

自己免疫性末梢神経障害患者血中抗GM1/GD1b抗体の反応特異性とヒト末梢神経における結合部位の検討

有田 政信*, 益子 宏美*, 望月 紀子*, 川名 広子*, 楠 進**

(平成8年9月30日受理)

Fine Specificity of Serum Antibody Binding to GM1 and GD1b and Immunostaining of Human Peripheral Nerve with Anti-GM1 and Anti-GD1b Antibodies

Masanobu ARITA, Hiromi MASHIKO, Noriko MOCHIZUKI, Hiroko KAWANA and Susumu KUSUNOKI

(Received September 30, 1996)

緒 言

近年ギランバレー症候群 (Guillain-Barré Syndrome, GBS) や慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (Chronic Inflammatory Demyelination Polyneuritis, CIDP) あるいはIgM paraproteinemiaを伴う末梢神経障害等の自己免疫性末梢神経障害において、糖脂質のなかでもシアル酸を糖鎖に含むガングリオシドを認識する抗体がしばしば血中に上昇していることがわかり、診断のための補助検査としての有用性が認識されてきた⁽¹⁾。またガングリオシドは細胞膜表面抗原であることから、抗ガングリオシド抗体は自己抗体として神経組織障害性に働いて、重要な発症因子となっている可能性も考えられている。

なかでも、われわれが前に報告した抗GQ1b IgG抗体は、Fisher症候群や眼筋麻痺を伴うGuillain-Barré症候群で、特異的にしかもほぼ全例にみられ、これらの疾患における眼筋麻痺に特異的に関連していると考えられる^(2,3)。一方で免疫組織化学的にGQ1bは眼球運動を支配する脳神経 (動眼神経・滑車神経・外転神経) のRanvier絞輪部周囲のミエリンないしシュワン細胞に局在することから、これらの部位への抗GQ1b IgG抗体の結合が、眼筋麻痺の病因として重要であると推測され

る⁽³⁾。抗GQ1b抗体についてのこれらの知見は、自己免疫性末梢神経障害の病態解明におけるガングリオシド抗体の解析の重要性を示しており、GQ1b以外のガングリオシドについても同様の検討が必要であると考えられる。われわれはさらにギラン・バレー症候群の急性期血中抗体が認識する微量成分ガングリオシドとして、GalNAc-GD1a⁽⁴⁾やGM1b⁽⁵⁾を報告した。

抗GM1および抗GD1b抗体は自己免疫性末梢神経障害において、最もしばしば検出されるガングリオシド抗体である⁽⁴⁾。抗GM1抗体あるいは抗GD1b抗体のみがみられる場合も認められるが、この場合はしばしば抗GM1抗体と抗GD1b抗体は同時に検出されている。GM1とGD1bは共に、糖鎖の非還元末端にGal-GalNAc糖鎖を有しているため (図1)、この部分を認識する抗体はGM1とGD1bに共に結合すると考えられる。

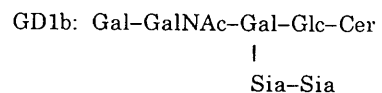
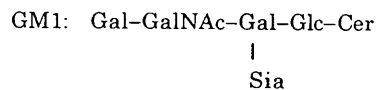


図1 GM1とGD1bガングリオシドの糖鎖構造

* 栄養学科 食品学第二研究室

** 東京大学付属病院神経内科

そこで本研究では抗GM1および抗GD1b抗体が認められた症例で、抗体はGM1およびGD1bのいずれにも結合していることをアフィニティーカラム (Affinity column) を用いて確認し、さらにウサギ抗血清からGM1とGD1bをそれぞれ単独に認識する抗体と両者に結合する抗体を分画して、そのヒト末梢神経に対する結合性を免疫組織染色法によって検討した。

実験材料及び方法

1) アフィニティーカラムの作製

平林らの方法⁽⁶⁾にもとづいて、容量0.5mlのGM1およびGD1b Affinityカラム (以下にそれぞれGM1カラムおよびGD1bカラムと呼ぶ) を作製した⁽⁷⁾。

