

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

重症筋無力症の病態解明と診断法および治療法の開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 重本和宏

平成20（2008）年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
重症筋無力症の病態解明と診断法および治療法の開発	1
重本和宏	
II. 分担研究報告	
1. 抗MuSK抗体で発症する重症筋無力症の疾患動物モデルの作成と そのメカニズムについて	9
重本和宏	
2. 重症筋無力症における抗MuSK抗体陽性患者の 臨床的特徴および抗MuSK抗体の特性について	21
太田光熙	
3. 重症筋無力症に特異的に検出された抗アルカリフォスファタ (AP) 抗体と陽性患者の臨床的特徴	31
小西哲郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	38

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 (こころの健康科学研究事業)

総括研究報告書

重症筋無力症の病態解明と診断法および治療法の開発

主任研究者 重本和宏

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所 研究部長

我々は高感度かつ簡便な抗 MuSK 抗体測定系を確立した。重症筋無力症患者の抗体値を測定したところ、SNMG の 27% で極めて高い力価を示した。抗 MuSK 抗体陽性患者は女性に多く、症状、球麻痺、および呼吸筋麻痺が SPMG と比較して多くみられ、クリーゼになりやすく症状も重症であった。四肢筋力低下は、SPMG と比較して少なかった。また胸腺腫を合併せず、胸腺過形成も少なかった。ステロイド療法を行った患者は、全例で抗体価の減少と臨床的症状の改善がみられた。血漿交換療法を行った患者でも、劇的な抗体価の減少と臨床的症状の改善がみられた。しかし胸腺摘出の症例では、抗体価の減少および臨床的症状の改善はみられなかった。1 例では胸腺摘出後、むしろ抗 MuSK 抗体価の増加がみられ、臨床的症状が悪化した。以上抗 MuSK 抗体の測定は、MG の診断、治療方針や予後の推定に極めて有用な血清診断学的マーカーとなることを示した。さらに我々は、精製した MuSK 蛋白をウサギに免疫することにより、抗 MuSK 自己抗体により重症筋無力症が発症することを世界で初めて示した。発症したウサギの神経筋シナプスでは AChR の凝集が減少しており、筋電図も重症筋無力症と同じパターンを示すことから、抗 MuSK 自己抗体が MuSK の機能を阻止して神経筋シナプスの維持を障害することを示した。一方で補体介在性後シナプス膜破壊の関与はほとんどないと予想された。そして MuSK 抗体による発症メカニズムとして以下のモデルを提唱した。抗 MuSK 抗体が神経筋シナプスに発現する MuSK に結合して、(a) MuSK の機能を直接阻害する、(b) MuSK 蛋白の発現減少 (antigenic modulation) の結果、MuSK の機能を抑制する。おそらく(a)と(b)の両者が作用していると考えられる。最後に我々は抗 AChR 抗体陽性 MG 患者に特異的に検出される新しい自己抗原 (抗体) を発見した。重症の全身型 MG 症で有意に検出されることから、本抗体の測定は、臨床的重症化の指標となる可能性が示唆された。

[研究組織]

分担研究者

重本和宏	財団法人東京都高齢者研究・福祉 振興財団 東京都老人総合研究所 老化ゲノムバイオマーカー研究チ ーム 研究部長	太田光熙	神戸薬科大学 病態生化学 教授
		小西哲郎	独立行政法人 国立病院機構 宇多野病院 院長

A. 研究目的

我々はMuSK (Muscle-specific kinase) に対する自己抗体により重症筋無力症が発症することを世界ではじめて明らかにした。重症筋無力症は自己免疫疾患の一つで全身の筋力低下、易疲労性を特徴として、特に眼瞼下垂、複視などの眼の症状も出現する。難治性難病のため厚生労働省が特定疾患の一つとして指定している。現在でも、全国で重症筋無力症の患者数は1万人以上存在すると推定され、高齢化社会に伴って発症数が増加していると予想されている。重症筋無力症患者の約80%は、末梢神経と筋肉の接ぎ目(神経筋接合部)の筋肉側に存在するアセチルコリン受容体(AChR)が自己抗体により障害を受け、神経から筋肉への命令が十分に伝わらないために発症する。残りの約30%の重症筋無力症患者で、神経筋接合部の筋肉側に存在するMuSKに対する自己抗体が検出されることが最近明らかになったが、重症筋無力症との因果関係は全く不明であった。

MuSK に対する自己抗体を保有する重症筋無力症患者は、嚥下障害、発語障害、呼吸困難、筋萎縮などの症状をもつ重症例が多く、従来の治療法に対して難治性のケースが多いと報告された。特に選択的な筋症状(顔筋、頸部肩の筋、球麻痺など)を示すものもあり、進行性の筋萎縮など筋ジストロフィーとの類似点も提示されているがその病態はまだ未解明である。

我々は、精製した MuSK 蛋白をウサギに免疫することにより、抗 MuSK 自己抗体により重症筋無力症様の症状を発症することを世界で初めて示した。重症筋無力症の発症動物モデルと臨床研究の方向性から、病態メカニズ

ムを解明しながら診断、治療、そして予防の研究開発を進めていく。また我々は抗 MuSK 抗体の正確な定量アッセイシステムを開発し、現在は国内大学病院や一般病院で確定診断として結果を提供しているが、今後も病態の把握と治療、予防を目的とした診断システムを開発する必要がある。さらに原因不明の重症筋無力症患者が存在することが明確になり、この病因、診断の研究も行う。

将来、これまでと同様に必ず一定の重症筋無力症患者が発症することは間違いなく、その原因と分子病態に基づいた疾患の予防、診断、治療法の開発の成果は、未来永劫にわたり国民保健、福祉に大きな貢献を果たす。さらに重症筋無力症発症の自己抗原 (AChR, MuSK) は、遺伝性筋無力症の原因遺伝子としても同定されている。したがって本課題の成果は筋無力症研究全般へ波及し、神経筋難病疾患の克服に貢献することが期待される。

B. 研究方法

本課題は MuSK 抗体陽性および原因不明の重症筋無力症の研究は動物発症モデルを作成して生命科学からのアプローチによる基盤研究と患者を対象とした臨床研究から構成される。

1. 抗 MuSK 抗体で発症する重症筋無力症の疾患動物モデルの作成とそのメカニズムについて

動物実験計画は実験施設(愛媛大学、東京都老人総合研究所)で承認された方法に従って動物愛護の精神に基づいて行った。マウスの筋肉から精製した RNA から MuSK の cDNA を PCR法でクローニングした。MuSK はリセプター型タイロシンカイネースであるが、その

細胞外ドメインの発現ベクターを作成して Cos7 細胞にトランスフェクションの後、分泌リコンビナント蛋白として精製した。リコンビナント蛋白作成にあたって動物モデル作成、メカニズム解明、さらには抗体価を測定するための臨床検査システムを目的として、アルカリフォスファターゼ(AP), ヒト免疫グロブリン IgG, His-tag とそれぞれ融合させた MuSK 蛋白を作成した。精製したリコンビナント MuSK 分泌蛋白をウサギ、マウスにそれぞれ 3 回以上免疫して 3 ヶ月以上の期間観察し、発症するのを待った。

