

200905017A

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21年度 総括研究報告書

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 重本和宏

平成22 (2010) 年 5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. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	12
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	13

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

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所 研究部長

研究要旨

我々は世界で初めて、100%の確立で同調して抗Musk抗体で発症する疾患モデル動物の開発に成功した。ラットの細胞外ドメインのリコンビナント蛋白を補体欠損マウスに2回免疫したところ、初回から1ヶ月後に全てのマウスで重篤な筋力低下、筋萎縮を示した。3Hzで座骨神経を刺激すると、筋電図は重症筋無力症患者と同様の漸減反応を示した。補体欠損マウスの疾患モデルの神経筋シナプスの形態変化を共焦点顕微鏡と走査型および透過型電子顕微鏡で詳細に明らかにすることができた。発症した補体欠損マウスの神経筋シナプス全体の形態変化が観察され、自己抗体がMuSKによるシナプスの維持機構を阻害することで発症することが明らかとなった。さらにこの疾患モデル動物は、抗MuSK抗体陽性の重症筋無力症と同様に、アセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害薬に対して過敏性を示すことが筋電図で明らかとなった。抗AChR抗体陽性重症筋無力症との病態像の違いはそのメカニズムによるものと考えられる。発症したマウスのシナプスにおいて、アセチルコリン受容体だけでなく、AChEとコラーゲンQ蛋白が減少しており、AChEに対する過敏性の機構を明らかにすることができた。さらに有効な薬物の検討を行ったところ、3,4-diaminopyridineが顕著にシナプスの伝達機能を改善することがわかった。我々の開発した疾患モデル動物は重症筋無力症の発症メカニズムと有効な治療法の開発に有用であることが明らかとなった。

A. 研究目的

治療法に関しては、抗MuSK抗体陽性重症筋無力症(MuSK-MG)はしばしば急激に症状が悪化し、球筋や呼吸筋力の低下による重症化するために早急に治療の方針計画を立てる必要がある。しかも治療に反応せず急速に悪化する症例もある。また、現在のMG治療ガイドラインにおいては、MGの治療薬の一つとしてアセチルコ

リンエステラーゼ阻害薬(AChE阻害薬)が示されている。実際、AChE阻害薬は抗AChR-MGのほとんどに対して有効であるが、抗MuSK-MG患者に対しては効果が薄いばかりでなく、むしろ抗コリン作動性クリーゼなど過敏性を示す症例も多いことが報告されている。このメカニズムを解明することは、抗MuSK抗体の発症機序だけでなく従来の治療指針を見直すために必要である。

これまで MuSK 抗体の IgG subclass の解析から、補体活性化作用がない IgG4 が優位であることを我々や他の研究者らにより明らかにされている。対照的に AChR 抗体は、補体活性化のある IgG1 および IgG3 が優位であり AChR-MG と MuSK-MG では病態機序が異なると考えられる。Vincent らは、HEK 細胞に MuSK を高発現させ蛍光抗体法を使うと MuSK-MG でも低量の IgG1 を検出することができるとしているが、その臨床的な意義は不明である。しかも、神経筋接合部生検においては AChR-MG では AChR 量の減少や補体などの免疫複合体の沈着が認められるが、MuSK-MG では認められないことが報告されている。AChR-MG の発症は (a) 自己抗体と補体による神経筋シナプス後膜の破壊、(b) AChR の機能を直接阻害、(c) 自己抗体による蛋白の発現減少 (antigenic modulation) によることが明らかにされている。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を発症することを世界で初めて示すことに成功し (Shigemoto et al., *J Clin Invest.* 2006)、その解析から、MuSK-MG は MuSK 蛋白に対する上記の (b) と (c) の機序が主体となり MuSK 機能を抑制して発症するという仮説を提唱している。しかしながら、ウサギを使った動物疾患モデルの作成には多量の抗原が必要である。そして我々は 100% の頻度で発症させることに成功してはいるが、3 回以上の免疫を長期間行う必要があり (3 ヶ月から一年)、発症の時期は予想ができず、症状が急激に悪化するために解析に間に合わないケースも多い。一方でマウスを使った疾患動物モデルの作成は、抗原量が少なく済み、また小動物であるため個体数を増やすことが可能であるという利点がある。実

際、我々や Hoch らによりマウスの MuSK-MG の疾患モデルの作成に成功しているが (Jha et al., *J Neuroimmunol.* 2006, Shigemoto et al., *Ann N Y Acad Sci.* 2006) Hoch らが報告した高頻度のマウス系統 (C58BL6, A/J) を使っても、我々は極めて低い発症頻度でしか疾患モデルの作成をすることができない (C57BL6 は 2/22、A/J は 0/6)。

マウスを使って MuSK-MG の疾患モデルを高頻度に作成することは以下の点で本課題を達成するために重要である。

- (1) 補体欠損マウスを使って MuSK-MG が発症するかどうか検討することが可能となる。
- (2) 補体が関与しない発症メカニズムを詳細に解明する。
- (3) AChE 阻害薬による過敏症のメカニズムを明らかにする。
- (4) 真に有効な薬物治療の開発を行う。

そこで我々は、補体欠損マウスを使って MuSK-MG を高頻度に発症させるために、検討を行った。そして実際に、最初の MuSK 抗原の免疫後に 100% の頻度で、同調して疾患を発症させることに成功した。このモデル動物を使って上記の課題について詳細に検討を行った。

B. 研究方法

1. 補体欠損マウスを使った疾患モデル動物の作成

補体欠損マウスに、精製した MuSK 蛋白を免疫して抗 MuSK 抗体によって発症する動物モデルの作成を試みた。歴史的に確立されたマウ

ス系統を調べたところ約39% (28/72)が補体欠損マウスであることが報告されている (Cinader et al., J Exp Med 1964). 我々はジャクソン研究所から高率に発症する可能性のある2系統の補体欠損マウスを入手した.

