

学位論文（博士）

Autocrine TNF-alpha increases penetration
of MAG antibodies across the blood-nerve barrier
in anti-MAG neuropathy

(MAG ニューロパチーでは自己分泌 TNF- α が
MAG 抗体の血液神経関門透過を亢進させる)

氏名 佐藤 亮太

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 臨床神経学講座

令和 4 年 12 月

目 次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	2
3. 目的	3
4. 対象	3
5. 方法	3
(1) 方法	3
(2) 解析	5
6. 結果	6
7. 考察	12
8. 結語	15
9. 謝辞	15
10. 参考文献	15

要旨

ミエリン関連糖蛋白 (myelin-associated glycoprotein: MAG) は、神経組織の髄鞘に局在する膜貫通糖蛋白であり、MAG に対する IgM 型自己抗体 (MAG 抗体) を有する患者では脱髄性末梢神経障害をきたす。末梢神経には血液神経関門 (blood-nerve barrier: BNB) があるために、通常は免疫グロブリンなどの大きな分子が神経内に侵入することはできない。しかし、MAG ニューロパチー患者から採取した腓腹神経内有髄神経線維の髄鞘には MAG 抗体が沈着しており、MAG 抗体は BNB を通過していることが想定される。MAG 抗体の BNB 通過機序を明らかにすることを目的に、MAG ニューロパチー患者血清、ヒト BNB 構成内皮細胞株と周皮細胞株、MAG ニューロパチー患者から採取した腓腹神経検体を用いて解析を行った。MAG ニューロパチー患者血清を作用させた内皮細胞に対して、全 RNA トランスクリプトーム解析と免疫染色を用いたハイコンテントイメージング解析を行い、NF- κ B の活性化と TNF- α の発現増加を確認した。次に内皮細胞と周皮細胞を共培養した BNB *in vitro* モデルで透過性を解析した。MAG ニューロパチー患者血清を作用させた結果、10 kDa デキストランや IgG の透過性を変化させることなく、IgM や MAG 抗体の透過性を亢進させ、TNF- α の中和抗体を添加することで IgM や MAG 抗体の透過性は抑制された。電子顕微鏡による観察では MAG ニューロパチー患者の腓腹神経内で BNB を構成する微小血管の密着結合は保たれており、内皮細胞内に多数の小胞が確認された。MAG ニューロパチー患者では、MAG 抗体は BNB 構成内皮細胞の自己分泌 TNF- α の増加を介して内皮細胞質内をトランスサイトシスの機序により通過していることが示唆された。TNF- α 阻害薬は既存の薬剤であり、本研究結果から、TNF- α 阻害薬による MAG ニューロパチー患者への新たな治療戦略が期待される。

研究の背景

髄鞘関連糖蛋白 (myelin-associated glycoprotein: MAG) に対する IgM 抗体 (MAG 抗体) を有する MAG ニューロパチー患者は、緩徐進行性の脱髄性末梢神経障害をきたす¹⁾²⁾。治療として経静脈的免疫グロブリン療法や CD20 抗体製剤であるリツキシマブの投与が行われるが、治療効果は限定的である³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾。MAG ニューロパチー患者に対する治療効果が限定的である原因として、MAG 抗体が神経線維に作用する機序が未だに解明されていないことが挙げられる。

MAG は神経組織の髄鞘に局在し、髄鞘の層構造の形成や軸索と髄鞘の接着に関与しているとされ⁷⁾、末梢神経内の糖脂質である sulfated glucuronyl paragloboside (SGPG) とともに、糖鎖構造として human natural killer-1 (HNK-1) エピトープをもつ⁸⁾。MAG 抗体はこの HNK-1 エピトープを認識することが明らかとなっており、MAG 抗体は HNK-1 を有する末梢神経構成因子に交差反応すると考えられている。実際に MAG ニューロパチー患者の腓腹神経では IgM 抗体が髄鞘に沈着していることが確認される⁹⁾。

産生された MAG 抗体が神経線維に作用するためには、血液神経関門 (blood-nerve barrier: BNB) を通過して末梢神経内に到達する必要がある。しかし、これまで MAG ニューロパチー患者の BNB 破綻について検討された報告は少なく¹⁰⁾、MAG 抗体の BNB 通過機序は不明であった。そこで、MAG 抗体が BNB を通過する機序を解明できれば、MAG ニューロパチー患者に対する新たな治療法の発見につながると考えた。我々は、ヒト BNB 構成内皮細胞株と周皮細胞株の樹立に成功しており¹¹⁾¹²⁾、この2つの細胞からなる BNB *in vitro* モデルを用いて MAG 抗体の BNB 通過機序を明らかにし、MAG ニューロパチー患者の腓腹神経内で BNB を構成している微小血管の超微形態を観察した。

目的

MAG ニューロパチー患者血清が BNB に及ぼす影響を解析し、MAG ニューロパチー患者の腓腹神経内 BNB 構成内皮細胞の病理学的変化を明らかにすることを目的とした。

対象

MAG ニューロパチー 16 例，単クローン性免疫グロブリン血症に伴うニューロパチー (Polyneuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy of uncertain significance : MGUS) 8 例，筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) 10 例，健常者 (healthy control : HC) 10 例の血清を使用した。血清は 80°C で保存し，使用前に 56°C で 30 分間かけて非働化した。培養細胞は，我々の研究室で樹立した温度感受性 SV40T 抗原遺伝子を導入した不死化細胞株のヒト BNB 構成内皮細胞 (FH-BNB)¹¹⁾，周皮細胞株 (pericytes : PCT)¹²⁾ を使用した。細胞は 5%CO₂，95%空気で 33°C の湿潤なインキュベータで培養し，実験前に 37°C インキュベータで 48 時間培養させて使用した。当科で腓腹神経生検をした MAG ニューロパチー 2 名，ALS 2 名，慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: CIDP) 1 名の病理標本を用いて免疫組織化学的検討および電子顕微鏡観察を行った。

