

アストロサイト由来の免疫抑制因子による EAE の治療 II; 組織学的解析と ligand の検索。

分担研究者 原 英夫¹⁾

共同研究者 田平 武²⁾

研究要旨

多発性硬化症の治療法の開発のために、PLP 反応性 T 細胞にアポトーシスを誘導するアストロサイト由来の因子 (astrocyte-derived immune suppressor factor ; AdIF) をクローニングした。昆虫細胞を用いた蛋白合成系を用いて recombinant AdIF 蛋白を作成し、EAE 発症 C57BL/6J マウスに対する治療効果を検索したところ、rAdIF を投与したマウスでは、コントロールと比べ EAE score の著明な改善が認められた。中枢神経系の組織学的検索では、コントロール群において CD4+T 細胞の浸潤と CD11b 陽性細胞が認められたが、治療群では軽微であった。さらに rAdIF が結合する T 細胞表面のレセプター (ligand) を同定した。

研究目的

これまで我々は、マウス・アストロサイト細胞株 G26-24 を用いて、インターフェロンガンマ処理と未処理の各 cDNA より subtracted cDNA ライブラリーを作成し、PLP 反応性 T 細胞にアポトーシスを誘導する因子として、未知の遺伝子の astrocyte-derived immune suppressor factor (AdIF) cDNA をクローニングした。recombinant AdIF protein を作成し、EAE 発症マウスに対する治療効果と中枢神経系におけるリンパ球やミクログリアに関して、免疫組織学的に詳細に検索した。

さらに rAdIF が結合する細胞表面のレセプター (ligand) を同定する試みを行った。

研究方法

リコンビナント蛋白の作成には、昆虫細胞 (Schneider (S2) cells) を用いた蛋白合成系を採用し、Drosophila expression system を用いた。C57BL/6J マウスに MOG ペプチドで免疫し、7 日後に recombinant AdIF (rAdIF) を静注及び腹腔内投与した。コントロール群には同量の PBS を投与した。その後、発症数・EAE score の変動などを観察した。

投与群とコントロール群の脳・脊髄へのリンパ球浸潤・細胞表面マーカー (CD3, CD4, CD8, CD19, CD86, CD11b, CD11c) などを免疫組織学的に検索した。

rAdIF に対する ligand (receptor) を検索した。マウス脾細胞からリンパ球を分離し、in vitro で ConA 刺激した後、RIPA バッファーでリンパ球の蛋白を精製した。recombinant AdIF protein と共に 4 °C で混和後、抗 rAdIF 抗体で免疫沈降

1) 国立長寿医療センター研究所血管性痴呆研究
部室長

2) 国立長寿医療センター研究所所長

した。沈降蛋白を SDS-PAGE gel にて泳動し、ゲルを染色して幾つかのバンドが得られた。それぞれのバンドをゲルより切り出し、trypsin で処理後、TOF-Mass にて解析し、Mascot Search にてその蛋白を同定した。

研究結果

1. MOG ペプチドで免疫した C57BL/6J マウスは、約 15 日頃より EAE を発症し、症状は約 2 週間持続し緩解した。rAdIF を静注及び腹腔内投与した B6 マウスでは、コントロールと比べ EAE score および Cumulative clinical score の著明な改善（コントロール：24.17 ± 13.38, 治療群：4.20 ± 5.35）が認められた。

脊髄の免疫組織学的検索では、コントロール群において CD3+CD4+T cell の浸潤が認められた。また CD86 陽性細胞も増加していた。一方治療群では、リンパ球の浸潤は軽度であった。CD11b は、コントロール群において陽性細胞が白質に多く認められ、治療群では少数であった。両群とも CD11c 発現細胞は少量であった。

2. rAdIF が結合する T 細胞表面のレセプター (ligand) を同定した。Mascot Search の結果、2～3 の蛋白は、細胞内に多量に含まれる actin, keratin であった。特異的と考えられた蛋白は、uPAR/Ly6/CD59/snake toxin-receptor superfamily に属する新規の細胞表面レセプターと考えられた。

結論

AdIF は、アストロサイト由来の未知の因子で、

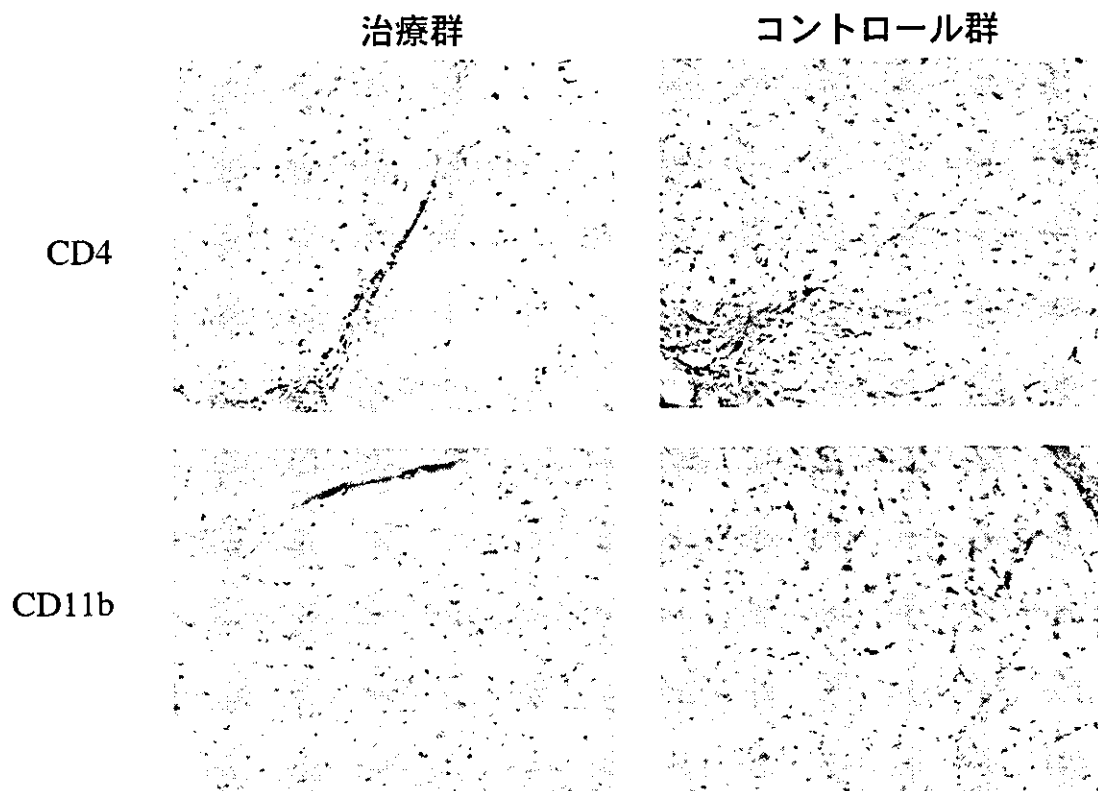
PLP 反応性 T 細胞にアポトーシスを誘導する蛋白として同定した。昆虫細胞を用いた蛋白合成系を用いて recombinant AdIF protein を作成した。C57BL/6J マウスに MOG ペプチドで免疫し EAE を発症させ、recombinant AdIF を投与すると有意に症状が緩和された。組織学的には、コントロール群において CD3+CD4+T 細胞の浸潤、CD86 陽性細胞の増加、CD11b 陽性ミクログリアの増加が認められた。治療群では、CD3+CD4+T 細胞の浸潤は少なく、CD86 陽性細胞・CD11b 陽性ミクログリアの増加も認められなかった。