発症したウサギ動物モデルについては、筋電図の測定とひらめ筋横断面組織 (H&E 染色) を使って筋繊維形態の解析を行った。さらにひらめ筋の神経筋シナプスを α -bungarotoxin-rhodamin で蛍光染色してその蛍光強度と面積を測定して正常ウサギのものと定量的に比較検討した。

次に MuSK 蛋白を免疫した発症したウサギ血清に含まれる抗 MuSK 抗体の特異性、MuSK 機能に対する影響を培養 C2C12 筋細胞を使って検討した。C2C12 細胞は筋芽細胞から筋管細胞へ分化誘導することができる。さらに agrin を培養細胞に添加すると 30 分以内に MuSK のタイロシンリン酸化が誘導するとともに、数時間後から細胞表面の AChR 凝集を誘導する。加えて C2C12 細胞の AChR 凝集は agrin だけでなく、laminin-1 や植物レクチン(VVA-B4)でも誘導されるが、これらの刺激は MuSK を活性化しないことから、MuSK 活性化の非依存性の AChR 凝集カスケードが存在していることを示している。そしてこの解析システムを使うことにより agrin-MuSK を介した、あるいは非依存性の AChR 凝集シ

グナル伝達の生化学的解析と機能解析を統合的に行うことが可能である。我々はこのアッセイシステムを使って、抗 MuSK 抗体の MuSK 活性化に対する影響、様々な AChR 凝集刺激に対する抑制作用を検討し、重症筋無力症発症メカニズムの解析を行った。

3. 重症筋無力症患者の自己抗体と臨床研究

臨床研究は宇多野病院倫理委員会で承認を受けた。対象患者にはインフォームドコンセントの後、了承を得た。

3-1. 重症筋無力症における抗 MuSK 抗体陽性患者の臨床的特徴および抗 MuSK 抗体の特性について

重症筋無力症患者の抗 MuSK 抗体および対応する臨床的研究は以下の患者を対象として行った。

(1) MG と確定診断でき、抗 AChR 抗体を測定した全身型 MG 患者 319 例 (SNMG; 48 例, SPMG; 271 例) および独立行政法人国立病院機構宇多野病院において抗 MuSK 抗体測定依頼を受けた院外の SNMG 患者 59 例。

(2) 対照例として MG 以外の神経筋疾患・自己免疫疾患患者 (Other diseases) 91 例 (Lambert-Eaton 筋無力症候群; 5 例, 多発性筋炎; 6 例, 筋ジストロフィー; 10 例, 関節リウマチ; 5 例, 多発性硬化症; 10 例, 脊髄進行性筋萎縮症; 5 例, 筋萎縮性側索硬化症; 10 例, 慢性炎症性脱髄性多発神経障害; 5 例, てんかん; 10 例, 甲状腺炎; 15 例, 1 型糖尿病; 10 例) およびコントロールとして健常者 (Healthy control) 70 例。

ヒトの筋肉から精製した RNA から MuSK の cDNA を PCR 法でクローニングした。抗

体価を測定するための臨床検査システムを目的として、アルカリフォスファターゼ(AP), His-tag とそれぞれ融合させた MuSK 細胞外全体の分泌蛋白を作成した。また MuSK 細胞外ドメインを2分割して、それぞれを His-tag の融合分泌蛋白として作成、精製した。(Ig1-2 domain および Ig3-4 domain)。

それぞれの抗原は Hunter らのクロラミンT 法により、¹²⁵I 標識を行った。¹²⁵I-抗原溶液と被検血清を室温で反応させた後、抗ヒト IgG 抗を添加し沈殿を洗浄後、放射活性をガンマカウンターで測定した。基準値：抗 MuSK 抗体価は、健常者血清 70 例の放射活性を基準とした。抗 MuSK 抗体の IgG subclass 解析はマイクロタイタープレートで RIA(radio immuno assay)法を使って測定した。

3-2.重症筋無力症に特異的に検出された抗アルカリフォスファターゼ (AP) 抗体と陽性患者の臨床的特徴

抗 MuSK 抗体測定の対象となった患者および対照群を用いた。抗 AP 抗体値は ¹²⁵I-AP (AP は Calzyme Laboratories 社製) を使って抗 MuSK 抗体と同様の方法で測定した。基準値: 抗 AP 抗体価は、健常者血清 70 例の放射活性を基準とした。

MuSK 細胞外ドメイン蛋白-AP リコンビナント蛋白に対して抗体陽性を示した SPMG 4 例および SNMG 4 例を対象に、患者血清 (抗体) と AP による吸収実験を行った。加えて上記の 8 例を対象に、¹²⁵I-AP を用いて、先と同様の方法で特異性の検討を行った。

臨床的指標が解析可能な SPMG 99 例 (抗 AP 抗体陽性 SPMG ; 10 例, 抗 AP 抗体陰性 SPMG ; 89 例) を対象に臨床像の解析をした。

C. 研究結果

1. 抗 MuSK 抗体で発症する重症筋無力症の疾患動物モデルの作成とそのメカニズムについて

ウサギおよびマウスに対して MuSK-Fc、-His-tag リコンビナント蛋白を 3 回以上、3 ヶ月以上の期間の間免疫すると筋無力症を発症させることに成功した。筋麻痺が顕著になる期間は 3 ヶ月から 12 ヶ月の間であった。筋無力症を発症したウサギのうち、筋萎縮は顕著ではなく四肢の可動性が保たれたまま筋麻痺になったもの、あるいは筋萎縮が顕著で四肢が拘縮して筋麻痺になったものが観察された。筋無力症を発症したウサギのひらめ筋組織の筋繊維形態および顔筋の筋電図は重症筋無力症の患者に観察されるものと同様の結果であった。

発症したウサギの血清中には抗 MuSK 抗体が存在することを確認した。また筋無力症のウサギと正常ウサギの神経筋シナプス後膜の AChR 凝集を、 α -bungarotoxin-rhodamin で蛍光染色してその蛍光強度と面積を測定して比較検討したところ、発症したウサギの神経筋シナプスの AChR 凝集は、正常ウサギ (N1,N2,N3) と比べ有意に減少していることが明らかとなった。

抗 MuSK 抗体はウサギの神経筋シナプスの AChR を減少させ筋麻痺を発症させるにもかかわらず、MuSK 蛋白のタイロシンリン酸化活性をむしろ誘導することがわかった。そこで抗 MuSK 抗体が、培養 C2C12 細胞の AChR 凝集に抑制効果があるかどうか検討した結果、抗 MuSK 抗体は MuSK を活性化する agrin だけでなく、活性化を伴わないで AChR