方法

1. 全 RNA トランスクリプトーム解析

MAG ニューロパチー患者 4 例，MGUS 患者 4 例，HC 4 例の 10%血清で FH-BNB を培養 (37°C，12 時間) し，RNeasy Mini Kit (Qiagen 社) を用いて FH-BNB から全 RNA を抽出し，mRNA を精製した。NEBNext Ultra II RNA Library Prep キット (New England Biolabs 社) および NEBNextplex Oligos for Illumina を用いて mRNA を断片化し，逆転写した。生成物を AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter 社)

を用いて精製し，Illumina Next-seq DNA シークエンサー上で配列決定した．CLC Genomics Workbench ソフトウェアプログラム (ver.8.01; Qiagen) を用いてマッピングし，JMP Pro ver.15.0.0 ソフトウェアで経路分析を行い，Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen) を用いてパスウェイ解析をした¹³⁾．

2. ハイコンテンツイメージング解析

96 well plate (CELLSTAR®, Greiner 社) 上に FH-BNB を培養した．その後，10%患者血清で1時間培養した後に NF- κ B p65 の免疫染色を，24 時間培養した後に TNF- α の免疫染色をおこなった．免疫染色の工程は，4%パラホルムアルデヒド 15 分で固定し，0.3%Triton X-100 を 10 分作用させ，0.3%Triton X-100 を添加した 5%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) で 12 時間ブロッキングした後，一次抗体 [NF- κ B p65 モノクローナル抗体 (Novus 社) または TNF- α モノクローナル抗体 (Novus 社)] を作用させて，二次抗体 [Alexa Fluor 488, Thermo Fisher Scientific 社] を作用させた．In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare 社) を用いて，1 well 当たり 4 視野 (800~1000 細胞に相当) を撮影し，IN Carta 画像分析ソフトウェアプログラム (Cytiva 社) と In Cell Analyzer ソフトウェアプログラム (Cytiva 社) を用いて 3 回解析し，平均値を算出した．

3. 透過性解析

トランスウェルインサート 24 well (孔径:0.4mm, Corning 社) の管腔側に FH-BNB 細胞，反対側に周皮細胞株を 5 日間培養した．MAG ニューロパチー，MGUS，ALS 及び HC の 10%血清で管腔側の FH-BNB 細胞を 37°C で 24 時間培養し，管腔側に FITC-10kDa デキストラン蛍光 (Sigma-Aldrich 社) 又は FITC-IgG (Sigma-Aldrich 社) を添加した．管腔外培養液を FlexStation 3 Multi-Mode マイクロプレートリーダー (Molecular Devices 社) を用いて，490/520nm (吸収/発光) で蛍光シグナルを計算した．同様に，

IgM または抗 MAG 抗体の透過性を評価するために、10%血清で管腔側の FH-BNB を 24 時間インキュベートし、次に、管腔および管腔外の両培養液を回収し、EK-MAG anti-MAG Autoantibodies ELISA (BÜHLMANN Laboratories AG 社) または Human IgM ELISA Kit (Abcam 社) を用いて、IgM 濃度/抗 MAG 抗体を測定した。TNF- α 中和抗体による透過性変化を検討するために、MAG ニューロパチー患者 2 名、MGUS 1 名、HC 1 名の 10%血清に TNF- α 中和抗体 (R&D 社) を添加し、EK-MAG anti-MAG Autoantibodies ELISA (BÜHLMANN Laboratories AG 社) または Human IgM ELISA Kit (Abcam 社) を用いて、管腔側と管腔外培養液中の IgM 濃度/抗 MAG 抗体を測定した。

4. TNF- α の濃度測定

血清 TNF- α 濃度は、ELISA (Abcam 社) を用いて、プロトコールに従って測定した。

5. 免疫組織化学と超微形態解析

MAG ニューロパチー患者 4 名、ALS 患者 2 名および CIDP 患者 1 名のパラフィン包埋腓腹神経標本に対して免疫組織化学的検討を行った。切片を脱パラフィン化したのち、クエン酸緩衝液中で 98°C、10 分間加熱することにより抗原を賦活化した。一次抗体として抗 TNF- α 抗体 (1:50, Novus 社)、二次抗体として抗ウサギ IgG 抗体 (1:200, Alexa Fluor 488, Invitrogen 社) を用いて間接免疫蛍光法を実施した。エポキシ樹脂包埋試料からの 80nm 厚切片を酢酸ウラニルおよび酢酸鉛で染色し、電子顕微鏡観察を行った。

解析

統計解析はすべて Prism 7 (Graph Pad 社) を用いて行った。Student の t 検定 (両側検定) を使用し、多重比較には一元配置分散分析と Tukey の多重比較検定を用いた。P<0.05, P<0.01 および P<0.001 を統計

的に有意と判断した。

結果

1. 血清を作用させた FH-BNB 遺伝子発現変化のプロファイリングとパスウェイ解析

MAG ニューロパチー群 (n=4), MGUS 群 (n=4), HC 群 (n=4) の 10%血清を作用させた FH-BNB から、発現が亢進していた遺伝子を同定し、パスウェイ解析を行った。MAG ニューロパチー群は、HC 群 (図 1A, B) や MGUS 群 (図 1C, D) と比較してパスウェイ解析の中心に TNF- α と NF- κ B が検出された。