抗原はラットの筋細胞 mRNA から細胞外ドメインの cDNA を PCR で増幅し発現ベクター内で His-tag とさせ、293T 細胞にトランスフェクションして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 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.

精製したリコンビナント蛋白を、補体欠損マウス一匹あたり 20 μ g をアジュバントと一緒に2週間おきに免疫して、体重変化を経時的に記録することで発症経過をモニターした. 対照群として PBS とアジュバントを同様に免疫して実験を行った. 動物実験計画は実験施設 (東京都健康長寿医療センター研究所) で承認された方法に従って行った.

2. 発症したマウスの病態解析

2-1. 筋力測定

前肢の筋力測定は室町機械の MK-380M を使って行った. マウス前肢を装置の網かごに捕まらせ、後肢は浮かせたまま尻尾を引っ張り前肢が網かごから離れるように条件を設定して測定を7回測定し、最高値と最低値を除いた5回

の値で平均と偏差を計算した.

2-2. 筋電図測定

発症したマウスとコントロールマウスから筋電図を測定するために、麻酔 (トリプロモエタノール) を腹腔に投与して行った. 座骨神経 (retroauricular branch) に対して 3Hz の反復電気刺激を加え腓腹筋 (gastrocnemius muscle) 中央部から筋電図を測定した.

2-3. 筋、シナプスの病理学的形態変化の解析

筋の HE 染色は、マウスから腓腹筋を採取後、液体窒素で急速凍結して、10 μ m の切片を作成して行った.

シナプスの免疫染色は、マウスから腓腹筋を採取して 1%パラフォルムアルデヒド-PBS 固定液に浸漬し室温で 10 分間インキュベーションした. 固定後に筋を PBS, 0.1M glycine/PBS でリンスした. 筋を実体顕微鏡下にて解剖用ハサミを使ってほぐした後、Alexa647-conjugated α -BTx (α -bungarotoxin) で、アセチルコリン受容体で AChR を染色した. 同時に、一次抗体 (抗ニューロフィラメント抗体と抗シナプトフィジン抗体の 1 : 1 混合) で4度にて反応させ洗浄したのち、二次抗体 (Alexa488-抗ヒツジ抗体) で蛍光染色した. 共焦点顕微鏡 (Leica SP5) で神経筋シナプスの形態変化を観察記録した. シナプスの AChE とコラーゲン Q (Col1Q) に対する一次抗体で染色した後、二次抗体 (Alexa488-あるいは Alexa555-抗ヒツジ抗体) で染色した.

走査型および透過型電子顕微鏡でシナプスを観察するために、マウスを麻酔科でウサギの神経筋シナプスを観察するために、4%パラフォルムアルデヒド (0.1M リン酸バッファー,

pH7.4)で環流固定した筋をグルタル溶液で固定して透過型電子顕微鏡の観察用切片を作成した。

2-3. 抗 MuSK 抗体価測定

マウスから採取した血清を用いて抗体価を ELISA 法で測定した。抗原として用いたラット MuSK 蛋白を ELISA プレートにコートした。測定は HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare) を使って行った。

3. 抗 MuSK 抗体の機能解析

MuSK 蛋白を免疫して発症したマウス血清に含まれる抗 MuSK 抗体がどのような機序により神経筋シナプスの AChR 凝集を抑制するか培養 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。さらにリコンビナント 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、数時間以内に細胞表面の AChR 凝集を誘導する。この解析システムを使うことにより agrin-MuSK を介した 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、agrin と抗 MuSK 抗体を同時に C2C12 に添加して AChR 凝集抑制に伴う MuSK 活性化シグナルの変化を解析した。血清中の抗 MuSK 抗体の IgG サブクラスをプロテイン A で精製して解析に用いた。さらに精製した抗 MuSK 抗体 IgG をパピイン処理して Fab 分画を精製して同様に抑制実験に用いた。

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)によるウエ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。

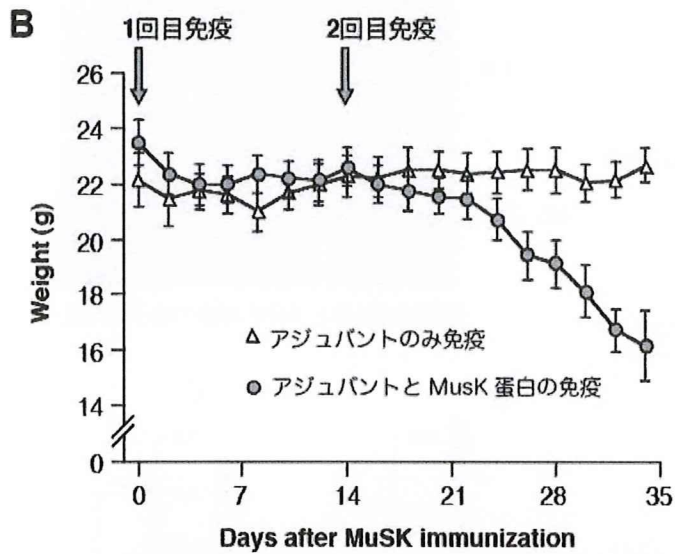
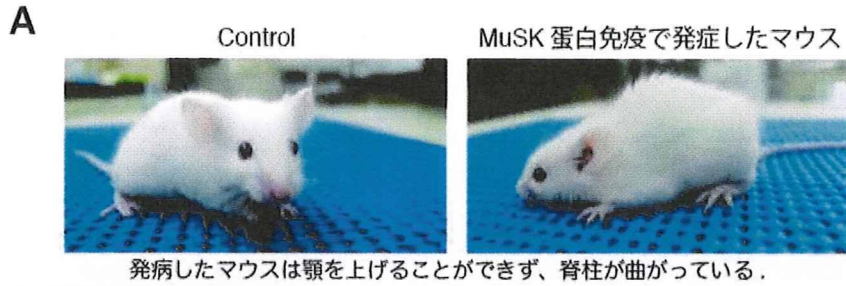
4. AChE 阻害薬、および

