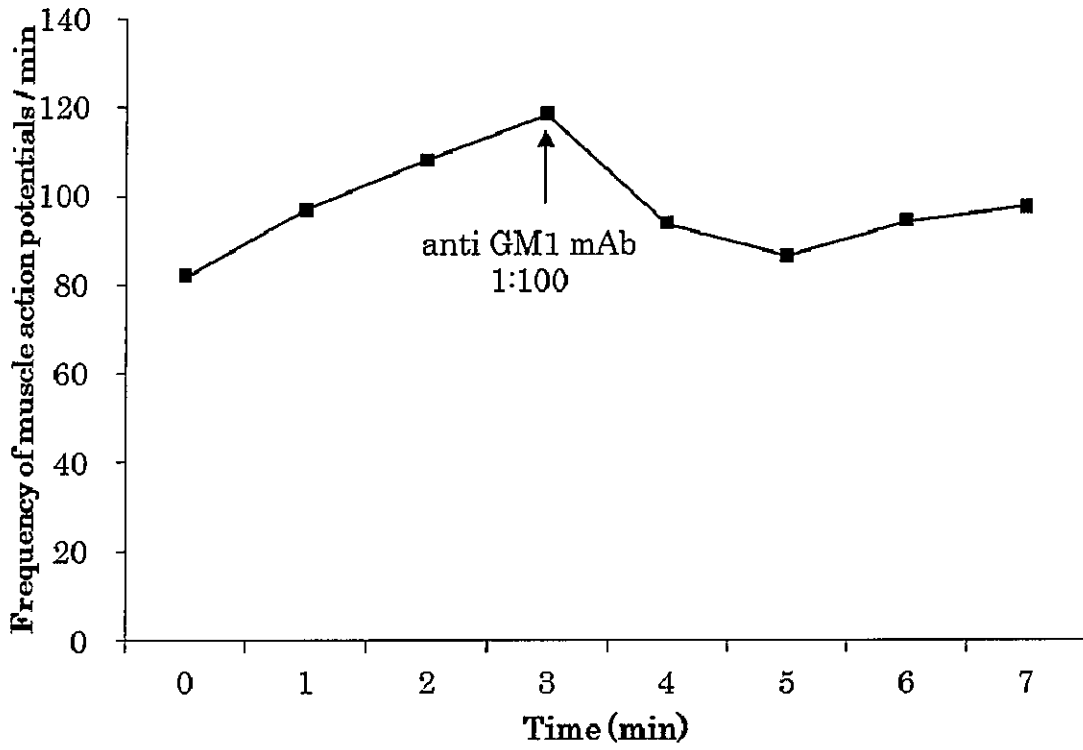
2. anti- GM1 mAb (1:100) after 30 sec



5 sec

図 7. GM2 synthase knockdown 培養神経・筋接合部モデルにおける anti-GM1 mAb の AP へ及ぼす影響

A



B

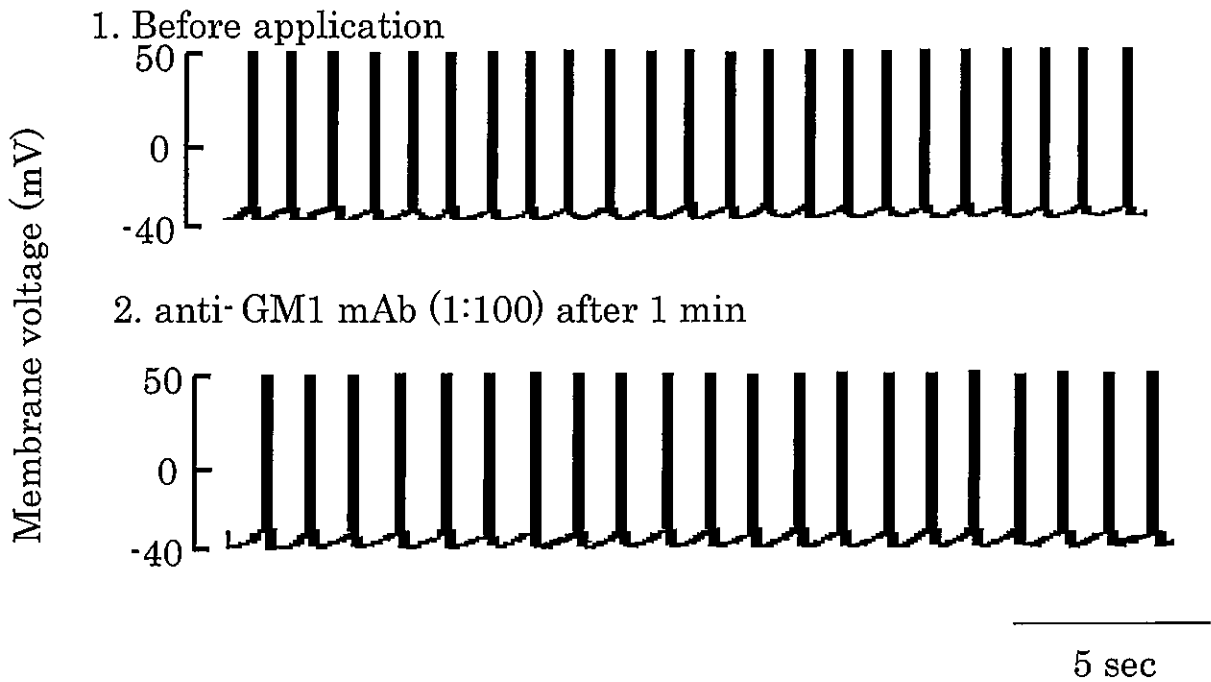


図 8. GD3 synthase knockdown 培養神経・筋接合部モデルにおける anti-GM1 mAb の AP へ及ぼす影響

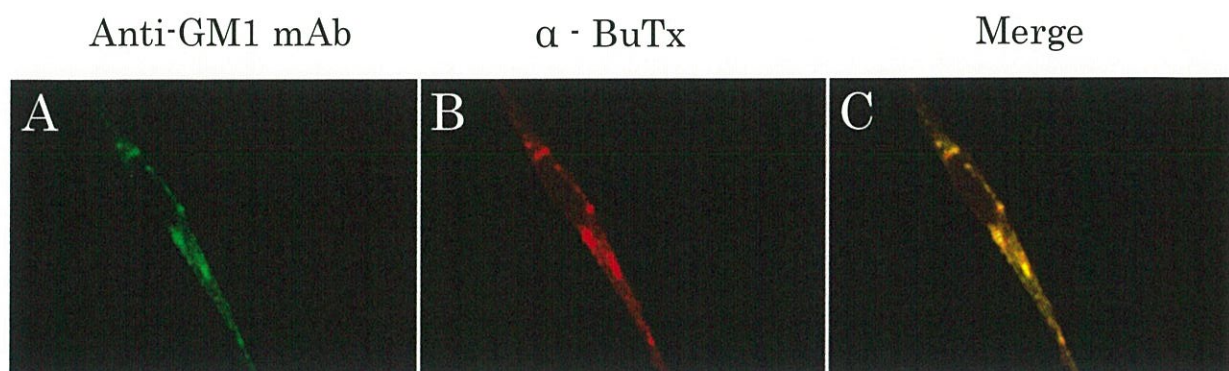


図 9. GM2 synthase sense を添加し培養した神経・筋細胞における anti-GM1mAb の結合性

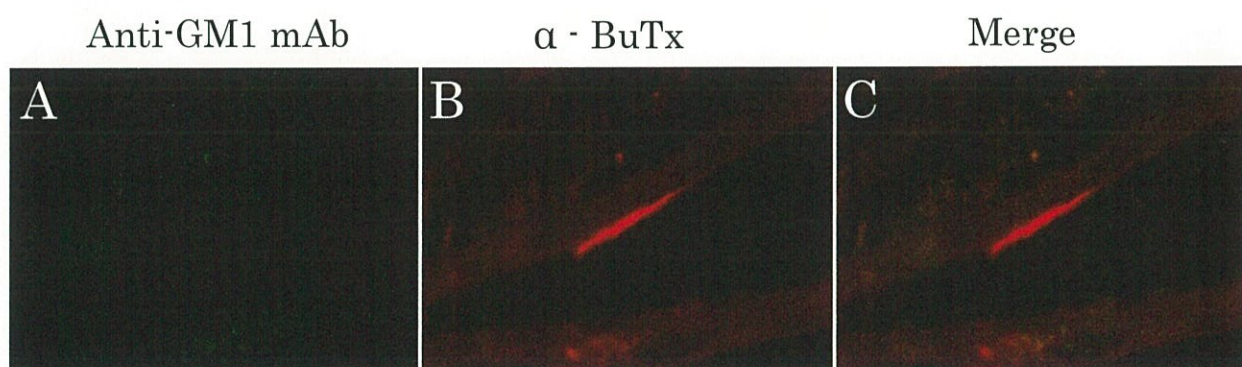


図 10. GM2 synthase knockdown モデルにおける anti-GM1mAb の結合性

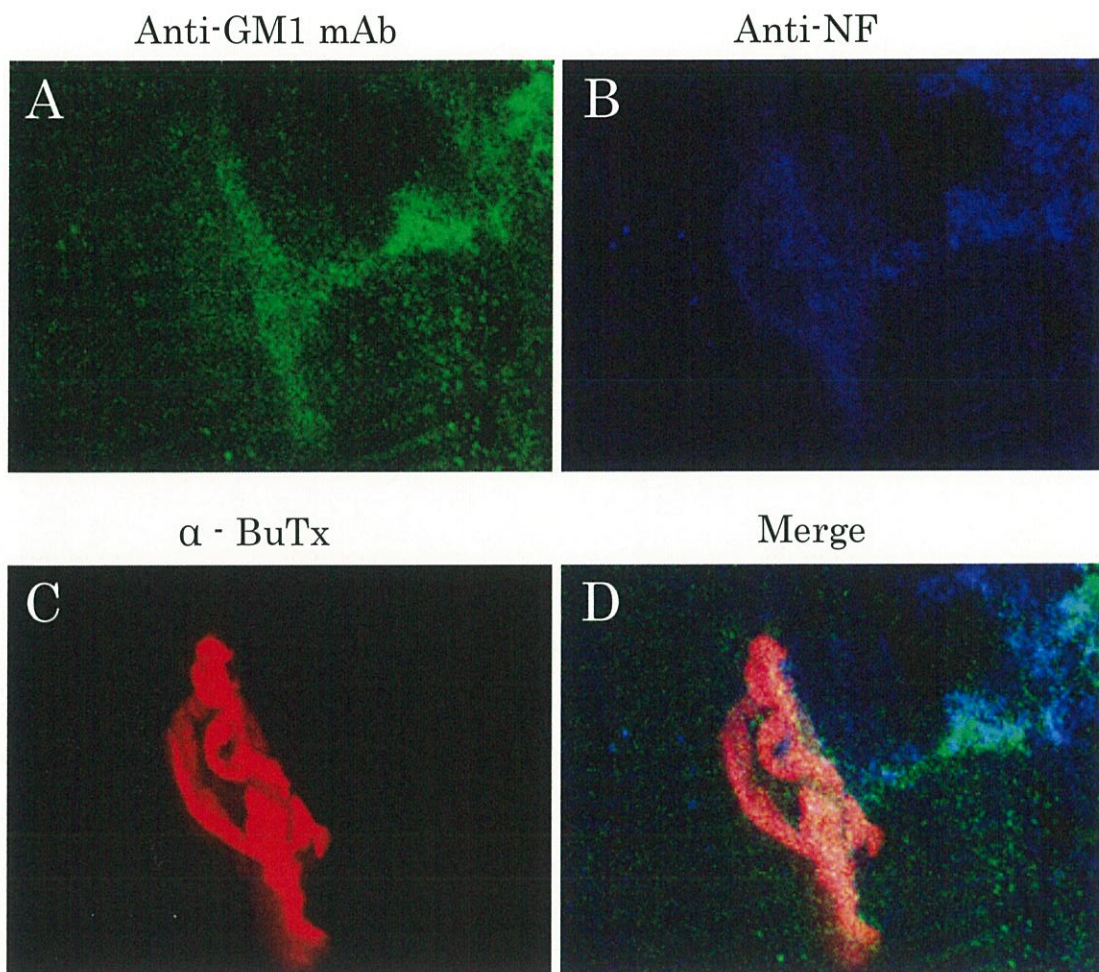


図 11. ラット横隔膜神経・筋標本を用いた anti-GM1 mAb, anti-NF および α - BuTx による三重染色

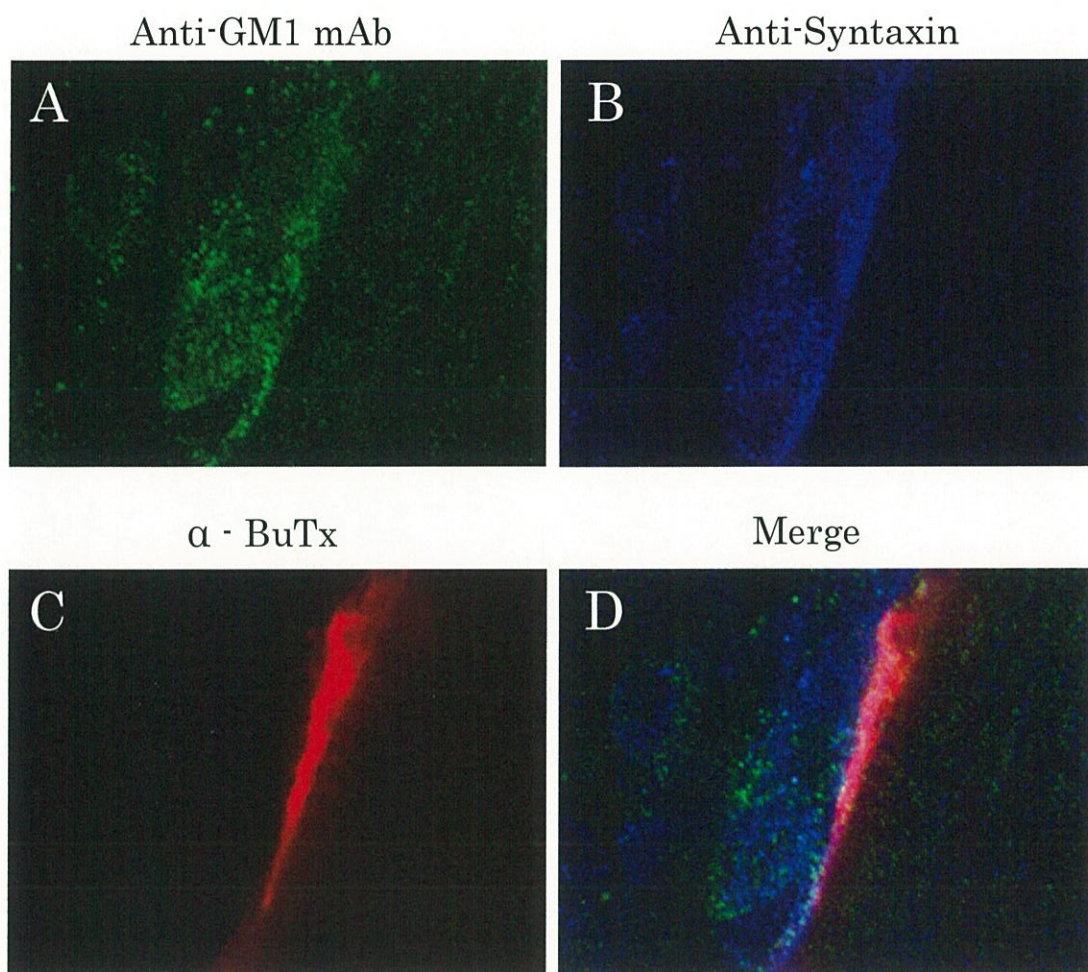


図 12. ラット横隔膜神経・筋標本を用いた anti-GM1 mAb, anti-Syntaxin および α - BuTx による三重染色

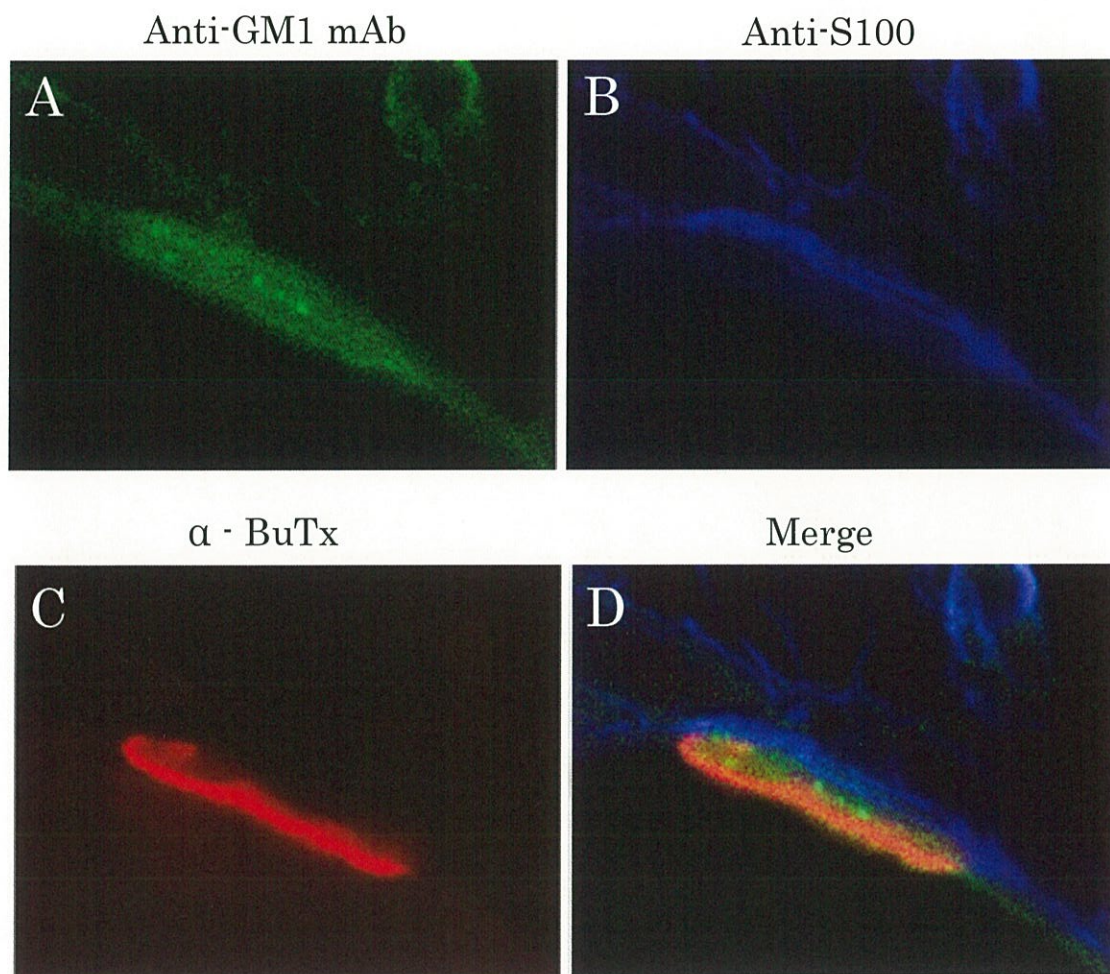


図 13. ラット横隔膜神経・筋標本を用いた anti-GM1 mAb, anti-S100 および α - BuTx による三重染色

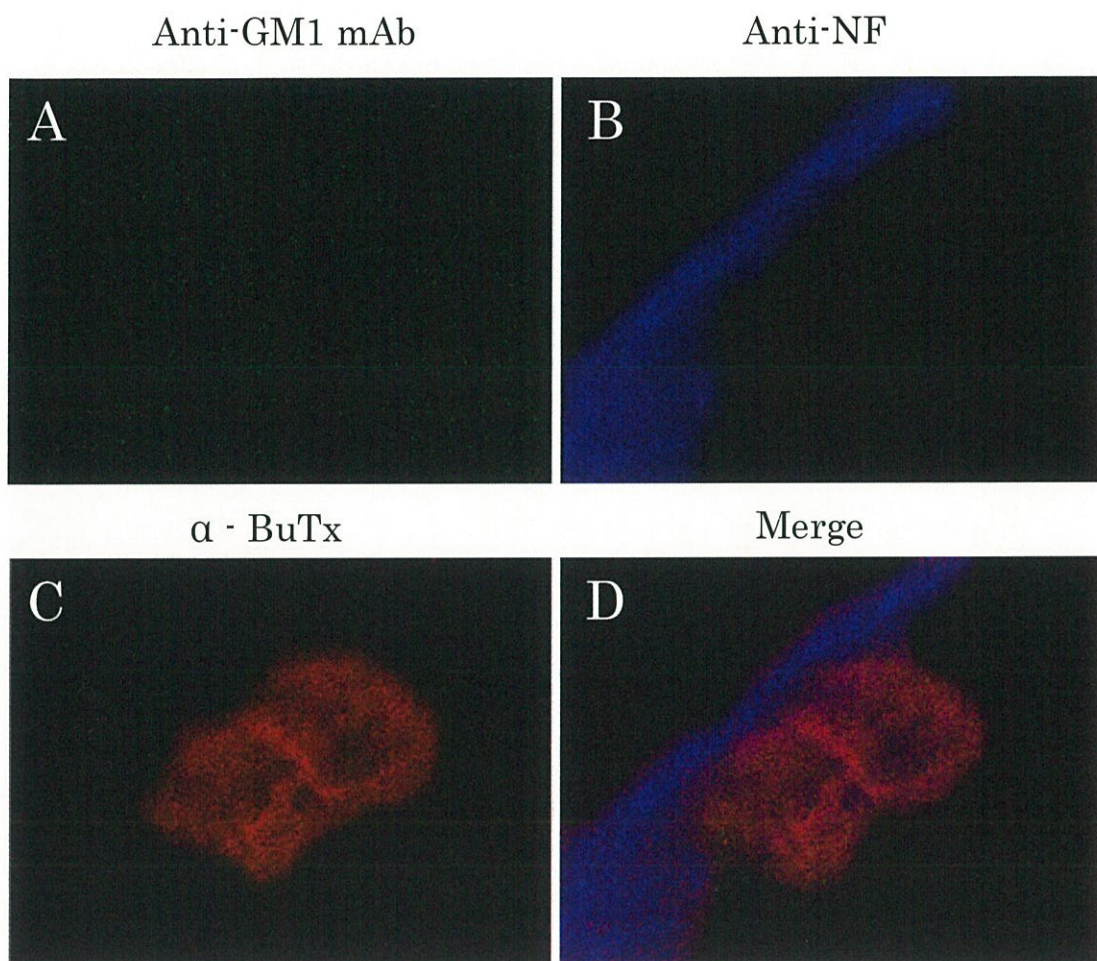


図 14. 糖脂質除去標本を用いた anti-GM1 mAb, anti-NF および α - BuTx による染色

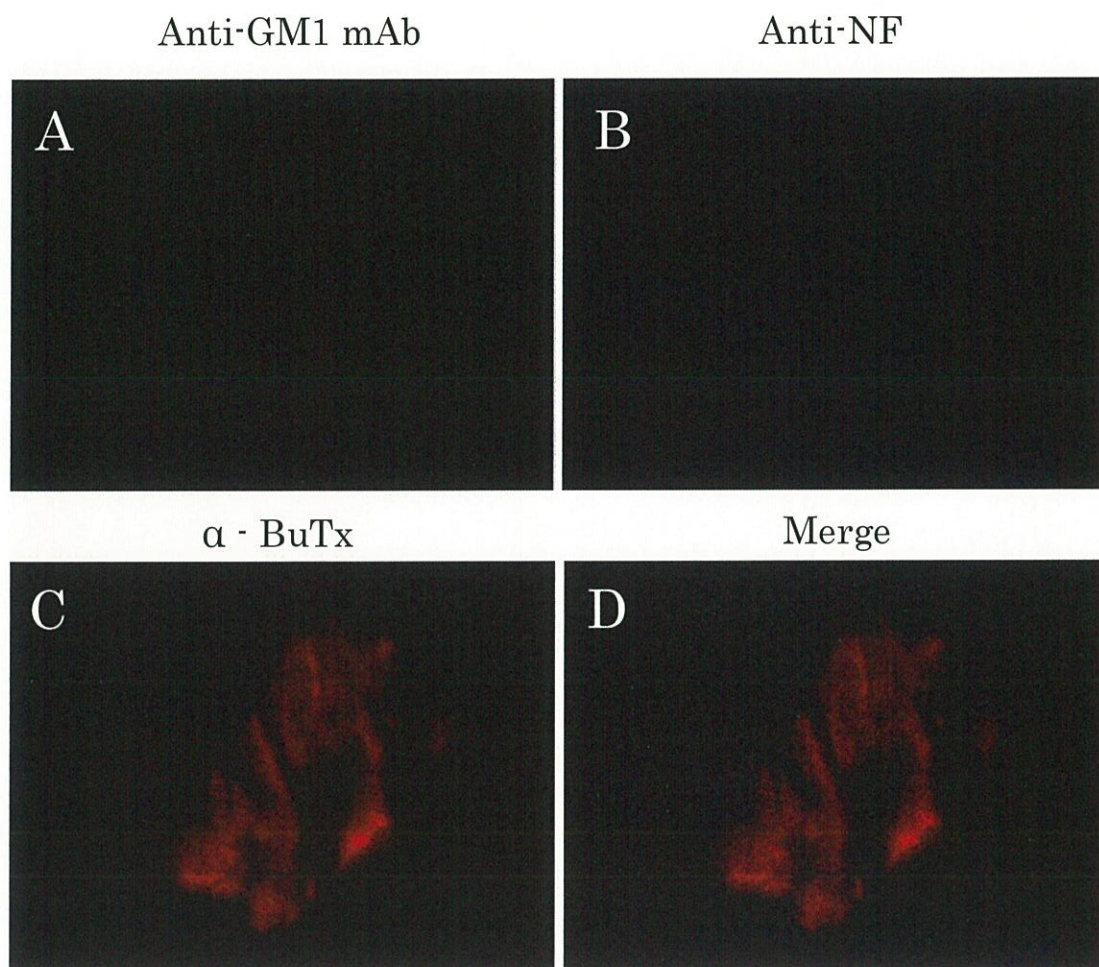


図 15. 神経線維除去標本を用いた anti-GM1 mAb, anti-NF および α - BuTx による染色

考 察

