

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
田中俊典	主査 教授 花房 俊昭
	副査 教授 黒岩 敏彦
	副査 教授 林 秀行
	副査 教授 米田 博
	副査 教授 玉井 浩
主論文題名 Biological roles of anti-GM1 antibodies in patients with Guillain–Barre syndrome for nerve growth factor signaling (ギランバレー症候群患者由来抗 GM1 抗体の神経成長因子シグナル伝達に対する生物学的意義)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究の背景および目的》</p> <p>Guillain–Barre syndrome (GBS) 及びその近縁疾患では、monosialo-gangliosides GM1 (GM1) に対する抗体をはじめ、種々の抗ガングリオシド抗体が検出される。実験的にウサギをガングリオシドで感作させることでニューロパチーを惹起できることや、臨床的に血漿交換やガンマグロブリン大量療法が GBS の治療に有効であることなどから、抗ガングリオシド抗体が GBS の病態に主たる役割を果たしていると考えられている。しかしそれらの抗体が、どのようなメカニズムで末梢神経を障害するのにかについては未だ必ずしも明らかではない。</p> <p>一方、GM1 は神経系の細胞をはじめとして種々の細胞の細胞膜に存在するガングリオシドの一つである。GM1 は単なる膜の構成分子ではなく、多彩な機能を有していることが知られており、例えば神経成長因子(nerve growth factor; NGF)のシグナル伝達を増強することが報告されている。NGF は末梢神経において細胞の修復や生存に関係する重要な因子であり、GBS 患者に見られる抗 GM1 抗体は、GM1 の作用を抑制することで NGF の機能に影響を及ぼし、GBS の病態に関与している可能性が考えられる。そこで抗 GM1 抗体陽性 GBS の発症メカニズムを明らかにする目的で、患者から採取し精製した抗 GM1 抗体が NGF シグナル伝達に影響を及ぼすか否かを検討した。</p> <p>《対象および方法》</p> <p>1) 対象と抗 GM1 抗体の精製</p> <p>GBS(軸索障害型)急性期で血清の抗 GM1 抗体価が高値であった患者4名、および平均年齢をマッチさせた健常者4名の血清より、Protein L カラムを用いて IgG を抽出した。精製した IgG は EIA 法により GM1 への結合能を確認した。一部の実験では精製した IgG を GM1 によって吸着させた後、実験に供した。また補足実験として、GM1 によって免疫したウサギ、及び、免疫していないウサギの血清を用いた。</p> <p>2) 細胞培養</p> <p>マウスの pheochromocytoma cell line である PC12 細胞を用いた。この細胞は NGF によって突起</p>	

を伸長させ、神経細胞様細胞に分化する。予備実験として、外部より GM1 を投与することにより、NGF による NGF 受容体である TrkA のリン酸化(NGF-TrkA リン酸化)が増強することを確認した。

### 3)リン酸化した TrkA の比率の測定

PC12 細胞培養系に 50 $\mu$ M の GM1 を添加し、12 時間 37 $^{\circ}$ C でインキュベーションした。その後それぞれの実験に応じた濃度の IgG を添加した後、50 ng/ml NGF を加え、30 分後に細胞を破碎した。次に、抗 TrkA 抗体を用いて細胞溶解液の免疫沈降を行ったのち、沈降物をウエスタンブロット法によって、一回目は抗リン酸化チロシン抗体で検出した。メンブランを洗浄後、同じメンブランを用いて二回目は抗 TrkA 抗体で検出した。この二回の検出で得られたシグナルの比をもって、全 TrkA に対するリン酸化した TrkA の比率とした。

### 4)細胞の突起伸長の計測

3)と同様に NGF を投与した後3日間培養を続け、顕微鏡で無作為に選んだ視野中の、突起の長さが細胞体の長さの2倍以上に伸びた細胞が全細胞数に占める割合を計算し、NGF による PC12 細胞の突起伸長効果の指標とした。