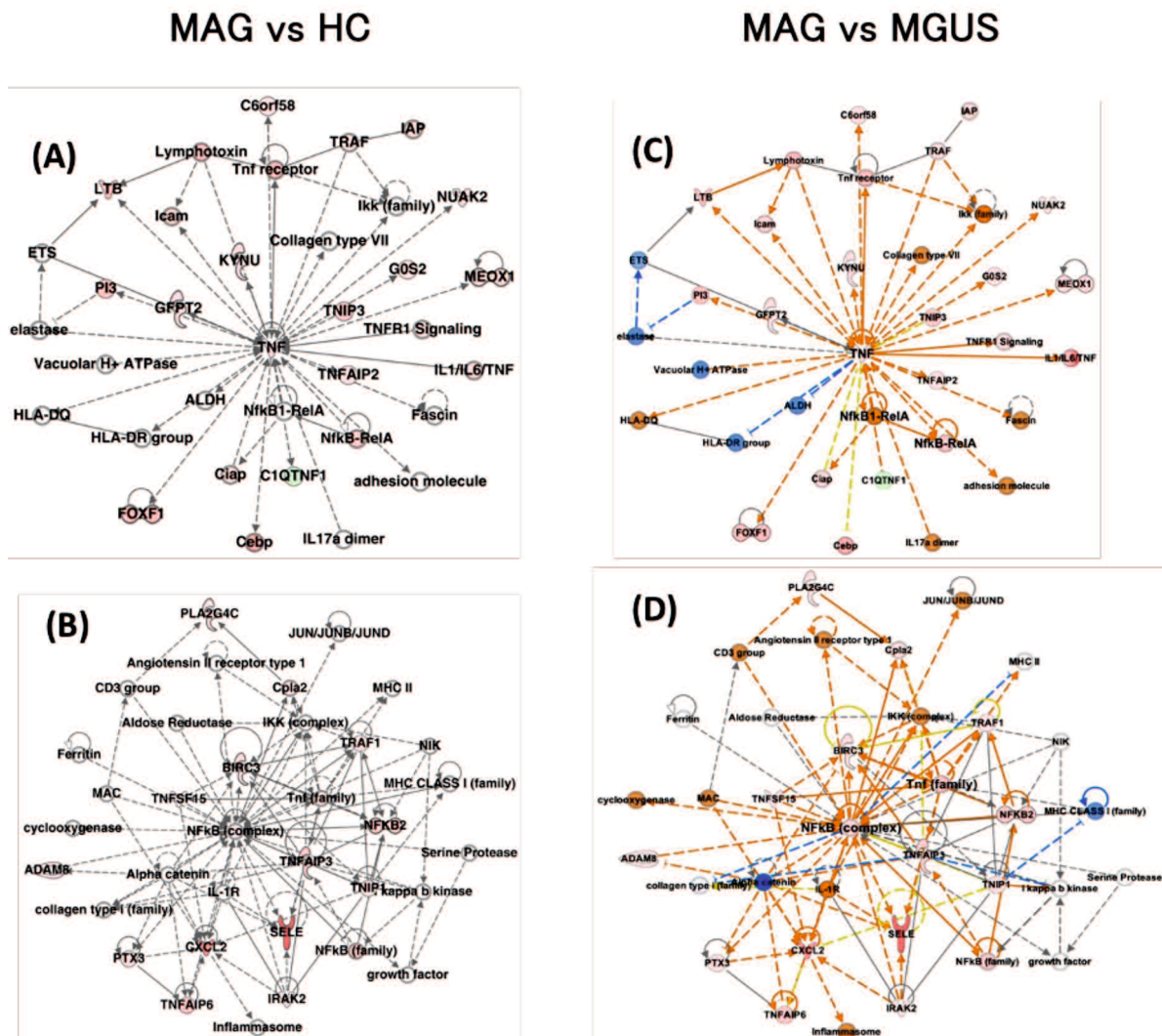


図 1. 血清を作用させた FH-BNB で発現が亢進していた遺伝子のパスウェイ解析

2. MAGニューロパチー患者血清はTNF- α およびNF- κ Bの増加を誘導した

全RNAトランスクリプトーム解析およびパスウェイ解析によってmRNAレベルで発現増加が確認されたデータが蛋白レベルで再現されるかを確認するために、FH-BNBにMAGニューロパチー群、MGUS群、ALS群、HC群の10%血清を反応させたのち、TNF- α とNF- κ Bの蛋白レベルの変化をハイコンテントイメージングシステムで解析した。FH-BNB中のTNF- α 量は、MGUS患者、ALS患者、HCと比較してMAGニューロパチー患者で有意に増加しており、NF- κ B p65核陽性細胞の割合もALS患者、HCと比較してMAGニューロパチー患者で有意に増加していた(図2A-C)。血清TNF- α 濃度については群間で有意差はなかった(図2D)。