ELISA 法により anti-GM1 mAb の抗体価を測定したところ、GM1 に対する抗体価は 64,000 倍であった。一方、GalNAc-GD1a に対する抗体価は 1,000 倍であり、GM2, GD1a, GD1b に対する抗体価は検出されなかった。これにより、本研究で使用した anti-GM1 mAb は、目的とする ganglioside である GM1 に対して特異性の高い抗体であることが確認された。

ラット培養神経・筋接合部モデルに anti-GM1 mAb (1 : 200) を添加したところ、AP に変化は認められなかった。しかし、anti-GM1 mAb (1 : 100) の添加により AP は急激に減少し、完全に抑制された。また、この抑制は可逆的であった。

我々は以前、IgG anti-GM1 antibody の抗体価の高い AMAN 患者の血清が、AP を可逆的に阻害することを報告している⁴⁶⁾。今回の検討においても、ラット培養神経・筋接合部モデルにおける AP は、anti-GM1 mAb (1 : 100) により可逆的に抑制された。これらの結果は、AP 抑制作用における anti-GM1 mAb の関与を強く示唆するものである。一方、末梢神経系には、血液-神経関門 (blood-nerve barrier : BNB) と呼ばれる防御機構が存在するが、神経根は BNB が脆弱なため、血中の IgG などの自己抗体が神経組織に到達しやすいとされている²³⁾。さらに、anti-GM1 antibody は神経根でランビエ絞輪部に作用し、神経伝導障害を引き起こすとも報告されている²³⁾。このことから、anti-GM1 mAb の培養神経・筋接合部モデルにおける AP 抑制機序としては、神経組織に進入した anti-GM1 mAb がプレシナプスに発現した GM1 に結合し、運動神経の伝達物質であるアセチルコリン (ACh) の遊離を抑制した可能性や、あるいはポストシナプスに発現したニコチン性 ACh 受容体 (nAChR) に作用し、その働きを阻害した可能性が推測される。また、GBS 患者の血清が運動神経終末の Ca²⁺ channel を阻害するという報告もあることから³⁶⁾、anti-GM1 mAb が GM1 を含む運動神経終末の ion channel を攻撃し、神経・筋伝導を阻害していると推測される。