AdIF 蛋白の ligand として、免疫沈降法/TOF-Mass 解析の結果、細胞表面レセプターの uPAR / Ly6 / CD59 / snake toxin-receptor superfamily に属する新規の蛋白の可能性が示唆された。この uPAR/Ly6/CD59 receptor superfamily は、GPI linker で細胞表面に結合する蛋白で、シグナル伝達にはさらに別の蛋白が関与していると考えられ、今後詳細に解析する。

健康危険情報 ; なし

知的財産権の出願・登録状況

アストロサイト由来の免疫抑制因子 (astrocyte-derived immune suppressor factor, AdIF) の同定。出願番号 2004-277307、平成 16 年 9 月 24 日



	コントロール	治療群(rAdIF 投与群)
CD3	++	±
CD4	++	±
CD8	±	-
CD19	+	-
CD86	++	±
CD11b	++	±
CD11c	-	-

中枢神経系の自己免疫性炎症性脱髄における

ミッドカインの役割について

分担研究者 錫村明生¹⁾

共同研究者 王金岩¹⁾, 金世杰¹⁾, 川ノ口潤¹⁾, 張桂琴¹⁾, 久能玲子¹⁾,
菌部佳史¹⁾, 八幡泉¹⁾, 竹内英之¹⁾, 水野哲也¹⁾
村松壽子²⁾, 村松喬²⁾

研究要旨

ミッドカイン (Midkine, MK) は発癌、炎症、修復の過程で強く発現され、癌の進行、炎症の進展、組織修復に関与している分泌タンパク質である。最近、MK 抑制による炎症性病態の抑制効果が報告されている。今回、我々は、神経系の自己免疫性炎症における MK の役割を明らかにするため、MK ノックアウト (MK^{-/-}) マウスと野生型 (Wt) マウスを用いて実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導し、その差異を検討した。MK^{-/-}マウス EAE 群では、臨床症状は顕著に抑制され、MK 投与により抑制効果は消失した。MK^{-/-}マウス EAE 群では、末梢リンパ節の CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞が有意に増加しており、Th2 優位へのシフトが認められた。以上から、MK 抑制が多発性硬化症の新たな治療戦略となりうる可能性が示唆された。

研究目的

ミッドカイン (Midkine, MK) は塩基性アミノ酸とシステインに富む分子量 13kD のヘパリン結合性分泌タンパク質であり、発癌、炎症、修復の過程で強く発現され、細胞の生存や移動を促進し、癌の進行、炎症の進展、傷害を受けた組織の修復に深く関与していると考えられている¹⁾。中枢神経系ではグリア細胞が産生する MK が神経細胞に作用することが明らかとなっている。最近、MK 抑制による炎症性病態の抑制効果が報告されている^{2, 3)}。MK はマクロファージや好中球などの炎症性細胞の遊走を促進することから、中枢神経系の炎症性病態にも関与すると想定されるが、詳細は

不明である。今回、我々は、神経系の自己免疫性炎症における MK の役割を明らかにするため、MK ノックアウトマウスと野生型マウスを用いて実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導し、その差異について検討した。

研究方法

MK ノックアウト (MK^{-/-}) あるいは野生型 (Wt) の C57BL/6 マウスに MOG₃₅₋₅₅ ペプチド 200μg を完全フロイドアジュバントと共に皮下接種後、百日咳毒素の腹腔内投与にて EAE を誘導し、臨床スコアを経時的に記録した。EAE 発症各時期に末梢リンパ節、中枢神経系に浸潤した単核球を抽出し、フローサイトメトリーにより CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞について解析した。さらに、分離したミクログリアによ

¹⁾名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野

²⁾名古屋大学大学院医学系研究科生物化学講座

る、抗原提示関連分子発現および炎症性メディエーター産生能の差異について検討した。

研究結果

MK^{-/-}マウスでは Wt マウスに比して EAE 発症率には差は見られなかったものの、臨床症状は顕著に抑制された (Fig. 1 左)。MK^{-/-}マウス群への皮下埋め込みカプセルによる MK 持続投与により、この抑制効果は消失した (Fig. 1 右)。各々から分離したミクログリアについて、サイトカイン、ケモカイン、一酸化窒素などの炎症性メディエーター産生能の有意な差異は認められなかったが、MK 投与による抗原提示関連分子 CD40、B7-1 の発現増加が認められた。末梢リンパ節における CD4⁺/CD8⁺T 細胞比には有意な差異が認められなかったが、制御性 CD4⁺CD25⁺T 細胞は MK^{-/-}マウスにおいて有意に増加していた (Fig. 2)。また、ex vivo での T 細胞誘導の検討で、MK^{-/-}マウスにおいて Th2 優位のシフトが認められた。

結論

MK^{-/-}マウスでは EAE 発症が顕著に抑制された。MK^{-/-}マウスでは、制御性 T 細胞の増加と Th2 優位へのシフトが生じており、これらにより EAE 発症が抑制されたと考えられた。さらなる詳細な機序については現在検討中である。MK 抑制が多発性硬化症の新たな治療戦略となりうる可能性が示唆された。

文献

1. Muramatsu, T. Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J. Biochem.* 132, 359-371. 2002.

2. Horiba, M. et al. Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 105, 489-495.2000.

3. Maruyama K, et al. Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis. Rheum.* 50, 1420-1429. 2004.

健康危険情報：なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

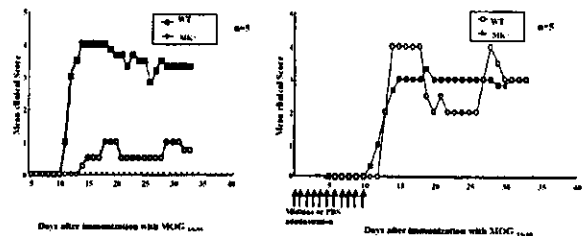


Fig. 1. Suppression of EAE Onset on MK^{-/-} Mice Ablated by Administration of Midkine.

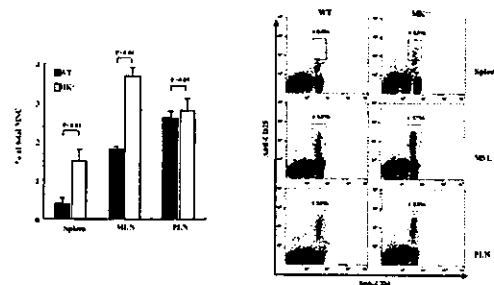


Fig. 2. Increased Activation of CD4⁺CD25^{high} T Cells in Peripheral Lymph Nodes after MOG₃₅₋₅₅ Immunization in MK^{-/-} Mice.