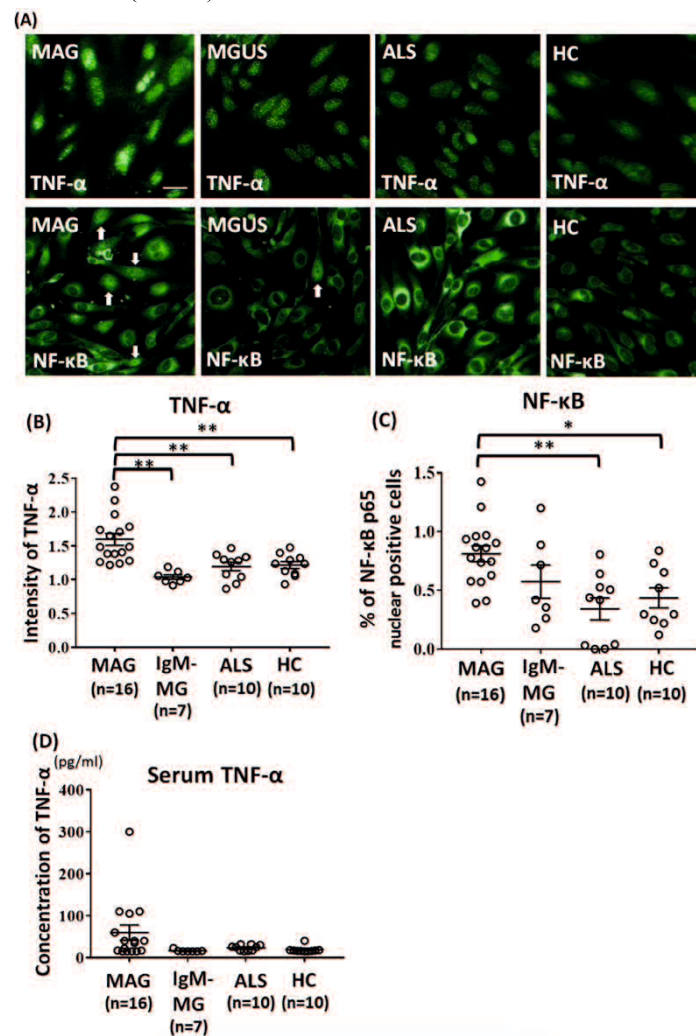


図2. MAGニューロパチー患者の血清曝露後のFH-BNBのTNF- α およびNF- κ Bの変化

(A) MAG ニューロパチー患者の 10%血清に曝露後の FH-BNB における TNF- α と NF- κ B p65 の免疫染色。写真は In cell analyzer 2000 で撮影した。Bar = 50 μ m。矢印は NF- κ B p65 陽性核を有する代表的な細胞を示す。(B)(C) MAG ニューロパチー (n=16), MGUS (n=8), ALS (n=10), HC (n=10) の 10%血清を FH-BNB に作用させ、ハイコンテンツイメージングシステムを用いて TNF- α を高発現した細胞と NF- κ B 核内移行細胞をカウントし、比較した。(D) 使用した血清中の TNF- α 濃度を測定し、比較した。P 値は一元配置分散分析に続いて Tukey の多重比較検定によって決定した。

3. IgM と MAG 抗体の BNB 透過性は MAG ニューロパチー患者血清を作用させることで増加した

FH-BNB と PCT を共培養した *in vitro* BNB モデルを用いて (図 3), 各患者と HC の 10%血清で FH-BNB を培養したのちに、10kDa デキストラン、IgG, IgM, MAG 抗体の透過性を比較した。10kDa デキストランと IgG の透過性には各群で有意差はなかった (図 4A, B) が、IgM の透過性と下部チャンバの MAG 抗体濃度については、ALS 群と HC 群と比較して MAG ニューロパチー患者群で有意に増加した (図 4C, D)。MAG 抗体の透過性の評価については、下部チャンバーにおける MAG 抗体価が検出限界を下回るサンプルが多く、MAG 抗体の透過性は解析できなかった。

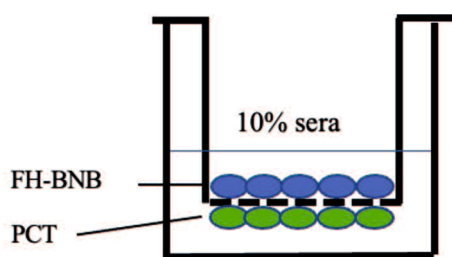


図 3. *in vitro* BNB 共培養モデル

24 ウェルのトランスウェルインサートの管腔側に FH-BNB, 反対側に PCT を培養し, *in vitro* BNB モデルを作製した。

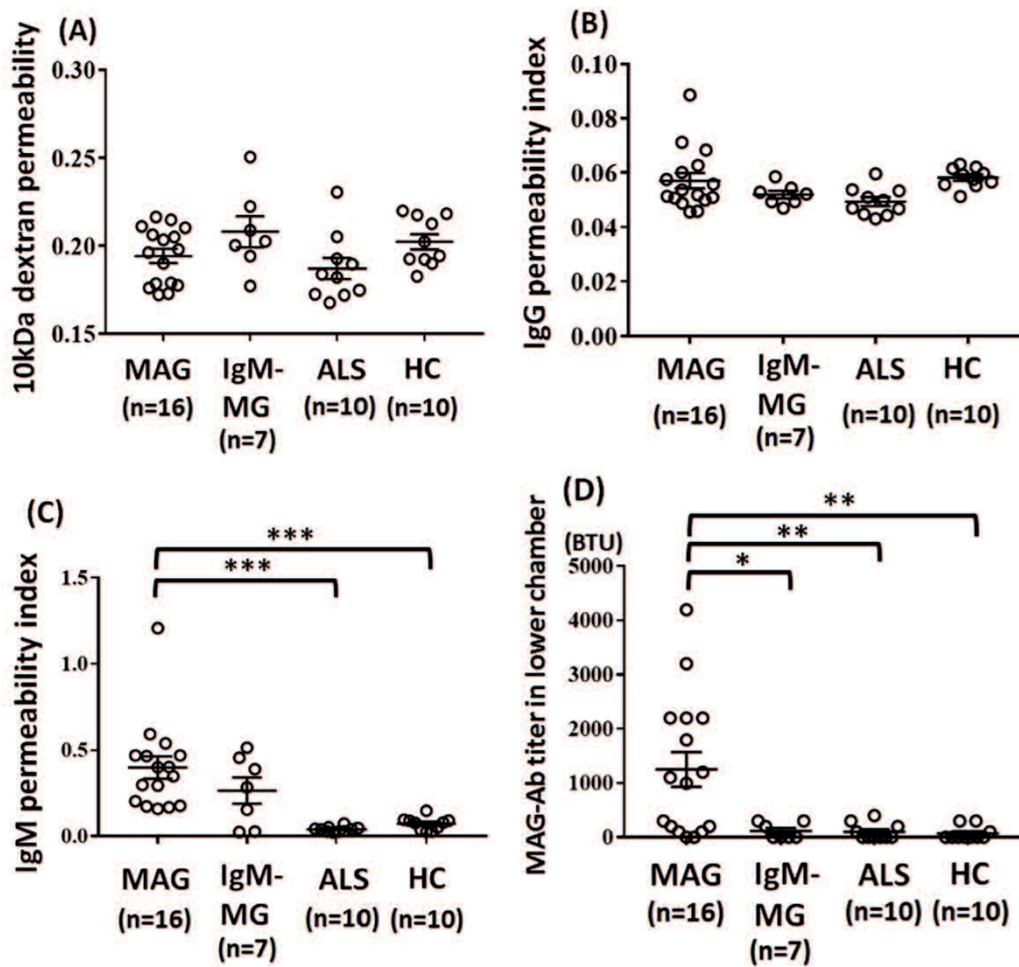


図4. 血清を作用させた in vitro BNB 共培養モデルの透過性変化

MAG ニューロパチー, MGUS, ALS, HC の個々の 10%血清を FH-BNB に作用させた. 10kDa デキストラン透過係数 (A), IgG 透過指数 (B), IgM 透過指数 (C), 及び下部チャンバーの MAG 抗体濃度 (D) を測定した. P 値は, 一元配置分散分析に続いて Tukey の多重比較検定を行うことによって算出した.

4. TNF- α 中和抗体は血清によって亢進した IgM と MAG 抗体の BNB 透過性を減弱させた

MAG 抗体の BNB 通過に TNF- α が影響しているか検討するために, MAG ニューロパチー 2 例, MGUS 1 例, HC 1 例の 10%血清に TNF- α 中和抗体を添加し, 透過性に変化が生じるか検討した.

TNF- α 中和抗体を添加した MAG ニューロパチー2 例では, IgM と MAG 抗体の透過性が有意に低下した (図 5 A,B). MGUS および HC では, TNF- α 中和抗体の有無で透過性に変化はみられなかった.

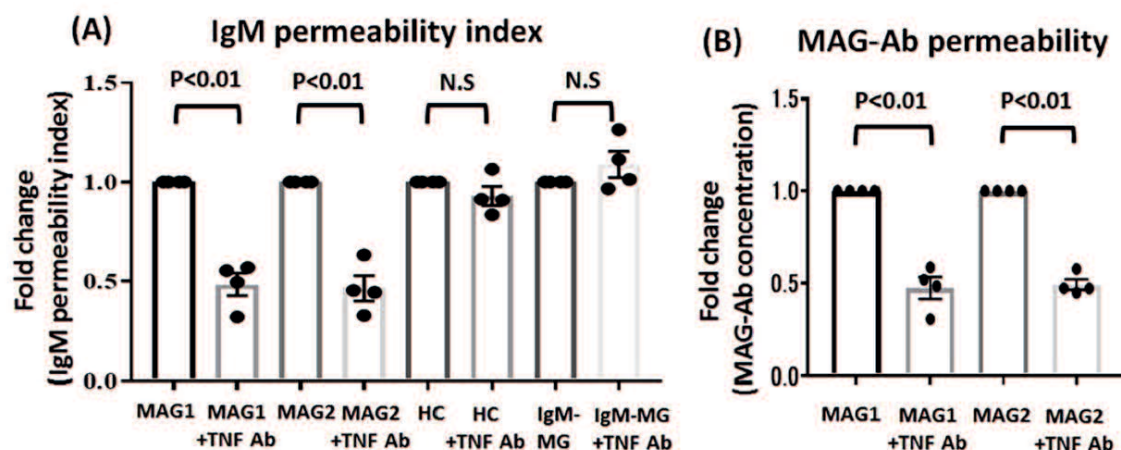


図 5. TNF- α 中和抗体による IgM および MAG 抗体の透過性変化

MAG ニューロパチー2 例, MGUS1 例, HC1 例に対して, *in vitro* BNB 共培養モデルを用いた TNF- α 中和抗体添加前後の透過性変化を示す. 各例の 10%血清を FH-BNB に作用させ, TNF- α 中和抗体の添加の有無による透過性変化を t 検定で検討した. MAG ニューロパチー例では TNF- α 中和抗体を添加することによって, IgM (A)と MAG 抗体 (B) 透過性を約 50%低下させた. MGUS と HC では, TNF- α 中和抗体による IgM と MAG 抗体の透過性変化はなかった.

5. MAG ニューロパチー患者の BNB 構管内皮細胞で TNF- α の発現亢進が観察された

MAG ニューロパチー患者 4 例, 非炎症性疾患の疾患コントロールとして ALS 患者 2 例, 炎症性ニューロパチーのコントロールとして CIDP 患者 1 例の腓腹神経生検標本に対して免疫組織化学的検討を行った. TNF- α の免疫染色では, ALS 例と CIDP 例の BNB 構成血管内皮細胞と比べて, MAG 抗体陽性ニューロパチー例の BNB 構成血管内皮細胞に TNF- α が高発現していた (図 6A). 電子顕微鏡による観

察では、MAG ニューロパチー患者の BNB 構成内皮細胞は肥大しており、内皮細胞間の密着結合は保たれている一方で (図 6B), 内皮細胞内に多くの小胞が観察される傾向があった (図 6C).

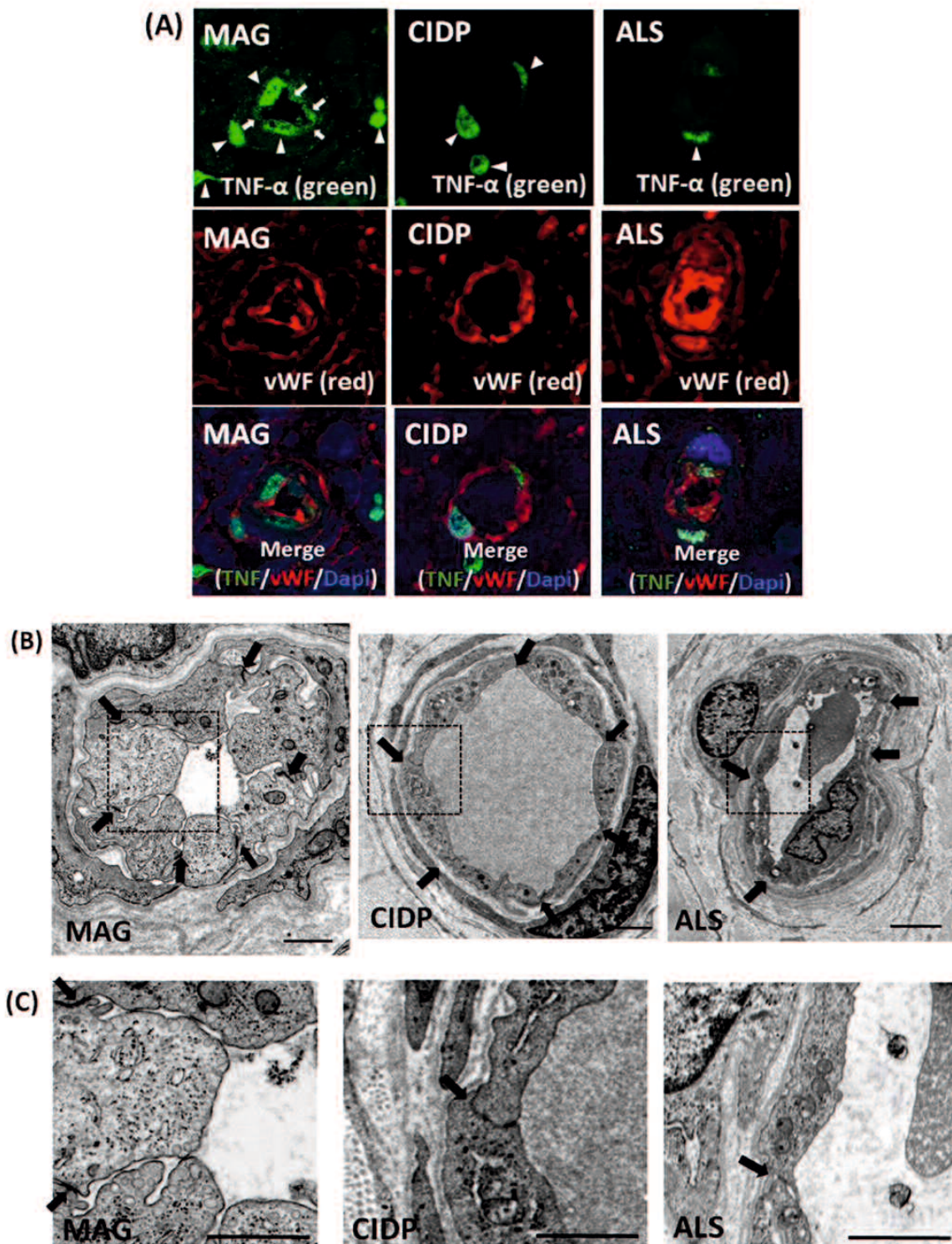


図 6. 腓腹神経生検標本の免疫組織化学的検討と超微形態の比較

(A) TNF- α の免疫染色. MAG ニューロパチー患者の腓腹神経内 BNB 構成血管内皮細胞には TNF- α が高発現している (矢印). CIDP 例と ALS 例では, TNF- α の染色性は非特異的に核に染まるのみであった (矢頭). 上段:TNF- α (緑色);中段: von willebrand factor (vWF)(赤色);下段:TNF- α (緑色)/vWF (赤色)/Dapi (青色). (B)(C) 電子顕微鏡写真. MAG ニューロパチー患者の生検標本では BNB 構成内皮細胞は肥大し, 内皮細胞間の密着結合は保たれており, ALS 例と CIDP 例と比較して細胞質内に多量の小胞が認められた. Bar = 1 μ m.