凝集誘導する laminin-1 や VVA-B4 に対しても凝集活性を強く抑制することが明らかになった。

2-1. 重症筋無力症における抗 MuSK 抗体陽性患者の臨床的特徴および抗 MuSK 抗体の特性について

抗 MuSK 抗体は SNMG 107 例中 29 例 (27%) で検出された。SPMG では陽性例はみられなかった。MG 以外の神経筋疾患・自己免疫疾患患者および健常者全例で抗 MuSK 抗体は陰性であった。抗 MuSK 抗体陽性検体全例で、MuSK 細胞外 domain の epitope は MuSK Ig1-2 domain が主であり、その割合は、全抗 MuSK 抗体価中の 68-97% を示した。このうち 4 例については MuSK Ig3-4 domain にも 20-30% の活性を示した。抗 MuSK 抗体陽性検体全例で、抗 MuSK 抗体の IgG subclass は IgG 4 が主であり、その割合は 45-100% を示した。このうち、3 例のみ、IgG 4 の割合が 70% 以下であり、IgG 1, 2 および 3 の活性の割合が 11-30% みられた。

抗 MuSK 抗体陽性患者は、女性優位 (女性:男性, 18:5) であった。発症年齢は、18-72 歳 (平均 45 歳) であった。MG 患者に特徴的な症状である筋力低下については、眼症状、球麻痺、および呼吸筋麻痺が SPMG と比較して多くみられ、症状も重症傾向にあった。一方、四肢筋力低下 (52%) は、SPMG と比較して軽症であった。また、胸腺腫を合併している患者はおらず、胸腺過形成 (26%) も比較的少なかった。

ステロイド療法を行った患者では、抗 MuSK 抗体価の減少およびそれに関連した臨床的症状の改善がみられた。血漿交換療法を行った患者では、血漿交換を行った後、劇的な抗 MuSK

抗体価の減少および臨床的症状の改善がみられた。また、血漿交換により劇的に減少した抗 MuSK 抗体価は、その後のステロイド投与により維持された。しかし一例では、血漿交換によりいったん抗 MuSK 抗体価が減少したものの、その後抗体価および臨床的重症度は治療前のレベルに戻り、プレドニゾロンおよびシクロスポリンの投与で改善された。胸腺摘出術を行った患者では、胸腺摘出術後、抗 MuSK 抗体価の減少および臨床的改善がみられなかった。一人の患者では胸腺摘出術後むしろ臨床的重症度が悪化した。その他 2 名の患者でも、胸腺摘出術後、抗 MuSK 抗体の減少および臨床的症状の改善がみられなかった。

2-2. MG および各種疾患患者、健常人における血清中抗 AP 抗体価

抗 AP 抗体は SPMG 249 例中 22 例 (9%) で検出された。一方、SNMG では陽性例はみられなかった。MG 以外の神経筋疾患・自己免疫疾患患者および健常者全例で抗 AP 抗体は陰性であった。¹²⁵I-AP-rMuSK を抗原として用いた場合、抗体は SPMG, SNMG 両群で検出された。SPMG の陽性検体では抗体は AP 前処理により吸収された。一方、SNMG の陽性検体では AP 前処理による影響はみられなかった。

次に、¹²⁵I-AP-rMuSK を用いて抗体陽性を示した SPMG 4 例および SNMG 4 例を対象として、¹²⁵I-AP で検出される患者抗体の AP 前処理 (吸収) ののち、さらに ¹²⁵I-AP を抗原として測定した場合、抗体値は SPMG 群のみで検出された。さらに上記 8 例の患者抗体を AP 前処理して ¹²⁵I-his-rMuSK を抗原として抗体値を測定すると、反応抗体は SNMG 群のみで検出した。

抗 AP 抗体は SPMG において極めて特異的に検出されることを発見した。これまで MG において抗 AP 抗体が検出されたという報告はなく、新規の自己抗体と考えられる。抗 AP 抗体陽性患者は、女性のみに見られた。(女性:男性, 10 : 0), 抗 AP 抗体陰性患者 (女性 70%) よりその割合は高かった。最重症時の MGFA 抗 AP 抗体陽性患者において重症例が多く、眼筋型 MG (class I) はみられなかった。特に、抗 AP 抗体陽性患者の半数は呼吸器装着が必要な患者群であった

D. 考察

我々は RIA 法を用いた極めて高感度かつ簡便な抗 MuSK 抗体測定系を確立して重症筋無力症患者の抗 MuSK 抗体を測定したところ、SNMG の 27%が陽性であり、しかもすべて極めて高い力価を示した。しかも SPMG や MG 以外の神経筋疾患・自己免疫疾患患者および健常者では検出されなかったことより、抗 MuSK 抗体測定は SNMG と診断された患者を診断する上で極めて有用な血清診断学的マーカーとなることが示された。

抗 MuSK 抗体陽性患者は女性に多く、球麻痺、および呼吸筋麻痺が SPMG と比較して多くみられ、クリーゼになりやすく症状も重症であった。一方、四肢筋力低下は、SPMG と比較して少なかった。抗 MuSK 抗体が顔面筋により選択的に作用し、障害を引き起こしていると考えられる。抗 MuSK 抗体陽性 MG では胸腺腫を合併せず、胸腺過形成も少なかった。

治療に関して、ステロイド療法を行った患者では、全例で抗 MuSK 抗体価の減少およびそれに関連した臨床的症状の改善がみられた。血漿交換療法を行った患者では、劇的な抗 MuSK

抗体価の減少および臨床的症状の改善がみられた。一方、胸腺摘出後、抗 MuSK 抗体価の減少および臨床的症状の改善はみられなかった。1例では胸腺摘出後、むしろ抗 MuSK 抗体価の増加がみられ、臨床的症状が悪化した。このように抗 MuSK 抗体の測定は、MG の治療方針や予後の推定に有用であることが示された。

以上の臨床研究から抗 MuSK 抗体と重症筋無力症の因果関係があると考えられるにもかかわらず、抗 MuSK 抗体が重症筋無力症の真の発症原因となるかどうか不明であった。我々は、精製した MuSK 蛋白をウサギに免疫することにより、抗 MuSK 自己抗体により重症筋無力症が発症することを世界で初めて示した。発症したウサギの神経筋シナプスでは AChR の凝集が減少しており、筋電図も重症筋無力症と同じパターンを示すことから、抗 MuSK 自己抗体が MuSK の機能を阻止して神経筋シナプスの維持を障害することを明らかにした。

抗 MuSK 抗体陽性の重症筋無力症患者血清に存在する抗 MuSK 抗体 IgG のサブクラスは圧倒的に IgG4 である (一部 IgG2 も検出することができるが大変少ない)。ヒト IgG4 には補体活性化能はないことから、抗 MuSK 抗体による病態機序には、補体による後シナプス膜破壊の関与はほとんどないことが示された。

次に培養筋細胞の AChR 凝集誘導の実験系を使って、我々は抗 MuSK 抗体による重症筋無力症の発症メカニズムを解析した。発症した筋無力症の動物モデルの自己抗体(精製した IgG)は、agrin だけでなくラミニンやレクチンによる培養筋細胞の AChR 凝集の全ての誘導を抑制することを示した。これは補体活性

化能のない抗 MuSK 自己抗体 (IgG) であっても MuSK の機能を抑制することで抗 MuSK 抗体陽性の重症筋無力症の発症の原因となることを、我々の動物発症モデルは示している。そして MuSK 抗体による発症の分子機序として以下のモデルを提唱した。抗 MuSK 抗体が神経筋シナプスに発現する MuSK と結合して、(a) MuSK の機能を直接阻害する、(b) MuSK 蛋白の発現減少 (antigenic modulation) の結果 MuSK の機能を抑制する。おそらく(a)と(b)の両者が作用していると考えられる。患者抗 MuSK 抗体が反応する MuSK 細胞外 domain の epitope 分析を行った結果、全例で MuSK Ig1-2 domain が主体であることが明らかとなった。上記の (a)と(b)の機序との関連についてはさらに解析を行う必要がある。

