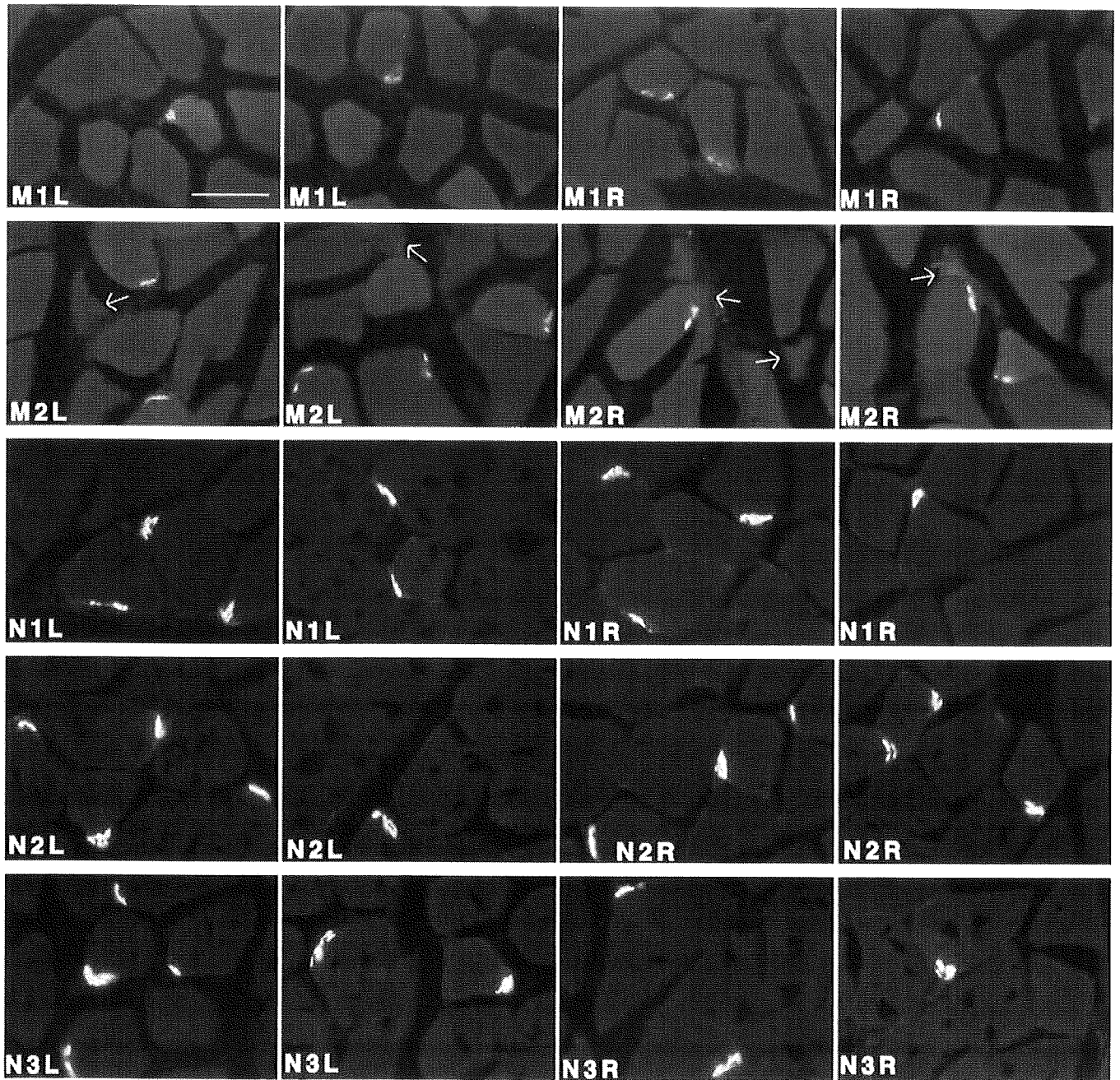
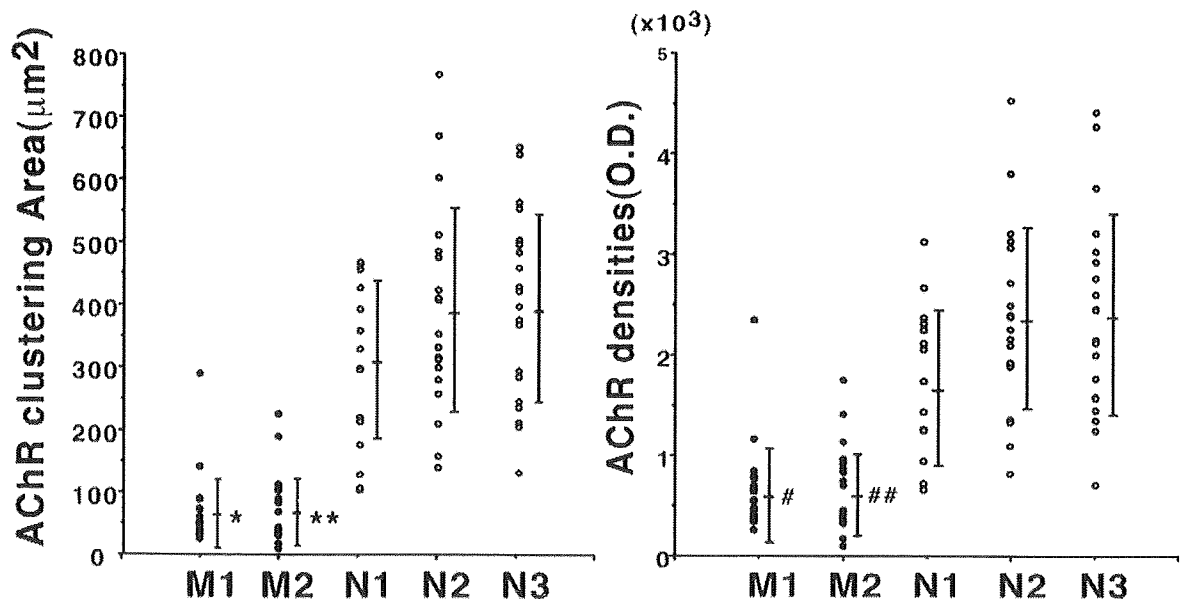
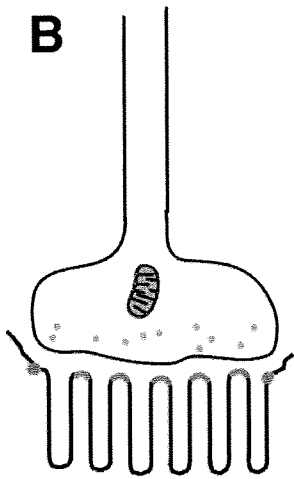