3, 4-diaminopyridine (3, 4-DAP) の投与 AChE 阻害薬として neostigmine (37.5 mg/kg; Sigma) を、また 3, 4-DAP (8 mg/kg; Tokyo Kasei) を発症したマウスを麻酔下にて、腹腔に投与して筋電図を解析した。

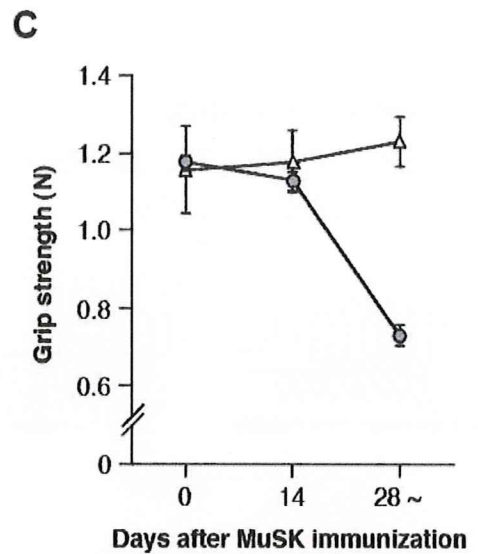
B. 研究結果

1. 画期的な動物疾患モデルの開発に成功

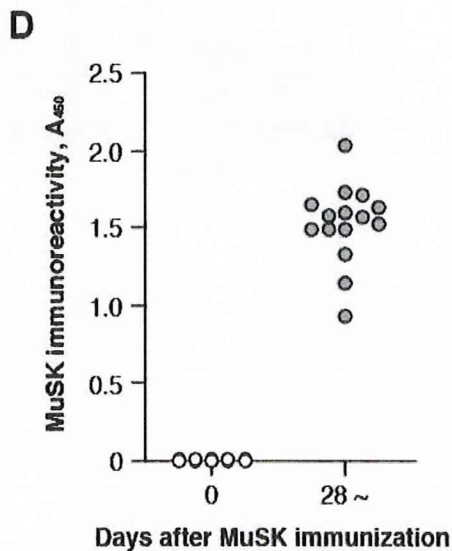
「疾患動物モデル (マウスの4種類のIgGは補体結合用があるので) は患者病態を必ずしも反映しない!」 というOxford大学Vincent教授の強い疑問に対して答えを得るために、補体欠損マウスに MuSK蛋白を免疫してMMGを発症させることに成功した(論文発表準備中)。驚くことに100%の確率で同調して重篤な症状を示す、MuSK抗体MGを発症させることができる(図1A, B)。発症の経過は再現性が高く、体重減少を指標にして発病初期から病態を解析することが可能である(図1B)。発症したマウスは易疲労性を示し、筋力低下のため顎を上げることができず、脊柱も曲がっている。マウス前肢の筋力低下は、体重減少に応じて測定することができた(図1C)。血中の抗MuSK抗体も発症したマウスで顕著に上昇していた(図1D)。発症したマウスの体重減少は、筋萎縮によるものと



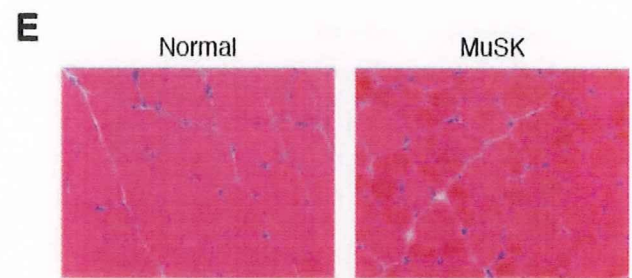
MuSK 蛋白を 2 回免疫したマウス (22 匹全て) は同調して体重減少を示し 28 日前後で全て MG を発症する。



体重減少と共に筋力減少がおきる。



免疫したマウスは全て抗 MuSK 抗体価が上昇する。



MG を発症したマウス (右) の筋には萎縮が見られる。

☒ 1

予想されたため、発症したマウスの筋の横断面をHE染色して観察したところ、正常に比べ筋の太さが均一でないことがわかった。一方、炎症細胞の進入や筋の各は筋線維の中央部には観察されなかった(図1E)。これは、筋力低下が筋線維に対する炎症による変化や、筋ジストロフィーで観察されるような筋線維の顕著な再生像がないことを示している。

1. 動物疾患モデルの病態

疾患マウスの筋電図変化(漸減変化)はMG患者と全く同じである。(図2参照)