活性化 microglia により誘導される neuritic beading は 神経細胞機能不全の一表象である

分担研究者 錫村明生

共同研究者 竹内英之, 水野哲也, 張桂琴, 王金岩, 川ノ口潤,
久能玲子, 菌部佳史, 八幡泉, 金世杰

研究要旨

各種の神経細胞傷害の初期表象として神経突起のビーズ様変性 (neuritic beading) が知られているが、その本体は未解明である。そこで、マウス初代 microglia と初代神経細胞との共培養系を用いて、活性化 microglia による neuritic beading 誘導の機序について解明を試みた。Neuritic beading の形成は神経細胞死に先行し、ミトコンドリア呼吸鎖抑制による神経細胞内 ATP の急激な低下と相関した。また、neuritic beading には破綻した細胞骨格タンパクや神経突起輸送タンパクが共存していた。NMDA 受容体の阻害により neuritic beading および神経細胞傷害はほぼ完全に抑制された。以上から、活性化 microglia から放出されるグルタミン酸が NMDA 受容体を介して神経細胞のミトコンドリア呼吸鎖を抑制し、それによるエネルギー欠乏が神経突起輸送障害を惹起し、神経細胞死に至らしめるものと考えられ、エネルギー欠乏の初期症状としての神経突起輸送系の障害が、形態学的に neuritic beading として顕在化するものと考えられた。NMDA 受容体阻害により活性化 microglia を介した神経細胞変性の抑制効果が期待できるものと考えられた。

研究目的

外傷、虚血、てんかん、加齢、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症といった各種神経疾患において、神経突起にビーズ様変性 (neuritic beading) が出現することが知られている。従来、神経細胞傷害の病理学的所見と考えられてきたが¹⁾、その本体は未解明である。また、これらの疾患では、神経傷害部位に活性化 microglia が認められ、神経細胞傷害との関連が推測されている。これまでに我々は、活性化 microglia による神経細胞傷害の初期に neuritic beading が形成されることを示した²⁾。そこで、活性化 microglia

名古屋大学環境医学研究所神経免疫分野

による neuritic beading 誘導の機序について解明を試みた。

研究方法

(1) C57BL/6 マウス初代混合 glia 細胞より分離した microglia と、大脳皮質初代神経細胞との共培養系を用いて、活性化 microglia による神経細胞傷害を以下の方法で経時的に解析した。

位相差顕微鏡下にて neuritic beading の定量を行った。神経細胞死については propidium iodide 色素排除法および TUNEL 染色で評価した。ミトコンドリア機能については、MTS assay・ミトコンドリア膜電位測定・細胞内 ATP 測定・呼吸鎖活性測定で評価した。形態学的評価として、ミトコンドリア、細胞骨格タ

ンパク、神経突起輸送タンパクの蛍光免疫染色を用いて共焦点レーザー顕微鏡下で解析した。

(2) 活性化 microglia から放出される NO・グルタミン酸・炎症性サイトカインなど各種傷害因子の阻害剤、Ca イオンキレーター、caspase 阻害剤、細胞骨格重合剤による効果について検討し、neuritic beading を誘導する活性化 microglia 由来の因子の同定を行った。

研究結果

Neuritic beading の形成は神経細胞死に先行し、ミトコンドリア呼吸鎖抑制による神経細胞内 ATP の急激な低下と相関した。形態学的解析から、Neuritic beading は、破綻した細胞骨格タンパクや神経突起輸送タンパクと共存することが示され、神経細胞内エネルギー欠乏に伴う神経突起輸送系の破綻が示唆された。TUNEL 染色陽性細胞はほとんど認められず、caspase 阻害剤でも抑制されなかったことから、活性化 microglia による神経細胞死は apoptosis ではなく necrotic な特徴を有するものと考えられた。

活性化 microglia から放出されるグルタミン酸が主たる神経細胞傷害因子であり、NMDA 受容体の阻害により neuritic beading および神経細胞傷害はほぼ完全に抑制された。

結論

活性化 microglia から放出されるグルタミン酸が NMDA 受容体を介して神経細胞のミトコンドリア呼吸鎖を抑制し、それによるエネルギー欠乏が神経突起輸送障害を惹起し、神経細胞死に至らしめるものと考えられた。エネルギー欠乏の初期症状としての神経突起輸送系の障害が、形態学的に neuritic beading として

顕在化するものと考えられた。つまり、neuritic beading はエネルギー欠乏による神経細胞機能不全の初期表象であることが示唆され、また、NMDA 受容体阻害により活性化 microglia を介した神経細胞変性の抑制効果が期待できるものと考えられた。

文献

1. Ramon y Cajal S: Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebrae. 1909.
2. Banno M, et al. The radical scavenger edaravone prevents oxidative neurotoxicity induced by peroxynitrite and activated microglia. Neuropharmacology 48: 283-290, 2005.
3. Takeuchi H, et al. Neuritic beading induced by activated microglia is an early feature of neuronal dysfunction toward neuronal death by inhibition of mitochondrial respiration and axonal transport. J Biol Chem 280: 10444-10454, 2005.

健康危険情報：なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

ウイルス性脱髄モデルを用いた免疫性脱髄関連分子の探索

分担研究者 大原義朗¹⁾

共同研究者 朝倉邦彦¹⁾, 紺谷靖英¹⁾, 高野真澄¹⁾

研究要旨

これまで Theiler ウイルスで脱髄をきたす株でのみ産生される L*蛋白と L 蛋白の上流にある Leader Peptide (L 蛋白)の zinc-binding motif の持続感染・脱髄における重要性を組換えウイルスを用いて検討してきた。昨年度および本年度はさらに詳細に脱髄発症の機構を解明するため、脳と脾臓の2つの臓器の cDNA ライブラリーを Bacterial two-hybrid system を用いて L 蛋白と反応する宿主側遺伝子の検索を行った。その結果、L 蛋白の標的分子の候補として clathrin-associated protein AP50 がいずれのライブラリーからも同定された。さらに組み換え蛋白の発現系による詳細な検討により、in vitro, in vivo のいずれにおいても AP50 と L 蛋白の interaction が確認された。AP50 は細胞膜からのエンドサイトーシスに関与する分子で、免疫系の重要な negative regulator である CTLA-4 の turnover に関連することが分かっている。このことから、L 蛋白は AP50 を介した CTLA-4 のエンドサイトーシスを抑制することにより、宿主のウイルスに対する CTL 反応を抑制し持続感染に寄与している可能性が考えられた。

研究目的

多発性硬化症 (MS) の原因の一つとしてウイルス感染の可能性が古くから示唆されている。我々はこれまで、Theiler ウイルスを用いた MS 実験モデルにおいてその病態の解明と治療法の開発について取り組んできた。Theiler ウイルス DA 株は、マウス脊髄に持続感染して免疫性脱髄を引き起こすことから MS の動物モデルとして用いられている。昨年度、脱髄の機序を解明する目的で脱髄に密接に関与すると考えられている Theiler ウイルス由来の L 蛋白、L*蛋白の標的分子の探索を two-hybrid system を用いて行った。Theiler ウイルスはマクロファージ系の細胞に持続感染して脱髄を引き起こすと考えられていることから、マウス脾臓 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、L 蛋白、L*蛋白とも数十種類の分子がその候補として検出された。本年度は、まず L 蛋白に焦点を絞り、別の臓器の cDNA ライブラリーを用いて脱髄発症に関与する分子の絞り込みおよび同定を行った。