考察

MAG ニューロパチー患者の腓腹神経生検標本では髄鞘に MAG IgM 抗体が沈着しており⁹⁾, MAG 抗体陽性患者の IgM をネコに投与することで脱髄性末梢神経障害をきたすことが確認されていることから¹⁴⁾, MAG 抗体自体が病原性をもつと考えられている. しかし, 高分子量蛋白である IgM 抗体が BNB を通過する機序は不明であった. そこで, 我々は, MAG 抗体陽性ニューロパチー患者の末梢神経では BNB が破綻しているために, MAG 抗体が末梢神経内へ侵入できるという仮説をたてた. 本研究では, はじめに全 RNA のトランスクリプトーム解析を行い, MAG ニューロパチー患者の血清に曝露した FH-BNB では, MGUS や HC と比較して, 有意に TNF- α と NF- κ B の発現が亢進していることを明らかにした. 次に MAG ニューロパチー患者血清を作用させた FH-BNB で, MGUS 群, ALS 群, HC と比べて, TNF- α を高発現した内皮細胞と NF- κ B が核内移行した内皮細胞が増加していることを示した. BNB の透過性の検討では, *in vitro* BNB 共培養モデルに対して, MAG ニューロパチー患者血清を反応させることで, 10kDa デキストランと IgG 透過性を変化させることなく, IgM と MAG 抗体の透過性を有意に亢進させた. この透過性実験の結果から, IgM や MAG 抗体の分子量 (約 900kDa) は IgG (150kDa) や

10hDa デキストランの分子量よりも大きいことより、高分子量である IgM ないし MAG 抗体は、小分子の透過性増加を伴わず (BNB 透過性増加を伴わず)、BNB を通過していることを示している。MAG ニューロパチー患者血清に TNF- α 中和抗体を添加することによって、IgM および MAG 抗体の透過性が低下したことから、MAG 抗体の BNB 通過に TNF- α が重要な役割を担っていることが明らかとなった。今回使用した血清 TNF- α 濃度の群間比較に有意差がなかったことから、MAG ニューロパチー患者では、自己分泌 TNF- α が BNB 構成血管内皮細胞を活性化していると考えられた。既報告によれば、MAG ニューロパチー患者の血清 TNF- α は増加していない¹⁵⁾。今回の研究は、血清 TNF- α 濃度が MAG ニューロパチー患者で増加しないことを改めて示した。病理学的検討によって、MAG ニューロパチー患者では腓腹神経内 BNB 構成内皮細胞に TNF- α が高発現しており、BNB の密着結合は形態学的に保たれ、細胞質内に多数の小胞がみられた。以上の結果から、MAG ニューロパチー患者では、自己分泌 TNF- α によって BNB 構成内皮細胞が活性化され、MAG 抗体はトランスサイトosisを介して内皮細胞の細胞質内を通過していることが示唆された。

TNF- α は NF- κ B を活性化する主要な炎症誘発性サイトカインであり¹⁶⁾、NF- κ B の活性化が炎症性サイトカインおよび接着分子の発現を促進し、内皮細胞における LDL 受容体を介した LDL の受容体介在性トランスサイトosisを増加させることが報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾。また、TNF- α /NF- κ B シグナル伝達は内皮細胞における SGPG のアップレギュレーションを誘導する²²⁾。本研究では MAG ニューロパチー患者の腓腹神経内 BNB 構成内皮細胞に多くの小胞が存在していることが明らかになったことから、自己分泌 TNF- α および NF- κ B シグナルが SGPG の発現を刺激し、MAG 抗体が SGPG を介して小胞内に取り込まれる、受容体介在性トランスサイトosisによって BNB を通過するメカニズムが想定された

(図 7). 今後, MAG ニューロパチー患者血清に反応させた FH-BNB において, 小胞のアップレギュレーションに関する更なる解析が必要である.

TNF- α を阻害することによって MAG 抗体の BNB 透過性を減少させたことから, MAG ニューロパチー患者に TNF- α 阻害薬が有効であることを示唆される. これまで MAG ニューロパチーに対する TNF- α 阻害薬の有効性は確立されていないが, TNF- α 阻害薬が髄鞘に沈着する MAG 抗体を減少させることが期待される. 現在, MAG ニューロパチー患者に対する最も有効な治療法は CD20 モノクローナル抗体のリツキシマブであるが, 神経障害の改善が得られるのは患者の 30-50%程度にとどまる⁴⁾⁵⁾⁶⁾. リツキシマブの治療効果が乏しい理由の一つとして, すでに産生されている MAG 抗体の末梢神経への侵入を阻止することはできないことが挙げられる. 近年, リツキシマブと BCL2 阻害薬を含む化学療法との併用により, MAG ニューロパチー患者の治療反応性が改善することが報告された²³⁾. 今回の研究結果から, リツキシマブと TNF α 阻害剤の併用治療が, MAG 抗体の量を減少させ, 髄鞘への MAG 抗体の沈着を阻止することから, MAG ニューロパチー患者への新規治療戦略として有効である可能性がある.

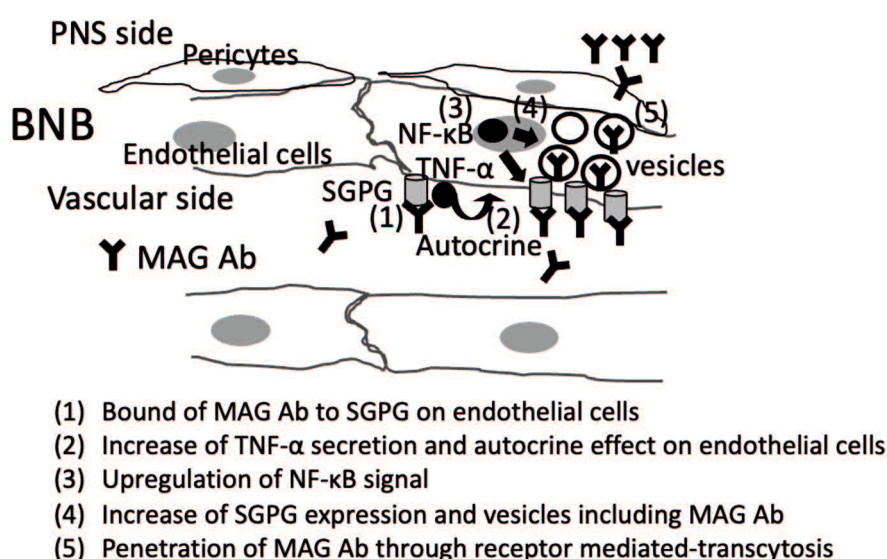


図 7. 本研究を踏まえた MAG 抗体の BNB 通過メカニズムの仮説

結語

本研究により、MAGニューロパチー患者では、自己分泌TNF- α によってBNB構成内皮細胞が活性化され、MAG抗体はトランスサイトシスを介してBNB構成内皮細胞質内を通過していることが示唆され、MAG抗体のBNB通過機序が解明された。