ウサギだけでなくマウスを使っても発症動物モデルを作成することに成功した。MuSK 抗体による重症筋無力症発症のメカニズム、有効な治療法や予防法について今後研究することが可能とになった。最後に我々は抗 AChR 抗体陽性 MG 患者に特異的に検出される新しい自己抗原 (抗体) を発見しその解析を行った。重症の全身型 MG 症で有意に検出されることから、本抗体の測定は、臨床的重症化の指標となる可能性が示唆された。

E. 結論

(1)抗 MuSK 抗体は、抗 AChR 抗体陰性患者の約 27 %で特異的に検出され極めて有用な血清診断学的マーカーとなることが明らかとなった。抗 MuSK 抗体陽性 MG 患者は、眼症状および球症状が著明で、呼吸筋麻痺も多くみられたが、四肢筋力低下や胸腺異常は少なかった。

また、ステロイド療法および血漿交換療法は著効を示し、胸腺摘出術は無効であった。本抗体の測定は MG の臨床的予後や治療方針を立てる上での指標として有用であることが明らかとなった。

(2)抗 MuSK 抗体で重症筋無力症を発症する動物モデルの作成に成功した。筋電図および筋組織像は重症筋無力症患者の病態と一致した。発症したウサギの血清には抗 MuSK 抗体 IgG が存在していた。発症したウサギの神経筋シナプス AChR 凝集は正常と比べ有意に減少していた。抗 MuSK 抗体と筋無力症の因果関係を証明することができた。機序として 2 つの機序を提唱した。(a) MuSK の機能を直接阻害する、(b) MuSK 蛋白の発現減少 (antigenic modulation) の結果 MuSK の機能を抑制する。

(3) 抗 AChR 抗体陽性 MG 患者に特異的に検出される新し自己抗原 (抗体) を発見した。臨床的重症化の指標となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shigemoto K, Kubo S, Maruyama N, Hato N, Yamada T, Jie C, Kobayashi N, Mominoki K, Abe Y, Ueda N, & Matsuda S. Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase. *J Clin Invest* 116(4): 1016-1024, 2006.
- 2) Ohta K, Shigemoto K, Fujinami A, Maruyama

- N, Konishi T, Shimoda Y, & Ohta M. Clinical and experimental features of MuSK antibody positive MG in Japan. *Eur J Neurol* 2007 ; 14(9): 1029-1034.
- 3) Konishi T, Ohta K, Shigemoto K & Ohta M. Anti-alkaline phosphatase antibody positive myasthenia gravis. *J Neurol Sci* 2007; 263(1-2): 89-93.
- 4) Akio Hayashi, Hiroyuki Shiono, Mitsuhiro Ohta, Kiyoe Ohta, Yoshiki Sawa: Heterogeneity of immunopathological features of AchR/MuSK autoantibody- negative myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2007 ; 189 (1-2): 163- 168.
- 5) Shigemoto K, Kubo S et al. :Myasthenia gravis experimentally induced with muscle-specific kinase. *Annals of the New York Academy of Science*. 2008 in press.
- 6) Shigemoto K. Myasthenia gravis induced by autoantibodies against MuSK. *Acta Myologica* 2008. in press.
- 7)丸山直記, 重本和宏. 神経筋接合部疾患における抗 MuSK 抗体と病態機序. *臨床神経*, 47:842-844, 2007.
- 8)中澤 大, 川尻真和, 越智雅之, 小原克彦, 太田潔江, 三木哲郎. 抗体価が重症度を反映した抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の1例 *臨床神経学* 第47巻 第6号 2007.6.1
- 9)重本和宏. 免疫性神経筋疾患の動物モデル: 重症筋無力症. *アニテックス*, 19(6):17-23, 2007
- Conference on Myasthenia Gravis and related disorders*. Chicago May 2007.
- 2) (招待講演) Shigemoto, K. Myasthenia gravis induced by autoantibodies against MusK. 7th *Japanese-French Workshop on "Development of Molecular Therapy toward Muscular Dystrophy"* in Japan 2007.
- 3) 重本和宏, 久保幸穂, 松田正司, 丸山直記. 抗 MuSK 抗体で重症筋無力症が発症するか? 第77回日本衛生学会総会, 2007
- 4) 丸山直記, 重本和宏. 神経筋接合部疾患における抗 MuSK と病態機序. (N.Y. Acad. Symposium と同日で丸山直記が代理発表) 第48回日本神経学会総会のシンポジウム 2007
- 5) 小西哲郎, 太田潔江, 重本和宏, 太田光熙. 抗 AP 抗体陽性重症筋無力症の臨床的特徴 第48回日本神経学会 2007.5.13 名古屋
- 6) 下駄祐子, 太田潔江, 藤波 綾, 重本和宏, 太田光熙. 抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の特徴 第47回日本臨床化学会 2007.11.22 大阪
- 7) 岸 雅彦, 太田潔江, 太田光熙, 斉田和子, 塩屋啓一, 比嘉利信, 中里雅光. B6 マウスを用いた抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の受動免疫実験 第19回日本神経免疫学会 2007.4.12
- 8) 岸 雅彦, 太田潔江, 太田光熙, 杉本精一郎. 抗 MuSK 抗体に関する電気生理学的検討 第37回日本臨床神経生理学会 2007.11.19 宇都宮

2. 学会発表

- 1) (招待講演) Shigemoto, K. Experimentally induced myasthenia gravis with muscle-specific kinase. *N.Y. Acad. Symposium, 11th International*

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金 (こころの健康科学研究事業)

分担研究報告書

重症筋無力症の病態解明と診断法および治療法の開発

—抗 MuSK 抗体で発症する重症筋無力症の疾患動物モデルの作成と

そのメカニズムについて—

分担研究者 重本和宏

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所 研究部長

2001年、Hochらは抗AChR抗体が検出することができない seropositive 重症筋無力症の患者の2/3の血清中に抗MuSK(Muscle specific kinase)抗体を検出した¹。我々は重症筋無力症患者の抗MuSK抗体の定量アッセイシステムを神戸薬科大学、国立病院機構宇多野病院と共同で開発して国内の患者を調べたところ、seronegative 重症筋無力症の約30%で抗MuSK抗体が高値で検出されることを報告した^{2,4}。一方で、抗MuSK抗体で発症するかどうか疾患動物モデルを作成することができなかつたために世界中で強く疑問視されていた^{5,6}。我々は、精製したMuSK蛋白をウサギに免疫することにより、抗MuSK自己抗体により重症筋無力症様の症状を発症することを世界で初めて示した⁷。発症したウサギの神経筋シナプスでは、AChRの凝集が減少しており、筋電図も重症筋無力症と同じパターンを示すことから、抗MuSK自己抗体がMuSKの機能を阻止して神経筋シナプスの維持を障害することを明らかにした。さらにマウスによる重症筋無力症の発症動物モデルの作成に成功した^{8,9}。