研究方法

昨年度と同じく迅速かつ効率的な cDNA スクリーニングを目的として、Yeast two-hybrid system に代わり Bacterial two-hybrid system を用いた。DA 株全長 cDNA を含むプラスミドより、L 蛋白 cDNA を PCR により増幅し、bait プラスミドベクターに挿入した。持続感染・免疫性脱髄の場となる中枢神経系の cDNA ライブラリーとしてラット脳 cDNA ライブラリーを、L 蛋白 cDNA を組み込んだ bait プラスミドベクターによりスクリーニングを行った。

まず、bait プラスミドベクターと target プラスミドベクター (cDNA ライブラリー) により大腸菌を形質転換 (cotransformation) し、抗生剤 (calbenicillin) による選択で 1 次スクリーニングを行った後、陽性クローンをさらに、 β -galactosidase 遺伝子と X-gal を利用した 2 次スクリーニングを行った。最終スクリーニングで陽性の target プラスミドベクターに含まれる cDNA の 5' 末端の塩基配列を決定して相同性検索を行い、遺伝子の同定を行うと同時に、昨年度脾臓 cDNA ライブラリーのスクリーニングによりすでに得られている L 蛋白の標的分子と重複する遺伝子の絞り込みを

¹⁾ 金沢医科大学微生物学講座

行った。

2つの cDNA ライブラリーから重複して得られたクローンはその完全長の塩基配列を決定し、L 蛋白とその分子との会合を *in vitro* および *in vivo* での解析により確認した。*in vitro* での解析は大腸菌を用いて発現させた組み換え蛋白を用いて Far-western blotting を行い、*in vivo* については、Mammalian two-hybrid assay system を用いて培養細胞内での蛋白間の会合をルシフェラーゼの発現により確認した。

研究結果

L 蛋白を組み込んだ bait ベクターを用いたラット脳 cDNA ライブラリーのスクリーニングでは、最終的に 32 個のクローンが得られた。これらのクローンに含まれる cDNA の塩基配列の一部(5'末端)を決定して、マウス脾臓 cDNA ライブラリーのスクリーニングによりすでに得られているクローンとの相同性検索を行った結果、1 つの遺伝子が完全に塩基配列が一致した。この遺伝子の全長の塩基配列を決定した結果、この遺伝子がコードする分子は clathrin-associated protein AP50 であることが明らかとなった。

L 蛋白と AP50 の組み換え蛋白を発現・精製して行った Far-western blotting により、*in vitro* でのこれらの蛋白の会合が確認され、さらに培養細胞 (BHK-21, 293T) を用いた Mammalian two-hybrid assay system においてもこれらの蛋白の会合が *in vivo* で確認された。

考察

持続感染・脱髄に重要な役割を果たしていると考えられている Theiler ウイルス L 蛋白と相互作用を示す標的分子として、clathrin-associated protein AP50 が2つの異なる cDNA ライブラリーよりクローニングされた。さらに詳細な検討で *in vitro*、*in vivo* のいずれの解析においても L 蛋白と AP50 の会合が証明された。AP50 は clathrin 被覆小胞を形成する AP-2 複合体の構成要素であり、細胞膜からのエンドサイトー

シスに関与する分子である。最近の研究で、この AP50 は免疫系の重要な negative regulator である CTLA-4 の turnover に関連することが分かっており、また CTLA-4 は様々なウイルス感染症や自己免疫において重要な役割を果たすことが示されている。このことから、L 蛋白は AP50 と結合して、活性化 T 細胞表面に発現した CTLA-4 のエンドサイトーシスを抑制することにより、宿主のウイルスに対する CTL 反応を抑制し持続感染している可能性が考えられた。今後このウイルス性脱髄における L 蛋白、AP50、CTLA-4 の役割が明らかになり、MS との関連が示唆されているウイルス、とくにヘルペスウイルスで同様の機能を持つ蛋白が見出されれば、MS におけるウイルスの果たす役割を解明する一助となる可能性がある。

結論

Theiler ウイルス由来の蛋白で、脱髄発症に関連すると考えられる L 蛋白の標的分子として clathrin-associated protein AP50 が同定された。ウイルスの持続感染および脱髄の機構を解明するうえで重要な分子と考えられた。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得:なし

実用新案登録:なし

重症筋無力症のクリーゼ予測因子に関する検討

分担研究者 吉川弘明¹⁾²⁾

共同研究者 古川 裕²⁾、岩佐和夫²⁾、山田正仁²⁾、佐藤勝明³⁾、
高守正治⁴⁾

研究要旨

重症筋無力症 (MG) におけるクリーゼは時に致命的となることがあるため、病初期にその発症を予測し、いわゆる high risk patient を抽出することは MG 診療を行う上で重要と思われる。我々は当科で経験した MG 症例について retrospective に解析し、クリーゼ発症群と非発症群の 2 群について、MG 発症年齢、性別、初診時重症度、初診時アセチルコリンレセプター (AChR) 抗体価、胸腺組織、他の自己免疫疾患の有無、悪性腫瘍の有無について検討した。その結果、初診時重症度においてはクリーゼ発症群の方が非発症群に比べ有意に高く、胸腺腫を合併する例が多かった。胸腺腫合併例ではクリーゼ発症群では非発症群に比べ初診時 AChR 抗体価が高かった。その他の項目については 2 群間に有意差は認めなかった。クリーゼ発症の予測因子として、初診時点での重症度および胸腺腫合併の有無が、また胸腺腫合併例においては AChR 抗体価が重要と思われた。

研究目的

重症筋無力症 (MG) におけるクリーゼの発症を病初期に予測することは MG 診療を行う上で極めて重要と思われる。我々は当科で経験した MG 症例について解析し、クリーゼ発症を予測する因子について検討した。

研究方法

1982 年から 2004 年までに当科に入院した MG 140 例 (平均発症年齢 44.0 (範囲:3-83) 歳、男性 49 例、同 43.7 (5-76)

歳、女性 91 例、同 44.1 (3-83) 歳) を対象とし、診療録を元に retrospective に調査した。クリーゼ発症群 (18 例) と非発症群 (122 例) の 2 群について、MG 発症年齢、性別、初診時重症度、初診時アセチルコリンレセプター (AChR) 抗体価、胸腺組織、他の自己免疫疾患の有無、悪性腫瘍の有無について検討した。重症度は Wolfe らの MG-ADL score¹⁾ を用いて評価した。球症状の重症度は MG-ADL score の評価項目のうち嚥下・咀嚼・構音の 3 項目の合計点数で表した。胸腺組織は正常、過形成、胸腺腫に大別した。

1) 金沢大学保健管理センター

2) 金沢大学大学院脳老化・神経病態学

3) 金沢医科大学病理病態学

4) 金沢西病院脳神経センター

研究結果

1. クリーゼ発症群の特徴

- a) クリーゼ発症時平均年齢
44.9 歳 (範囲: 11-80 歳)
- b) クリーゼ発症前イベント
- | | |
|------------|-----|
| 胸腺摘除術 | 8 例 |
| 感染 | 3 例 |
| ステロイド開始、増量 | 3 例 |
| 放射線療法後 | 1 例 |
| 精神的ストレス | 1 例 |
| 特定できるものなし | 4 例 |
- (重複例あり)

2. クリーゼ発症群と非発症群の比較

クリーゼ発症群と非発症群の比較を表 1. に示した。MG 発症年齢、性別、初診時 AChR 抗体価、MG 以外の自己免疫疾患合併率、悪性腫瘍合併率には 2 群間で明らかな差を認めなかった。一方、初診時重症度においてはクリーゼ発症群の方が非発症群の方に比べ有意に高く、球症状について比較した場合においてもクリーゼ発症群の方が有意に高かった。またクリーゼ発症群では胸腺腫を合併する例が多かった。