### 5)統計学的解析

統計学的解析は、non-paired t test を用いて検定した。

### 《結果》

- 1) GM1 で免疫したウサギの血清は、NGF による TrkA のリン酸化を濃度依存的に抑制した。
- 2) GBS 患者から採取した抗 GM1 抗体を含む IgG は、濃度依存的に NGF による TrkA のリン酸化を抑制した。元の患者の抗 GM1 抗体価が高いほど抑制効果も大きかった。
- 3) 結果2)の抑制効果は、あらかじめ IgG を GM1 で吸着しておくこと認められなかった。
- 4) GBS 患者から採取した抗 GM1 抗体を含む IgG を添加しておくこと、NGF による PC12 細胞の突起伸長が抑制された。

### 《考察》

抗 GM1 抗体陽性 GBS 患者の急性期の血清から抽出した IgG は、PC12 細胞において、GM1 による NGF-TrkA リン酸化の増強を抑え、突起伸長を抑制することが示された。この現象は、GM1 で免疫したウサギ血清にも同様の抑制作用があること、IgG の濃度依存的であること、元の患者血清の抗 GM1 抗体価に比例していること、さらに GM1 で吸着させた IgG ではこの抑制効果は失われたことから、抽出した IgG に含まれていた抗 GM1 抗体が GM1 に直接的に作用することで惹起された現象であると考えられる。

GBS の 10～42%の症例で抗 GM1 抗体価が高値をとるといわれており、抗 GM1 抗体陽性 GBS は臨床的に軸索障害型で重症化することが多いとされている。抗 GM1 抗体は直接神経細胞(軸索)に作用し GBS の原因となる抗体と見なされているにもかかわらず、そのメカニズムには疑問な点も多い。本研究で示されたように、抗 GM1 抗体そのものが単独で生物学的に機能をもつという事実は、疑問の解明に新しい視点を与えるものであろう。一方で、NGF はある種の神経疾患で末梢神経における発現が増加するなど、主として神経突起の再生と生存に関わっているとされている。このことを考慮すると、抗 GM1 抗体による GM1 を介した NGF 作用の抑制は、GBS における末梢神経の損傷に関与するというよりも、損傷からの回復過程の抑制に関与している可能性が考えられる。

### 《結論》

抗 GM1 抗体陽性 GBS において、抗 GM1 抗体は GM1 作用の抑制を介して NGF シグナル伝達を障害し、NGF による神経伸長作用を抑制することで神経傷害の回復過程を抑制している可能性が示された。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	田 中 俊 典
論文審査担当者		主 査 教 授	花 房 俊 昭
		副 査 教 授	黒 岩 敏 彦
		副 査 教 授	林 秀 行
		副 査 教 授	米 田 博
		副 査 教 授	玉 井 浩
主論文題名			
<p>Biological roles of anti-GM1 antibodies in patients with Guillain-Barre syndrome for nerve growth factor signaling  (ギランバレー症候群患者由来抗 GM1 抗体の神経成長因子シグナル伝達に対する生物学的意義)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>申請者は、抗 GM1 抗体陽性の Guillain-Barre syndrome (GBS) の発症メカニズムを明らかにする目的で、PC12 細胞を用い、患者血清から抽出した IgG が GM1 によって増強される神経成長因子 (NGF) シグナル伝達に与える影響を、NGF 受容体である TrkA のリン酸化をウエスタンブロット法で検出することにより検討している。その結果、GM1 で免疫したウサギの血清および GBS 患者由来 IgG は、濃度依存的に NGF による TrkA のリン酸化を抑制することが明らかになった。逆に、GM1 で免疫していないウサギの血清、正常対照者由来の IgG、および GM1 で吸着させた GBS 患者由来 IgG には、NGF による TrkA リン酸化抑制効果はなく、この抑制効果が抗 GM1 抗体そのものの作用によることが示された。また、GBS 患者由来 IgG は、NGF による PC12 細胞の突起伸長を抑制する作用も有していた。これらの成績は、GBS の病態において、GBS の回復過程に NGF が関与している可能性を示すのみならず、抗 GM1 抗体そのものに生物学的活性があることを示した点、および GM1 の機能的側面に注目した点で、新しい考え方を提示するものである。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌)</p> <p>Biochimica et Biophysica Acta- Molecular Basis of Disease  1772(5): 543-548, 2007</p>			