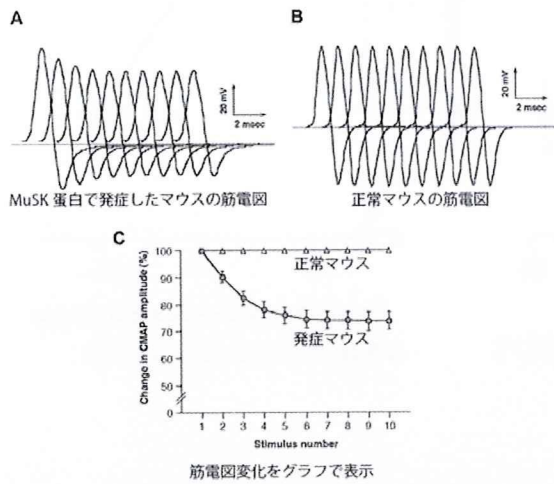


図2

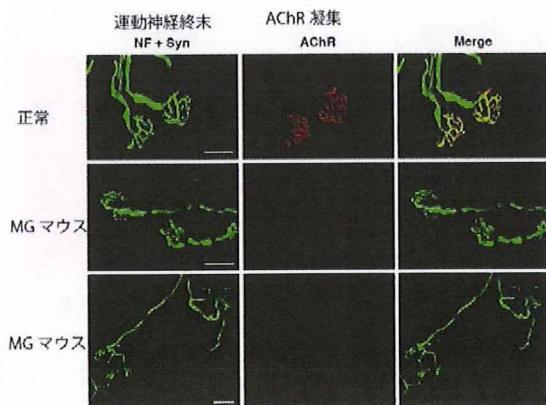


図3 発症したMGマウスの神経筋接合部の変化(ひらめ筋) 運動神経終末の縮小、sporuting、さらにAChR凝集の顕著な減少。

発病した神経筋接合部の形態を共焦点顕微鏡で調べたところ、運動神経終末の縮小とAChR凝集の顕著な減少が観察された(図3, 4, 5)。運動神経終末のspoutingも顕著である。

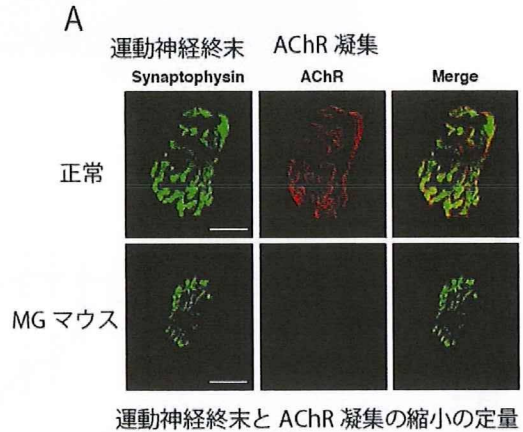


図4

Neurofilament,
Synaptophysin

AChR

Merge

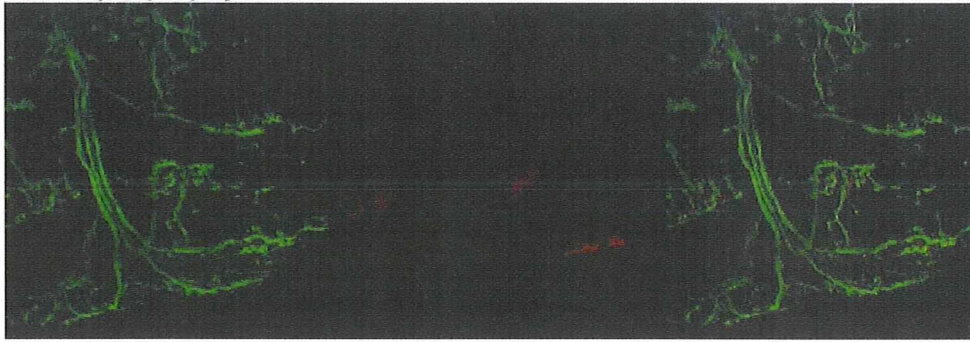


図5 MGを発症した補体欠損マウスの運動神経終末のsproutingとAChR凝集減少
共焦点画像

さらに走査型および透過型電子顕微鏡によるシナプス後膜の変化を観察したところ、シナプスの溝および襞の顕著な減少が観察された(図6、7). このようなシナプスの変化は抗MuSK抗体MG患者でも同様な変化がおきていると予想される.

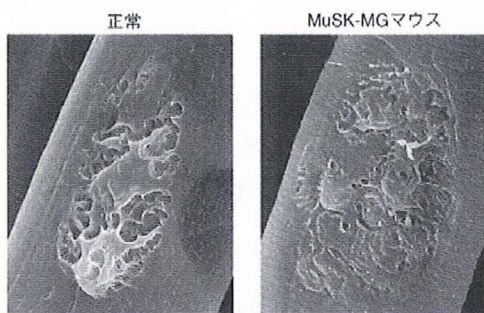


図6 発症した補体欠損マウスの神経筋シナプスの溝とひだの構造変化
走査型電子顕微鏡画像. 溝とひだの顕著な縮退が見られる.

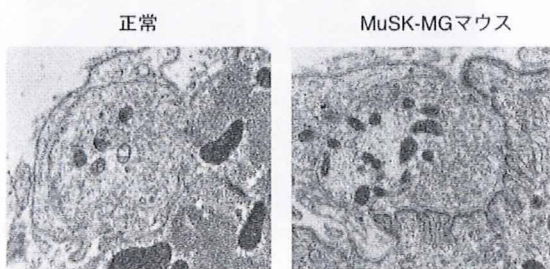


図7 発症した補体欠損マウスの神経筋シナプスのひだの構造変化
走査型電子顕微鏡画像. ひだの顕著な縮退が見られる.