胸腺腫合併例におけるクリーゼ発症群と非発症群の比較を表 2. に示した。胸腺腫合併例においてはクリーゼ発症群では非発症群に比べ初診時 AChR 抗体価が高かった。また初診時重症度においてはクリーゼ発症群の方が非発症群に比べて有意に高く、球症状のスコアも高かった。

考察

MG におけるクリーゼが、症状、特に球症状が強く胸腺腫合併例に多いことは経験

表 1. クリーゼ発症群と非発症群の比較

	クリーゼ発症群 (18 例)	クリーゼ非発症群 (122 例)
MG 発症年齢 (歳)	44.1 (11-79) [†]	43.5 (3-83) [†]
性別		
男性	6	43
女性	12	79
初診時重症度		
MG-ADL score (総点数) *	9.4 (8.3-10.6) [†]	4.4 (4.0-4.9) [†]
(球症状) *	3.2 (2.6-3.9) [†]	0.9 (0.7-1.2) [†]
初診時 AChR 抗体価 (nM)	126.2 (47.0-205.5) [†]	48.3 (15.1-81.5) [†]
胸腺組織 [‡]		
胸腺腫	12	28
過形成	5	40
正常	1	29
胸腺腫合併率 (%) *	66.7	28.9
MG 以外の自己免疫疾患 合併率 (%)	22.2	11.5
悪性腫瘍合併率 (%)	16.7	5.7

* p<0.05 † 胸腺摘除術は全 140 例中 115 例に施行
‡ 範囲 § 95%信頼区間

表 2. 胸腺腫合併例におけるクリーゼ発症群と非発症群の比較

	クリーゼ発症群 (12 例)	クリーゼ非発症群 (28 例)
MG 発症年齢 (歳)	48.3 (11-79) [†]	52.8 (3-83) [†]
性別		
男性	6	10
女性	6	18
初診時重症度		
MG-ADL score (総点数) *	8.3 (6.8-9.8) [†]	4.3 (3.3-5.3) [†]
(球症状) *	2.8 (2.1-3.6) [†]	0.9 (0.4-1.4) [†]
初診時 AChR 抗体価 (nM) *	73.0 (38.2-107.7) [†]	26.3 (2.5-50.0) [†]

* p<0.05 † 範囲 ‡ 95%信頼区間

的にはよく知られていたところであるが、今回クリーゼ発症群と非発症群の 2 群に分けて検討することでより具体的に示すことができた。

今回検討したクリーゼ発症例のうち約半数は胸腺摘除術に関連したものであった。胸腺摘除術に関連したクリーゼの検討についてはいくつかの報告があるが²⁾³⁾、発症の

予測因子として術前の球症状の有無、術前のクリーゼの有無、AChR 抗体価が 100 nmol/L 以上、が重要とされる。今回の我々の検討でもクリーゼ発症群では球症状が非発症群に比べ有意に強く、AChR 抗体価も高い傾向にあり、これまでの報告を支持する結果となった。

今回の検討ではクリーゼを発症した 18 例中 12 例に胸腺腫の合併を認めた。胸腺腫合併 MG の約半数にリアノジン受容体 (RyR) 抗体を認め、その抗体価と臨床重症度が相関するとされる⁴⁾。また横紋筋抗体や Titin 抗体など胸腺腫に関連するとして知られる抗体がクリーゼ発症に関与している可能性もある。これらの抗体の有無とクリーゼ発症の関係については今後検討する予定である。

我々は以前に MG の長期治療について検討し、胸腺腫合併 MG においてステロイドの減量が困難であることを示した。MG の免疫抑制療法としてはステロイド以外に azathioprine⁵⁾ や tacrolimus⁶⁾ の有用性が報告されている。臨床重症度の高い例や胸腺腫合併例については、これらの薬剤を組み合わせたより有効で副作用の少ない免疫抑制療法も考慮すべきと思われる。

結論

クリーゼ発症の予測因子として、初診時点での重症度および胸腺腫合併の有無が重要である

文献

1) Wolfe GI et al. Myasthenia gravis

activities of daily living profile. Neurology 1999; 52: 1487-9

2) Watanabe A et al. Prognostic factor for myasthenic crisis after transsternal thymectomy in patients with myasthenia gravis. J Thorac Cardiovasc Surg 2004; 127: 868-76

3) Kawaguchi N et al. Treatment and outcome of myasthenia gravis: retrospective multi-center analysis of 470 Japanese patients, 1999-2000. J Neurol Sci. 2004; 224: 43-47

4) Mygland A et al. Ryanodine receptor antibodies related to severity of thymoma associated myasthenia gravis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1994; 57: 843-6

5) J. Palace et al. A randomized double-blind trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis. Neurology 1998; 50: 1778-1783

6) Yoshikawa H et al. Low-dose tacrolimus for myasthenia gravis. J Clin Neurosci. 2002; 9: 627-628

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

重症筋無力症の難治症例に対する cyclosporinA (ネオーラル) の 使用経験

分担研究者 藤井 義敬

共同研究者 鈴木 恵理子、小林 昌玄

研究要旨

重症筋無力症(MG)の病態には胸腺の関与があり、症状の安定を得ることが困難な症例もある。当科における全身型MGの治療指針は抗コリンエステラーゼ阻害剤、手術療法で効果がなければステロイド剤内服を行い、日常生活に支障があれば入院ステロイドパルス療法を施行する。パルス療法が頻回に及び日常生活の著名な障害があればシクロスポリン、アザチオプリン、プレドニンの免疫抑制剤 3 剤少量併用療法を試みている。今回私達は日常生活に著名な障害のみられた 2 例にシクロスポリン、イムラン、プレドニンの 3 剤併用療法を施行した。経過中サンディミュンからネオーラルへ薬剤切り替えとなったが、切り替えに伴い症状の悪化や副作用の増強などのトラブルを生じることなく、良好な症状のコントロールが得られたため報告する。

研究目的

重症筋無力症(MG)の病態には胸腺の関与があり、全身型MGに対しては拡大胸腺摘出術が標準治療の 1 つである。しかし、手術療法のみで症状改善をみる症例ばかりではなく、術後も抗コリンエステラーゼ阻害剤や免疫抑制剤が必要な症例が多い。今回私達は重症で頻回の入院ステロイドパルスを要した症例に抗コリンエステラーゼ阻害剤、ステロイド剤に cyclosporinA(ネオーラル)を併用することにより症状の安定が得られたMGの 2 例を経験したので報告する。