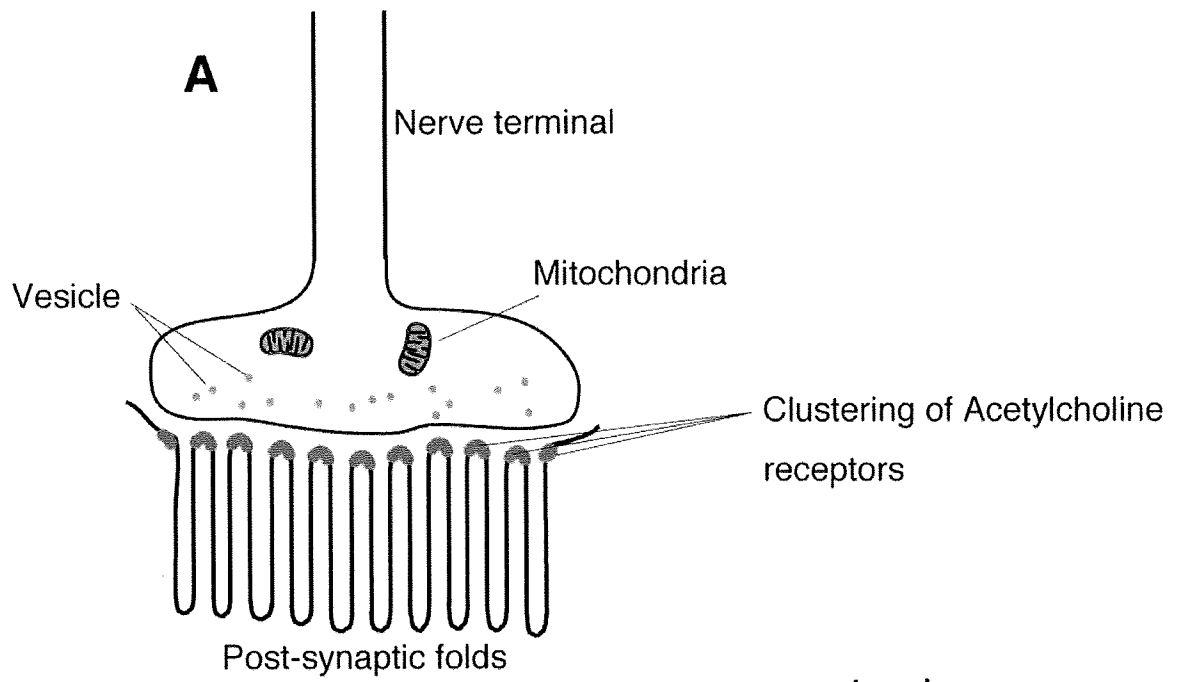
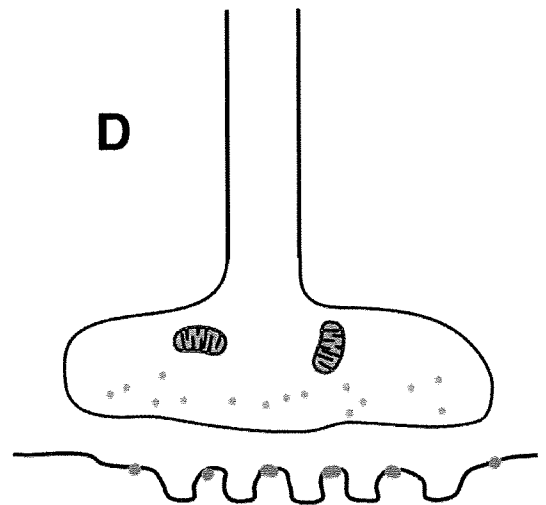
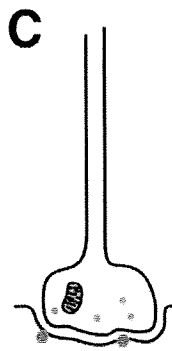