A. 研究目的

抗MuSK自己抗体と重症筋無力症発症の因果関係を明らかにするには、動物モデルで抗MuSK自己抗体によって症状を誘導する必要がある。マウスMuSK蛋白の細胞外分泌蛋白を作成、精製したのちウサギに免疫して筋無力症を発症するかどうか調べた。また発症したウサギの筋電図、筋組織像解析、および神経筋シナプスのAChRの凝集を解析して神経筋シナプスの病変により重症筋無力症を発症しているかどうか解析を行った。さらに発症したウサギの血清に存在する抗MuSK抗体の抗原特異性、MuSKの機能に対する抑制活性についてin vitroのAChR凝集解析法を用いて検

討を行った。

B. 対象と方法

1. リコンビナント MuSK、 agrin 蛋白の作成

マウス MuSK 遺伝子は、マウス筋から mRNA を抽出して cDNA を作成してファージ vector に入れライブラリーを作成した。ヒト MuSK 遺伝子の断片を PCR で増幅しそれをプローブとしてマウス MuSK 遺伝子を単離した。MuSK 蛋白の細胞外ドメインを PCR で増幅し発現ベクター内でアルカリフォスファターゼ (AP)、ヒト免疫グロブリン IgG、His-tag とそれぞれ融合させ、293T 細胞にトランスフェク

ションしてそれぞれのコンビナント蛋白を発現作成した。リコンビナント蛋白は抗 AP モノクローナル・アガロース、ProteinA・セファロースあるいは His-tag 結合レジンで精製した。マウス agrin 遺伝子は脊髄から RNA を抽出して RT-PCR 法で増幅し発現ベクター内で His-tag と融合させ、293T 細胞にトランスフェクションして His-tag 結合レジンを使って精製した。リコンビナント蛋白は蛋白電気泳動の後、銀染色およびクマシー染色で精製度と濃度を測定した。また BCA 蛋白濃度測定法も用いた。

2. リコンビナント蛋白の免疫

動物実験計画は実験施設(愛媛大学、東京都老人総合研究所)で承認された方法に従って行った。これまでウサギ4匹に対して1回に100-400 µg の精製した MuSK-Fc、-His-tag リコンビナント蛋白を3回以上免疫した。免疫したウサギは少なくとも3ヶ月以上観察し発症するかどうか観察した。C57BL6 マウスに対しては20 µg を3回以上免疫した。

3. 発症したウサギの病態解析

3-1. 筋電図測定

発症したウサギと正常ウサギから筋電図を測定するために、麻酔(ケタミン)を使った。顔面神経(retroauricular branch)に対して20Hzの反復電気刺激を加え顔筋(retroauricular muscle)から筋電図を測定した。

3-2. 筋組織の形態解析

4%パラフォルムアルデヒド(0.1M リン酸バッファー, pH7.4)で環流固定の後、ひらめ筋の筋腹を採取した。ひらめ筋の横断面切片の

H&E 染色で筋組織形態を観察した。

3-3. 神経筋シナプスの AChR 凝集の定量的解析

ウサギを4%パラフォルムアルデヒド(0.1M リン酸バッファー, pH7.4)で環流固定の後、ひらめ筋の筋腹部を採取して、液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結した。筋の横断面切片に対して α -bungarotoxin-rhodamin で神経筋シナプスの AChR 凝集を染色した。蛍光染色された AChR 凝集はオリンパス正立蛍光顕微鏡で観察して記録した。蛍光強度および面積は NIH image analysis software (version 1.62)で測定した。

4. 抗 MuSK 抗体の抗原特異性と機能解析

4-1. 抗 MuSK 抗体の特異性の検討

ウサギ血清に存在する抗 MuSK 抗体(血清)を一次抗体として使いウエスタン解析を行った。MuSK-AP リコンビナント蛋白を泳動し PVDF メンブレンに転写した。二次抗体は抗ウサギ peroxidase を使って発色した。生細胞に発現する AChR 凝集に対する抗 MuSK 抗体の結合能は次のように行った。リコンビナント agrin (1nM)を分化させた C2C12 培養筋細胞に加えて16時間語に誘導された AChR 凝集に対して、ウサギの血清から ProteinA・セファロースで精製した抗 MuSK 抗体を含む IgG 抗体を使って蛍光免疫染色法により検討した。二次抗体として fluorescein・抗ウサギ抗体を用いた。MuSK と共凝集する AChR は α -bungarotoxin-rhodamin で二重染色した。染色された MuSK-AChR 凝集はオリンパス正立蛍光顕微鏡で観察して記録した

4-2. 抗 MuSK 抗体の機能解析

発症したウサギの抗 MuSK 抗体による MuSK

の機能抑制活性について検討した。C2C12 培養筋細胞にリコンビナント agrin (1nM) と共にウサギから精製した IgG 抗体を加えて、agrin で誘導される MuSK、AChRβ サブユニットのリン酸化反応および AChR 凝集誘導活性に対する影響について解析を行った。

AChR 凝集に対する影響については、MuSK のリン酸化とは関係なく AChR 誘導活性のある laminin-1 と植物レクチン(VVA-B4) に対する抗 MuSK 抗体の影響を解析した。Agrin と同様に、laminin (40nM) あるいは VVA-B4 (25μg/ml) と同時に抗 MuSK 抗体を分化した C2C12 培養筋細胞に添加して 16 時間後に誘導される AChR 凝集の数を定量した。MuSK のリン酸化は agrin を分化した C2C12 培養筋細胞に添加して 30 分後に作成したライゼートに対して、抗リン酸化抗体(4G10 と PY20 抗リン酸化モノクローナル抗体)によるウェスタン解析により検討した。C2C12 培養筋細胞のライゼートに対して抗 MuSK 抗で免疫沈降サンプルを泳動し PVDF メンブレンに転写した。二次抗体は抗マウス peroxidase を使って発色した。同じメンブレンを洗浄し、ウサギの抗 MuSK 抗体で MuSK 蛋白を検出した。AChR のリン酸化検出はライゼートをビオチン化した α-bungarotoxin とアビジン agarose で沈降して泳動し PVDF メンブレンに転写したのち抗リン酸化抗体(4G10 と PY20 抗リン酸化モノクローナル抗体)と抗 AChR -beta モノクローナル抗体によるウェスタン解析により検討した。

C. 研究結果

1. MuSK 蛋白の免疫で重症筋無力症を発症する疾患動物モデル (うさぎ) の作成

これまで4匹のウサギに対して MuSK-Fc、-His-tag リコンビナント蛋白を3回以上、3ヶ月以上の期間の間免疫すると全てのウサギで筋無力症を発症した(図1A)。筋麻痺が

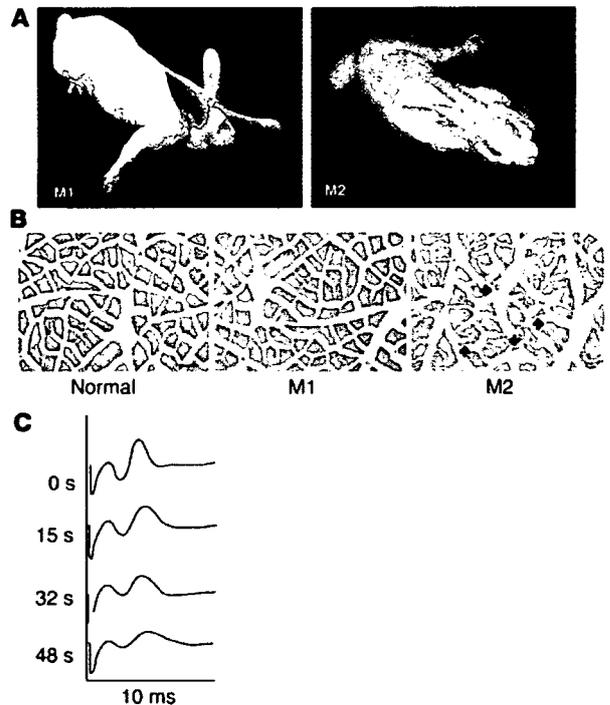


図1. MuSK 蛋白の免疫で発症した重症筋無力症の疾患動物モデル。

- A. MuSK 蛋白を免疫後、重症筋無力症患者様の麻痺が観察された(M1、M2)。M2 のウサギは顕著な筋萎縮が観察される。
- B. 正常なウサギ、M1、M2、それぞれのウサギのヒラメ筋横断面組織像 (H&E 染色)。M2 ウサギの筋繊維に萎縮が観察される。M2 の矢印で筋繊維の顕著な形態変化、筋繊維の大小不同、小角化繊維 (small angular fiber) が見られる。
- C. M1 ウサギの顔面神経 (retroauricular branch) を 20Hz で、0.1ms の持続パルス刺激した時の筋電波形。刺激後波形が減衰しており、重症筋無力症患者の筋電図所見と一致した。

顕著になる期間は3ヶ月から12ヶ月の間であった。筋無力症を発症したウサギのうち、筋萎縮は顕著ではなく四肢の可動性が保たれたまま筋麻痺になったもの(図1A: M1)、あるいは筋萎縮が顕著で四肢が拘縮して筋麻痺に

なった(図1A: M2)ものが観察された。

正常と筋無力症を発症したウサギのひらめ筋組織の横断面切片のH&E染色で筋繊維形態を観察した。正常に比べ発症した M1 のウサギの筋繊維の形態変化はほとんど観察されなかったが、M2 のウサギでは筋繊維の顕著な形態変化、筋繊維の大小不同、小角化繊維(small angular fiber)が見られる。このような変化は重症筋無力症や悪液質(cachexia)などで観察される変化である(図1B)。

次にウサギの顔面神経に対して20Hzの反復刺激を加え、顔筋の筋電図を測定するとCMAP(compound muscle action potential)の顕著な減少が測定された。これは重症筋無力症の患者の筋電図で見られる所見と一致する。

2. 神経筋シナプスの AChR 凝集の変化

MuSK を免疫したウサギが重症筋無力症と同じ病態(筋麻痺、筋萎縮、筋電図)を示したことから、免疫した MuSK 蛋白に対する抗体が自己抗体としてウサギの神経筋シナプスの後膜に発現している MuSK 蛋白に結合し発症すると考えられる。そこで発症したウサギと正常ウサギの神経筋シナプス後膜の AChR 凝集を、 α -bungarotoxin-rhodamin で蛍光染色してその蛍光強度と面積を測定して比較検討した。その結果、発症したウサギの神経筋シナプス(M1 と M2 のウサギ)では AChR 凝集に結合した α -bungarotoxin-rhodamin の蛍光強度と面積は、正常ウサギ(N1, N2, N3)と比べ有意に減少していることが明らかとなった(図2A, B)。

次に発症したウサギの血清に抗 MuSK 抗体が存在するかどうか検討した。まずウエスタ

ン解析により、ウサギ血清中に MuSK-AP に反応し AP そのものには反応しない、MuSK 特異的抗体が存在することが示された(図3A)。さらに抗 MuSK 抗体が生細胞表面に発現している MuSK に結合することができるか検討した。C2C12 細胞表面に AChR と MuSK を agrin で凝集

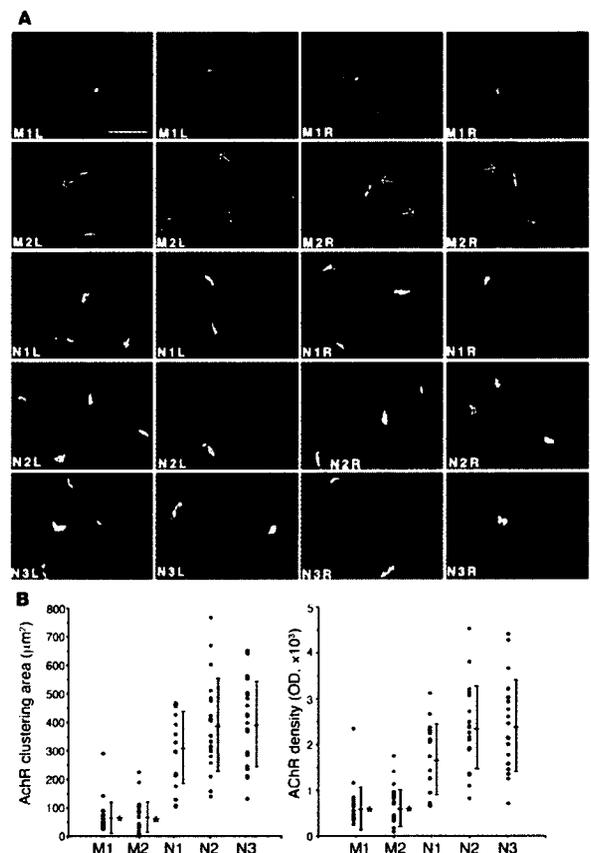


図2 重症筋無力症を発症したウサギ神経筋シナプスでは AChR 凝集の面積と密度の低下が見られる。N1, N2, N3 は正常なウサギ、M1, M2 は筋無力症発症したウサギ、L左足ヒラメ筋 R右足ヒラメ筋

- A. AChR 凝集を α -bungarotoxin-rhodamin で染色し蛍光顕微鏡で観察記録した。正常ウサギに比べて疾患動物の AChR 凝集の面積と密度の低下が顕著である。
- B. α -bungarotoxin-rhodamin で染色された AChR 凝集の面積と蛍光強度(密度)をそれぞれ定量した結果

させ麻痺したウサギの血清を一次抗体として反応させたのち、fluorescein 標識抗ウサギ二次抗体で反応させると、 α -bungarotoxin-rhodamin で蛍光染色される AChR 凝集と重なる場所に染色する(図3B). 抗 MuSK 抗体は生細胞に発現する MuSK 細胞外ドメインに結合することが確認された。