【症例 1】22 歳 女性

<現病歴>H3 年 1 月眼瞼下垂、構音障害、嚥下困難等出現、近医で MG と診断された。H3 年 7 月胸腺摘出術施行するが完全寛解せ

ずクリーゼも起こし、胸腺摘出の再手術も施行された。その後 2 ヶ所の病院で、抗コリンエステラーゼ阻害剤とステロイド剤の内服を行うが症状不安定のため、H12 年 1 月当院紹介受診となった。<家族歴>父が Huntington 舞蹈病。<来院時検査所見>体重 52kg、anti-AChR 抗体価 72.6nmol/l (0.2 以下)、MGFA の臨床分類で Class IIIb であった。<経過>症状不安定のため H12. 3. 13~3. 15 ステロイドパルス療法施行し、3. 17 マイテラーゼ 30mg、サンディミュン 100mg、イムラン 100mg、プレドニン 10mg 隔日の免疫抑制剤 3 剤少量併用療法開始した。H12. 6. 21 白血球低値続いたためイムラン 75mg に減量したが症状悪化し、7. 19 再び 100mg に増量した。症状改善なく、サンディミュンを H12. 9. 17 に 150mg、さらに H13. 1. 24 に 200mg に増量した。その後症状は徐々に改善、H13. 7. 11 イムラン中止した。

名古屋市立大学 第 2 外科

H13.8.8 サンディミュンからネオーラルに薬剤切り替えとなった。H13.9.5 ネオーラル 250mg に増量、11.28 イムラン 100mg で再開したが、H15.11.12 pre crisis となり、ステロイドパルス療法施行した。ネオーラルへの切り替えに伴い症状の悪化や副作用の増強、トラフ値の著明な変動は認めなかった。その後は症状徐々に安定し、現在マイテラーゼ 10mg、ネオーラル 250mg、イムラン 100mg、プレドニン 10mg 隔日内服により MGFA 分類 IIa、日常生活に支障なく、軽労働可能でコントロール良好である。

【症例 2】 51 歳 男性。

<現病歴>H7.7月上旬から右眼瞼下垂出現、MG 疑われ H7.7.17 当科紹介受診となった。画像上 thymoma を認め手術目的で 7.26 入院となった。<既往歴>18 歳 Appendectomy、44 歳 両側気胸（保存的治療）<入院時検査所見>体重 50kg、anti-AChR 抗体価 15.7nmol/l、MGFA 分類 Class I、テンシロンテスト（+）であった。<経過>（下図参照）MG 合併胸腺腫正岡 III 期と診断し、H7.8.8 拡大胸腺胸腺腫摘出術施行、組織所見では B3 type、II 期胸腺腫であった。8.29 ~total 50Gy の radiation 施行、眼瞼下垂、複視続くため 8.30~マイテラーゼ 30mg、9.19~プレドニン 10mg 隔日内服開始となった。しかし、MG 症状は徐々に悪化するため、マイテラーゼ 60mg、プレドニン 40mg 隔日投与にまで増量し、11.21 にはメスチノン 120mg も追加した。一旦症状安定し、マイテラーゼ 45mg、プレドニン 20mg 隔日にまで減量したが再び増悪したため両剤増量し、H10.1月に2回、3月に1回各々3日間ステロイドパルス療法施行した。H10.4.3

マイテラーゼ 30mg、サンディミュン 100mg、イムラン 50mg、プレドニン 20mg 隔日の免疫抑制剤 3 剤少量併用療法開始した。その後サンディミュンは 150mg まで増量となった。ネオーラルに切り替えとなったが、切り替えに伴い症状の悪化、副作用の増強、トラフ値の著明な変動は認めなかった。最高値 110 あった anti-AChR 抗体価も現在は 10 前後と低値で落ち着いており、ネオーラル 100mg、イムラン 100mg、マイテラーゼ 30mg、プレドニン 10mg 隔日投与で MGFA 分類 IIb、建設作業員として社会復帰し、症状は安定している。

考察

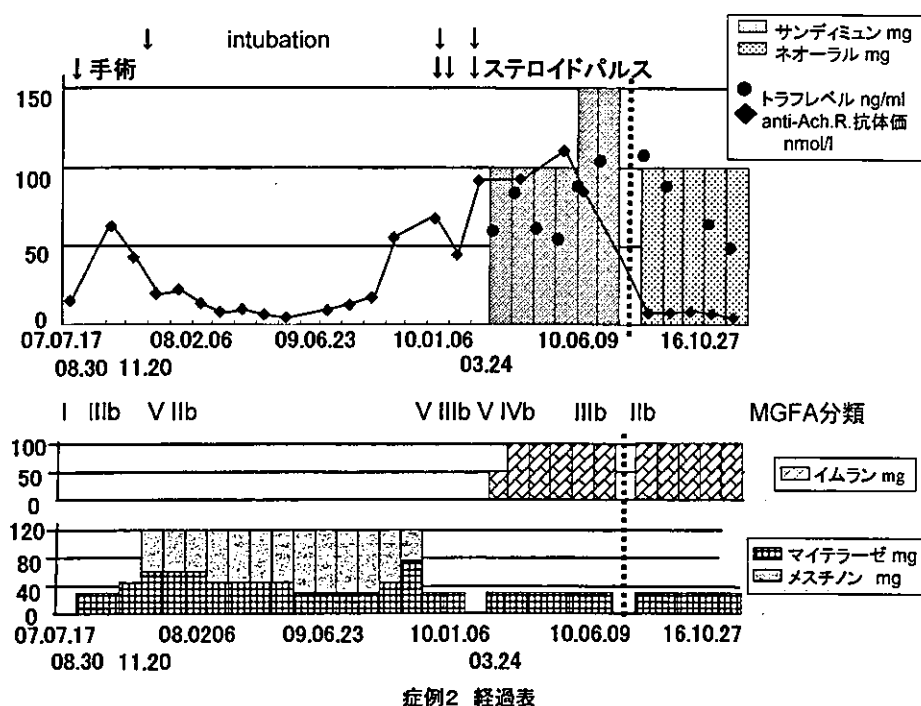
cyclosporinA(サンディミュン、ネオーラル)は FK506 と同様の作用機序をもち、活性化 T 細胞の細胞内 cyclosporin 結合蛋白 (cyclophyrin) に結合しカルシニューリンの活性化を抑制する。その結果 NFAT の核内移行を抑制し、最終的に IL-2 をはじめとするサイトカインの発現を抑制する。全身型 MG の cyclosporin と placebo を用いた randomized double-blind placebo-controlled study で cyclosporin 群の方が MG 臨床症状の改善と anti-Ach. R. 抗体価の有意な減少がみられたという報告がある。サンディミュンは脂溶性薬剤であるため、吸収に胆汁を必要とし、胆汁酸分泌量や食事の影響を受けやすく個体内、個体間で吸収のバラツキが生じた。ネオーラルはこのような背景を克服するべく開発されたマイクロエマルジョン製剤で安定した吸収が得られる。副作用としては腎障害、多毛、中枢神経症状などがある。副作用予防に投与量は血中薬物濃度(トラフ値:朝の内服前、

およそ投与 12 時間後) を参考に決定する。FK506 が H12 年 9 月に胸腺摘出術後のステロイド薬治療でコントロールできない難治 MG に対して保険適応がなされたが、cyclosporinA は保険適応外である。

まとめ

今回の症例では症例 1 で多毛を認める以外副作用を認めず、2 例とも cyclosporinA (ネオーラル) を投与することにより

anti-AChR 抗体価が低下し、症状の安定が得られた。症例 1 では cyclosporinA を増量することにより 100~150nmol/l のトラフ値を維持でき、症状の安定が得られた。症例 2 では cyclosporinA 投与によりステロイド剤の減量が可能であり (40mg 隔日→10mg 隔日内服)、また anti-AChR 抗体価も著名に低下し、50~100nmol/l のトラフ値で病状のコントロールが得られた。