2) 抗体の分画

ウサギをGM1あるいはGD1bで免疫して得た抗血清⁽⁷⁾から、前記で作成したカラムを用いて次のような方法で各ガングリオシド抗体の分画を行った。すなわち、GM1を免疫して得た抗血清0.2mlをGM1カラムに通し、結合した分画を3M NaSCNを含むphosphate-buffered saline (PBS) で溶出する。この結合分画をさらにGD1bカラムに通して、非吸着画分 (すなわちGM1に結合するがGD1bには反応しない抗体を含む画分) を抗体Aとした。一方GD1bを免疫して得た抗血清0.2mlをGD1bカラムに通し、吸着画分を同様の方法で得て、それをさらにGM1カラムに通し、その吸着画分を抗体B、非吸着画分を抗体Cとした。

さらに1例の慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIDP) 患者から得た血清で抗GM1, GD1b IgM抗体を含むもの0.2mlを同様にGM1およびGD1bカラムに通して、その結合特異性を検討した。これらの各抗体の抗体活性は、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) によって測定を行った⁽⁴⁾。

3) 免疫組織染色法

ヒト剖検例より得た後根神経節、脊髄前根・後根、坐骨神経の凍結切片を、アセトンで室温5分間固定後、10%ヤギ血清を含むPBSで30分間処理して非特異的結合のブロッキングを行った。その後、一次抗体 (抗体A, BおよびC) と室温で1.5時間反応させ、PBSにて洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体 (Cappel社, 200倍希釈) と反応を行った。反応後、PBSにて洗浄し、3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB) を50mg/ml含むPBSに0.1% H₂O₂を加えた基

質溶液と反応させて発色させた。さらに、抗体と組織上の糖鎖との特異的反応によって染色されていることを確認するため、シアリダーゼ処理後の免疫染色の変化についても検討した。すなわち、組織の凍結切片をアセトンで固定後、0.1M酢酸緩衝液中に0.1U/mlの*Chlostridium perfringens*由来のシアリダーゼを含む溶液と37°C、2時間反応させ、その後各抗体溶液によって、上記の様に免疫組織染色を行った。対照としてシアリダーゼを含まない酢酸緩衝液のみにより前処理した切片についても同様の染色を行った。

結 果

抗GM1, 抗GD1b IgM抗体陽性のCIDP患者血清を、GM1およびGD1bカラムを用いて分画したところ、抗体活性はどちらの場合もカラム吸着画分に回収され、非還元末端のGal-GalNAc糖鎖を認識する抗体が上昇していることが明らかとなった (図2)。

一方GM1およびGD1bカラムを用いて分画・調製したウサギ抗体A, B, Cは、それぞれ図3に示すような抗体活性を有した。すなわち抗体AはGM1のみに、また、抗体CはGD1bのみに特異的に反応するのに対して、抗体BはGM1とGD1bのいずれにも反応して、非還元末端糖鎖のGal-GalNAcを認識するものと考えられた。

これらの抗体を用いてヒト末梢神経を免疫組織染色したところ、抗体BとCは大部分の後根神経節神経細胞に結合することが明らかとなった (図4)。また脊髄前根・後根のcross sectionでは、抗体BとCにより一部の有髄線維のミエリンと考えられる部分がドーナツ状に染色された。それらの部分のlongitudinal sectionでは、Ranvier絞輪部周囲のミエリンないシユワン細胞が染色されていることが明らかとなった (図5)。

一方抗体Aによる染色では、検索したヒト末梢神経組織において有意の染色はみられなかった (図6a)。

シアリダーゼ処理を行った組織と各抗体との反応を検討した結果、抗体Bとの反応は認められたが、抗体Cとの反応は認められず染色は完全に消失した。さらにシアリダーゼ処理後には、抗体Aにより前記の抗体BとCによるものと同様の染色が認められた (図6b)。