また、観察された病理象は、我々が世界で初めて作成に成功したウサギの病態と同じであった.

補体欠

損マウスで作成した疾患動物モデルは、抗MuSK抗体MG患者の病態を再現できることを示すことができたが、次にこの抗MuSK抗体MGモデルを使ってAChE阻害剤 neostigmineの効果筋電図と筋力を測定することで解析した. その結果、neostigmineの効果は限定的であることがわかった(表1、図8).

表1 Neostigmineによる筋活動電位の減衰率の改善度

	Before	After	改善率 (%)
No. 83	16.2%	9.2%	43.2%
No. 221	38.4%	24.5%	36.2%
No. 226	32.0%	24.3%	24.0%
No. 228	18.2%	11.3%	37.7%
No. 242	25.4%	19.5%	23.3%
No. 243	23.3%	10.7%	54.1%

Mean : 36.4 ± 4.8%

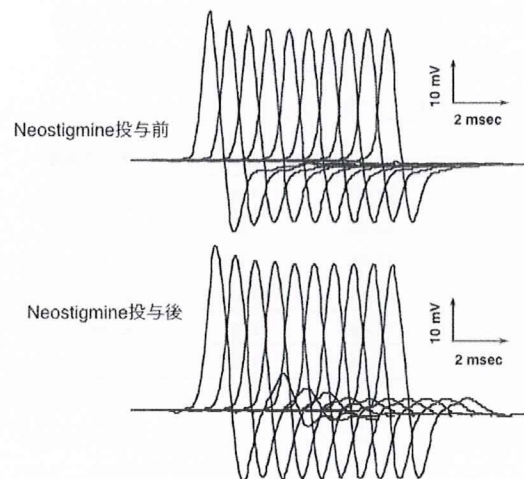


図8 AChE阻害薬(neostigmine)による筋電図変化の改善は限定的である.

さらに補体欠損マウスモデルを使って、患者で観察される異常な筋電図を測定した。これはAChE阻害剤に対する過敏性を、疾患動物モデルを使って世界で初めて実験的に示すことができた(図9)。

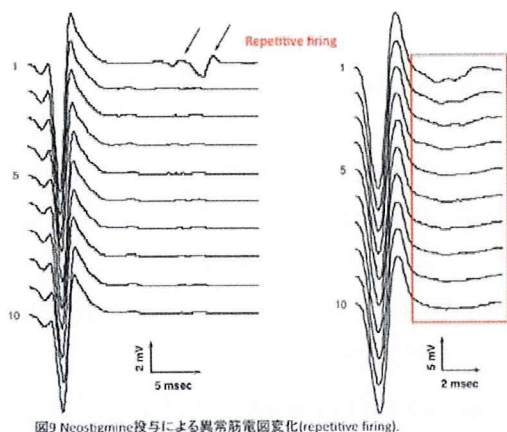


図9 Neostigmine投与による異常筋電図変化(repetitive firing).

AChE 阻害剤投与に見られるこのような筋電図の異常波形(repetitive firing)はPungaらによって報告されている。(Punga et al., Muscle Nerve 2006)。

さらに我々はMuSK-MGに有効な薬剤のスクリーニングを行ったところ、シナプス伝達、前膜(神経)の活動を促進する薬物3,4-DAPは発症したマウスの筋電図を顕著に正常に戻すことを発見した(表2, 図10)。

表2 3,4-Diaminopyridineによる筋活動電位の減衰率の改善度

	Before	After	改善率 (%)
No. 242	32.4%	2.3%	92.9%
No. 243	21.7%	0.6%	97.4%
No. 244	22.8%	8.9%	60.7%
No. 245	26.4%	1.2%	95.4%
No. 247	16.6%	4.3%	74.2%

Mean : 84.1 ± 7.2%

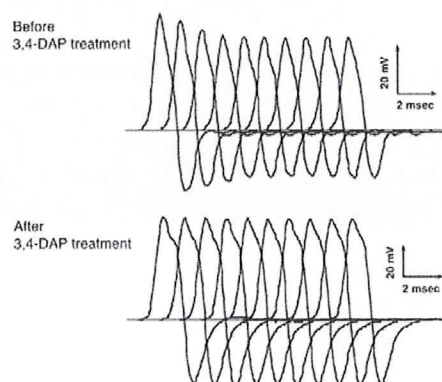


図10 3,4-DAP投与による筋電図の顕著な改善。

3,4-DAPは特に重症で進行性の筋萎縮に至る患者の治療薬として、またその予防薬として実用化できる可能性を示した。

さらに発症のメカニズムとAChE阻害剤に対する過敏性の原因を明らかにするために、発症したマウスの筋の神経筋シナプスにおけるAChEの発現とAChEをシナプス膜へドッキングさせるコラーゲンQの発現を、抗体を使って検出したところ、AChR凝集の減少にともなってAChEとコラーゲンQの発現が顕著に減少していた(図11)。