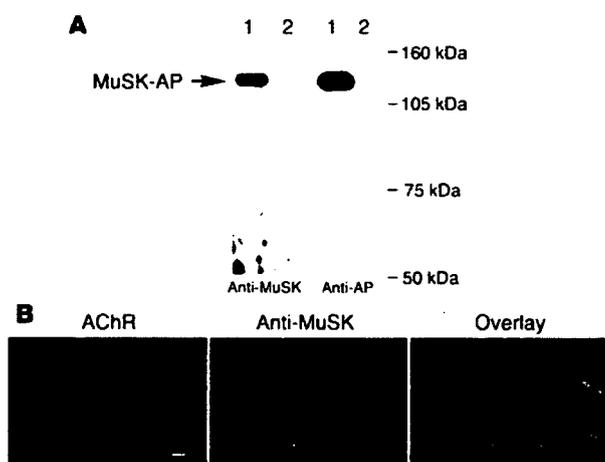


図3. ウサギ抗 MuSK 自己抗体の抗原特異性

- A. 精製した MuSK 蛋白に対する抗 MuSK 自己抗体の反応(ウェスタンブロット)左側のレーン1は MuSK-AP 蛋白、レーン2は negative control
- B. C2C12 細胞表面に Agrin で誘導された AChR と MuSK の凝集に抗 MuSK 抗体が結合する。(左), α -bungarotoxin-rhodamin で染色した AChR 凝集 ; (中央), 抗 MuSK 抗体で染色された MuSK ; (右), 両方の結果の overlay 像

3. 抗 MuSK 抗体の機能解析

3-1. MuSK タイロシンリン酸化活性に対する影響

MuSK 蛋白免疫により筋無力症を発症したウサギの神経筋シナプスでは AChR 凝集が顕著に減少していた。発症したウサギには抗 MuSK 抗体が存在しており MuSK 細胞体ドメ

インに結合することがわかった。次にこの抗 MuSK 抗体が MuSK のリン酸化活性にどのような影響を与えるか解析を行った。結果は予想に反して、抗 MuSK 抗体自体に agrin と同じように MuSK のタイロシンリン酸化活性を誘導することが明らかとなった(図4A)。また agrin による MuSK のタイロシンリン酸化活性を抑制しないこともわかった(図4A)。MuSK のリン酸化によって下流シグナルが活性化され AChR ベーターサブユニットがタイロシンリン酸化されることがわかっている。そこで抗 MuSK 抗体の下流シグナルに与える影響を調べるために AChR ベーターサブユニットのタイロシンリン酸化への影響を解析した。結果は抗 MuSK 抗体単独で MuSK と下流シグナルの両方を活性化し、その結果 AChR ベーターサブユニットのタイロシンリン酸化を誘導した(図4B)。また agrin による MuSK と下流シグナルの活性化を抑制せず、同様に AChR ベーターサブユニットのタイロシンリン酸化を誘導することが明らかになった。

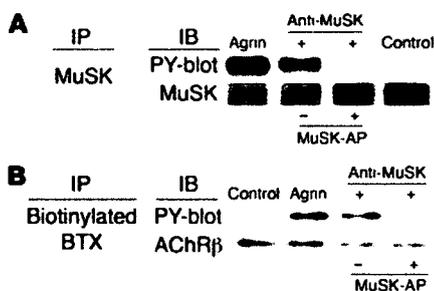


図4. 抗 MuSK 抗体は agrin と同様に MuSK と AChR(beta)のタイロシンリン酸化を活性化する。

- A. C2C12 細胞に agrin, 抗 MuSK 抗体, agrin と抗 MuSK をそれぞれ添加して MuSK の活性化(タイロシンカイネース)を抗タイロシンカイネース抗体で検出した。抗 MuSK 抗体による MuSK の活性化は、抗体を MuSK 蛋白で吸収すると消失した(MuSK 特異性の証明)。
- B. 同様に C2C12 細胞に agrin, 抗 MuSK 抗体, agrin と抗 MuSK を添加して、AChR beta サブユニットのタイロシンリン酸化を検出し

た抗MuSK抗体によるAChR(beta)のチロシンリン酸化は、抗MuSK抗体をMuSK蛋白で吸収すると消失した

3-2.C2C12細胞のAChR凝集活性に対する影響

抗MuSK抗体はウサギの神経筋シナプスのAChRを減少させ筋麻痺を発症させるにもかかわらず、MuSK蛋白のチロシンリン酸化活性をむしろ誘導することがわかった。そこでC2C12細胞のAChR凝集に対する影響について*in vitro*の実験系で検討した。C2C12細胞を筋管細胞へ分化させα-bungarotoxin-rhodaminでAChRを蛍光染色すると、agrinなどのAChR凝集刺激が無くてもスポット状に凝集を観察することができる(図5A:spontaneous AChR凝集)。C2C12筋細胞のspontaneous AChR凝集誘導に対して抗MuSK抗体を一晩加えるとAChR凝集を顕著に抑制した(図5)。

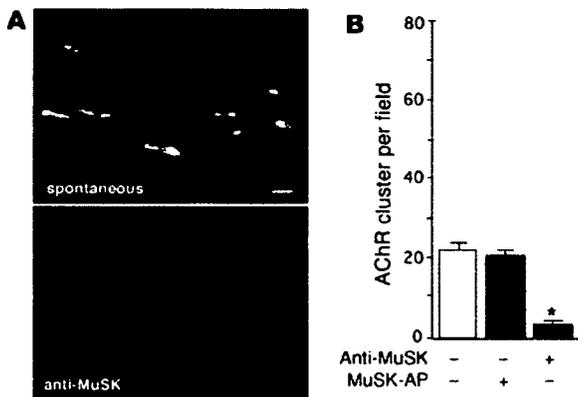


図5. 抗MuSK自己抗体C2C12細胞のspontaneous AChR凝集を抑制する。

- A. 分化誘導したC2C12細胞のAChR凝集。(下)抗MuSK抗体を添加して16時間培養するとAChR凝集は顕著に減少する。
- B. 抗MuSK抗体によるspontaneous AChR凝集の抑制結果を定量した

次にagrin添加によるAChR凝集に対する

効果を調べた。Agrinを分化したC2C12細胞に添加するとMuSKのチロシンリン酸化を活性化して16時間後にはAChR凝集を観察することができる(図6A)。そこでagrinと精製した抗MuSK抗体IgGを同時に添加してAChR凝集を抑制するかどうか検討した。その結果は予想したようにagrinによるAChR凝集を有意に抑制することが確認された(図6A, B)。さらにC2C12細胞にAChR凝集を誘導することができるlaminin-1と植物レクチンVVA-B4に対しても同様に抗MuSK抗体の影響を解析した(図6A, B)。Laminin-1とVVA-B4はMuSKを活性化しないが、分化したC2C12細胞のAChR凝集を誘導することができる。そこでlaminin-1あるいはVVA-B4それぞれと抗MuSK抗体を同時に添加して16時間後にAChR凝集誘導を観察した。その結果抗MuSK抗体はagrinだけでなく、laminin-1やVVA-B4によるAChR凝集誘導も強く抑制することが明らかになった。