自己免疫性末梢神経障害患者血中抗GM1/GD1b抗体の特異性とヒト末梢神経における結合部位の検討

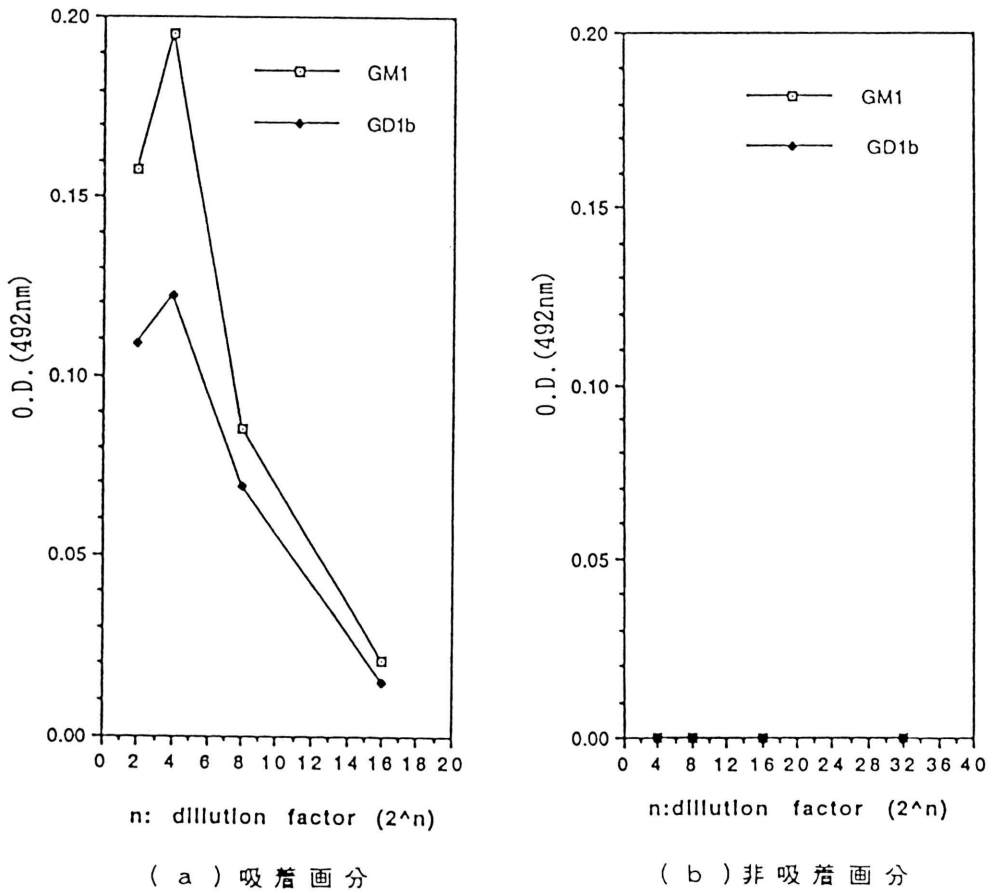


図2 CIDP患者血中の抗GM1/GD1b IgM抗体のGM1カラムによって分離した吸着画分 (a) と非吸着画分 (b) のGM1とGD1bガングリオイドに対する反応性

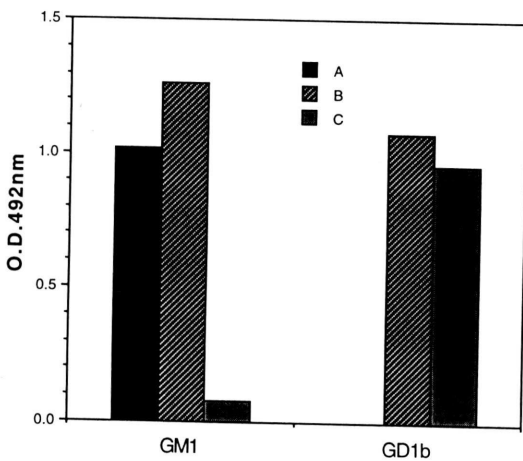


図3 ウサギ免疫血清をGM1及びGD1bカラムで調製した各抗体A, B, Cの反応性

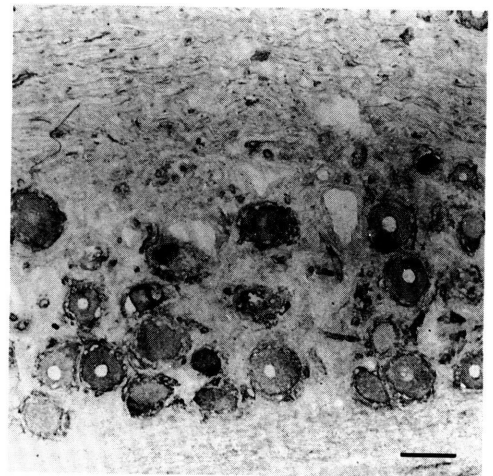


図4 抗体Cによるヒト末梢神経の免疫染色 (bar=0.1mm)