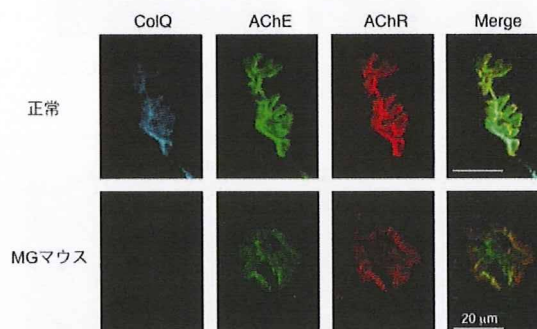


図11 抗MusK抗体MGではAChR凝集に加えて、AChEとコラーゲンの発現が顕著に減少している。

D. 考察

この疾患モデルは以下の点において画期的な疾患動物モデルの開発に成功したと言える。

① 100%の確率でMuSK抗体MGを発症させることができるだけでなく、発症の経過は再現性が高く体重減少を指標にして発病初期から病態を解析することが可能である。この方法は他の自己免疫性神経疾患のモデル動物開発だけでなく蛋白分子の機能解析など基礎研究にも応用することが期待される。

② 発症したマウスは遺伝的に補体を欠損しているため、抗原抗体反応による組織破壊が発病メカニズムから除外することができる。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ている。この疾患モデルの発病機序の研究はMG患者の原因解明へと発展することが期待される。

③ 開発した疾患マウスを使って、シナプスの形態変化を解析したところシナプス後膜の変化だけでなく、その病態はシナプス前膜まで及んでいることが明らかとなった。抗MuSK抗体はMuSKによるシナプス後膜のAChR凝集だけでなく、おそらくMuSKを介したシナプス前膜への逆行性の維持シグナルも抑制することが考えられる(図12)。また透過型電子顕微鏡で、発症したウサギのシナプス後膜を観察したと

ころシナプス襞の単純化や減少、さらには消失も観察された。一方で、抗AChR抗体発症する重症筋無力症のシナプス後膜で観察される補体による膜破壊像は全く観察されなかった。こられの結果から、我々が提唱している発症メカニズムの仮説をさらに裏付けることができた。その仮説とは、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(図12)。

④ 我々の開発した疾患動物は、MuSK-MG患者と同じようにAChE阻害剤に対して過敏性を示すことを発見した。その機序としてAChEはコラーゲンQを介してMuSKに結合しておりMuSKの機能あるいは発現が抑制されることによりAChEの発現と機能が減少するため、阻害剤に対する過敏性が出現すると考えることができる(図12)。

⑤ 同調して100%発症する疾患モデル動物は真に有効な治療法、とくに薬物のスクリーニングに大変有用である。我々は、3,4-DAPがMuSK-MGに対して有効であることを示した。この機序を明らかにすることで、疾患の発病メカニズムとあわせて新しい治療方針の確立が可能となった。

⑥ 今回使用したマウスの系統には、免疫学的に自己免疫疾患を発症させる遺伝子変異を有していると考えられる。この遺伝子型を明らかにすることで、自己免疫疾患の発病メカニズムを明らかにすることができるであろう。

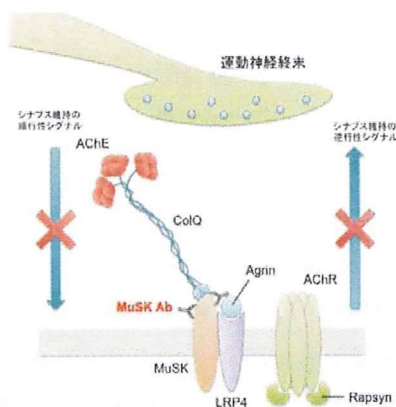


図12 抗MuSK抗体MG発症のメカニズム

E. 結論

我々は MuSK-MG をマウスに 100%の頻度で同調させて発症させることに世界で初めて成功した。この疾患モデルを使うことで、補体が関与しない MuSK-MG の発症メカニズムの解明、MuSK によるシナプスの維持機構、AChE 阻害薬による過敏症の機序、真に有効な薬物のスクリーニングが可能となった。また我々は従来の MG の治療薬である AChE 阻害剤が抗 MuSK 抗体 MG では使用すべきでないことを、患者研究と基礎研究から明らかにすることができた。平成 19 年度分担研究者の宇多野病院 小西哲郎院長が中心となり、その治療方針に対する提言を行っている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shigemoto, K., Kubo, S. Mori, S. Yamada, S. Miyazaki, T. Akiyoshi, T. Muscle weakness and neuromuscular junctions in aging and

disease. *Geriatr Gerontol Int. Suppl. 1*, 2010 (in press).

2. 重本和宏, 久保幸穂, 丸山直記. 神経筋接合部位の異常と筋力低下. *日本老年医学会雑誌* 46(2):p106-113. 2009

3. 重本和宏, 丸山直記. サルコペニア (加齢性筋肉減少症) とそのバイオマーカー. *老年医学*, 47(6):p733-735. 2009

学会発表

1) Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Shigemoto K. Activation of complement is indispensable for myasthenia gravis caused by MuSK antibodies. Society for Neuroscience 2009, 2009, 10/17 Chicago.

2) 森 秀一, 久保幸穂, 秋好沢諭, 山田茂, 宮崎剛, 重本和宏. MuSK は神経筋シナプスの維持に重要である ~研究モデル動物の確立~ 第 32 回日本基礎老化学会大会. 2009, 6/27 横浜.

3) Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Shigemoto K. Activation of complement is indispensable for myasthenia gravis caused by MuSK antibodies. 第 32 回日本神経科学大会. 2009, 9/19 名古屋.