次に、anti-GM1 mAb が ganglioside synthase knockdown モデルに及ぼす影響を検討した。Ganglioside の生合成経路において、GM1 を含む a-series の合成に必要な

な GM2 synthase を knockdown したモデルでは, anti-GM1 mAb による AP の抑制は認められなかった。一方, b- および c-series の生合成を阻害する GD3 synthase を knockdown したモデルにおいては, anti-GM1 mAb により AP は抑制された。また, GM2 synthase を knockdown していない神経・筋接合部モデルを用いた免疫蛍光二重染色では, anti-GM1 mAb は nAChR を標識する α -BuTx と同様の部位に結合が認められた。しかし, GM2 synthase knockdown モデルでは, anti-GM1 mAb による染色性は消失した。このことは, GM1 が nAChR と同様に運動神経の終末に発現していることを示すとともに, AP の抑制が anti-GM1 mAb と GM1 との結合で生じていることを示唆するものである。従って, anti-GM1 antibody が増加するタイプの GBS においては, anti-GM1 antibody が神経伝導の遅延等の機能異常を生じさせ, 病態の発症や進展に寄与している可能性がある。

運動神経・筋接合部における GM1 エピトープの局在を明らかにすることは, GBS で運動神経が選択的に阻害される機序を知る上で非常に重要である。本研究では, ラット横隔膜標本を用いた免疫蛍光三重染色により GM1 の局在性を検討した。

Anti-GM1 mAb の結合性は, プレシナプスにおける運動神経軸索の構成要素のひとつである neurofilament を認識する anti-NF と高度に一致したが, α -BuTx との一致性は低かった。さらに anti-GM1 mAb は, ミエリン鞘を形成するシュワン細胞を認識する anti-S100, およびシナプス小胞の膜タンパクを認識する anti-Syntaxin による染色部位と同様の結合性を示した。これらの結果から, GM1 は神経終末のプレシナプス側に限局して発現していること, また anti-GM1 mAb は運動神経終末において, シュワン細胞やシナプス小胞に発現している GM1 とも結合することが明らかとなった。