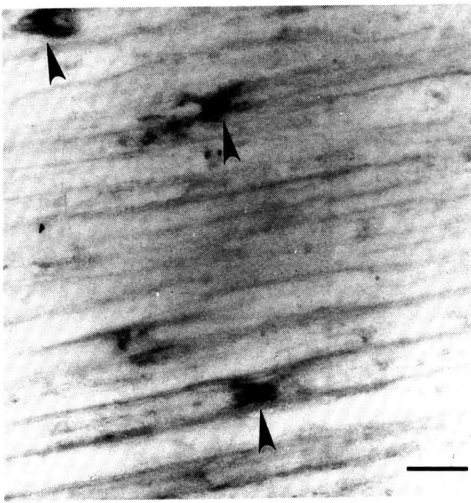


図5 ヒト脊髄前根・後根のLongitudinal Sectionの抗体Cによる免疫染色 (bar=0.05mm)

考 察

ガングリオシドGM1とGD1bを認識する抗体は、自己免疫性末梢神経障害で最もしばしば認められるガングリオシド抗体である。GM1とGD1bをそれぞれ単独に認識する抗体が認められる場合もあるが、抗GM1と抗GD1bの両者に対する抗体活性が同時に血中に認められることの方がより頻度が高い。このような場合、先に示した様にGM1とGD1bは共に非還元末端にGal-GalNAc構造を有しているので、このエピトープを認識して両者に結合する抗体が上昇しているものと推測されている。本研究では、この点を明らかにするために、抗GM1及び抗GD1b IgM抗体陽性のCIDP患者血清について、GM1及びGD1bカラムを用いてその抗体の反応性を検討した。その結果、このCIDP患者血清中には、GM1とGD1bをそれぞれ単独に認識する抗体が同時に上昇しているのではなく、GM1とGD1bを同時に認識する抗体、即ち、非還元末端糖鎖であるGal-GalNAc基結合抗体が上昇していることが明らかとなり、従来の推測が確認された。今回の検討は、CIDP患者血清の一例についてのみであるので、今後さらに症例数を増やして検討する必要がある。

さて抗GM1および抗GD1b抗体が、発症機序に関与すると仮定した場合、その結合部位がどこであるかを検討する目的で、3種類の異なる結合特異性を有する抗体

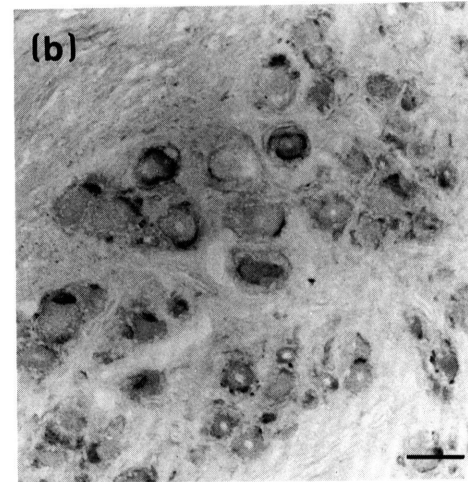
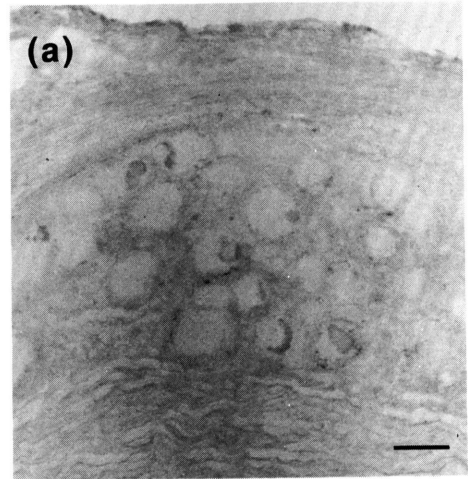


図6 ヒト末梢神経組織の抗体Aによる免疫染色 (bar=0.1mm)
(a) 無処理
(b) シアリダーゼ処理後

を作製した。この3種類の抗体は、GM1およびGD1bカラムを用いて、GM1のみを単独に認識する抗体A、GD1bのみを単独に認識する抗体C及びGM1とGD1bの両者を認識しGal-GalNAc基に結合する抗体Bの調製に成功した。これらの各抗体を用いてヒト末梢神経組織を免疫染色した。