書籍

1. Shigemoto, K., Kubo, S. Mori, S. Yamada, S. Miyazaki, T. Akiyoshi, T and Maruyama, S

The Immunopathogenesis of Experimental
Autoimmune Myasthenia Gravis Induced by
Autoantibodies against Muscle-specific
kinase. *Book title: Myasthenia gravis
Diseas Mechanisms and Immune Intervention.*
Editor: Premkumar Christadoss. Linus
Publication, Inc. In Chaper 17, p304-323.
2009 (In press)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

Shigemoto,K. Kubo,S. Mori.S. Yamada,S. Miyazaki,T. Akiyoshi, T and Maruyama,S	The Immunopathogenesis of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis Induced by Autoantibodies against Muscle-specific kinase.	<i>Book title: Myasthenia gravis Diseases Mechanisms and Immune Intervention. Linus Publication, Inc.</i>	Chapter 17	304-323	2009
---	---	---	------------	---------	------

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shigemoto,K. Kubo,S. Mori.S. Yamada,S. Miyazaki,T. Akiyoshi,T.	Muscle weakness and neuromuscular junctions in aging and disease.	Geriatr Gerontology Int.	Suppl.1	In press	2010
重本和宏、久保幸穂、丸山直記	神経筋接合部位の異常と筋力低下	日本老年医学会雑誌.	46(2)	106-113	2009
重本和宏、丸山直記	サルコペニア（加齢性筋肉減少症）とそのバイオマーカー	老年医学	47(6)	733-735	2009

研究成果の刊行物・別刷

Muscle Weakness and Neuromuscular Junctions in Aging and Disease

Kazuhiro Shigemoto¹, Sachiho Kubo¹, Syuuichi Mori¹, Shigeru Yamada¹, Takuyu Akiyoshi^{1,2} and Tsuyoshi Miyazaki¹

¹Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Research Team for Molecular Biomarkers

Sakaecho 35-2, Itabashi, Tokyo 173-0015 Japan

²Department of Geriatric Medicine, Tokyo University School of Medicine,

To whom correspondence should be addressed:

Kazuhiro Shigemoto M.D., Ph.D
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology
Research Team for Molecular Biomarkers

Sakaecho 35-2, Itabashi-ku
Tokyo 173-0015 Japan
kazshige@tmig.or.jp
tel: +81-3-3964-3241 (ext.3025)
fax: +81-3-3579-4776

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

Introduction

A critical issue in today's super-aging society is the need to reduce the burden of family care while continuing to make our medical institutions supportive. A rapidly emerging, major health concern is the debilitating effect of muscle weakness and atrophy from aging, termed *sarcopenia*; however, the molecular basis of this condition is not well understood. Our research aim is to elucidate the molecular mechanisms of age-related muscle atrophy and to devise new measures for preventing and treating this disability. A promising treatment for muscle atrophy is the promotion of muscle regeneration by recruiting stem cells into the targeted region. The first requirement is to understand how the motor system, which consists of muscles and motoneurons, is maintained to accomplish that goal. Recent studies in the field of neuroscience have focused on neuromuscular junctions (NMJs), which play important roles in the maintenance of both motor nerves and muscle fibers. Signaling between muscles and motoneurons at NMJs supports interactions within the motor system. To understand the mechanisms involved, we focus our research on the pathogenic processes underlying neuromuscular diseases. The well-known autoimmune disease, myasthenia gravis (MG), serves as a model not only for tracking the pathogenesis and treatment outcomes of all autoimmune diseases, but also for understanding synaptic functions in maintaining the motor system. Here we describe recent insights into the molecular mechanisms required for the maintenance of NMJs and the related causes of muscle atrophy.

Neuromuscular Junctions

NMJs, which are structures located between motor terminals and muscles, are the sites of synapses between motor nerves and muscle fibers. At the anterior horn of the spinal cord and brainstem, skeletal muscle fibers are innervated by large motor neurons. The terminal arborization of each α -motor neuron is situated in a shallow depression of the muscle cell membrane, which is invaginated further into deep and regular folds, termed postjunctional folds (Figure 1). The motor nerve terminal is specialized for neurotransmitter (acetylcholine:ACh) release. Synaptic vesicles containing ACh cluster adjacent to specialized structures of the presynaptic membrane, called active zones. The active zones are aligned precisely with mouths of the postjunctional folds. ACh receptors (AChRs) are highly concentrated, with a density of about 12,000 receptors per μm^2 , at the post-junctional membrane nearest the fold's peak (Figure 1). When the

nerve action potential reaches the terminal, depolarization opens voltage-gated Ca^{+} channels on the presynaptic membrane. This allows a Ca^{+} influx that triggers the fusion of synaptic vesicles with the presynaptic membrane and the release of ACh. The postsynaptic membrane responds rapidly and dependably to ACh released from the overlying active zones in the nerve terminal. AChRs, by binding ACh, become transiently permeable to both Na^{+} and K^{+} , then opening the associated voltage-gated ion channels, which contribute to the action potential and muscle contraction. The synaptic cleft between nerve terminals and postsynaptic membrane is about 50 nm wide. A layer of connective tissue called basal lamina (basement membrane) sheaths each muscle fiber, passes through the synaptic cleft and extends into the junctional folds. Both the presynaptic terminal and the muscle fiber secrete molecules including collagen IV, laminin, ectactin and heparan sulfate proteoglycans to the basal lamina. However, synaptic portions of the basal lamina contain their distinctive isoform composition separate from that of the extrasynaptic portions. Synaptic basal lamina also contain the enzyme acetylcholinesterase, which quickly inactivates the ACh released from the presynaptic terminal by hydrolyzing it to acetate and choline. Concentrations of released ACh in the synaptic cleft decrease rapidly by diffusion and interaction with acetylcholinesterase, upon which the neuromuscular transmission terminates.