糖脂質除去標本を用いた検討においては, anti-GM1 mAb の標本に対する結合性が消失した。神経・筋接合部標本を chloroform / methanol 処理することにより, 脂質である ganglioside は消失することが報告されている⁴⁷⁾。従って, 本検討でみられた結合性の消失は, anti-GM1 mAb の特異性の高さを証明するものである。また神経線維除去標本では, collagenase 処理による運動神経終末のプレシナプス側の消失がみられる⁴⁸⁾が, この処理により anti-GM1 mAb およびプレシナプスの指標とな

る anti-NF のいずれも、標本に対する結合性が消失した。一方、ポストシナプス側を標識する α -BuTx は正常に染色された。これらは、GM1 が神経終末のプレシナプス側に限局して発現していることをより強く支持する結果である。

以上の結果より、anti-GM1 mAb はラット培養神経・筋接合部において自発性筋活動電位を抑制することが明らかとなった。また、この自発性筋活動電位への影響は、anti-GM1 mAb が運動神経終末のプレシナプスに局在する ganglioside GM1 に結合していることが一因であると推測される。

第 2 章

Mouse IgG anti-GM1 monoclonal antibody が
電位依存性 Ca²⁺ channel を介した神経伝導へ及ぼす影響

緒 言

Guillain-Barré Syndrome (GBS) の急性期伝導異常の発症機序として、anti-ganglioside antibody による神経軸索障害が推察されている⁴⁹⁾。神経根では、ランビエ絞輪および軸索への IgG 沈着や軸索周囲腔へのマクロファージの侵入が認められたが、坐骨神経などの末梢神経ではほとんどみられなかったとする報告もある⁵⁰⁾。末梢神経系には、中枢神経系に存在する血液-脳関門 (blood-brain barrier : BBB) と同様の防御機構があり、血液-神経関門 (blood-nerve barrier : BNB) と呼ばれている。しかし、BNB は BBB ほど構造的に強固ではなく、アルブミン、IgG などは神経内膜部まで侵入することができる^{51,52)}。特に、神経根の BNB は脆弱なため、血中の自己抗体が神経組織に到達しやすいとされており、anti-GM1 antibody は、まず神経根でランビエ絞輪部に作用し、神経伝導障害を引き起こすとする報告がある⁵³⁾。また、anti-GM1 antibody は補体の存在下で、有髄神経の Na⁺ channel の機能を障害することが報告されている⁵⁴⁻⁵⁶⁾。それに対し、anti-GM1 antibody は、Na⁺ channel の機能障害や神経伝導ブロックを起こさなかったとする報告もある⁵⁷⁾。これらの報告のように、anti-GM1 antibody と Na⁺ channel の関係については多くの研究がなされているが、anti-ganglioside antibody が神経伝導障害を起こすメカニズムは、未だ明らかにされていない。

一方、神経伝導に関与する ion channel として電位依存性 Ca²⁺ channels (Voltage Gated Calcium Channels : VGCCs) が知られている。VGCCs は、電気生理学的に T-type, L-type, N-type, P / Q-type, R-type に分類される³⁷⁾。その中で、特に神経伝導において重要な役割を果たしているといわれているのは N-type および P / Q-type である⁵⁸⁾。N-type は筋細胞にはほとんど存在せず、主に神経細胞のシナプス前膜部に局在し、アセチルコリン (ACh) の遊離に必須な Ca²⁺ 流入の経路となっている。P / Q-type は主に神経細胞のシナプス前膜部に N-type より多量に存在し、ACh の遊離に中心的役割を演じると考えられている⁵⁸⁾。しかし、anti-GM1 antibody が神経伝導における VGCCs へ及ぼす影響は未だ検討されていない。

そこで本研究では、ラット培養神経・筋接合部モデルを用い、運動神経・筋接合部

において anti-GM1 monoclonal antibody (anti-GM1 mAb) が VGCCs に及ぼす影響について電気生理学的に検討した。また、ラット横隔膜神経・筋接合部標本を用い、Ca²⁺ channel における anti-GM1 mAb の結合部位を検討した。

実験材料および実験方法

1. Anti-GM1 mAb による自発性筋活動電位 (spontaneous muscle action potential: AP) 抑制作用に及ぼす VGCCs 阻害剤の影響

1.1. 実験材料, 使用機器

ω -conotoxin GVIA (ω -CTx): 和光純薬

ω -agatoxin IVA (ω -AgTx): 和光純薬

cytochrome C: Sigma

その他のものは全て第 1 章「実験材料および実験方法 3.1. 実験材料, 使用機器」に準じた。

1.2. 溶液の組成と調製

1.2.1. Cytochrome C 液

蒸留水を用いて, 1 mg/mL の濃度に調製した。

その他の使用溶液は全て第 1 章「実験材料および実験方法 3.2. 溶液の組成と調製」に準じた。

1.3. 使用薬物の調製

ω -CTx および ω -AgTx は, cytochrome C 液を用いて 100 μ M に調製し, 使用時に測定用外液で 10 倍希釈した。

1.4. 神経・筋接合部モデルの作製

第 1 章「実験材料および実験方法 3.3. 神経・筋接合部モデルの作製」に準じた。

1.5. AP の測定

第 1 章「実験材料および実験方法 3.6. 自発性筋活動電位の測定」に準じた。

1.6. 神経・筋接合部モデルに対する VGCCs 阻害薬および anti-GM1 mAb の添加
神経・筋培養細胞より，約 4 分間安定した AP を確認後， ω -CTx または ω -AgTx をそれぞれ終濃度が 30 nM および 10 nM となるように添加した。再度 AP が安定したことを確認後，測定用外液で希釈した anti-GM1 mAb (1 : 100) を 100 μ L 添加した。

2. ラット横隔膜神経・筋接合部標本における VGCCs と anti-GM1 mAb の結合部位に関する検討

2.1. 実験材料

anti-Ca_v2.2 (anti - α_{1B}) : Alomone Labs

anti-Ca_v2.1 (anti - α_{1A}) : Alomone Labs

その他のものは全て第 1 章「実験材料および実験方法 4.1. 実験材料，使用機器 および 5.1. 実験材料，使用機器」に準じた。

2.2. 溶液の組成と調製

第 1 章「実験材料および実験方法 4.2. 溶液の組成と調製」に準じた。

2.3. 横隔膜の採取および凍結ブロックの作製

第 1 章「実験材料および実験方法 5.3. 横隔膜の採取および凍結ブロックの作製」に準じた。

2.4. 免疫蛍光三重染色による anti-GM1 mAb 結合部位の検討

一次抗体として anti- α_{1A} (1 : 1000) , anti- α_{1B} (1 : 1000) を用いた以外は，第 1 章「実験材料および実験方法」5.6. に準じた。

2.5. 統計処理

発生した AP は，第 1 章「実験材料および実験方法 3.8. 統計処理」に準じて集計し，1 分間ごとの AP 発生頻度として表現した。また，Anti-GM1 mAb 添加直前

の3分間、および anti-GM1 mAb 添加後から wash out までのそれぞれの AP 発生頻度の平均値から、anti-GM1 mAb による AP 抑制率を算出した。群間の有意差は、Bartlett 法により分散の均一性を検定し、均一の場合は一元配置分散分析を経て Tukey-Kramer 法を、不均一の場合は Kruskal-Wallis の検定を経て Steel-Dwass 法を用いて多重比較検定を行った。なお、有意水準は 5% とした。

結 果

1. Anti-GM1 mAb による AP 抑制作用に及ぼす VGCCs 阻害剤の影響

Anti-GM1 mAb の Ca^{2+} channel への作用を検討するために、ラット培養神経・筋接合部モデルに VGCCs 阻害剤を添加し、anti-GM1 mAb が AP に及ぼす影響について検討した。

1.1. N-type VGCCs 阻害剤の前処置が anti-GM1 mAb による AP 抑制作用に及ぼす影響

ラット培養神経・筋接合部モデルに対して、N-type VGCCs 阻害剤である ω -CTx 30 nM を前処置した後に anti-GM1 mAb (1 : 100) を添加したところ、AP の変化はほとんど認められなかった (図 16.A,B)。また、anti-GM1 mAb (1 : 100) による AP 減少作用に対する ω -CTx の抑制作用は、統計学的に有意であった (図 16.C)。

1.2. P / Q-type VGCCs 阻害剤の前処置が anti-GM1 mAb による AP 抑制作用に及ぼす影響

P / Q-type VGCCs 阻害剤である ω -AgTx 10 nM を神経・筋接合部モデルに添加したところ、AP の大きな減少がみられたが、完全な抑制には至らなかった。その後、AP が約 15 秒安定していることを確認して anti-GM1 mAb (1 : 100) を添加したところ、AP はさらに減少したが、その減少は限定的であり、完全な抑制はみられなかった (図 17.A,B)。また、Anti-GM1 mAb (1 : 100) に対する ω -AgTx による拮抗作用にも、統計学的な有意差が認められた (図 17.C)。

2. ラット横隔膜神経・筋接合部標本における VGCCs と GM1 の局在性に関する検討

ラット横隔膜神経・筋接合部標本を用いた免疫蛍光三重染色により、Anti-GM1 mAb の VGCCs への結合性を検討した。

2.1. Anti-GM1 mAb と N-type VGCCs の局在性

Anti-GM1 mAb (図 18.A) は、横隔神経・横隔膜の神経・筋接合部標本において、N-type VGCCs を標識する anti- α_{1B} (図 18.B) の発色部位とほぼ同様の部位に結合が認められた。ニコチン性アセチルコリン受容体を標識する α -BuTx (図 18.C) は、anti-GM1 mAb と anti- α_{1B} の染色部位中に収まる形で発色が認められた (図 18.D)。

2.2. Anti-GM1 mAb と P / Q-type VGCCs の局在性

Anti-GM1 mAb (図 19.A) は、横隔神経・横隔膜の神経・筋接合部標本において、P / Q-type VGCCs を標識する anti- α_{1A} (図 19.B) の発色部位とほぼ同様の部位に結合が認められた。 α -BuTx (図 19.C) は、anti-GM1 mAb および anti- α_{1A} の染色部位とほぼ同様の部位に発色が認められた (図 19.D)。