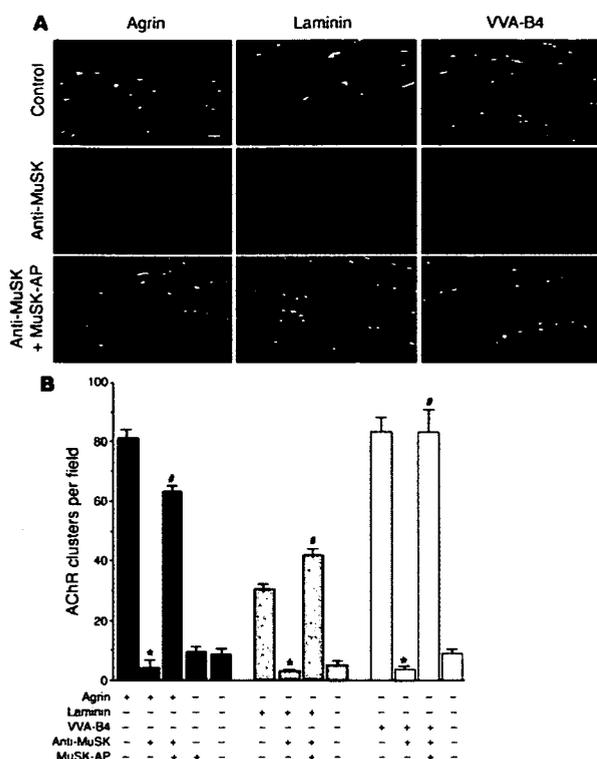


図6. agrin, laminin1, VVA-B4で誘導されるAChR凝集は抗MuSK抗体で抑制される。抗MuSK抗体による抑制は、抗体をMuSK蛋白で吸収すると消失する(抗体の特異性)。

D. 考察

30年前に重症筋無力症が、神経筋シナプスの筋側部に集まる神経伝達分子レセプター(アセチルコリンレセプター)に対する自己抗体により発症することが、Lindstromらによって証明された¹⁰。2001年、Hochらはseropositive重症筋無力症の患者の2/3の血清中に抗MuSK(Muscle specific kinase)抗体を検出した¹。我々は重症筋無力症患者の抗MuSK抗体の定量アッセイシステムを神戸薬科大学太田教授と共同で開発して国内の患者を調べたところ、seronegative重症筋無力症の約30%で抗MuSK抗体が高値で検出されることを報告した²⁻⁴。その他の臨床研究報告から、抗MuSK抗体が重症筋無力症との因果関

係はきわめて深いと予想されたにもかかわらず、抗MuSK抗体による動物発症モデルを作成することができなかったため、抗MuSK抗体が重症筋無力症の真の発症原因となりうるのかどうか激しい議論が起きた^{5,6}。つまり、抗MuSK自己抗体と重症筋無力症発症の因果関係を明らかにするには、動物モデルで抗MuSK自己抗体によって症状を誘導できるかどうか重要な問題であった。我々は、精製したMuSK蛋白をウサギに免疫することにより、抗MuSK自己抗体により重症筋無力症様の症状を発症することを世界で初めて示した⁷。発症したウサギの神経筋シナプスでは、AChRの凝集が減少しており、筋電図も重症筋無力症と同じパターンを示すことから、抗MuSK自己抗体がMuSKの機能を阻止して神経筋シナプスの維持を障害することを明らかにした。言い換えればMuSKが、神経筋シナプスを維持するのに必須であることが明らかになった。

抗MuSK抗体陽性の重症筋無力症患者血清に存在する抗MuSK抗体IgGのサブクラスは圧倒的にIgG4である(一部IgG2も検出することができるが大変少ない)²。しかしながらヒトIgG4には補体結合能はない。抗AChR抗体に関しては、これまでの研究から、補体結合能のあるIgG1やIgG3が主要なサブクラスであることがわかっている。このように抗MuSK抗体による病態機序には、補体介在性後シナプス膜破壊の関与はほとんどないことが、これまでの研究から示された¹¹。この点は抗MuSK抗体が重症筋無力症の発症原因となりうるかどうかの議論で、抗MuSK抗体によって発症する動物モデルを示すことに成功していなかったことに加えて疑問とされていた点である。

抗 MuSK 抗体による重症筋無力症の発症メカニズムを明らかにするには、MuSK の機能を知る必要がある。しかしながら MuSK の機能も未解明であり、リガンドは現在も明らかではない。 agrin が MuSK のリガンドではないかと予想して、両方の分子が直接結合するかどうか多くの労力が払われたが、結局誰も証明することができず、現在では agrin は MuSK のリガンドではないというのがコンセンサスである。一方で、 agrin 蛋白を培養筋細胞に添加すると、その直後に MuSK のタイロシンカインースが活性化され、数時間後には AChR の凝集が観察される⁷。 MuSK は他のリセプター型タイロシンカインースと同様に、細胞外ドメインに未知のリガンドが結合して 2 量体を形成することにより活性化する¹²。 MuSK のリガンドは agrin と未知の分子の複合体から成るのか、あるいは agrin と結合できる別の分子が MuSK の co-receptor として存在する可能性が現在考えられている。ところでラミニンや植物レクチン(VVA-B4)によっても培養細胞 AChR を凝集することができるが、これらのいずれの刺激も MuSK を活性化しない^{13,14}。従って AChR を凝集するシグナル経路は agrin-MuSK 活性化以外にも存在することは明らかである。生体内でも、そのシグナル経路が重要な役割を果たしていると考えられる。実際に胎児期に運動神経終末が進展して筋支配する前、すなわち神経終末から分泌される agrin の非存在下であっても、MuSK の働きにより筋組織の中心領域で AChR の緩やかな集積が誘導されることが示されている^{15,16}。

そこで、上記の培養筋細胞の AChR 凝集誘導の実験系を使って、我々は抗 MuSK 抗体による重症筋無力症の発症メカニズムを解析

した⁷。大変興味深いことに、抗 MuSK 抗体で発症した筋無力症の動物モデルの自己抗体(精製した IgG)は、 agrin だけでなくラミニンやレクチンによる培養筋細胞の AChR 凝集の全ての誘導を抑制することを示した。これらの結果は発症動物の抗 MuSK 抗体は、 MuSK 機能を直接抑制することを強く支持する。また成熟した神経筋シナプスでは AChR 凝集は動的なターンオーバーで維持され、その機構に MuSK が必要であると考えられる¹⁷。これまで我々が観察したウサギの神経筋シナプス AChR 凝集の顕著な減少はあるものの、補体による破壊像は観察されていない。これらの結果から、補体結合能の無い抗 MuSK 自己抗体 (IgG) であっても抗 MuSK 抗体陽性の重症筋無力症の発症の原因となることを、我々の動物発症モデルは示している。

我々は抗 MuSK 抗体による発症機序として以下のモデルを提唱した。抗 MuSK 抗体が神経筋シナプスに発現する MuSK と結合して、(a) MuSK の機能を直接阻害する、(b) MuSK 蛋白の発現減少 (antigenic modulation) の結果 MuSK の機能を抑制する (図7)。おそらく(a)と(b)の両者が作用していると考えられる。ウサギだけでなくマウスを使っても発症動物モデルを作成することができるようになり^{8,9,18}(図8)、MuSK 抗体による重症筋無力症発症のメカニズムに加えて、有効な治療法や予防法についても今後研究することができるようになった。