文献

1. 青山 晃治ら:シクロスポリンが著効した悪性胸腺腫をともなう重症筋無力症の一例. 臨床神経 38:465-467, 1998
2. 小西 哲郎:重症筋無力症と免疫抑制療法. Annual Review 神経 2003:67-75, 2003
3. 重症筋無力症治療ガイドライン. 神経治

療学 20(4):486-501, 2002

4. 重症筋無力症の治療-2003-. 神経内科 59(3):221-275, 2003
5. Tindall RSA etc.:A clinical therapeutic trial of cyclosporine in myasthenia gavis. Ann NY Acad Sci 681:539-551, 1993

重症筋無力症のシグナル解析

分担研究者 糸山泰人¹⁾

共同研究者 小野寺宏¹⁾, 齋藤龍史¹⁾, 田郷英昭¹⁾, 鈴木靖士¹⁾, 松村輔二²⁾,
近藤 丘²⁾, 大内将弘³⁾, 清水雅行³⁾

研究要旨

重症筋無力症(MG)の免疫異常における胸腺の影響については不明な点が多く、胸腺摘出術により MG 患者の免疫動態がどのように変化するかも解明されていない。そこで、末梢血の T 細胞依存性抗体産生能をケモカイン CXCR5 発現から、また MG 胸腺の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて正常胸腺と比較した。CXCR5 陽性 CD4 T 細胞 (TFH) は未治療 MG 患者で有意に増加しており、また重症例および AchR 抗体高値例で有意に増加していた。治療後 TFH は徐々に減少しており、MG では T 細胞依存性抗体産生系が変調しており治療により正常化に向かうことが示された。MG 過形成胸腺と正常胸腺をマイクロアレイで比較した結果、神経筋接合部関連遺伝子の発現異常は無く、アポトーシス関連分子の発現も正常であった。このことから、MG 過形成胸腺では細胞死関連システムや神経筋接合部関連抗原の提示に関する量的な異常の無いことが明らかになった。しかし、MG 胸腺で発現レベルが変化しているサイトカインやケモカインが見いだされ病態への関与について今後の検討が必要と考えられた。

研究目的

重症筋無力症(MG)の免疫異常における胸腺の影響については不明な点が多く、胸腺摘出術により MG 患者の免疫動態がどのように変化するかについても解明されていない。そこで、末梢血の T 細胞依存性抗体産生能をケモカイン CXCR5 発現から、また MG 胸腺の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて正常胸腺と比較した。

2) 東北大学医学部呼吸器外科
3) 仙台医療センター心臓血管外科
研究方法

健常者と MG 患者の末梢血リンパ球におけるケモカイン受容体 CXCR5 発現率を FACS にて測定した。MG 症例では治療前と胸腺摘出後1ヶ月以内(急性期)および6ヶ月以上(慢性期)とを区別して解析した。

MG 患者の胸腺のシグナル異常を遺伝子発現異常の観点から解析するために、過形成胸腺と正常胸腺(小児)をペアとして2ペア設定してマイクロアレイにより検討し

1) 東北大学医学部神経内科

た (Agilent whole human genome 約 37000 遺伝子を解析)。

研究結果

末梢血 T_H細胞における CXCR5 発現

リンパ組織の B 領域において B 細胞の抗体産生を制御する follicular B helper T 細胞 (T_{FH}) は CXCR5 陽性の CD4⁺T 細胞として同定できる。末梢血における T_{FH} 頻度は治療前の MG 患者において (合併する胸腺異常の病理像にかかわらず) 対照群と比較して有意に増加していた。胸腺摘出術後急性期 (<1 ヶ月) には T_{FH} の頻度はさらに増加するが、術後慢性期には徐々に減少し術後 6 ヶ月以降の慢性期では正常レベルに回復していた。術後の症状改善および抗アセチルコリン受容体抗体価の減少と T_{FH} 減少との間には統計学的に有意な関連性が認められた。尚、MG 患者の末梢血における成熟 B 細胞 (CXCR5 陽性) の頻度は胸腺摘出前後のいずれの時期においても正常群と差がなかった

MG 過形成胸腺における遺伝子発現

正常の胸腺は思春期以後には徐々に退縮して脂肪組織と置き換わっていく。そのため DNA マイクロアレイ解析のコントロールに age-match させた胸腺を用いると、MG 胸腺と脂肪組織との mRNA 発現量を比較することになって MG 胸腺特異的な遺伝子発現異常が検出できなくなることが危惧された。そこで本研究では胸腺機能の活発な

小児胸腺と過形成胸腺との pair を設定して検討した。この結果、CD4, CD8, CD3 の遺伝子発現量は pair1, pair2 とともに変動が 2 倍以内に収まっており、“胸腺”間の遺伝子発現という当初の目的が達成されていると考えられた。発現が 2 倍以上増減した遺伝子については、pair1 で過形成胸腺で発現が増加した遺伝子が 1098 であり減少した遺伝子が 360 認められた。pair2 では発現増加遺伝子が 1504、減少遺伝子が 398 観察された。両 pair とともに過形成胸腺で発現が 2 倍以上増加した遺伝子は 694、減少した遺伝子は 107 観察された。3 倍以上増加した遺伝子は 269、減少した遺伝子は 10 観察された。胸腺上皮では年齢と共にメタロチオネイン関連遺伝子の発現が増加することが知られているが、本研究でも過形成 MG 胸腺では metallothionein 1B, 1E, 1J, 1K, 1L, 2A の発現が著増していた。アセチルコリン受容体 (すべてのサブユニットについて) や MuSK, Agrin 遺伝子の発現には変化が認められなかった。CCL2 等多くのケモカイン遺伝子の発現が過形成胸腺で増加していた。また fos をはじめとして種々の転写関連遺伝子の発現の変動が観察された。アポトーシスに関連する bcl-2 や bax の発現には差がなかった。

考察

MG では T 細胞依存性抗体産生系が変調しており治療により正常化に向かうことが示された。TFH は術後一過性に増加するため、胸腺摘出術後のクリーゼや症状悪化

に關与している可能性が示唆された。MG 重症度や AchR 抗体価と TFH 頻度が有意に相關したことから、MG の病態に CXCR5 を介したシグナル異常が關与している可能性が高いと考えられる。今後、CXCR5 シグナルの制御による治療について検討が必要である。

MG 過形成胸腺と正常胸腺をマイクロアレイで比較した結果、神経筋接合部関連遺伝子の発現異常は無く、アポトーシス関連分子の発現も正常であった。このことから、MG 過形成胸腺では細胞死関連システムや神経筋接合部関連抗原の提示に関する量的な異常の無いことが明らかになった。しかし、MG 胸腺で発現レベルが変化しているサイトカインやケモカインが見いだされ病

態への關与について今後の検討が必要である。

結論

1. 治療前の MG 患者の末梢血では B 細胞の抗体産生を制御する follicular B helper T 細胞を介した機能に変調していることが示唆された。
2. MG 胸腺（過形成胸腺）では種々の免疫関連遺伝子の発現が変化していた。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