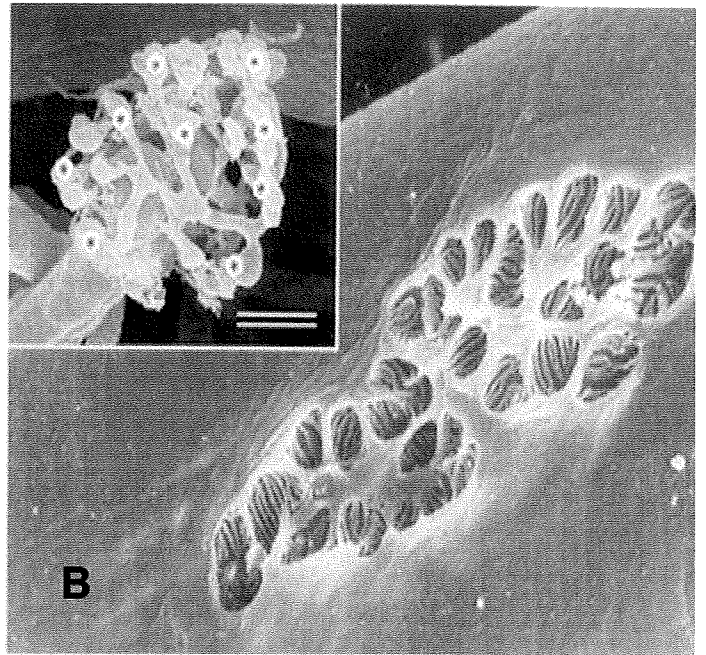
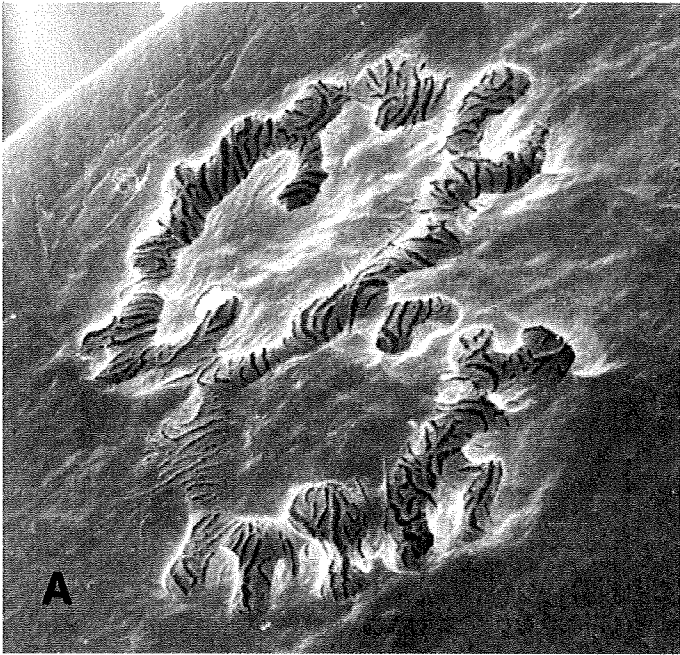
A**B**