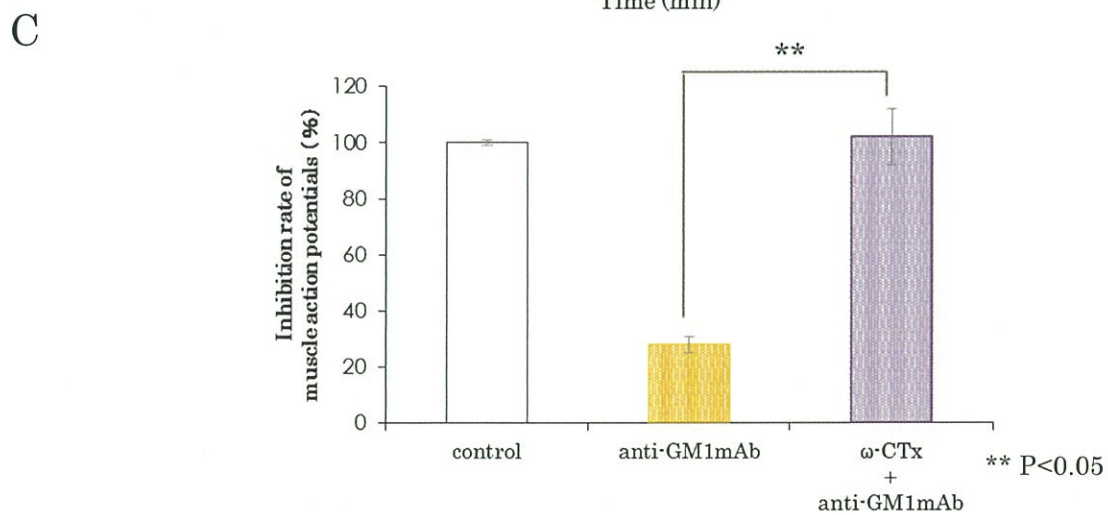
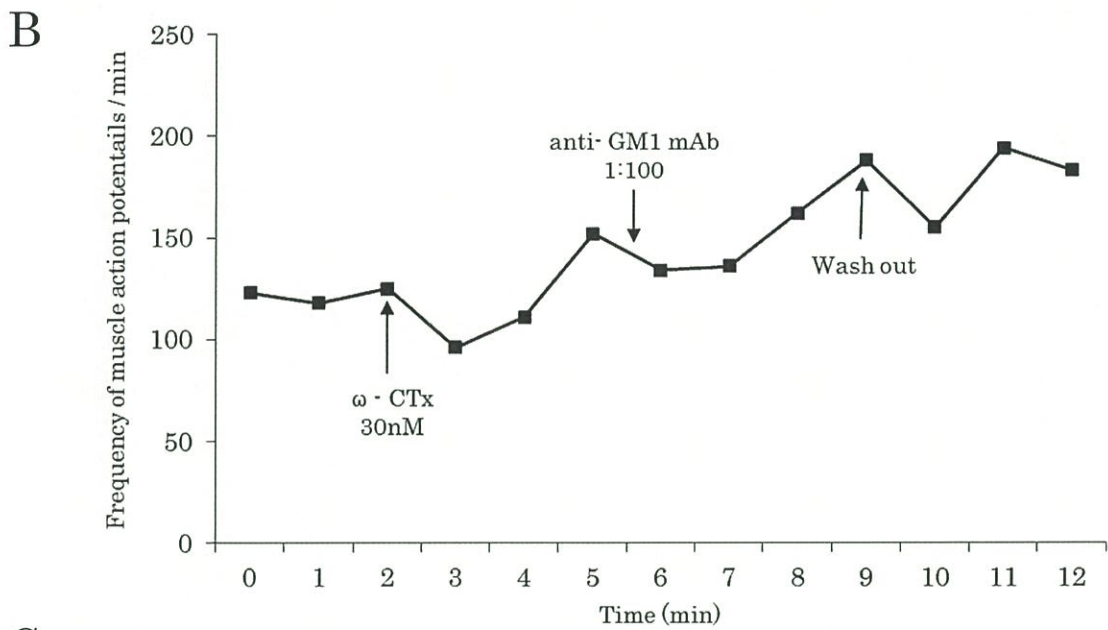
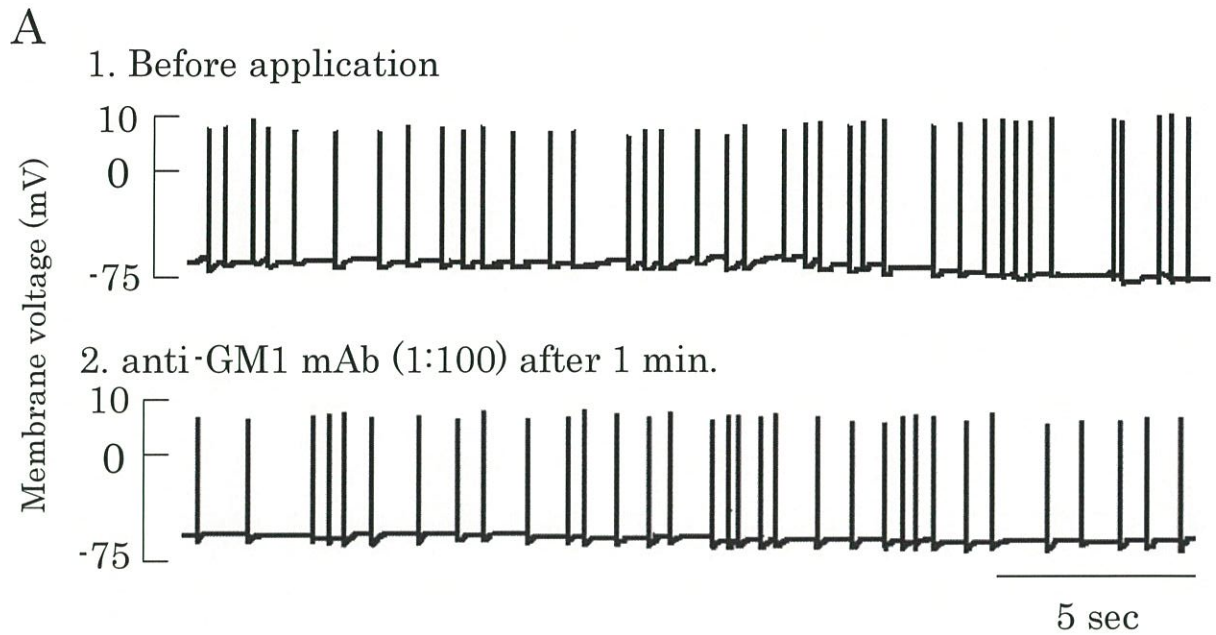


図 16. N-type VGCCs 阻害剤の前処置が anti-GM1 mAb による AP 抑制作用に及ぼす影響

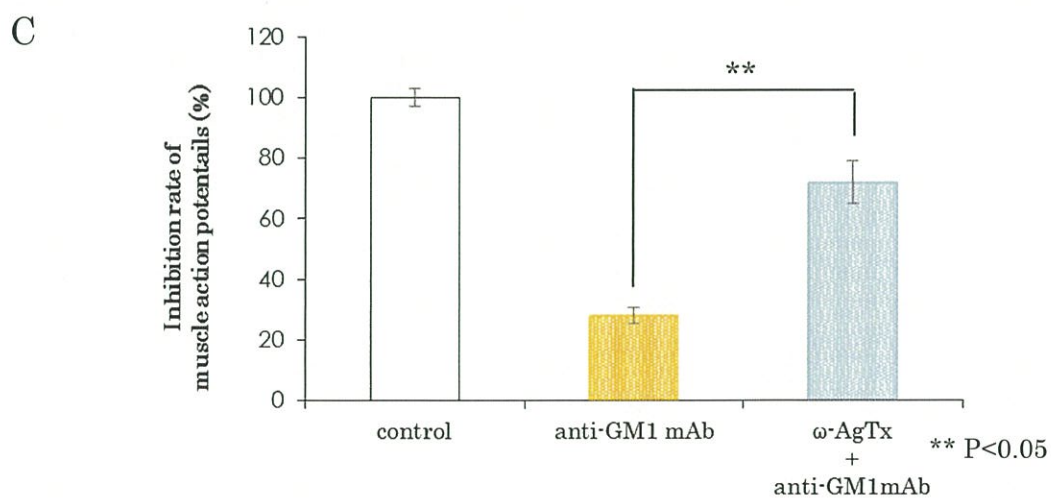
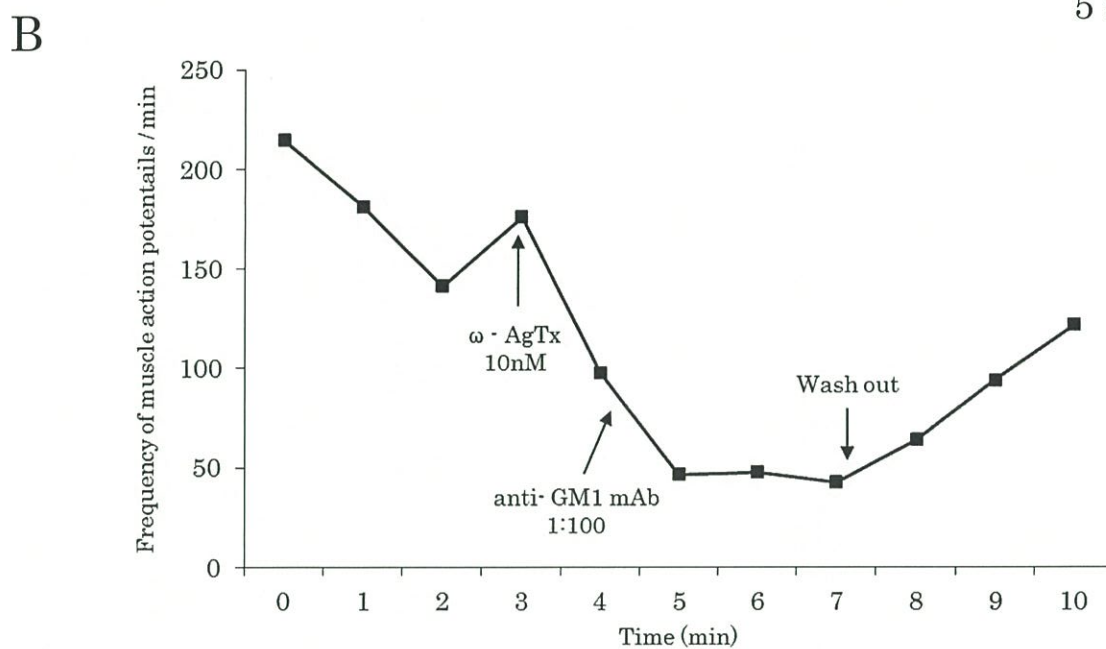
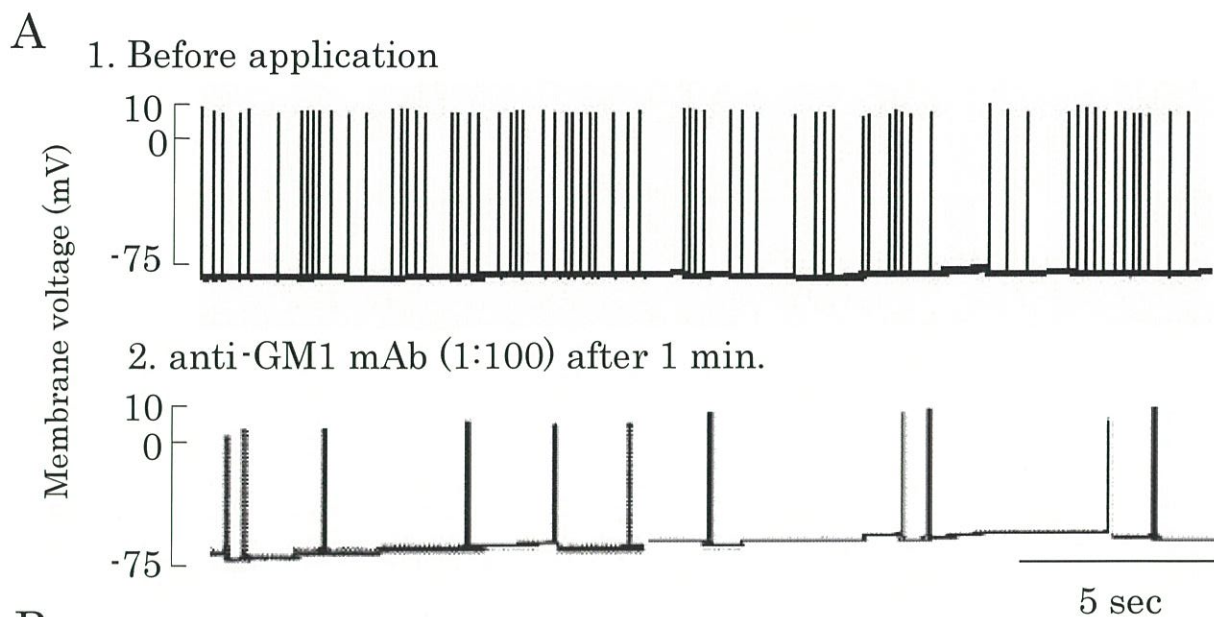


図 17. P/Q-type VGCCs 阻害剤の前処置が anti-GM1 mAb による AP 抑制作用に及ぼす影響

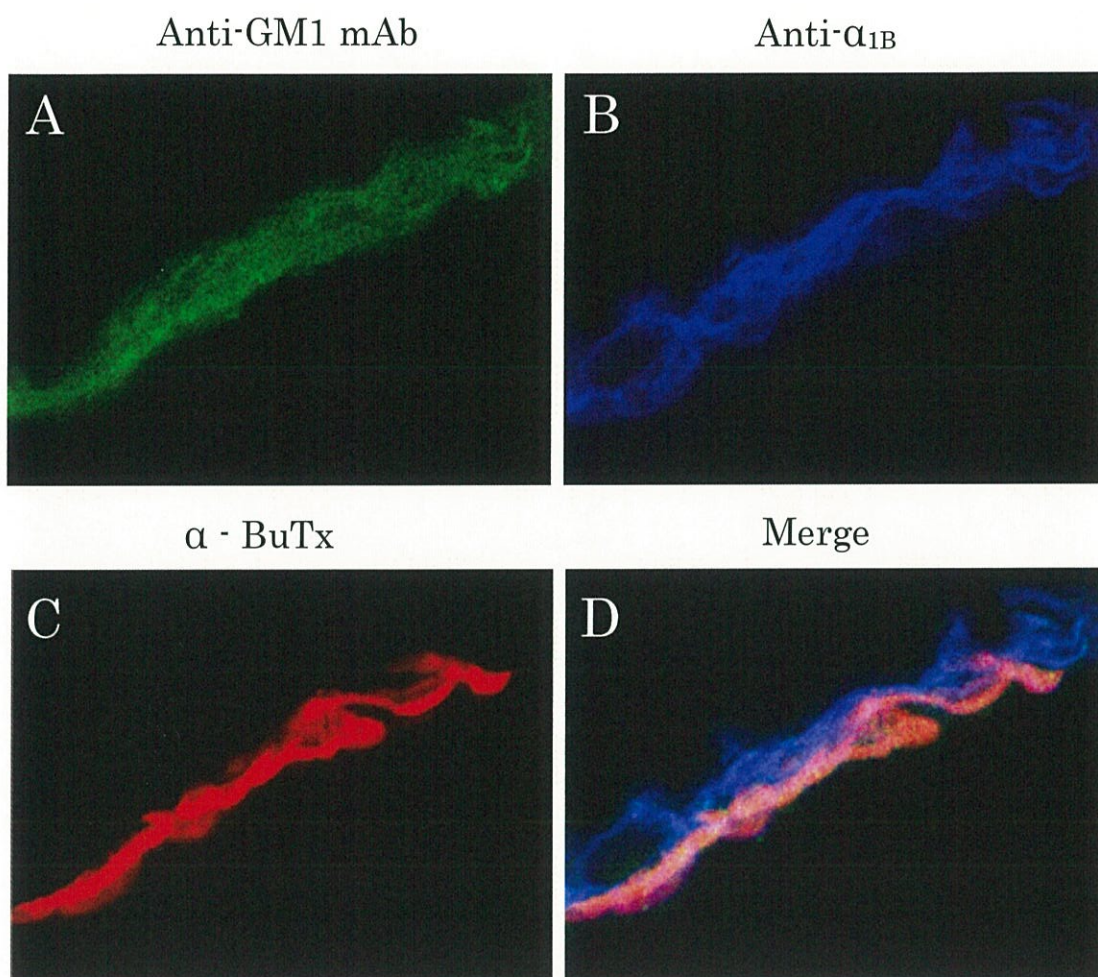


図 18. ラット横隔膜神経・筋接合部モデルを用いた anti-GM1 mAb, anti- α_{1B} および α - BuTx による三重染色

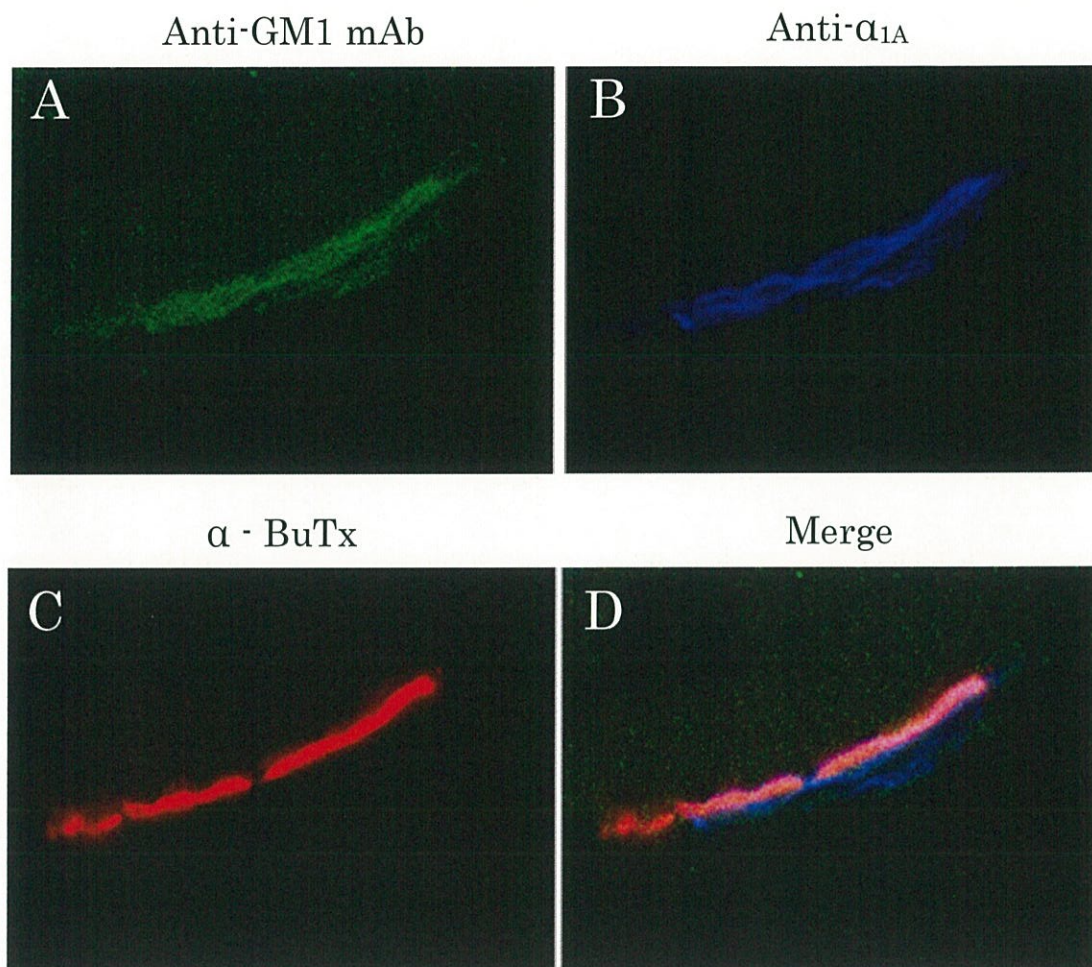


図 19. ラット横隔膜神経・筋接合部モデルを用いた anti-GM1 mAb, anti- α_{1A} および α - BuTx による三重染色

考 察

本章においては、VGCCs と anti-GM1 mAb との関係について検討した。VGCCs は活動電位の発生に寄与しているほか、細胞内への Ca^{2+} 流入を制御することによって、神経伝達物質の遊離などに重要な役割を果たしている²⁶⁾。P / Q-type VGCCs は ACh 遊離に中心的な役割を演じており、N-type VGCCs は ACh の遊離に必須な Ca^{2+} 流入の経路となっている⁵⁹⁾。第 1 章で報告したように、ラット培養神経・筋接合部モデルに anti-GM1 mAb (1 : 100) を添加すると AP の可逆的な、しかし急激な抑制が認められたが、N-type VGCCs 阻害剤である ω -CTx を前処置したところ、anti-GM1 mAb による AP 抑制作用は完全に阻害された。一方で、P / Q-type VGCCs 阻害剤である ω -AgTx の前処置では、anti-GM1 mAb による AP の抑制は部分的に阻害されるに留まった。