Myasthenia gravis and autoantibodies to AChR

MG is a rare neuromuscular disease, but a well-recognized disorder because of such characteristic clinical features as ptosis with fluctuating general fatigue and muscle weakness that worsens with repeated activity (1, 2) but tends to improve with rest. Ptosis and diplopia occur early in the majority of these patients. With passing time, when the bulbar and respiratory muscles deteriorate, the disease becomes life-threatening so that intubation with mechanical ventilation is required. About 80% of patients with MG have autoantibodies against AChR (1, 2). In 1973, Patrick and Lindstrom provided the first evidence indicating the pathogenicity of AChR antibodies in a model of experimentally induced MG (3). Thereafter, a number of studies showed the pathogenic roles of AChR antibodies in causing structural and functional damage of the NMJ, but no such autoantigens could be identified in ~20% of these MG patients (4). However, even patients who did not have AChR antibodies responded to immunotherapies, and their serum antibodies transferred a defect in neuromuscular

transmission to mice, indicating that autoantibodies against NMJ can induce the muscle weakness.

Previously, studies on the mechanism(s) of synaptic transmission at the NMJ had facilitated understanding of how antibodies to AChR induce the pathogenicity typical of MG (1, 2). Effective neuromuscular transmission depends on numerous interactions between ACh and its receptor, AChR, and the failure of neuromuscular transmission results in myasthenic weakness and fatigue. To evoke action potential for the contraction of muscle fibers, a large enough number of AChRs must be present at postsynaptic membranes. In 1973, Fambrough and colleagues found an abnormal decrease in the number of AChR at postsynaptic membranes of the NMJ of patients with MG (5). Others showed that AChR antibodies affect neuromuscular transmission by three main mechanisms: (a) Complement-mediated lysis of post-synaptic membrane by binding and activation of complement at the NMJ; (b) accelerated degradation of AChR molecules cross-linked by antibodies (antigenic modulation); (c) functional AChR block by antibodies. The predominant pathogenicity is caused by the complement-mediated mechanisms (6), but all three mechanisms tend to reduce the number of available AChRs and, thereby, decrease neuromuscular transmission between motor nerve endings and postsynaptic membranes. Therefore, an individual nerve impulse cannot generate enough postsynaptic depolarization to achieve the crucial firing threshold required for opening of sufficient voltage-gated sodium channels to initiate an action potential in the muscle fiber (7).

Antibodies to muscle-specific kinase in MG patients

For the last three decades, causative autoantibodies other than those to AChR have been sought in MG patients but have eluded identification in spite of extensive research efforts (1, 2). In 2001, Hoch et al. found autoantibodies against muscle-specific kinase (MuSK) in a proportion of patients with generalized MG (4). MuSK is essential during the development of NMJ, when it organizes fetal AChR clustering at the postsynaptic membrane. Subsequently, in mature NMJ, MuSK is expressed predominantly at the postsynaptic membrane. Studies by Vincent and others showed that the frequency of MuSK antibodies in “seronegative MG patients,” i.e., those who lack autoantibodies to AChR, varied from 4 to 50% (4, 8-11). Ohta et al. detected MuSK antibodies in about 30% of seronegative MG patients but not in any MG patients with AChR antibodies

(seropositive MG) or other autoimmune diseases (12-14). The clinical features of patients with MG and MuSK antibodies are distinctive. These individuals often suffer from a severe bulbar dysfunction that is difficult to resolve with immunosuppressive and immunomodulatory treatments, and muscular atrophy of facial and tongue muscles is common (14, 15). The response to acetylcholine esterase inhibitors is generally unsatisfactory with risk of worsening symptoms, especially when starting treatment in patients with bulbar symptoms or an impending respiratory crisis (16). Thymectomy does not alleviate the symptoms (14). In short-term therapy, patients with MuSK-positive MG respond as well to plasma exchange and intravenous immunoglobulin as those with AChR seropositive MG (14). Even so, those patients whose neck and shoulder muscles are affected often experience respiratory weakness (15). MG in which weakness is limited to the ocular muscle is not frequent but does occur (15).

A number of clinical studies showed that MuSK MG constitutes a distinct subclass of the disease (8-10, 15). The reason is that many patients with MuSK antibodies develop severe muscle weakness and eventual atrophy, which is less common in patients with AChR seropositive MG, and the former respond differently to therapy than persons in the latter group. After the identification of MuSK antibodies in an MG patient, laboratory testing is now required to confirm the diagnosis of MG, to seek AChR antibodies and to formulate the clinical treatment.

MuSK functions in NMJ

MuSK plays multiple roles in clustering AChR during development of the postsynaptic membranes of NMJ (17, 18). Contact of the motor-nerve growth cone with the muscle induces a narrow, distinct endplate zone in the mid-muscle that is marked by a high density of AChR clustering. In this step, agrin released from motoneurons activates MuSK and redistributes AChR clusters to synaptic sites (18, 19). However, agrin does not bind MuSK, and additional components are required to activate MuSK (17, 19). Recent studies demonstrated that Lrp4, a member of the LDLR family, is a receptor of agrin, forms a complex with MuSK, and mediates MuSK activation by agrin (20, 21). Intriguingly, MuSK is also required for organizing a primary synaptic scaffold to create the post-synaptic membrane (18). Prior to muscle innervation, AChR clusters form at the central regions of muscle fibers, creating an endplate zone that is somewhat broader than that in innervated muscle. Thus, MuSK is required for pre-patterning of