MuSK antibodies



AChR antibodies



神経筋接合部位の異常と筋力低下

重本 和宏 久保 幸穂 丸山 直記

要約 サルコペニア（加齢性筋肉減少症）は転倒によるけがの危険性を増加させ、場合によってはそれによって身体的自立を妨げ、また障害を引き起こし身体活動量の低下を招く。さらに、サルコペニアによる運動機能低下-寝たきり-認知症の悪循環は、重度心身障害者の要介護増加に繋がっていく。従って、老化によって筋萎縮に至るメカニズムの解明は、その科学的根拠に基づいた早期予防、リハビリの有効性および効果判定、新しい運動処方開発の基盤として必須である。最近、筋は運動神経の支配下において一方的に維持されるのではなく、筋が中枢側の運動神経を維持する機構が存在することがわかってきた。つまり、筋と運動神経は適切な運動習慣によって保持される動的な相互作用で互いを維持していることになる。この機構の重要性は、神経筋接合部の筋側に発現する MuSK (muscle-specific kinase) に対する自己抗体で発症する重症筋無力症の病態研究から明らかとなった。重症筋無力症は高齢社会を背景に 18 年前の全国調査と比較して 2.5 倍に患者数が増加しているが、我々は重症筋無力症がアセチルコリン受容体 (AChR) だけでなく、MuSK に対する自己抗体で発症することを世界で初めて示した。筋と運動神経の間の維持機構を明らかにすることができれば、筋萎縮の原因解明と治療法の開発に大きな進歩をもたらすと予想される。

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

(日老医誌 2009; 46: 106-113)

はじめに

サルコペニアは認知症と並んで介護予防の面から社会的要請の強い重要な研究課題である。一方で、筋萎縮をもたらすサルコペニアは筋・運動神経の機能維持システムを解明するための手がかりとなる重要な生物学的表現形の一つである。筋萎縮の原因解明と予防・治療法の開発には、生命現象の普遍的原理の探求として設定した目標に向けて研究を推進する必要があると考えている。我々のグループは新しい視点から老化研究に取り組んでいる。サルコペニア（加齢性筋肉減少症）、廃用性筋萎縮、神経筋疾患による筋力低下・筋萎縮のメカニズムを、神経筋シナプスを介した運動神経と筋の相互維持作用による維持システムを知ることで解明したいと考えている。もともと健康筋には萎縮へと向かうカスケードが常在している。適切な運動習慣により、シナプスを介した筋と運動神経の相互作用システムが、萎縮カスケードに拮抗することで筋と運動神経の両方が保持されている。

この筋と運動神経の相互作用を阻害する原因が、運動機能システムのいずれかの場所で発生すると筋萎縮が誘導される。私たちは、原因不明であった重症筋無力症の発症メカニズムを明らかにする過程で、シナプス筋側のシナプス後先端部にアセチルコリン受容体 (AChR) と凝集して発現している MuSK 蛋白 (muscle-specific kinase: 受容体型リセプター型タイロシンカイネース) が、運動神経終末と筋側の相互作用に必要な分子であることを明らかにした。