謝辞

本研究に際し、実験の遂行・データ分析・論文作成をご指導頂いた清水文崇先生、トランスクリプトーム解析にご協力いただきました渡邊健司先生、水上洋一先生、貴重な患者血清をご提供いただきました近畿大学医学部 脳神経内科 桑原基先生、楠進先生、実験の遂行・データ分析にご協力頂いた竹下幸男先生、前田敏彦先生、佐野泰照先生、古賀道明先生、本研究にあたり統括・ご指導を賜りました神田隆先生に深謝申し上げます。

参考文献

1. Dalakas MC. Pathogenesis and Treatment of Anti-MAG Neuropathy. *Curr Treat Options Neurol* 2010;12:71-83.
2. Steck AJ, Stalder AK, Renaud S. Anti-myelin-associated glycoprotein neuropathy. *Curr Opin Neurol* 2006;19:458-63.
3. Svahn J, Petiot P, Antoine JC, et al. Anti-MAG antibodies in 202 patients: clinicopathological and therapeutic features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2018;89:499-505.
4. Dalakas MC, Rakocevic G, Salajegheh M, et al. Placebo-controlled trial of rituximab in IgM anti-myelin-associated glycoprotein antibody demyelinating neuropathy. *Ann Neurol* 2009; 65: 286-93.
5. Lunn MP, Nobile-Orazio E. Immunotherapy for IgM anti-myelin-associated glycoprotein paraprotein-associated

- peripheral neuropathies. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; 10:CD002827.
6. Dalakas MC. Advances in the diagnosis, immunopathogenesis and therapies of IgM-anti-MAG antibody-mediated neuropathies. *Ther Adv Neurol Disord* 2018; 11: 1756285617746640.
 7. Schachner M, Bartsch U. Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin. *Glia* 2000; 29: 154-165.
 8. Quarles RH. Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *J Neurochem* 2007;100:1431-48.
 9. Gabriel JM, Erne B, Bernasconi L, Tosi C, Probst A, Landmann L, et al. Confocal microscopic localization of anti-myelin-associated glycoprotein autoantibodies in a patient with peripheral neuropathy initially lacking a detectable IgM gammopathy. *Acta Neuropathol* 1998;95(5):540-6.
 10. Kanda T, Usui S, Beppu H, Miyamoto K, Yamawaki M, Oda M. Blood-nerve barrier in IgM paraproteinemic neuropathy: a clinicopathologic assessment. *Acta Neuropathol* 1998;95:184-92.
 11. Abe M, Sano Y, Maeda T, et al. Establishment and characterization of human peripheral nerve microvascular endothelial cell lines: a new in vitro blood-nerve barrier (BNB) model. *Cell Struct Funct* 2012;37:89-100.
 12. Shimizu, F., Sano, Y., Abe, M.A., Maeda, T., Ohtsuki, S., Terasaki, T., Kanda, T. Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *J. Cell. Physiol* 2011; 226, 255-266.
 13. Kohno M, Kobayashi S, Yamamoto T, et al. Enhancing calmodulin binding to cardiac ryanodine receptor completely inhibits pressure-overload induced hypertrophic signaling. *Commun Biol* 2020;3:714.

14. Willison HJ, Trapp BD, Bacher JD, Dalakas MC, Griffin JW, Quarles RH. Demyelination induced by intraneural injection of human antimyelin-associated glycoprotein antibodies. *Muscle Nerve* 1988;11:1169-76.
15. Stork ACJ, Rijkers GT, Vlam L, et al. Serum cytokine patterns in immunoglobulin m monoclonal gammopathy-associated polyneuropathy. *Muscle Nerve* 2019;59:694-698.
16. Liu ZG. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res* 2005;15:24-7.
17. Pan W, Kastin AJ. Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier. *Prog Neurobiol* 2007;83:363-74.
18. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2017;2:17023.
19. Zhong L, Simard MJ, Huot J. Endothelial microRNAs regulating the NF-kappaB pathway and cell adhesion molecules during inflammation. *FASEB J* 2018;32:4070-4084.
20. Mussbacher M, Salzman M, Brostjan C, et al. Cell Type-Specific Roles of NF-kappaB Linking Inflammation and Thrombosis. *Front Immunol* 2019;10:85.
21. Zhang Y, Yang X, Bian F, et al. TNF-alpha promotes early atherosclerosis by increasing transcytosis of LDL across endothelial cells: crosstalk between NF-kappaB and PPAR-gamma. *J Mol Cell Cardiol* 2014;72:85-94.
22. Dasgupta S, Silva J, Wang G, Yu RK. Sulfoglucuronosyl paragloboside is a ligand for T cell adhesion: regulation of sulfoglucuronosyl paragloboside expression via nuclear factor kappaB signaling. *J Neurosci Res* 2009;87:3591-9.
23. Briani C, Visentin A, Castellani F, et al. The BCL2 Inhibitor Venetoclax Plus Rituximab Is Active in MYD88

Wild-Type Polyneuropathy With Anti-MAG Antibodies. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2022; 9: e1181.