コンプリメンタリーペプチドモノクローナル抗体による重症筋無力症患者血清中の idiotype 抗体の測定—第2報—

分担研究者 荒賀 茂¹⁾

共同研究者 佐久間 研司²⁾、中野 俊也²⁾、楠見 公義²⁾、田原 知幸³⁾、
中島 健二²⁾

研究要旨

重症筋無力症 (MG) は、骨格筋の acetylcholine receptor α -subunit (AChR α) に対する自己抗体により発症する。今回この自己抗体のエピトープ AChR α の 61-76 のコンプリメンタリーペプチドに対するモノクローナル抗体をさらに 2 つ作成し、MG 患者血清中の自己抗体の測定を行った。対象は MG42 例と正常対照群の 37 例である。正常対照群の idiotype 抗体値である $0.166 \pm 0.067 \mu\text{g/ml}$ より、 $\text{mean} + 3\text{SD}$ ($0.368 \mu\text{g/ml}$) を正常上限値として検討を行った。Seronegative MG8 例では idiotype 抗体はすべて陰性であったが、seropositive MG34 例中 14 例で陽性であった。親和性の異なるコンプリメンタリーペプチド抗体は、エピトープをターゲットとしたオーダーメイド治療としての有用な手段となりうる。

研究目的

昨年度重症筋無力症 (MG) のエピトープ AChR61-76 に対するコンプリメンタリーペプチド感作により得られたヒト抗体 (KM02, IgG1, k) が、患者血清中の Idiotype 抗体を認識することを報告した。今回、同様の方法で親和性の異なるコンプリメンタリーペプチド抗体を作成し、患者血清中の Idiotype 抗体の検出を試みた。

研究方法

1. コンプリメンタリーペプチド抗体の合成: ヒトの α -AChR での 61-76 に対するアミノ酸配列に対するコンプリメンタリーペプチドの N 末に Cystein 残基を加えたペプチドを合成した。そのアミノ酸配列 (RhCA61-76) は、Cys-His-Ile-Val-Val- Lys-Gln-Pro-Ile-Try-Ile-Val-Ile-Ala-Thr-His-Tyr である。これに NHS-Esters-Maleimide crosslinker を用いて、KLH および bovine Albumin (Alb) のカップリングを行った。KLH カップリングペプチドは感作用に、Alb カップリングペプチドは最終ブーストと抗体

測定用に用いた。

2. RhCA61-76 感作: MPLTM+TDM

(Corixa) を使い、KLH coupling RhCA61-76 の emulsion を作成した。得られた emulsion で 10 週令オスの KMTM マウスに感作を行った。感作量は $20 \mu\text{g}$ /マウスで、皮下に $100 \mu\text{l}$ 、腹腔内に $100 \mu\text{l}$ 投与した。抗体価の推移を見ながら、合計 3 回の感作を行った。十分な抗体が得られた時点で、Alb-RhCA61-76 の $10 \mu\text{g}$ の静注により最終ブーストを行った。

3. mAb 抗体の作成: 最終ブースト後 3 日後に摘脾を行い、脾細胞を回収した。これを Sp2/0 細胞との fusion を PEG で行い、HAT 含有 DMEM 培地で培養を行った。抗体価のスクリーニングには、抗原として Albumin-RhCA61-76 を用い、HAT selection を行った。クローン化陽性細胞は、HT 含有 DMEM で培養処理後に通常 DMEM 培地で培養した。2 つのクローン陽性細胞 (KM15 IgG4 κ ; KM34 IgG1 κ) を得た。

4. mAb 抗体の精製: クローン化した mAb は無血清培地 (Hybridoma-SFM) で培養を行い、培養上清を抗体精製用とした。培養上清は、AKTA での MEP HYPERCEL カラムで精製を行った。

-
- 1) 藤井政雄記念病院
2) 鳥取大学医学部脳神経内科
3) キリンビール株式会社・医薬カンパニー 医薬探索研究所創薬グループ

5. mAb のビオチン化：2mg の mAb を 10mM periodate で酸化後に EZ-Link™ Biotin-Hydrazide (Pierce) に結合させた。
6. mAb 抗体による idiotype 抗体の回収：streptavidin (4μg/ml) 100μl を 96well ELISA plate に coating を行い、引き続き同量の biotin-coupling mAb を固相化した。StartBlock blocking buffer (Pierce) で blocking 後に T-PBS (PBS, 0.05% Tween-20) で 10 倍希釈した患者血清 100μl を duplicate で 4℃, overnight で反応させた。T-PBS で 10 回洗浄後、200mM Glycine-HCl, pH2.5) 100μl, 10 分反応させて、idiotype 抗体を溶出させた。
7. ELISA による IgG の定量：溶出した idiotype 抗体は sandwich ELISA 法により IgG の定量を行った。固相部分にヤギ抗ヒト IgG (gamma specific) と反応部に peroxidase labeled ヤギ抗ヒト IgG (Fab') で測定した。測定感度は 1.5μg/ml ~ 1.5ng/ml である。
8. MG 患者 42 例 (男性 13 例、女性 29 例) と正常対照群 37 例 (男性 15 例、女性 22 例) で検討を行った。

研究結果

1. ELISA での affinity および、等電点電気泳動の解析より、新たに作成した KM15, KM34 が KM01, KM02 とは異なるエピトープを認識することを示した。特に同じサブクラスをもつ KM34, KM02 が異なる等電点を示し、かつその affinity に差が見られることより、認識エピトープレベルに違いがあると考えられた(図1)。
2. ELISA による affinity の解析では、KM01=KM02>KM34>KM15 の順の affinity を示した。
3. 正常対照群の IgG 量の平均値+3SD を cutoff として、つまり 0.368mg/ml 以上を陽性例を判定した。
4. MG42 例のうち 14 例で陽性であった。陽性症例はすべて AChR 抗体陽性例であり、陰性症例では detect されなかった。

考察

混合mAb 抗体での idiotype 抗体の検出率は、前回 KM02 のみでの検出率と比較して、

変化は見られなかった。つまり、KM02 で陰性であった群は、混合モノクローナル抗体を使用しても陽性転化は見られなかった。おそらく AChR61-76 エピトープを認識する自己抗体に関して、これら mAb での affinity に差があっても、認識には基本的に差がないと考えられた。

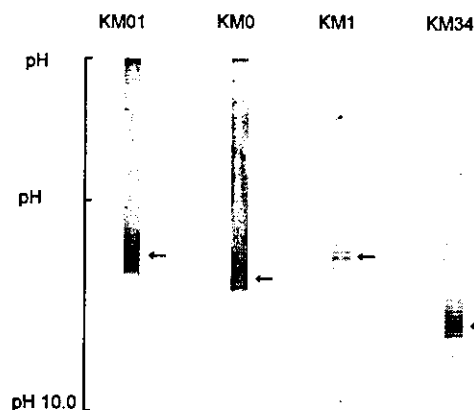


図1. IEF による mAbs の解析

結論

新たに作製したモノクローナル抗体で認識される idiotype 抗体は、通常 AChR で認識される抗体陽性例と一致した。このことは陰性群では、この AChR61-76 エピトープを認識する抗体がないことを示唆する。

今後の課題はこの KM マウスを使用している新たなエピトープ解析とその結果に基づいた新たなコンプリメンタリーペプチドの合成とモノクローナル抗体の作製である。また現在までに作製したモノクローナル抗体による、患者血清中 AChR 抗体の除去カラムの作製ステップが次の段階と考える。

健康危険情報

なし

知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし