

70 healthy participants in RIA using a AP-MuSK protein. The mean+3SD of AP-MuSK titers for SNMG and other diseases was 0.0031+0.0061 nM, and 0.0026+0.0070 nM, respectively. AP Ab was detected in 9% (two men, twenty women) of the 249 SPMG patients (70 men and 179 women) but not in the 70 patients with SNMG (19 with, 51 without MuSK Ab). No Ab was detected in the non-MG patients or healthy participants (Fig. 1). In this population ($n=22$), AP Ab-positive MG patients showed significant female pre-

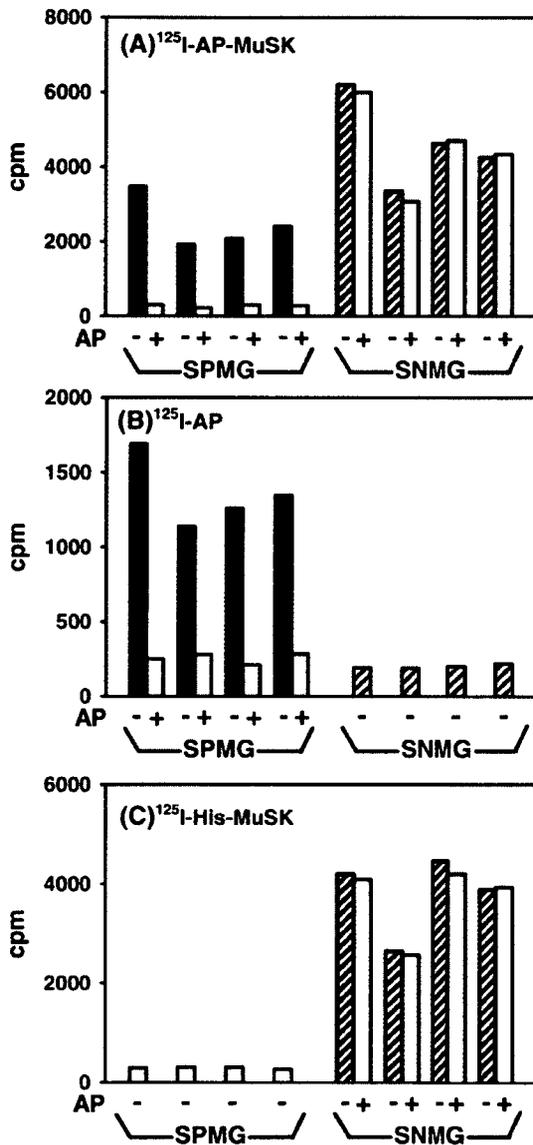


Fig. 2. Antibody specificity detected in 4 SPMG and 4 SNMG sera by the ^{125}I -AP-MuSK assay. Inhibition studies of sera co-incubated with an excess of unlabeled AP. (A) ^{125}I -AP-MuSK precipitation assay. (B) ^{125}I -AP precipitation assay (C) ^{125}I -His-MuSK precipitation assay. 5 μL of SPMG sera were used for assay (A) and 5 μL of a 1:300 dilution of SNMG sera were used for assay (C). AP Abs were present in SPMG but not in SNMG.

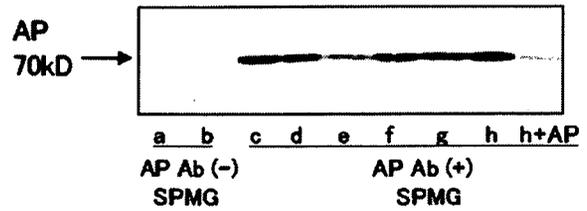


Fig. 3. Immunostaining patterns of AP Ab-negative SPMG (a and b) and AP Ab-positive SPMG (c–h) sera. Six AP Ab-positive sera recognized a single AP band which disappeared when the samples were preabsorbed with AP protein (Fig. 3h+AP). No band was detected in sera from the AP Ab-negative SPMG patients or the healthy controls.

dominance by Fisher's exact test ($p<0.05$) as compared with those with AP Ab-negative SPMG. The mean AP Ab value for SPMG was 0.265 nM ($n=22$; 0.017 to 0.8 nM).

All AP-MuSK Ab-positive patients were tested in the inhibition assay, in the ^{125}I -AP RIA, and ^{125}I -His-MuSK RIA. As shown in Fig. 2A, AP-MuSK Ab-positive sera was found in both SPMG and SNMG by the ^{125}I -AP-MuSK assays. AP-MuSK Ab was detected in 22 of the 249 SPMG patients as shown in Fig. 1. SNMG sera had extremely high Ab titers, whereas SPMG sera had relatively low ones. The specificity of the assay system was determined by AP inhibition experiments with all AP-MuSK Ab-positive sera. Co-incubation of SPMG sera with an excess of unlabeled AP (27 μg) decreased ^{125}I precipitation to the control levels in all sera tested, whereas co-incubation of SNMG sera with AP did not alter precipitation (Fig. 2A). ^{125}I -AP precipitation assays also detected AP Abs in all SPMG patients with AP-MuSK Ab, but not in SNMG sera. Co-incubation of positive sera with unlabeled AP decreased ^{125}I precipitation to the control levels in all sera tested (Fig. 2B). His-MuSK precipitation assays detected MuSK Abs in the SNMG but not the SPMG sera (Fig. 2C). Thus AP Abs were present in SPMG but not in SNMG.

We also performed the immunoblot analysis on sera from patients with high AP Ab titers, and tested in the inhibition assay. Western blotting was used on sera from 2 AP Ab-negative (Fig. 3a, b) and 6 AP Ab-positive (Fig. 3c–h) SPMG patients, and from 4 healthy participants. Immunostaining patterns of these sera are shown in Fig. 3. Molecular weights of the proteins reactive with those in the sera were calibrated with standard proteins. Coomassie brilliant blue staining showed transblotted purified AP protein of approximately 70 kD. Six AP Ab-positive sera recognized a single 70 kD band which disappeared when the sera were preabsorbed with the AP protein (Fig. 3h+AP). No band was present in sera from the healthy controls or AP Ab-negative SPMG patients.

We evaluated the relationship between AP Ab and AChR Ab antibodies in 18 AP Ab-positive patients. There was no correlation between AChR and AP Ab titers (Fig. 4), and no cross-reactivity was found between AChR and AP on the addition of AP to the AChR assay system (data not shown). The relationships between variations in AP Ab and AChR

Ab in individuals, were determined by measuring both antibody titers in serial samples of serum taken from seven participants who had antibodies against both AChR and AP. In some cases, there were temporary discrepancies between the changes in both titers, but there also was a broad correlation between AChR and AP Ab titer fluctuations in certain patients (data not shown). Those patients showed less improvement after undergoing various therapies and had consistently high antibody titers for 5 to 24 years after disease onset.

The clinical features of the AP Ab-positive among the 99 SPMG patients (27 men, 72 women) (Table 1) were characterized. Ten (10%) had AP Abs (mean±SD: 0.241±0.235 nM). All were women, and there was significant female predominance in the AP Ab-positive group by Fisher's exact test ($p<0.05$). Although the mean age of AP Ab-positive patients was older compared to AP Ab-negative patients, the statistical analysis did not show significant difference among Ab positive and negative patients even excluding ocular type MG patients. There was no difference in the disease duration between the AP Ab-positive and -negative patients. Fifteen participants with AChR Ab-positive ocular MG (MGFA class I) had no AP Ab. The MGFA clinical classification at maximum severity was significantly more severe in the AP Ab-positive than AP Ab-negative group, including patients with and without ocular MG ($p<0.05$ by the Mann–Whitney U test). The frequency of intubation requiring mechanical ventilation, defined as MGFA class V, was increased in the AP Ab-positive group (5/10, 50%) but did not differ statistically from that in the AP Ab-negative generalized MG group (18/74, 24%). Nor did the frequency of thymoma differ between the groups. The mean AChR Ab titer was higher but did not differ significantly in patients with AP Ab. There was no sig-

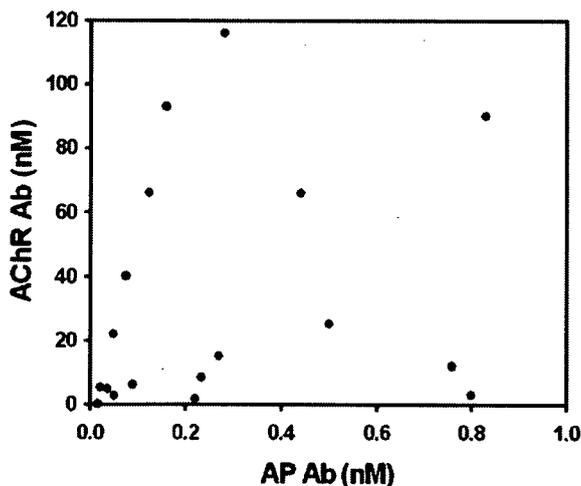


Fig. 4. There is no significant correlation between the AP Ab and AChR Ab titers.

Table 1

Baseline clinical characteristics of SPMG patients with and without AP Ab

Characteristic	AP Ab-positive patients (n=10)	AP Ab-negative patients (n=89)
Age: mean±SD (range)	49.3±13.9 (24–67)	38.0±20.8 (1–85)
Men/women*	0/10	27/62
Mean disease duration (year)	21.5 (3–35)	18.2 (1–51)
MGFA at max severity†		
I	0	15
II	0	20
III	4	29
IV	1	7
V	5	18
Thymoma (%)	2 (20%)	27 (30%)
Thymectomy	10	79
Prednisolone or immunosuppressants	8	74
Anti-AChR Ab: mean±SD (nM) (range)	209±285 (0.4–1750)	25.3±30.1 (0.2–400)
Anti-AP Ab: mean±SD (nM) (range)	0.24±0.21 (0.011–0.80)	

*: $p<0.05$ by Fisher's exact test. †: $p<0.05$ by the Mann–Whitney U test.

nificant correlation between the AP and AChR Abs titers for either Ab-positive patient group.

Most patients in both groups had lessened MG symptoms after prednisolone treatment with or without other immunosuppressants. Only a few in each group showed improvement after receiving anti-cholinesterase medication without immunosuppressants.

4. Discussion

AP Ab was detected exclusively in 9% of SPMG patients tested, similar to the value given in our earlier report [5]. In contrast, no AP Ab was detected in the SNMG and non-MG patients, or in the healthy participants [5]. We confirmed immunologically by western blot analysis the presence of antibodies against AP in SPMG patients and showed there was no cross-reactivity or correlation between AChR and AP. The other aim of this study was clarification of the clinical characteristics of AP Ab-positive SPMG patients as compared to those who had AP Ab-negative SPMG. Clinical characteristics found for the AP Ab-positive patients are female predominance, absence of ocular MG, as well as a severe clinical course trend that included myasthenic crisis requiring artificial ventilation. Female predominance also has been reported in MuSK Ab-positive SNMG [2,4,6,7], but the reason for it is not clear. Whether AP Ab has a modifying effect on the clinical symptoms of SPMG and whether it represents a useful clinical indicator of SPMG requires further study.

Our findings indicate that AP Ab is a novel autoantibody found only in SPMG patients and that its presence may result in a more severe form of generalized MG as compared to patients with AP Ab-negative SPMG. The location of AP in the

cell and cell membrane with relevance to its antigenicity must be clarified to notice how AP antibody concerns pathophysiology of SPMG.

References

- [1] Drachman DB. Myasthenia gravis. *N Engl J Med* 1994;330:1797–810.
- [2] Evoli A, Tonali PA, Padua L, Monaco ML, Scuderi F, Batocchi AP, et al. Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. *Brain* 2003;126:2304–11.
- [3] Jeretzkii III A, Barohn RJ, Ermatoff RM, Kaminski HJ, Kecsey JC, Penn AS, et al. Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. *Neurology* 2000;55:16–23.
- [4] McConville J, Farrugia ME, Beeson D, Kishore U, Metcalfe R, Newsom-Davis J, et al. Detection and characterization of MuSK antibodies in seronegative myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2004;55:580–4.
- [5] Ohta K, Shigemoto K, Kubo S, Maruyama N, Abe Y, Ueda N, et al. MuSK Ab described in seropositive MG sera found to be Ab to alkaline phosphatase. *Neurology* 2005;65:1988.
- [6] Vincent A, Bowen J, Newsom-Davis J, McConville J. Seronegative generalized myasthenia gravis: clinical features, antibodies, and their targets. *Lancet Neurol* 2003;2:99–106.
- [7] Sanders DB, El-Salem K, Massey JM, McConville J, Vincent A. Clinical aspects of MuSK antibody seronegative MG. *Neurology* 2003;60:1978–80.

Heterogeneity of immunopathological features of AChR/MuSK autoantibody-negative myasthenia gravis

Akio Hayashi^a, Hiroyuki Shiono^{a,*}, Mitsuhiro Ohta^b, Kiyoe Ohta^c,
Meinoshin Okumura^a, Yoshiki Sawa^a

^a Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, Japan

^b Department of Medical Biochemistry, Kobe Pharmaceutical University, Japan

^c Utano National Hospital, Clinical Research Center, Japan

Received 5 March 2007; received in revised form 5 July 2007; accepted 6 July 2007

Abstract

We compared B cells and germinal centers in thymus from myasthenia gravis (MG) patients either with anti-acetylcholine receptor (AChR) autoantibodies or with neither anti-muscle-specific tyrosine kinase (MuSK) nor anti-AChR (seronegative MG: SN-MG). The numbers and frequencies of total and germinal center B cells varied in the SN-MG thymi, some of which were normal/atrophic. Others were clearly hyperplastic, their B cell parameters overlapping with those in AChR-positive MG, which implicates the thymus in pathogenesis. Indeed, some SN-MG patients apparently benefited from thymectomy, which should be considered a management option.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Myasthenia gravis; Acetylcholine receptor; Muscle-specific tyrosine kinase; Germinal center; Thymectomy; Flow cytometry

1. Introduction

Approximately 80–90% of patients with generalized myasthenia gravis (MG) have circulating autoantibodies against the muscle acetylcholine receptor (AChR) (Lindstrom, 2000; Vincent, 2002). These AChR antibody-positive MG (AChR-MG) patients frequently have thymic alterations, which are characterized by expanded perivascular spaces containing lymphoid infiltrates and B cell follicles with germinal centers (Willcox, 1993; Levinson and Wheatley, 1996). B lymphocytes isolated from these thymi can spontaneously produce anti-AChR antibodies *in vitro* (Vincent et al., 1978; Scadding et al., 1981; Fujii et al., 1984), and many of their thymic germinal centers appear to be AChR-specific (Sims et al., 2001; Shiono

et al., 2003). These findings suggest that the thymus plays pathogenetic roles in AChR-MG patients, consistently with the suspected benefits of thymectomy (Gronseth and Barohn, 2000).

In contrast, some AChR antibody-‘seronegative’ patients were reported to have autoantibodies against the muscle-specific tyrosine kinase (MuSK) (Hoch et al., 2001). The frequency of MuSK antibody-positive MG (MuSK-MG) patients varies (Scuderi et al., 2002; Evoli et al., 2003; Sanders et al., 2003), but is low in Asia (Yeh et al., 2004; Shiraishi et al., 2005). In addition, in all countries, some patients are negative for both autoantibodies: AChR/MuSK-‘seronegative’ MG (SN-MG). Two recent reports compared the pathological features of thymi from MuSK-MG, AChR-MG and SN-MG patients (Lauriola et al., 2005; Leite et al., 2005); they both emphasized that mild abnormalities were common (30–60%) in SN-MG, but were much rarer in MuSK-MG than AChR-MG.

In the present study, we quantitated thymic changes in SN-MG patients using flow cytometric and histological analyses,

* Corresponding author. Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita-City, Osaka, 565-0871, Japan. Tel.: +81 6 6879 3152; fax: +81 6 6879 3163.

E-mail address: hishiro@surg1.med.osaka-u.ac.jp (H. Shiono).

Table 1
Patient characteristics

	AChR-MG (n=13)	SN-MG (n=10)
Sex ratio F:M	12:1	8:2
MG onset-age, yr, mean (range)	28.3 (16–50)	32.5 (5–40)
Age at thymectomy, yr, mean (range)	30.5 (17–55)	36.0 (19–52)
MG duration at thymectomy, mo, mean (range)	25.3 (4–58)	42.0 (4–173)
MGFA clinical classification		
Class I	1	0
Class IIa	1	2
IIb	2	1
Class IIIa	7	2
IIIb	2	2
Class IVa	0	1
IVb	0	1
Class V	0	1
Histological diagnosis, number (%)		
Hyperplasia	4 (30.8)	5 (50.0)
Normal thymus	5 (38.4)	3 (30.0)
Involution	4 (30.8)	2 (20.0)

AChR-MG = acetylcholine receptor antibody-positive myasthenia gravis.

SN-MG = AChR/muscle-specific tyrosine kinase antibody seronegative myasthenia gravis.

MGFA = myasthenia gravis foundation of America (Jaretzki et al., 2000).

focusing on the thymic germinal centers. As an independent index of the pathogenetic role of the thymus, we assessed the outcome of thymectomy.

2. Methods

2.1. Patients

One hundred and seven patients were diagnosed with generalized MG by clinical and electromyographic criteria, and underwent extended thymectomy at Osaka University Hospital from 1982 to 2001; of these, 14 were seronegative for anti-AChR antibodies. Here anti-AChR antibodies were measured with the radioimmunoassay kit (RSR Limited, Avenue Park, Pentwyn, Cardiff, U.K.) at Shionogi Laboratory (Osaka, Japan). Briefly, sera were incubated overnight at 4 °C with ^{125}I -bungarotoxin-labeled fetal+adult AChR. Then goat anti-human IgG was added to precipitate the IgG in each sample. The radioactivity (cpm) in each (washed) pellet was converted into a titer (in nMol/liter) of anti-AChR antibody in serum. With informed consent and Ethical Committee approval, we enrolled 10 SN-MG whose thymi were available for flow cytometric analysis, and a random 13 AChR-MG patients whose thymi were available for both surface markers and intracellular Bcl-2 expression. We excluded patients already taking steroid treatment before thymectomy. Using a sensitive radioimmunoprecipitation assay with recombinant human MuSK protein (Ohta et al., 2004), all AChR seronegative patients were shown to be negative for anti-MuSK antibodies. The clinical characteristics are shown in Table 1.

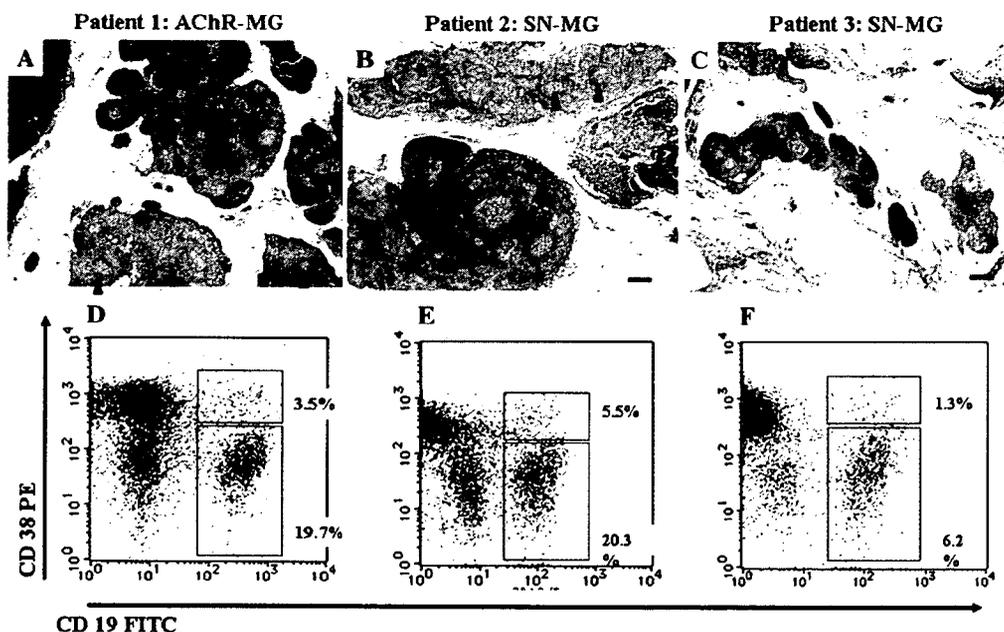


Fig. 1. Hematoxylin and eosin staining of thymus specimens (A–C) and flow cytometric analyses of thymic lymphocytes (D–F) from 3 representative patients with myasthenia gravis (MG). Patient 1 was a 19-year-old female, anti-AChR positive MG (A, D). Patients 2 (B, E) and 3 (C, F) were 20- and 19-year-old SN-MG females; both were negative for both anti-AChR- and anti-MuSK-antibodies (SN-MG). Arrowheads indicate germinal centers in the thymic medulla. The thymus from patient 2 (SN-MG, B) showed lympho-follicular hyperplasia with as many germinal centers as in patient 1 (AChR-MG, A), whereas patient 3 (SN-MG) showed fatty replacement with almost no germinal centers (C). Bars = 300 μm . Two-color flow cytometric analyses of CD19 and CD38 expression in thymic lymphocytes are shown below the individual sections (D–F). The percentages of germinal center B cells (CD19⁺CD38⁺) and extra-follicular B cells (CD19⁺CD38⁻) are indicated. None of the patients had received corticosteroids before thymectomy.

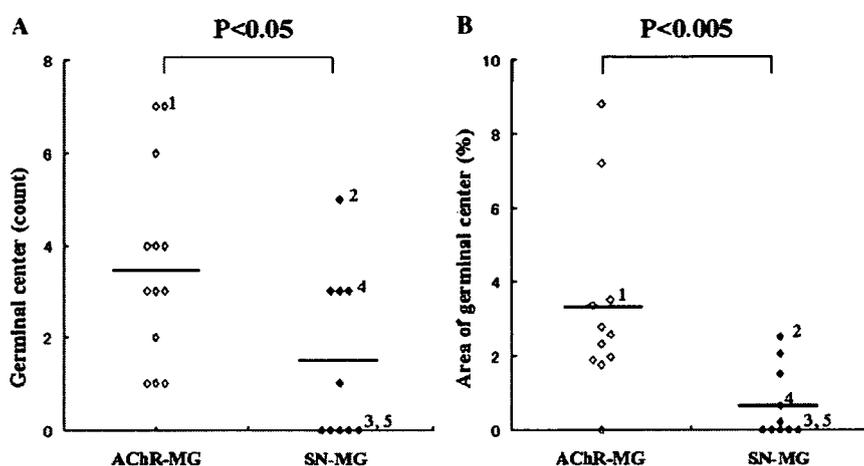


Fig. 2. Quantitation of thymic germinal centers in MG subgroups. (A) Maximum number of germinal centers per low power field ($\times 40$). (B) Percentage area of thymic tissue occupied by germinal centers. Bars indicate the average values. Numbers beside the labels indicate the patients noted in Fig. 1 (1 to 3) and 2 SN-MG patients (4 and 5), whose specimens were used to examine the expression of Bcl-2 in Fig. 5. Patient 4 was a 46-year-old female and patient 5 a male aged 51.

2.2. Histological analysis

Hematoxylin and eosin stained sections of the thymi were prepared from paraffin blocks, coded and then microscopically examined by a single blinded observer under low magnification ($\times 40$) for classification into hyperplasia, normal and involuted thymus. We also counted the maximum number of germinal centers per low-power field ($\times 40$) in all sections from each thymus (average: 3.7 slides for each case). The same field images were captured using a digital camera, and then the percentage area of germinal centers in the total thymic tissue was calculated by counting the total pixels of the traced area using Mac SCOPE version 2.6.

2.3. Immunologic analysis

Removed thymic tissues were weighed and disrupted mechanically; washed cell suspensions were enriched on a Ficoll-Hypaque

(Lymphoprep, Nycomed, Norway) before staining for surface markers, as described previously (Okumura et al., 2003). Briefly, lymphocytes were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human CD19 (DAKO, Denmark) and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CD38 (Becton Dickinson, CA). CD19⁺ cells and CD19⁺CD38⁺ cells corresponded to total and germinal center B cells, respectively.

We also analyzed Bcl-2 expression by germinal center B cells, using a method previously reported (Shiono et al., 1997). In brief, viable cells were stained with biotin-conjugated anti-CD19 (HD37, DAKO, Glostrup, Denmark) and PE-conjugated anti-CD38, and then a hamster anti-human Bcl-2 antibody (6C8, Pharmingen, CA) was used after fixation and permeabilization. After adding a secondary FITC-conjugated anti-hamster IgG antibody (mixed clone, Pharmingen, CA) and RED670-labeled streptavidin (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), we performed three-color flow cytometric analysis. Cells from tonsils obtained

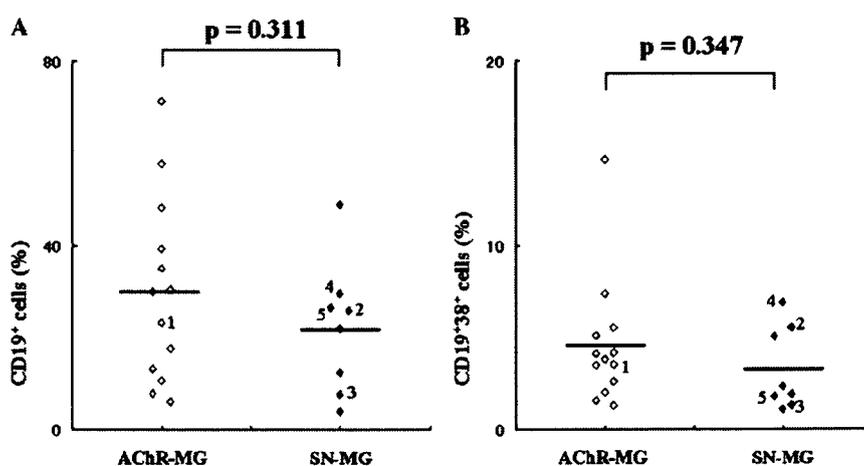


Fig. 3. Percentage of thymic B cell populations by flow cytometric analysis. Panel A shows the percentage of CD19⁺ cells in total thymic lymphocytes, i.e. total thymic B cells, while panel B shows CD19⁺38⁺ germinal center B cells. There was no significant difference between the 2 groups. Numbers beside the labels indicate the patients noted in Figs. 1 and 5.

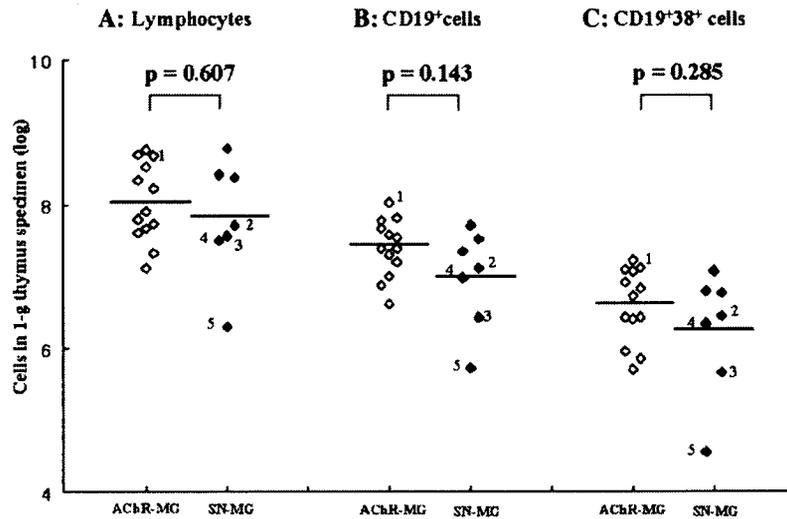


Fig. 4. Absolute numbers of thymic lymphocytes and B cells. The scales are logarithmic and show the numbers of total lymphocytes, CD19⁺ B cells and CD19⁺CD38⁺germinal center B cells per gram of excised thymus tissue. The differences between the 2 groups were not significant for any of the cell types. Numbers beside the labels indicate the same patients in Figs. 1 and 5.

during routine tonsillectomy from 8 patients without any clinical signs of immunological disorder were used as a control.

2.4. Statistical analyses

We used Mann-Whitney's U test in comparing two subgroups. The outcome of MG was compared using χ^2 with Yates' correction. The threshold for significance of p -values was $p < 0.05$. Statistical analyses were done with the Stat View software (StatView-5 J, SAS Institute Inc.).

3. Results

3.1. Clinical features of SN-MG patients

Table 1 shows the clinical characteristics of the SN-MG patients. No anti-MuSK antibodies were detected in the 13 AChR-MG and 10 AChR seronegative patients. Further, there were no differences between the AChR-MG and SN-MG subgroups in onset-age, duration, or severity of their MG, or in age at thymectomy.

3.2. Thymic features

The morphology of the thymus, summarized in Table 1, was not significantly different between the AChR-MG and SN-MG subgroups. Notably, 5 of the 10 SN-MG thymi showed typical hyperplasia as illustrated in Fig. 1B, where the germinal center count was 5. In half of the SN-MG thymi, these counts overlapped those in AChR-MG, but they were close to zero in the other half (Fig. 2), whose thymi were normal or even atrophic (Fig. 1C), accounting for the significantly lower germinal center numbers and areas in the SN-MG group as a whole (Fig. 2A, 3.5 ± 2.1 versus 1.5 ± 1.8 , $p < 0.05$; Fig. 2B, $3.3 \pm 2.5\%$ versus 0.7 ± 1.0 , $p < 0.005$).

3.3. Immunologic analysis by flow cytometry

As expected from the morphological results, flow cytometric analyses showed that the percentages of total CD19⁺ cells and CD19⁺CD38⁺ germinal center B cells overlapped with those in AChR-MG, and the differences were not significant. Even in the atrophic SN-MG thymi, B cells were usually still at least 5% of the total (Figs. 3 and 4). By contrast, in the thymus of a 5-year-old child who underwent cardiac surgery, CD19⁺ cells and CD19⁺CD38⁺ cells constituted 1.9% and 0.5% of thymic lymphocytes, respectively (data not shown).

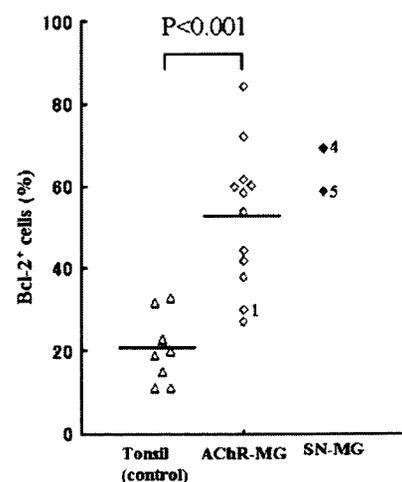


Fig. 5. Bcl-2 expression in germinal center B cells from myasthenic thymus and control tonsil specimens. The percentage of Bcl-2 protein positive cells in CD19⁺CD38⁺ cells is shown. The mean value (bars) for anti-AChR positive MG (AChR-MG) was significantly higher than in the tonsils. Bcl-2 was expressed in germinal center B cells from 2 AChR/MuSK seronegative MG (SN-MG) patients as highly as in the AChR-MG patients.

Table 2
Outcome of myasthenia gravis symptom

MGFA post-intervention status	AChR-MG (n=13) [hyperplastic]	SN-MG (n=10) [hyperplastic]
Complete stable remission	3 [2]	3 [3]
Pharmacological remission	0	0
Minimal manifestations		
MM-0	1 [0]	0
MM-1	0	0
MM-2	1 [0]	0
MM-3	0	0
Improved	4 [2]	4 [2]
Unchanged	3 [0]	2 [0]
Worse	1 [0]	1 [0]

3.4. Failure of Bcl-2 down-regulation in germinal center B cells in SN-MG

As previously reported (Shiono et al., 1997), the percentage of Bcl-2⁺ germinal center B cells (CD19⁺CD38⁺) in the AChR-MG patients was significantly higher than in the control tonsil cells, in which Bcl-2 was normally down-regulated among this subset (Fig. 5, 52.7±16.9% versus 20.5±8.5, $p<0.001$). We also examined the expression of Bcl-2 in 2 SN-MG patients, whose B cell frequencies were above average (Fig. 5, 69.1% and 58.9%). Evidently, down-regulation of Bcl-2 protein had failed in these patients' germinal center B cells just as it does in AChR-MG patients (Shiono et al., 1997). As expected, it was also expressed in a high proportion of the extra-follicular B cells (data not shown, Shiono et al., 1997).

3.5. Clinical course in SN-MG patients

Patient 1 (AChR-MG) and patient 2 (SN-MG), whose thymi were hyperplastic, both showed large numbers of total and germinal center B cells (Fig. 1), and were in complete remission without any additional use of steroids at the time of writing. In contrast, patient 3 (SN-MG) showed an involuted thymus and very few germinal center B cells (Fig. 1C, F), and required steroid treatment after thymectomy. The status of all patients is shown in Table 2. Seven (70%) of the 10 SN-MG patients were improved and 3 (30%) in complete stable remission without any steroid treatment at the time of this report. The frequencies of complete remission and improvement were not significantly different between the SN-MG and AChR-MG subgroups ($p=0.968$). Table 2 also shows how many of the SN-MGs who improved after thymectomy had hyperplastic thymi.

4. Discussion

Our main novel finding here is the variability in SN-MG thymi and their germinal center B cells; in some patients, the B cell parameters overlap with those in AChR-MG, but, in others, with the controls. Together with the many similarities in clinical picture (Evoli et al., 2003), our results imply that some SN-MG patients might benefit from similar therapies – including thymectomy – an important possibility that demands further studies.

The frequency of MuSK positive patients among seronegative MG reported in Asian studies seem to be lower than in Caucasian patients (Yeh et al., 2004; Shiraishi et al., 2005). Yeh et al. found autoantibodies to MuSK in only 1 of 26 patients in Taiwan who lacked anti-AChR. There appear to be racial differences in the subgroups of MG (rarity of childhood MG in western countries) as well as clinical aspects. Therefore, it was not surprising that no MuSK positive patients were found in our small AChR seronegative series.

We have previously reported alterations of the thymus in AChR-MG patients, especially in their germinal center B cells (defined as CD19⁺CD38⁺ cells by flow cytometric analysis). First, we found that, in MG thymi, this subset failed to show the normal down-regulation of Bcl-2, suggesting that autoreactive B cells that normally undergo apoptosis in germinal centers may aberrantly survive in MG (Shiono et al., 1997). We then reported that reductions in anti-AChR antibody titers 1 year after thymectomy correlated significantly with the number of thymic CD19⁺ and CD19⁺CD38⁺ cells (Okumura et al., 2003). Those findings suggested that one of the biological roles of thymectomy as treatment for MG is removing thymic germinal centers and interruption of the concomitant antibody diversification. The advantage of this type of flow cytometric analysis is that it examines the entire thymus (regardless of any fatty replacement and surrounding fat tissues).

In the present study, histological findings and germinal center numbers varied among the SN-MG patients, so the average values were lower than in the AChR-MG patients. However, several of the SN-MG patients (e.g. patient 2) showed thymic hyperplasia strikingly similar to that in AChR-MG, whereas others showed atrophy. In addition, Bcl-2 protein in thymic CD19⁺CD38⁺ cells from 2 SN-MG patients was as highly expressed as in AChR-MG thymi. We propose that autoreactive B cells in these patients' thymi may have escaped the negative selection normally seen in the germinal centers in secondary lymphoid follicles in tonsils.

We show here that several SN-MG patients had very similar thymic hyperplasia to that in AChR-MG; it apparently correlated with improvements in their MG after thymectomy, but that demands confirmation in a larger series. By contrast, hyperplasia was much less obvious in MuSK-MG, where the thymus was usually normal or atrophic (Evoli et al., 2003). Presently, surgery is considered unsuitable for the treatment of MuSK-MG, where the thymus shows few abnormalities (Lauriola et al., 2005; Leite et al., 2005). By contrast, if the thymus is hyperplastic in SN-MG (as in patient 2), its removal may be beneficial. Although further studies are required, physicians and surgeons should be aware that this subgroup includes individuals who may benefit.

Acknowledgments

This study was supported by a Grant-in Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan. We are grateful to Professor Nick Willcox, Oxford University, for critical reading of the manuscript and for encouragement. We also thank Miss N. Araki for secretarial assistance.

References

- Evoli, A., Tonali, P.A., Padua, L., Monaco, M.L., Scuderi, F., Batocchi, A.P., Marino, M., Bartocconi, E., 2003. Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. *Brain* 126, 2304–2311.
- Fujii, Y., Monden, Y., Nakahara, K., Hashimoto, J., Kawashima, Y., 1984. Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: production by lymphocytes from thymus or thymoma. *Neurology* 34, 1182–1186.
- Gronseth, G.S., Barohn, R.J., 2000. Practice parameter: thymectomy for autoimmune myasthenia gravis (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 55, 7–15.
- Hoch, W., McConville, J., Helms, S., Newsom-Davis, J., Helms, A., Vincent, A., 2001. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patient with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat. Med.* 7, 365–368.
- Jaretzki, A., Barohn, R.J., Ernstoff, R.M., Kaminski, H.J., Keesey, J.C., Penn, A.S., Sanders, D.B., 2000. Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. *Ann. Thorac. Surg.* 70, 327–334.
- Lauriola, L., Ranelletti, F., Maggiano, N., Guerriero, M., Punzi, C., Marsili, F., Bartocconi, E., Evoli, A., 2005. Thymus changes in anti-MuSK-positive and -negative myasthenia gravis. *Neurology* 64, 536–538.
- Leite, M.I., Strobel, P., Jones, M., Micklem, K., Moritz, R., Gold, R., Niks, E.H., Berrih-Aknin, S., Scaravilli, F., Canelhas, A., Marx, A., Newsom, D., Willcox, N., Vincent, A., 2005. Fewer thymic changes in MuSK antibody-positive than in MuSK antibody-negative MG. *Ann. Neurol.* 57, 444–448.
- Levinson, A.I., Wheatley, L.M., 1996. The thymus and the pathogenesis of myasthenia gravis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 78, 1–5.
- Lindstrom, J.M., 2000. Acetylcholine receptors and myasthenia. *Muscle Nerve* 23, 453–477.
- Ohta, K., Shigemoto, K., Kubo, S., Maruyama, N., Abe, Y., Ueda, N., Ohta, M., 2004. MuSK antibodies in AChR Ab-seropositive MG vs AChR Ab-seronegative MG. *Neurology* 62, 2132–2133.
- Okumura, M., Ohta, M., Takeuchi, Y., Shiono, H., Inoue, M., Fukuoka, K., Kadota, Y., Miyoshi, S., Fujii, Y., Matsuda, H., 2003. The immunologic role of thymectomy in the treatment of myasthenia gravis: Implication of thymus-associated B-lymphocyte subset in reduction of the anti-acetylcholine receptor antibody titer. *J. Thorac. Cardiovasc Surg.* 126, 1922–1928.
- Sanders, D.B., E.I.-Salem, K., Massey, J.M., McConville, J., Vincent, A., 2003. Clinical aspects of MuSK antibody positive seronegative MG. *Neurology* 60, 1978–1980.
- Scadding, G.K., Vincent, A., Newsom-Davis, J., Henry, K., 1981. Acetylcholine receptor antibody synthesis by thymic lymphocytes. Correlation with thymic histology. *Neurology* 31, 935–943.
- Scuderi, F., Marino, M., Colonna, L., Mannella, F., Evoli, A., Provenzano, C., Bartocconi, E., 2002. Anti-p110 autoantibodies identify a subtype of “seronegative” myasthenia gravis with prominent oculobulbar involvement. *Lab. Invest.* 82, 1139–1146.
- Shiono, H., Fujii, Y., Okumura, M., Takeuchi, Y., Inoue, M., Matsuda, H., 1997. Failure to down-regulate Bcl-2 protein in thymic germinal center B cells in myasthenia gravis. *Eur. J. Immunol.* 27, 805–809.
- Shiono, H., Roxanis, I., Zhang, W., Sims, G.P., Meager, A., Jacobson, J.W., Liu, J.L., Matthews, I., Wong, Y.L., Bonifati, M., Micklem, K., Stott, D.I., Todd, J.A., Beeson, D., Vincent, A., 2003. Scenarios for anti immunization of T and B cells in myasthenia gravis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 998, 237–256.
- Shiraishi, H., Motomura, M., Yoshimura, T., Fukudome, T., Fukuda, T., Nakao, Y., Tsujihata, M., Vincent, A., Eguchi, K., 2005. Acetylcholine receptors loss and postsynaptic damage in MuSK antibody-positive myasthenia gravis. *Ann. Neurol.* 57, 289–293.
- Sims, G.P., Shiono, H., Willcox, N., Stott, D.I., 2001. Somatic hyper mutation and selection of B cells in thymic germinal center responding to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. *J. Immunol.* 167, 1935–1944.
- Vincent, A., 2002. Unraveling the pathogenesis of myasthenia gravis. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 797–804.
- Vincent, A., Scadding, G.K., Thomas, H.C., Newsom-Davis, J., 1978. In vitro synthesis of anti-acetylcholine receptor antibody by thymic lymphocytes in myasthenia gravis. *Lancet* 1, 305–307.
- Willcox, N., 1993. Myasthenia gravis. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 910–917.
- Yeh, J.H., Chen, W.H., Chiu, H.C., Vincent, A., 2004. Low frequency of MuSK antibody in generalized seronegative myasthenia gravis among Chinese. *Neurology* 62, 2131.

特集

免疫性神経・筋疾患の動物モデル

重症筋無力症

重本 和宏

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

1. 重症筋無力症と疾患動物モデル

自己免疫疾患は、免疫系が自己の臓器などを誤って異物として認識した結果、炎症反応によって引き起こされる。自己抗原の同定だけでなく、人の病気に相当する疾患動物モデルをつくることによって、はじめて自己免疫疾患として疾患概念を確立することができる。我々は神経筋シナプス接合部に発現する muscle-specific kinase (MuSK) 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。さらに、疾患動物モデルを使って発症のメカニズムについても解析を行なっている。

2. 重症筋無力症とは

重症筋無力症は自己抗体により発症する自己免疫疾患として最初に明らかにされた神経筋疾患である^{1,2)}。全身の筋力低下、易疲労性（休むと回復する）を特徴として、とくに眼瞼下垂、複視などの眼の症状を特徴とする。重篤なケースでは呼吸筋麻痺による呼吸困難や、嚥下困難や舌萎縮などいわゆる球麻痺などの症状も呈する。現在、重症筋無力症は難病として厚生労働省が特定疾患の一つとして指定している。日本における患者数は1万人以上存在すると推定されるが、人口の高齢化に伴って潜在的な患者が増加していると予想されることから、我が国だけでなく欧米においても高齢者を含めた患者の実態調査が進められてい

る。重症筋無力症は患者血清に存在する自己抗体が、運動神経終末の神経伝達を抑制するために骨格筋の収縮が阻害されるために発症する。ちなみに顔筋、眼球を動かす外眼筋、咽頭収縮筋も骨格筋として分類される。治療は抗コリンエステラーゼ剤、ステロイド、免疫抑制剤、胸腺腫摘出（胸腺腫が併発のケース）、重症の場合は血漿交換（血中の自己抗体を除去）が行なわれる。現在では適切な医療を受けていれば死亡に至るケースは少ない。

3. 重症筋無力症と自己抗体

重症筋無力症の特徴的な症状（眼瞼下垂や易疲労性）を示す疾患は、17世紀にはイギリスの著名な医学者、Thomas Willisによって文献に記録されている^{1,2)}。近世になってから重症筋無力症が自己免疫によって発症する疾患であると強く考えられるようになった。しかしながらその原因と発症のメカニズムがつきとめられたのは、最近になってからである。約30年前に、Lindstromらは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：AChR）に対する自己抗体により重症筋無力症と同じ病気を動物で発症させることに成功した。さらに実際に重症筋無力症の患者の80%でAChR抗体が検出されることを示した。また患者から採取したAChR抗体をマウス腹腔に注射する

と、筋麻痺を誘導できることや、患者の血液から透析により自己抗体を除去すると症状が改善されることから自己抗体により発症することが確かめられた。一方で約20%の重症筋無力症の患者の血中には、AChR抗体が検出されないため、未知の自己抗原に対する抗体により発症すると予想して多くの研究がなされたにも関わらず、自己抗原はまったく不明であった。

4. Muscle-specific kinaseに対する自己抗体の発見

2001年に、HochらはAChR抗体が検出されない重症筋無力症の患者の2/3の血清中にMuSK (Muscle specific kinase) 抗体を検出した³⁾。我々も重症筋無力症患者の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、原因不明の重症筋無力症の約30%で抗MuSK抗体が高値で検出されることを報告した⁴⁾。米国、イギリス、イタリアおよび我が国で、MuSK抗体が陽性となる重症筋無力症患者の症状や臨床経過を調べたところ、AChR抗体陽性の重症筋無力症と比べ異なる特徴が明らかになってきた。抗AChR抗体陽性の重症筋無力

症の主症状である、四肢の筋力低下や易疲労性の症状は比較的少ないが、有意に嚥下困難、構音障害、咀嚼障害などの球麻痺症状、頸部筋力低下、呼吸筋麻痺がみられる症例が多い⁵⁾。また舌萎縮や顔筋萎縮に至るケース、そして種々の治療法に対して難治性であり、呼吸筋麻痺による重篤な症状に至るケースも多い。胸腺腫の併発はMuSK抗体陽性患者では見つかっておらず、この点もAChR抗体陽性重症筋無力症ときわめて異なる特徴である。現在では、MuSK抗体陽性の重症筋無力症は、AChR抗体陽性の疾患とは区別して患者の治療にあたる必要があると考えられるようになっている。

このように臨床研究から抗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、一方で抗MuSK抗体による動物発症モデルを作成することが成功しないため、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。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

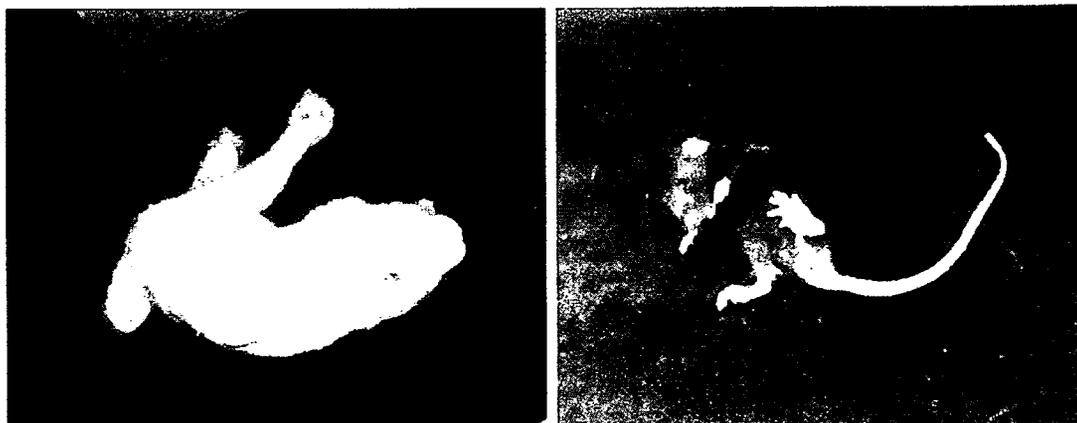


図1 MuSK抗体により発症した重症筋無力症の疾患動物モデル

組み換えにより作成したMuSK蛋白をウサギ、マウスに免疫すると筋無力症を発症した。発症したウサギの筋電図はヒト重症筋無力症と同じパターンを示した。

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(図1)⁶⁾。加えてマウスでも発症することにも成功した⁷⁾。

5. MuSKとはなにか

1995年に筆者の所属していた英国のLudwig Instituteではマウス Nsk2 (=MuSK), そして米国リジェネロン社のYancopoulosらはラット MuSK 遺伝子を単離した。MuSKはレセプタータイロシン型カイネースに分類され、その細胞外領域に未知の分子が結合することにより細胞内のタイロシンカイネース酵素の部位を活性化させ、MuSKの機能が調節される。MuSK蛋白の発現は神経筋シナプス接合部の後膜側(筋側)に発現していることがわかった。ところでこのMuSKは、1992年にシビレイの発電器官から同定されたTorpedoレセプター型タイロシンカイネース遺伝子と相同である。シビレイは軟骨魚類なので、それより進

化した生物はMuSK遺伝子が保存されていると考えられる。ちなみに、シビレイの発電器官は神経筋シナプス接合部が積み重なったもので、シナプス後筋肉が退化しその代り発電器官として進化したものである。MuSKやAChRは発電器官の膜に発現している。シビレイの脳神経の一部がこの発電器官へ神経支配しており、神経終末から分泌されたアセチルコリンが、発電器官のAChRに結合して脱分極を誘導する。シビレイは、これを使って100V弱の電位差を発生させ、小魚などを気絶させて捕食に利用する。シビレイの発電器官を実験材料として利用して、AChR(アセチルコリンレセプター)に関する多くの重要な研究がなされている。

6. MuSK蛋白の構造と機能

MuSKの蛋白分子構造は、免疫グロブリン様の蛋白高次構造を形成すると予想される領域(免疫グロブリン様ドメイン)が4個あり、それらには

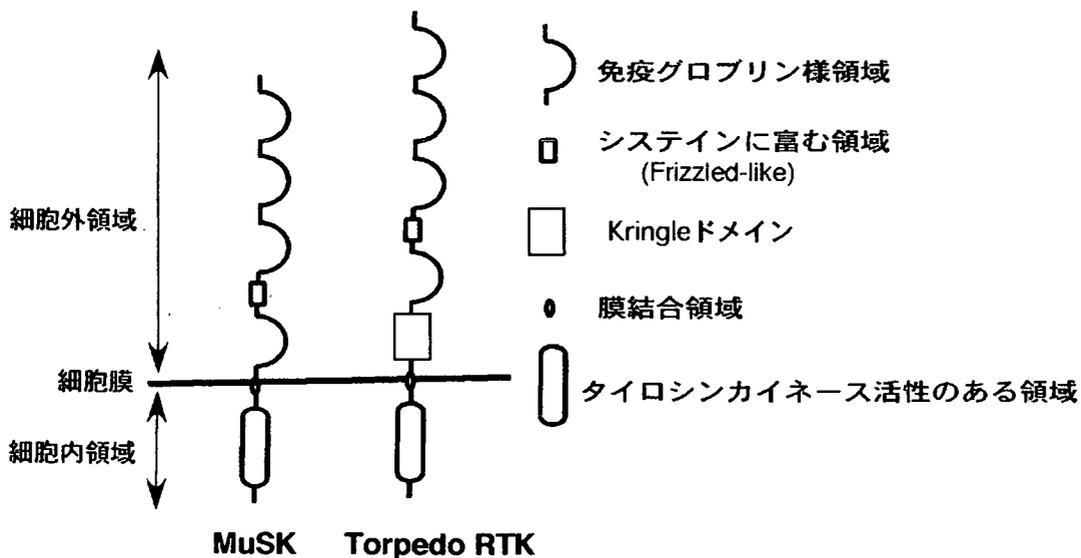


図2 MuSK蛋白のドメイン構造

MuSKはリセプター型タイロシンカイネース(RTK)蛋白に分類される。細胞外に突き出た領域は、それぞれの蛋白の高次構造のドメイン構造で表した。4個の免疫グロブリン様ドメイン、Frizzled-likeドメインから構成されている。シビレイのTorpedo RTKには、Kringle-likeドメインが一つ余分にある。

さまれたシステインに富んだ領域 (kringle-likeドメイン) からなる細胞外のリセプター構造と、細胞膜貫通領域をはさんで、タイロシンカイネースの活性基のある細胞内領域からなる (図2)。システインに富んだ領域はWntレセプターであるFrizzled分子のリガンド結合領域と良く似た蛋白高次構造を形成すると予想されるWnt分子は発生や癌などの様々な生命現象で分泌性シグナル分子として働いている。シビレイのTorpedoレセプター型タイロシンカイネース遺伝子には、さらにも

う一つのタンパク質高次構造モジュールのKringleドメインが存在する (図2)。MuSKの細胞外ドメインは、他の分子との相互作用により様々な機能を担っていると考えられる。

7. MuSKの機能

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。これまでMuSKは神経筋シナプス後膜に特異的に発現しており、運動神経終末から分必さ

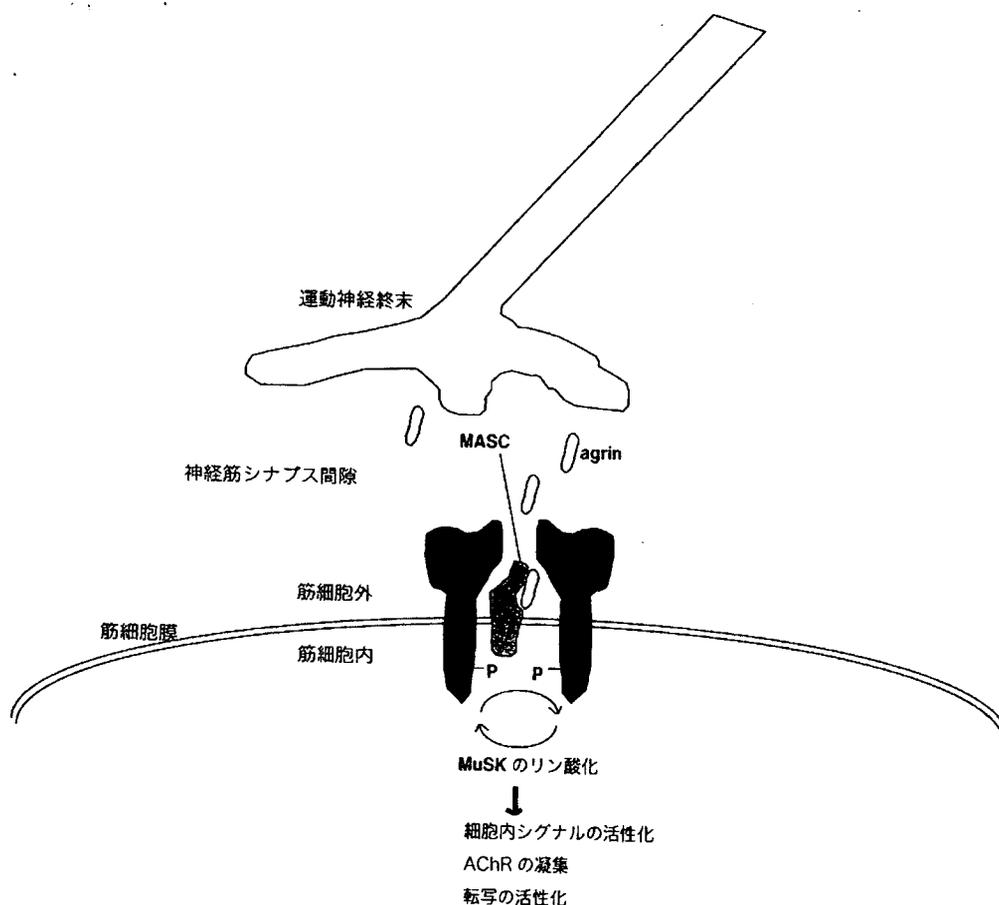


図3 神経筋シナプス接合部の模式図

運動神経終末から分泌される agrin (ヘパラン硫酸プロテオグリカン) と未知の分子 MASC (myotube-associated specificity component) により、MuSKが2量体を形成して細胞内領域にあるカイネースが活性化される。そして、お互いの細胞内領域をリン酸化することにより、様々なシグナル分子が結合し、細胞外から細胞内へシグナル伝達されAChRの凝集や核へ転写活性化シグナルを伝える。agrinは、直接MuSKと結合することができない。

れる agrin (ヘパリン硫酸プロテオグリカン) により活性化され、AChRの凝集と運動神経終末の形成を行なうことが明らかにされている(図3)。MuSK遺伝子を発生工学の手法により遺伝的に欠失させた、いわゆるノックアウトマウスでは神経筋シナプスが形成されないことから、MuSKがシナプス形成に必須の遺伝子であることが明らかにされた。加えてシナプスの運動神経終末から分泌される、 agrin のノックアウトマウスの表現型が、MuSKノックアウトマウスときわめて類似していることから、 agrin と MuSK の機能が密接に関連していることが明らかになった。

Agrin は McMahan の agrin 仮説として有名である。これは神経筋シナプスで運動神経終末から分泌される未知の分子により、シナプス筋側で AChR 凝集を誘導する分子が存在するという仮説であった。そして実際に AChR 凝集活性を示す agrin 分子が同定された。実験的に agrin を培養筋細胞に添加すると、筋細胞表面の AChR 凝集を誘導することができるが、そのためには MuSK のタイロシンカイネーシスの活性化が必須であることが示されている。しかし、 agrin は MuSK に直接結合しないことから、MuSK に結合して活性化を誘導するリガンドはいまだに不明であり、AChR 凝集のメカニズムもほとんど解明されていない。 agrin が MuSK のリガンドであれば、両方の分子が直接結合するはずであるが、多くの労力が払われたにも関わらず結局誰も証明することができない。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。未知リガンド(あるいは co-receptor かもしれない)と agrin の両方が MuSK のタイロシンカイネーシスの活性化に必要であると予想される(図3)。

興味深いことに、胎児期において運動神経終末が筋支配する以前から、 agrin 非存在下でも MuSK の働きにより、筋組織の中心領域で AChR の緩や

かな集合が誘導されることが示されている。これは、シナプス神経終末から agrin によりシナプス後部筋側へ伝えるシグナルの仲介役のリセプターとして、MuSK が AChR を凝集するだけでないことを示している。さらに、AChR 凝集には MuSK からのシグナル伝達だけでは不十分で、MuSK 蛋白の細胞外ドメインそのものが必要である。これらの結果から、MuSK は AChR や未知の分子と複合体を形成する足場蛋白としても機能している可能性が考えられる。MuSK は神経終末がシナプスを介して筋を支配する前から、将来運動神経支配される予定領域の決定に必要な分子として作用すると考えられる。このように MuSK は神経筋シナプスの発生に必須であることが明らかにされているが、成熟したシナプスでも MuSK が必要かどうか、またその機能については不明であった。

8. MuSK抗体による重症筋無力症発症のメカニズム

MuSK抗体により発症する重症筋無力症は、AChR抗体で発症するケースと比べて臨床的にかなり異なっていることをすでに述べた。この疾患に適した治療法を開発するには疾患動物モデルを使って発症のメカニズムを明らかにする必要がある。AChR抗体による重症筋無力症の発症メカニズムは、30年前に動物モデルを使ってこれまで多くの研究者により明らかにされてきた。それは大きく分けて3つの機序に分けることができる^{1,2)}。(a) AChR抗体に結合して活性化された補体による神経筋シナプス後膜の破壊。(b) 抗体結合による AChR の発現減少とその結果による神経伝達の減少 (antigenic modulation)。(c) 抗体による AChR の機能阻害。とくに (a) の補体によるシナプス後膜の破壊が、AChR抗体による重症筋無力症の発症機序として主要な原因と考えられている。いずれの機序でも、運動神経からの伝達が抑

制されることにより運動障害があらわれる。

ところでMuSK抗体陽性の重症筋無力症患者血清に存在するMuSK抗体のIgG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）⁹⁾。しかしながらヒトIgG4には補体介在性作用はない。AChR抗体に関してはこれまでの研究から、補体介在性のある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と考えられることが示されている。この点は、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、MuSK抗体が重症筋無力症の発症原因となりうるかどうか疑問が投げかけられていたポイントの一つである。

先述のMuSK抗体により発症したウサギの神経筋シナプスでは、AChRの凝集が顕著に減少していた⁶⁾。筋電図も重症筋無力症の患者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により、重症筋無力症と同じ病態をウサギが発症することがわかった⁶⁾。これは言い換えれば、MuSKが成熟した神経筋シナプスを維持するのに必須であることを示している。神経筋シナプスの筋側で、AChRと一緒にMuSK蛋白が発現している。MuSKはリセプター蛋白の構造をしており、自己抗体は細胞の外側に突き出ている部位に結合することによりMuSKの機能を障害すると考えられる（図3）。発症したウサギの神経筋シナプスの形態を調べると大変面白いことがわかった⁷⁾。まず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。正常のシナプス後膜では発達した鬚があり表面積を広くすることにより、アセチルコリンによる神経伝達を効率よく行なうことができる。発症したウサギのシナ

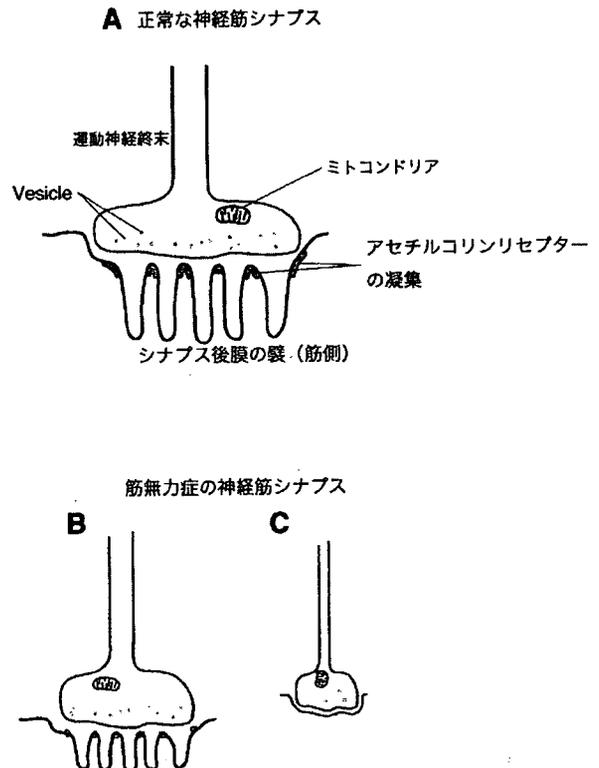


図4 MuSK抗体で発症したウサギの神経筋シナプスの形態変化（模式図）

(A) 正常のシナプスの後膜の鬚は発達している。神経終末に接した、後膜鬚の先端にAChRが凝集している。(B) MuSK抗体により発症したウサギのシナプスでは、後膜の鬚が小さくなっておりAChRの凝集も減少している。(C) シナプス後膜の鬚がまったく消失しているシナプスも見られる。加えて発症したウサギのシナプスでは運動神経終末も小さくなっている(B, C)。このような形態変化は、Dok7, MuSKの突然変異によって発症する先天性筋無力症患者のシナプスでも見られる。

プス後膜の鬚は減少あるいはまったく消失していることがわかった（図4）。面白いことに神経筋シナプスに見られる変化は、シナプス前膜つまり運動神経終末にまで及んでいた（図4）。このように疾患動物モデルを使った解析から、MuSK自己抗体による重症筋無力症発症のメカニズムはAChR抗体とは異なることが明らかになってきた。

おわりに

我々の重症筋無力症の発症モデル動物の研究から、MuSKは成熟した神経筋シナプスの維持にも必須の機能を果たしていることがわかった。そしてMuSKに対する自己抗体は、MuSKによるシナプスの維持機構を抑制するために重症筋無力症が発症することを明らかにした⁹⁾。最近、MuSKと相互作用することによりAChR凝集を誘導する細胞内シグナル分子としてDok7 (downstream of tyrosine kinases) が同定された。この蛋白分子は55 kDaで、細胞膜への局在に必要なPHドメイン (pleckstrin-homology domain), MuSKのリン酸化部位への結合に必要なPTBドメイン (phosphotyrosine-binding domain), SH2ドメイン (Src homology 2 domain) からなる。Dok-7はAChRやMuSKと同じく神経筋シナプス接合部の後膜に発現しており、MuSKによるAChR凝集に必須の分子であることが示された。Oxford大学のBeesonはDok7突然変異による先天性筋無力症が発症することを明らかにした⁹⁾。この疾患は遺伝性疾患で、小児期の歩行障害で発見される。MuSK抗体陽性重症筋無力症の臨床症状と共通点があるのが大変興味深い^{9), 10)}。Dok7の突然変異による機能異常は全身の神経筋シナプスに及んでいるはずだが、筋力低下は四肢よりも体幹の筋がより強い。舌の萎縮や眼瞼下垂もみられるケースが多い。これとは別にMuSKの突然変異による先天性筋無力症も報告されている¹¹⁾。驚くことにDok-7, MuSKの突然変異によって発症した患者の神経筋シナプスの形態変化は、我々の動物モデルの病理組織像と共通の変化が観察されている (図4)^{9), 11)}。そしてMuSK抗体の重症筋無力症, Dok7あるいはMuSK突然変異で発症する先天性筋無力症で共通の発症メカニズムが存在することが予想される。最後に、MuSK抗体により重症筋無力症を後天的に動物に発症させることができるので、この疾患

モデル動物は神経筋疾患の分子病態メカニズムおよび神経筋シナプスの維持機構を理解する上で今後重要な鍵となるだろう。

文 献

- 1) Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ. Myasthenia gravis : past, present, and future. *J Clin Invest* 2006 ; **116** (11) : 2843-54.
- 2) Vincent A, Lang B, Kleopa KA. Autoimmune channelopathies and related neurological disorders. *Neuron* 2006 ; **52** (1) : 123-38.
- 3) Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001 ; **7** (3) : 365-8.
- 4) Ohta K, Shigemoto K, Fujinami A, Maruyama N, Konishi T, Ohta M. Clinical and experimental features of MuSK antibody positive MG in Japan. *Eur J Neurol* 2007 ; **14** (9) : 1029-34.
- 5) Ohta K, Shigemoto K, Kubo S, et al. MuSK Ab described in seropositive MG sera found to be Ab to alkaline phosphatase. *Neurology* 2005 ; **65** (12) : 1988.
- 6) Shigemoto K, Kubo S, Maruyama N, et al. Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase. *J Clin Invest* 2006 ; **116** (4) : 1016-24.
- 7) Shigemoto K, Kubo S, chen J. Experimentally induced myasthenia gravis with muscle-specific kinase. *Ann N Y Acad Sci* 2007 ; in press.
- 8) Beeson D, Higuchi O, Palace J, et al. Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy. *Science* 2006 ; **313** (5795) : 1975-8.
- 9) Slater CR, Fawcett PR, Walls TJ, et al. Pre- and post-synaptic abnormalities associated with impaired neuromuscular transmission in a group of patients with 'limb-girdle myasthenia'. *Brain* 2006 ; **129** (Pt 8) : 2061-76.
- 10) Palace J, Lashley D, Newsom-Davis J, et al. Clinical features of the DOK7 neuromuscular junction synaptopathy. *Brain* 2007.
- 11) Chevessier F, Faraut B, Ravel-Chapuis A, et al. MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 2004 ; **13** (24) : 3229-40.

神経筋接合部疾患における抗 MuSK 抗体と病態機序

丸山 直記¹⁾ 重本 和宏²⁾

(臨床神経, 47: 842—844, 2007)

Key words: 重症筋無力症, 筋特異的カイネース, 神経筋接合部, 自己抗体

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；AChR）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¹⁾。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²⁾。われわれ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しらべたところ、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^{3,4)}。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ず、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おきた^{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。われわれは、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はじめて示した(Fig.1)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。いいかえればMuSKが、神経筋シナプスを維持するのに必須であることを明らかにした。

抗AChR抗体による重症筋無力症の発症メカニズムは、これまで多くの研究者により明らかにされてきた。それは大きく分けて3つの機序に分けることができる。(a)抗AChR抗体に結合して活性化された補体による組織破壊。(b)抗体結合によるAChRの発現減少とその結果による神経伝達の減少(antigenic modulation)。(c)抗体によるAChRの機能阻害^{8,9)}。とくに(a)の補体によるシナプス後膜の破壊が、抗AChR抗体による重症筋無力症の発症機序として主要な原因と考えられているが、一方で抗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)。しかしながらヒトIgG4には補体介在性作用はない。抗AChR抗体に関しては、これまでの研究から、補体介在性の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と考えられることが、それまでの研究から示された。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も、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、謎とされていた一つである。

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のタイロシンカイネースが活性化され、数時間後にはAChRの凝集が観察される。MuSKは他のレセプター型タイロシンカイネースと同様に、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されると予想される。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。したがって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の緩やかな集合が誘導されることが示されている。

そこで、上記の培養筋細胞のAChR凝集誘導の実験系を

¹⁾東京都老人総合研究所〔〒173-0015 板橋区栄町35—2〕

²⁾愛媛大学医学部

現 東京都老人総合研究所

(受付日: 2007年5月16日)

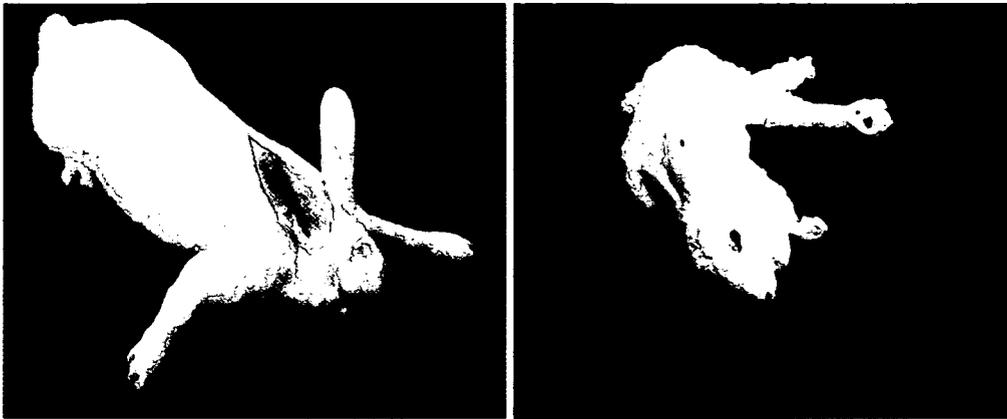


Fig. 1 Manifestation of muscle weakness after injection of purified MuSK proteins in experimental animals (a paretic rabbit).

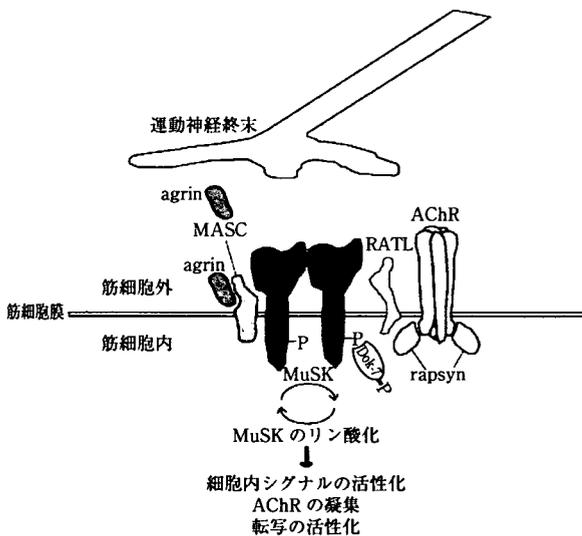


Fig. 2 Pathogenic mechanisms of the antibodies are composed of multiple events by the stall of MuSK functions as a multifunctional platform regulating synapse formation and maintenance. These reflect the complexity of clinical features ranging from a typical MG to the variants.

使って、われわれは抗 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。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 凝集のすべ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、補体の関与しない前述した (b) や (c) のメカニズムによって、MuSK 機能を抑制することを強く支持する。さらに発症したウサギの神経筋シナプスの 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、われわれの動物発症モデルは示していると考えられる。

MuSK が神経筋シナプスの形成に必要であることは、これまでノックアウトマウスを使って示されている。加えて、われわれの重症筋無力症の発症モデル動物の研究から、MuSK は成熟した神経筋シナプスの維持にも必須であることを示した (Fig. 2)。われわれは、抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症は自己抗体により MuSK のシナプスの維持機構が抑制されるために発症すると考えている。さらに、Oxford 大学の Beeson らが報告した Dok7 突然変異による先天性筋無力症と、MuSK 抗体陽性重症筋無力症の臨床症状およびわれわれの動物モデルの病理組織像に共通点があり大変興味深い¹⁰⁾。抗 MuSK 抗体による重症筋無力症と Dok7 突然変異による先天性筋無力症の発症メカニズムとの共通点は、それらの病態と MuSK の機能を理解する上でも今後重要な鍵となると考えている。

文 献

- 1) Patrick J, Lindstrom J: Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science* 1973; 180: 871—872
- 2) Hoch W, McConville J, Helms S, et al: Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001; 7: 365—368
- 3) Ohta K, Shigemoto K, Kubo S, et al: MuSK antibodies in AChR Ab-seropositive MG vs AChR Ab-seronegative MG. *Neurology* 2004; 62: 2132—2133
- 4) Ohta K, Shigemoto K, Kubo S, et al: MuSK Ab described in seropositive MG sera found to be Ab to alkaline phosphatase. *Neurology* 2005; 65: 1988
- 5) Lindstrom J: Is "seronegative" MG explained by autoantibodies to MuSK? *Neurology* 2004; 62: 1920—1921
- 6) Selcen D, Fukuda T, Shen XM, et al: Are MuSK antibod-

- ies the primary cause of myasthenic symptoms? *Neurology* 2004; 62: 1945—1950
- 7) Shigemoto K, Kubo S, Maruyama N, et al: Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase. *J Clin Invest* 2006; 116: 1016—1024
- 8) Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ: Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest* 2006; 116: 2843—2854
- 9) Vincent A, Lang B, Kleopa KA: Autoimmune channelopathies and related neurological disorders. *Neuron* 2006; 52: 123—138
- 10) Palace J, Lashley D, Newsom-Davis J, et al: Clinical features of the DOK7 neuromuscular junction synaptopathy. *Brain* 2007

Abstract

Pathogenic mechanisms of myasthenia gravis induced by antibodies against muscle-specific kinase

Naoki Maruyama, M.D.¹⁾ and Kazuhiro Shigemoto, M.D.²⁾
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo, Japan

Antibodies to acetylcholine receptor (AChR) are major cause of the human autoimmune disease, myasthenia gravis (MG). Additionally, autoantibodies against Muscle-specific kinase (MuSK) were found in a proportion of patients with generalized MG. After the identification of MuSK antibodies in MG patients, laboratory test for measuring antibodies to MuSK is now required to confirm the diagnosis of MG and the clinical treatment as well as AChR antibodies. MuSK is critical to the clustering of AChR and plays multiple roles at neuromuscular junctions (NMJ). However, it has been dispute concerning the pathogenicity of MuSK antibodies in muscle weakness of MG, as the experimental autoimmune MG caused by MuSK antibodies was absent. Here we describe the recent progress to understand the pathogenic roles of MuSK antibodies in muscle weakness of experimental animals induced by MuSK protein.

(*Clin Neurol*, 47: 842—844, 2007)

Key words: myasthenia gravis, muscle-specific kinase, neuromuscular junction, autoantibodies

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

中濱 大¹⁾ 川尻 真和¹⁾ 越智 雅之¹⁾
小原 克彦¹⁾ 太田 潔江²⁾ 三木 哲郎¹⁾

要旨：症例は 54 歳女性である。眼瞼下垂、複視、構音・嚥下障害、首下がり、筋疲労にて発症した。エドロホニウム試験陽性かつ反復誘発筋電図検査で wanning 現象をみとめた。抗アセチルコリン受容体抗体は陰性であったが、抗筋特異的チロシンキナーゼ (muscle-specific tyrosine kinase, MuSK) 抗体価高値 (239nmol/l) が判明し、抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症と診断した。Quantitative Myasthenia Gravis Score (QMG score) をもちいて、筋無力症状の重症度と抗体価の推移を観察したところ、本例では治療による重症筋無力症重症度の変化と抗体価の推移が相関していた。症例によっては、抗 MuSK 抗体価は治療方針決定の上で有用なマーカーであると考えられた。(臨床神経, 47: 356-358, 2007)

Key words: 抗 MuSK 抗体, 重症筋無力症, 抗アセチルコリン受容体抗体, QMG スコア

はじめに

抗アセチルコリン受容体抗体 (抗 AChR 抗体) 陰性の重症筋無力症 (MG) の 40~70% に、抗筋特異的チロシンキナーゼ (muscle specific tyrosine kinase, MuSK) 抗体が検出される¹⁾。MuSK は神経筋シナプス形成に必須であることから、抗 MuSK 抗体と MG の関連が注目されてきた²⁾。その一方で、抗 MuSK 抗体は MG の病態には直接関与せず、付帯徴候の可能性が高いとの報告もなされてきた³⁾。近年、抗 MuSK 抗体が MG 発症原因であることがモデル動物を作成することで証明された⁴⁾⁵⁾。したがって、抗 MuSK 抗体価は、MG における病勢のマーカーとなりうると思われる。しかし、これまでに診断後も抗 MuSK 抗体価を経時的に測定した報告は少ない。今回、治療経過を通して抗 MuSK 抗体価の測定をおこない、抗体価が病勢を反映した症例を経験したので報告する。

症 例

患者：54 歳、女性。

主訴：複視、眼瞼下垂、首下がり。

家族歴：特記事項なし。

既往歴：高血圧、C 型肝炎無症候性キャリアー。

現病歴：2004 年 10 月より複視、2005 年 2 月より眼瞼下垂、構音・嚥下障害、頸部の脱力、四肢の脱力が出現し、休養をとると症状が改善した。また、症状の日内変動をみとめた。その後も症状は徐々に増悪し、9 月に当科を受診した。抗 AChR 抗体は陰性、エドロホニウム試験陽性かつ反復誘発刺激試験

で wanning 現象をみとめ、重症筋無力症と診断した。エドロホニウム試験においては、顔面を中心に著明な筋線維束攣縮が誘発された。抗コリンエステラーゼ薬を投与するも効果なく中止。症状はさらに増悪し、12 月には頸部の脱力も出現し、首下がりの状態となった。労作後の脱力も増悪したため 2006 年 2 月某日当科に入院した。

入院時現症：一般身体所見では BMI 16.3kg/m² と痩せをみとめたが他には明らかな異常所見をみとめなかった。神経学的には意識は清明、脳神経領域では著明な両側眼瞼下垂、眼球運動障害 (両側内転障害、左優位の両側下転、外転障害)、複視、構音障害 (鼻声)、嚥下障害をみとめた。筋力は頸筋、上肢近位筋の筋力低下 (徒手筋力テスト 3 程度)、日内変動、疲労現象をみとめた。筋萎縮や筋線維束攣縮、感覚障害や自律神経障害はみとめなかった。深部反射は両側膝蓋腱反射の亢進をみとめたが、病的反射はみとめなかった。

検査所見：血算、生化学、凝固系、内分泌検査に異常をみとめなかった。HCV 抗体陽性であった。抗 AChR 抗体は結合型抗体、阻止型抗体ともに陰性であった。拇指球筋での反復誘発刺激試験 (3Hz) で wanning (15%) をみとめた。胸部 CT 検査では胸腺腫はみとめなかった。また、頭部 CT、腹部・骨盤部 CT 検査、ガリウムシンチ検査でも明らかな腫瘍病変をみとめなかった。

入院後経過：(Fig. 1) 抗 AChR 抗体陰性の MG (MGFA 分類は Class IIIb) と診断し、2006 年 2 月よりプレドニゾロンを 20mg/日より開始し、漸増した。治療開始後、抗 MuSK 抗体陽性が判明した。治療前の 1 月某日の抗体価は 239.0 nmol/l (基準値：0.01nmol/l 以下) と異常高値を示した。プレドニゾロン 40mg/日頃より症状の改善をみとめた。プレドニ

¹⁾愛媛大学医学部加齢制御内科〔〒791-0295 愛媛県東温市志津川 454〕

²⁾独立行政法人国立病院機構・宇野野病院臨床研究部生化学〔〒616-8255 京都市右京区鳴滝音戸山町 8〕

(受付日：2006 年 12 月 23 日)