なお、 ω -AgTx の処置により AP の速やかな抑制がみられたが、完全な消失には至らなかった。また、anti-GM1 mAb の添加は、 ω -AgTx による AP の抑制状態が 15 秒以上安定していることを確認して実施した。その結果、anti-GM1 mAb を単独で添加した場合に生じる AP の完全な抑制はみられなかったことから、 ω -AgTx の前処置は anti-GM1 mAb の作用を部分的に阻害したと判断した。以上のことより、anti-GM1 mAb による AP 抑制作用には、N-type および P / Q-type VGCCs のいずれも関与しているが、その作用は主に N-type VGCCs を介して発現していることが明らかとなった。

Ca^{2+} channel が anti-ganglioside antibody の標的となることはすでに報告されている^{33,34)}。IgG anti-GM1 mAb は神経伝達物質の放出や Ca^{2+} channel の活性化を阻害すると考えられており、GBS 患者血清が軸索末端に存在する Ca^{2+} channel を阻害する可能性も報告されている^{35,36)} が、詳細は解明されていない。VGCCs からの Ca^{2+} の流入が運動神経終末の神経・筋接合部からの ACh 遊離の引き金となることは広く知られている。また、我々はすでに IgG anti-GM1 mAb が VGCC 電流を阻害することを報告している⁴⁶⁾。本研究では、さらに anti-GM1 mAb が N-type および P / Q-type VGCCs に影響を及ぼしていること、特に N-type VGCCs が強く関与してい

ることを明らかにした。

また、ラット横隔膜神経・筋接合部標本を用いた免疫蛍光三重染色を行ったところ、anti-GM1 mAb は N-type VGCCs のマーカーである anti- α_{1B} 、および P / Q-type VGCCs のマーカーである anti- α_{1A} の染色部位と同様の部位に結合性を示した。このことより、N-type および P / Q-type VGCCs に局在する GM1 が、GBS の自己抗体の標的となっている可能性が示された。しかしながら、GBS には GM1, GM1b, GD1a, GD1b, Gal-NAc-GD1a, GQ1 を含む多くの ganglioside に対する抗体が関与しており、VGCCs 電流への影響について未だ不明な点も多く、今後の詳細な検討が必要である。

以上の結果より、anti-GM1mAb は、神経・筋接合部の N-type および P / Q-type VGCCs に結合することが示された。それにより、Ca²⁺ channel 働きが阻害され、活動電位の発生が抑制されるために、四肢麻痺や腱反射低下・消失といった GBS 特有の運動神経症状が発症すると推測される。

総 括

1. ラット培養神経・筋接合部モデルを用いた検討において、anti-GM1 mAb は AP を可逆的に抑制した。また、ラット横隔膜神経・筋接合部標本を用いた免疫染色では、anti-GM1 mAb はプレシナプスの構成要素を標識する anti-NF, anti-S100 および anti-Syntaxin と同様の部位に結合性を示した。さらに、collagenase 処理によりプレシナプスの軸索を除去した標本では、anti-GM1 mAb による染色性は消失した。一方、ポストシナプス側の α -BuTx とは、染色部位はほとんど一致しなかった。これらの結果より、anti-GM1 mAb による AP 抑制作用は、anti-GM1 mAb がプレシナプスに局在している GM1 に結合することにより発現している可能性が示唆される。

なお、本研究で用いた anti-GM1 mAb の特異性の高さは、抗体価が 64,000 倍であり、他の ganglioside と明らかな交差性を示さなかったこと、また免疫染色においては脂質である ganglioside を除去することで結合性が消失したことにより保証されるものである。

2. Anti-GM1 mAb による AP 抑制作用は、N-type VGCCs 阻害剤である ω -CTx の前処置によりほぼ完全に、P / Q-type VGCCs 阻害剤である ω -AgTx の前処置により部分的に阻害された。以上の結果より、anti-GM1 mAb は N-type および P / Q-type VGCCs を介して AP 抑制作用を示すが、その関与は P / Q-type より N-type VGCCs の方が優位であることが明らかとなった。

3. ラット横隔膜神経・筋接合部標本における VGCCs と GM1 の局在性に関する検討において、anti-GM1 mAb は N-type および P / Q-type VGCCs を標識する抗体の発色部位とほぼ同様の部位に結合性を示した。このことより、anti-GM1 mAb は N-type および P / Q-type VGCCs の膜タンパク上に局在する GM1 に結合することが明らかとなった。

本研究により、GBS 患者では先行感染により産生された自己抗体である anti-GM1 antibody が、神経・筋接合部のプレシナプスに局在する GM1 と結合することで神経伝導の阻害を引き起こし、これが四肢麻痺や腱反射の消失といった急性運動麻痺症状の一因となっている可能性が示された。またその機序として、anti-GM1 antibody が N-type および P / Q-type VGCCs の膜タンパク上に局在する GM1 に結合し、Ca²⁺ の流入阻害を介して神経伝導に影響を与えている可能性が示唆される。

謝 辞

本研究の遂行に際し、終始熱心な御指導、御鞭撻を賜り、本論文の御校閲を賜りました、薬品作用学教育田口研究室 田口 恭治教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

また、本論文の主査をお願い致しました薬品作用学教育堀口研究室 堀口よし江教授、副査をお願い致しました薬剤学研究室 渡邊善照教授、薬剤師実務教育濱本研究室 濱本知之教授に謹んで御礼申し上げます。

また、最後に、多大なご協力を頂きました奥羽大学薬理学研究室 阿部賢志講師に深く感謝致します。

参考文献

1. Irie S, Saito T, Kanazawa N, Nukazawa T, Ito H, Ogino M, Kowa H. Relationships between anti-ganglioside antibodies and clinical characteristics of Guillain-Barré syndrome. *Intern Med.* 36 (9): 607-12: 1997.
2. Ariga T, Yu RK. Antiglycolipid antibodies in Guillain-Barré syndrome and related diseases: review of clinical features and antibody specificities. *J Neurosci Res.* 80 (1): 1-17: 2005.
3. Yuki N, Odaka M. Ganglioside mimicry as a cause of Guillain-Barré syndrome. *Curr Opin Neurol.* 18 (5): 557-61: 2005.
4. Guillan G, Barré JA. Sur un syndrome de radiculonévrite avec hyperalbuminose du liquid céphalorachidien sans réaction cellulaire: remarques sur les caractères cliniques et graphiques de réflexes tendineux. *Bull Soc MedHop Paris.* 40: 1462-70: 1916.
5. Vriesendorp FJ, Mishu B, Blaser MJ, Koski CL. Serum antibodies to GM1, GD1b, peripheral nerve myelin, and *Campylobacter jejuni* in patients with Guillain-Barré syndrome and controls: correlation and prognosis. *Ann Neurol.* 34 (2): 130-5: 1993.
6. Chiò A, Cocito D, Leone M, Giordana MT, Mora G, Mutani R. Guillain-Barré syndrome: a prospective, population-based incidence and outcome survey. *Neurology.* 60 (7): 1146-50: 2003.
7. Govoni V, Granieri E. Epidemiology of the Guillain-Barré syndrome. *Curr Opin Neurol.* 14 (5): 605-13: 2001.
8. Asbury AK, Arnason BG, Adams RD. The inflammatory lesion in idiopathic polyneuritis. Its role in pathogenesis. *Medicine (Baltimore).* 48 (3): 173-215: 1969.
9. Hughes RA, Cornblath DR. Guillain-Barré syndrome. *Lancet.* 366 (9497): 1653-66: 2005.
10. Ho TW, Hsieh ST, Nachamkin I, Willison HJ, Sheikh K, Kiehlbauch J. Motor

- nerve terminal degeneration provides a potential mechanism for rapid recovery in acute motor axonal neuropathy after *Campylobacter* infection. *Neurology*. 48 (3): 717-24: 1997.
11. McKhann GM, Cornblath DR, Ho T, Li CY, Bai AY, Wu HS, Yei QF, Zhang. Clinical and electrophysiological aspects of acute paralytic disease of children and young adults in northern China. *Lancet*. 338 (8767): 593-7: 1991.
 12. McKhann GM, Cornblath DR, Griffin JW, Ho TW, Li CY, Jiang Z, Wu HS. Acute motor axonal neuropathy: a frequent cause of acute flaccid paralysis in China. *Ann Neurol*. 33 (4): 333-42: 1993.
 13. Svennerholm L, Boström K, Fredman P, Jungbjer B, Lekman A, Månsson. Gangliosides and allied glycosphingolipids in human peripheral nerve and spinal cord. *Biochim Biophys Acta*. 1214 (2): 115-23: 1994.
 14. Lu JL, Sheikh KA, Wu HS, Zhang J, Jiang ZF, Cornblath DR, McKhann. Physiologic-pathologic correlation in Guillain-Barré syndrome in children. *Neurology*. 54 (1): 33-9: 2000.
 15. Griffin JW, Li CY, Ho TW, Tian M, Gao CY, Xue P, Mishu B, Cornblath DR. Pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol*. 39 (1): 17-28: 1996.
 16. Hadden RD, Cornblath DR, Hughes RA, Zielasek J, Hartung HP, Toyka KV, Swan AV. Electrophysiological classification of Guillain-Barré syndrome: clinical associations and outcome. Plasma Exchange/Sandoglobulin Guillain-Barré Syndrome Trial Group. *Ann Neurol*. 44 (5): 780-8: 1998.
 17. Ho TW, Mishu B, Li CY, Gao CY, Cornblath DR, Griffin JW, Asbury AK. Guillain-Barré syndrome in northern China. Relationship to *Campylobacter jejuni* infection and anti-glycolipid antibodies. *Brain*. 118 (Pt 3): 597-605: 1995.
 18. Ogawara K, Kuwabara S, Mori M, Hattori T, Koga M, Yuki N. Axonal Guillain-Barré syndrome: relation to anti-ganglioside antibodies and *Campylobacter jejuni* infection in Japan. *Ann Neurol*. 48 (4): 624-31: 2000.