その結果、GD1bを単独に認識する抗体(抗体C)が、後根神経節神経細胞と前根及び後根の有髄線維のRanvier絞輪周囲のミエリンないしシュワン細胞を染色

することが明らかとなった。われわれは、GD1bを単独に認識するマウスモノクローナル抗体であるGGR12が同様の染色結果を示すことを既に報告しているが⁽⁸⁾、本研究での抗体Cによる染色結果も、それと合致するものであるため、GD1bの上記の部位への局在が再確認された。シアリダーゼ処理によって染色性が失われた結果から、抗体CがGD1bを特異的に認識していることを支持するものである。

一方、GM1とGD1bを共に認識する抗体のみの画分である抗体Bも抗体Cと同様の染色性を示した。この結果によって、GD1bを単独に認識する抗体のみでなく、最もしばしばみられるGal-GalNAc結合型抗体も、ヒト末梢神経の重要な部位に結合して発症機序に関与する可能性が示された。

これに対してGM1を単独に認識する抗体Aは、有意の染色を示さなかった。このことはGM1を単独に認識するマウスモノクローナル抗体GMB16を用いた既報告と合致するものである⁽⁸⁾。シアリダーゼ処理して、GD1bがGM1に変換した後の組織切片では、抗体BやCと同様の染色性を示した結果から、抗体AはGM1がaccessibleな状態で局在していれば優位の免疫染色を示すことのできる抗体であることが判る。これらのことより、GM1はヒト末梢神経の少なくとも根レベルでは局在するのではなく分散した状態で存在していることが推測された。

本研究の結果は、自己免疫性末梢神経障害における、抗GM1および抗GD1b抗体の作用機序を考察する上で極めて有用な示唆を与えるものと考えられた。今後、抗GM1及び抗GD1b抗体陽性症例の臨床的多様性の問題⁽¹⁾を含めて、さらに詳細な検討が必要と考えられた。

Abstract

Fine specificity of serum antibody binding to GM1 and GD1b in a patient with autoimmune neuropathy was investigated. It proved to be reactive with the terminal Gal-GalNAc residue. Immunostaining of the human peripheral nervous system with three types of rabbit antibodies was performed; antibody A: monospecific to GM1, antibody B: reactive with both GM1 and GD1b by binding to the terminal Gal-GalNAc

residue, antibody C: monospecific to GD1b. Antibody B and C immunostained most of the human dorsal root ganglion cells and the paranodal myelin of the spinal roots, whereas antibody A produced no immunostaining. After the treatment with sialidase, the immunostaining with antibody C was eliminated, whereas the places immunostained with antibody C without sialidase treatment became reactive with antibody A. Thus, GD1b in the dorsal root ganglion cells and paranodal myelin may be targets for serum antibody against GD1b in autoimmune neuropathy, either monospecific to GD1b or reactive with Gal-GalNAc residue. GM1 may not be localized but dispersed in the human peripheral nerve.

参考文献

- 1) 楠進, 神経研究の進歩 39, 923-930 (1995)
- 2) A. Chiba, S. Kusunoki, T. Shimizu, I. Kanazawa, *Ann. Neurol.*, 31, 677-679 (1992)
- 3) A. Chiba, S. Kusunoki, H. Obata, R. Machinami, I. Kanazawa, *Neurology*, 43, 1911-1917 (1993)
- 4) S. Kusunoki, A. Chiba, K. Kon, S. Ando, K. Arisawa, A. Tate, I. Kanazawa, *Ann. Neurol.*, 35, 570-576 (1994)
- 5) S. Kusunoki, M. Iwamori, A. Chiba, S. Hitoshi, M. Arita, I. Kanazawa, *Neurology*, 47, 237-242 (1996)
- 6) Y. Hirabayashi, T. Suzuki, Y. Suzuki, T. Taki, M. Matsumoto, H. Higashi, S. Kato, *J. Biochem.*, 94, 327-330 (1983)
- 7) S. Kusunoki, J. Shimizu, A. Chiba, Y. Ugawa, S. Hitoshi, I. Kanazawa, *Ann. Neurol.*, 39, 424-431 (1996)
- 8) S. Kusunoki, A. Chiba, T. Tai, I. Kanazawa, *Muscle Nerve*, 16, 752-756 (1993)