高齢社会を背景に重症筋無力症 (myasthenia gravis: MG) の患者数が我が国でも増加していることが、2006 年に実施された厚生労働省の免疫性神経疾患に関する調査で明らかになった。18 年前の全国調査に比べ総数で 2.5 倍 (いずれも推定で 6,000 人から 1 万 5,100 人へ)、10 万人当たりの有病率も 5.1 人から 11.8 人へと増えている。欧米では 1990 年代になってから、50 歳以上の年代で予想されたよりも多くの患者が見つかるようになった。2005 年には長野県で 25 年前に比べ、65 歳以上の患者の罹患率が 10~15 倍に増加していることが報告されたのはじめ、デンマーク、イタリア、ギリシャなどでも同様の報告が発表された¹⁾。高齢者の MG 診断では、眼瞼下垂、複視、構音障害、嚥下困難を含む筋力低下などの MG に特徴的な症状が、若年者に比べ見過ごされ

A neuromuscular junction disorder and muscle weakness

Kazuhiro Shigemoto, Sachiko Kubo, Naoki Maruyama :
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

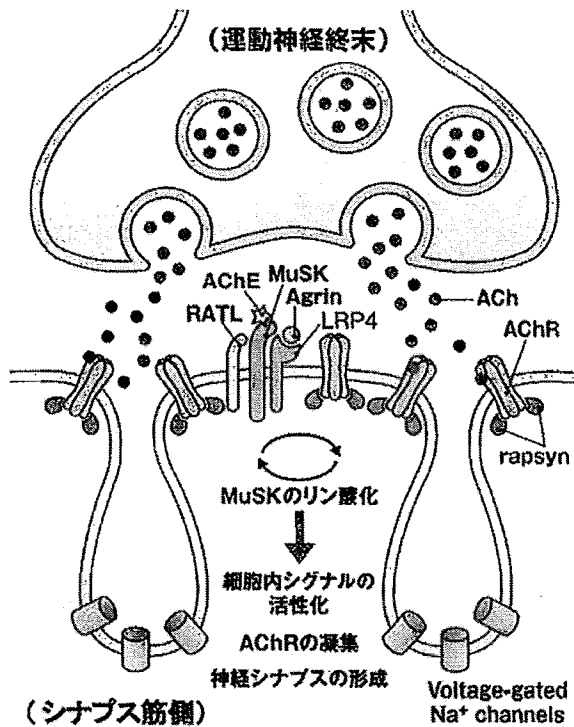


図1 神経筋シナプス接合部の模式図

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 LRP4 (LDL 受容体) が MuSK と結合した結果、MuSK が 2 量体を形成して細胞内領域にあるカインースが活性化する。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。MuSK は AChE (acetylcholinesterase) のアンカー分子である。MuSK に結合するシグナル蛋白として Dok-7 (downstream of kinase) が同定された。Agrin は、直接 MuSK と結合することができない。Rapsyn は足場蛋白として AChR と結合している。MuSK と AChR がシナプス膜に共凝集していることから、rapsyn と MuSK を結ぶ蛋白として RATL が想定されているが同定されていない。

がちになる。そして、MG がアセチルコリンレセプター (AChR) 抗体だけでなく、muscle-specific (MuSK) 抗体でも発症することが明らかとなった今、MG が疑われる患者に対しては MuSK 抗体も測定する必要がある。本稿では、MuSK 抗体陽性 MG (MuSK-MG) を中心に最近の知見を紹介する。

MuSK 抗体の発見と病原性の証明

30 年前の AChR 抗体の発見以来、自己抗体が不明の 10~20% の全身型 MG 患者も血漿交換で症状が改善されることや、患者抗体をマウスの腹腔に投与すると筋電

図に変化が検出できることから、未知の抗原に対する自己抗体で MG が発症することが予想された²³⁾。しかし、その抗原については約 30 年間まったく手がかりがつかめなかった。2001 年 Hoch らは、全身型 AChR 抗体陰性 MG 患者の 70% で MuSK 抗体が陽性になることを報告し⁴⁾、その他のグループも同様に MuSK 抗体が陽性となる患者群が存在することを確認した²³⁾。2006 年、筆者らはウサギを使った動物実験により MuSK 抗体で MG が発症することを最初に報告した⁵⁾。続いて Hoch らはマウスを使い異なる動物種でも MuSK 抗体で MG が発症することを確認した⁶⁾。さらに今年 Cole らにより、MuSK 抗体陽性患者の IgG 分画をマウス腹腔に投与した passive transfer 実験で、マウスに MG を発症することが明らかとなった⁷⁾。「MuSK 抗体で MG が発症する」という概念は今や確立されたと言ってよいであろう。