19. Vriesendorp FJ, Flynn RE, Pappolla MA, Koski CL. Complement depletion affects demyelination and inflammation in experimental allergic neuritis. *J Neuroimmunol.* 58 (2): 157-65: 1995.
20. Yuki N, Yoshino H, Sato S, Shinozawa K, Miyatake T. Severe acute axonal form of Guillain-Barré syndrome associated with IgG anti-GD1a antibodies. *Muscle Nerve.* 15 (8): 899-903: 1992.
21. Kusunoki S, Kaida K, Ueda M. Antibodies against gangliosides and ganglioside complexes in Guillain-Barré syndrome: new aspects of research. *Biochim Biophys Acta.* 1780 (3): 441-4: 2008.
22. Willison HJ, Yuki N. Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain.* 125 (Pt 12): 2591-625: 2002.
23. Plomp JJ, Molenaar PC, O'Hanlon GM, Jacobs BC, Veitch J, Daha MR. Miller Fisher anti-GQ1b antibodies: alpha-latrotoxin-like effects on motor end plates. *Ann Neurol.* 45 (2): 189-99: 1999.
24. Yuki N, Yoshino H, Sato S, Miyatake T. Acute axonal polyneuropathy associated with anti-GM1 antibodies following *Campylobacter* enteritis. *Neurology.* 40 (12): 1900-2: 1990.
25. Ogawara K, Kuwabara S, Koga M, Mori M, Yuki N, Hattori T. Anti-GM1b IgG antibody is associated with acute motor axonal neuropathy and *Campylobacter jejuni* infection. *J Neurol Sci.* 210 (1-2): 41-5: 2003.
26. 薄 敬一郎, 結城 伸泰. 分子相同性仮説に基づく Guillain-Barré 症候群の発症機序と抗ガングリオシド抗体. *神経進歩.* 47: 534-544: 2003.
27. McGrogan A, Madle GC, Seaman HE, de Vries CS. The epidemiology of Guillain-Barré syndrome worldwide. A systematic literature review. *Neuroepidemiology.* 32 (2): 150-63: 2009.
28. Jacobs BC, Rothbarth PH, van der Meché FG, Herbrink P, Schmitz PI, de Klerk MA. The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barré syndrome: a case-control study. *Neurology.* 51 (4): 1110-5: 1998.

29. Yuki N, Taki T, Inagaki F, Kasama T, Takahashi M, Saito K, Handa S, Miyatake T. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J Exp Med.* 178 (5): 1771-5: 1993.
30. Yuki N, Handa S, Taki T, Kasama T, Takahashi M, Saito K, Miyatake T. Cross-reactive antigen between nervous tissue and a bacterium elicits Guillain-Barré syndrome: molecular mimicry between ganglioside GM1 and lipopolysaccharide from Penner's serotype 19 of *Campylobacter jejuni*. *Biomed Res.* 13: 451-3: 1992.
31. Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, Taguchi K. Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barré syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101 (31): 11404-9: 2004.
32. Brown WF, Snow R. Patterns and severity of conduction abnormalities in Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 54 (9): 768-74: 1991.
33. Tanaka Y, Waki H, Kon K, Ando S. Gangliosides enhance KCl-induced Ca²⁺ influx and acetylcholine release in brain synaptosomes. *Neuroreport.* 8 (9-10): 2203-7: 1997.
34. Ledeen RW, Wu G. Ganglioside function in calcium homeostasis and signaling. *Neurochem Res.* 27 (7-8): 637-47: 2002.
35. Buchwald B, Zhang G, Vogt-Eisele AK, Zhang W, Ahangari R, Griffin JW. Anti-ganglioside antibodies alter presynaptic release and calcium influx. *Neurobiol Dis.* 28 (1): 113-21: 2007.
36. Ortiz N, Rosa R, Gallardo E, Illa I, Tomas J, Aubry J, Sabater M, Santafé. IgM monoclonal antibody against terminal moiety of GM2, GalNAc-GD1a and GalNAc-GM1b from a pure motor chronic demyelinating polyneuropathy patient: effects on neurotransmitter release. *J Neuroimmunol.* 119 (1): 114-23: 2001.

37. Taguchi K, Shiina M, Shibata K, Utsunomiya I, Miyatake T. Spontaneous muscle action potentials are blocked by N-type and P/Q-calcium channels blockers in the rat spinal cord-muscle co-culture system. *Brain Res.* 1034 (1-2): 62-70: 2005.
38. 楠 進, 金澤 一郎. Guillain-Barré 症候群と Fisher 症候群. *日本臨牀.* 55 (4): 940-4: 1997.
39. Créange A, Sharshar T, Planchenault T, Christov C, Poron F, Raphaël JC, Gherardi RK. Matrix metalloproteinase-9 is increased and correlates with severity in Guillain-Barré syndrome. *Neurology.* 53 (8): 1683-91: 1999.
40. Kieseier BC, Kiefer R, Gold R, Hemmer B, Willison HJ, Hartung HP. Advances in understanding and treatment of immune-mediated disorders of the peripheral nervous system. *Muscle Nerve.* 30 (2): 131-56: 2004.
41. Sheikh KA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Griffin JW. The distribution of ganglioside-like moieties in peripheral nerves. *Brain.* 122 (Pt 3): 449-60: 1999.
42. Corbo M, Quattrini A, Latov N, Hays AP. Localization of GM1 and Gal (beta 1-3) GalNAc antigenic determinants in peripheral nerve. *Neurology.* 43 (4): 809-14: 1993.
43. Odaka M, Yuki N, Nobile-Orazio E, Carpo M, Hirata K. Antibodies to GM1 (NeuGc) in Guillain-Barré syndrome after ganglioside therapy. *J Neurol Sci.* 175 (2): 96-106: 2000.
44. 椎名 政敏, 平成 15 年度 昭和薬科大学大学院 薬学研究科 修士学位論文 (2004)
45. 佐藤 留美, 平成 14 年度 昭和薬科大学大学院 薬学研究科 修士学位論文 (2003)
46. Nakatani Y, Hotta S, Utsunomiya I, Tanaka K, Hoshi K, Ariga T, Yu RK, Miyatake T, Taguchi K. Cav2.1 voltage-dependent Ca²⁺ channel current is inhibited by serum from select patients with Guillain-Barré syndrome. *Neurochem Res.* 34 (1): 149-57: 2009.
47. Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. GalNAc-GD1a in human peripheral nerve: target sites of anti-ganglioside antibody.

- Neurology*. 61 (4): 465-70: 2003.
48. Lanuza MA, Garcia N, Gonzalez CM, Santafe MM, Nelson PG, Tomas J. Role and expression of thrombin receptor PAR-1 in muscle cells and neuromuscular junctions during the synapse elimination period in the neonatal rat. *Neurosci Res*. 73 (1): 10-21: 2003.
 49. Kuwabara S, Ogawara K, Mizobuchi K, Koga M, Mori M, Hattori T, Yuki N. Isolated absence of F waves and proximal axonal dysfunction in Guillain-Barré syndrome with antiganglioside antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 68 (2): 191-5: 2000.
 50. Susuki K, Nishimoto Y, Yamada M, Baba M, Ueda S, Hirata K, Yuki N. Acute motor axonal neuropathy rabbit model: immune attack on nerve root axons. *Ann Neurol*. 54 (3): 383-8: 2003.
 51. Arvidson B. Cellular uptake of exogenous horseradish peroxidase in mouse peripheral nerve. *Acta Neuropathol*. 37 (1): 35-41: 1997.
 52. Mato M, Ookawara S, Sugamata M, Aikawa E. Evidence for the possible function of the fluorescent granular perithelial cells in brain as scavengers of high-molecular-weight waste products. *Experientia*. 40 (4): 399-402: 1984.
 53. 薄 敬一郎, 結城 伸泰. 有髄神経伝導におけるガングリオシドの機能と軸索型ギラン・バレー症候群 (神経糖鎖生物学)・糖鎖と神経・筋疾患, 病態モデル. *蛋白質 核酸 酵素*. 49: 2479-84: 2004.
 54. Susuki K, Rasband MN, Tohyama K, Koibuchi K, Okamoto S, Funakoshi K, Hirata K, Baba H, Yuki N. Anti-GM1 antibodies cause complement-mediated disruption of sodium channel clusters in peripheral motor nerve fibers. *J Neurosci*. 27 (15): 3956-67: 2007.
 55. Takigawa T, Yasuda H, Kikkawa R, Shigeta Y, Saida T, Kitasato H. Antibodies against GM1 ganglioside affect K⁺ and Na⁺ currents in isolated rat myelinated nerve fibers. *Ann Neurol*. 37 (4): 436-42: 1995.
 56. Takigawa T, Yasuda H, Terada M, Haneda M, Kashiwagi A, Saito T, Saida T,

- Kitasato H, Kikkawa R. The sera from GM1 ganglioside antibody positive patients with Guillain-Barré syndrome or chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy blocks Na⁺ currents in rat single myelinated nerve fibers. *Intern Med.* 39 (2): 123-7: 2000.
57. Hirota N, Kaji R, Bostock H, Shindo K, Kawasaki T, Mizutani K, Oka N. The physiological effect of anti-GM1 antibodies on saltatory conduction and transmembrane currents in single motor axons. *Brain.* 120 (Pt 12): 2159-69: 1997.
58. 高柳 一成. 細胞膜の受容体：基礎知識から最新の情報まで. 南山堂. 1998
59. 赤羽 悟美, 中瀬古 寛子. 高閾値活性化型電位依存性 Ca²⁺チャネル - L, P/Q, N, R 型 Ca²⁺チャネル. 医学のあゆみ別冊, 医歯薬出版株式会社. 49-63: 2005.

上記内容は、以下の雑誌に投稿した。

1. Hotta S, Nakatani Y, Kanbe T, Abe K, Masuda Y, Utsunomiya I, Taguchi K. Effects of IgG anti-GM1 monoclonal antibody on neuromuscular transmission and calcium channel binding in the rat neuromuscular junction. *Experimental and Therapeutic Medicine* : in press (Accept : September 2014)
2. Hotta S, Nagaoka T, Taguchi K, Nakatani Y, Utsunomiya I, Masuda Y, Abe K, Yuki N. Neurophysiological and immunohistochemical studies of IgG anti-GM1 monoclonal antibody on neuromuscular transmission : effects in rat neuromuscular junction. *Neurological Sciences* 2014 ; 35 : 205-213.