MuSK とは何か？

MuSK はレセプター型チロシンキナーゼに分類され神経筋シナプスの筋側で、シナプス膜の先端部に AChR とともに凝集して集積している (図 1)。胎児の発生期、神経筋シナプスの AChR 集積とシナプスの形態形成に MuSK が必要であることが、ノックアウトマウスを使った研究で明らかにされた⁸⁾。また著者らは、MuSK が成体の神経筋シナプスの維持にも必要であることを示した⁹⁾¹⁰⁾。MuSK の細胞外領域に、運動神経終末由来の agrin と未知の分子が結合することにより細胞内のチロシンキナーゼ酵素の部位を活性化させて MuSK 機能が調節される¹¹⁾。MG 患者の MuSK 抗体はこの機能を抑制すると考えられる⁹⁾¹⁰⁾。

MuSK 抗体陽性 MG 患者の臨床的特徴

1. MuSK 抗体陽性 MG の疫学

神戸薬科大学、国立病院機構宇多野病院と共同で MuSK 抗体の鋭敏な測定方法を開発した。宇多野病院の結果と他の報告を加え集計すると、本邦では AChR 抗体陰性患者の 30.7% (27/115) が MuSK 抗体陽性である¹²⁾。また、欧米の報告を集計すると 38% (247/648) で日本より頻度が高い¹³⁾。米国では、白人系よりもアフリカ系に MuSK 抗体 MG の患者が多い傾向にある¹⁴⁾。また、Vincent らは地球上南北の高緯度の国ほど発症頻度が少なくなると報告しており、これは人種の違いだけでは説明できないことから MuSK-MG の発症に何らかの環境要因も存在することが予想されている¹⁵⁾。MuSK-MG 患者の男女比を見ると、日本では 1:3.6 (5:18)、欧米は 1:5.1 (25:127) でともに女性の割合が多い¹²⁾¹⁵⁾。

をシナプス膜に結合するアンカー蛋白として必要であり、コリン過敏性の原因はこの機能を抑制するために起きる可能性が考えられる²⁰⁾³¹⁾。

おわりに

我々は、神経筋シナプスを介した運動神経と筋の相互維持作用による維持システムを知るために分子、細胞、動物レベルのイメージング技術による革新的な研究方法の開発を行っている。マウスなどの疾患動物モデルとシビレイの電気器官(神経筋シナプスが巨大化した組織)を使った基礎研究の成果を、ヒト対象としたサルコペニアと筋萎縮性神経筋疾患を対象とした医療へ展開したいと考えている。完全に萎縮した筋の回復は現在も不可能ですから、医療現場ではイノベーションが強く求められている。急速に展開する幹細胞・iPS細胞技術を用いた移植医療に期待がよせられている。しかし、萎縮した筋の再建には細胞補充療法だけでなく筋・神経維持システムの理解に基づく再構築が必要である。筋は運動神経の従属的な支配下にあるのではなく、むしろ筋が運動神経を維持する分子機構があるからだ。我が国で神経筋シナプスに興味を持って研究するグループはほとんどない。シナプスの研究は運動神経や筋を対象とした新しい概念に基づく研究分野へと発展させたい。筋と運動神経を含む運動器の健康維持に関わる医療技術の開発には、シナプス研究の成果を取り入れる必要がある。

文 献

- 1) Aarli JA: Myasthenia gravis in the elderly: is it different? *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1132: 238-243.
- 2) Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ: Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest* 2006; 116: 2843-2854.
- 3) Vincent A, Lang B, Kleopa KA: Autoimmune channelopathies and related neurological disorders. *Neuron* 2006; 52: 123-138.
- 4) 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.
- 5) Shigemoto K, Kubo S, Maruyama N, et al: Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase. *J Clin Invest* 2006; 116: 1016-1024.
- 6) Jha S, Xu K, Maruta T, et al: Myasthenia gravis induced in mice by immunization with the recombinant extracellular domain of rat muscle-specific kinase (MuSK). *J Neuroimmunol* 2006; 175: 107-117.
- 7) Cole RN, Reddel SW, Gervasio OL, et al: Anti-MuSK patient antibodies disrupt the mouse neuromuscular junction. *Ann Neurol* 2008; 63: 782-789.
- 8) DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, et al: The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 1996; 85: 501-512.
- 9) Shigemoto K: Myasthenia gravis induced by autoantibodies against MuSK. *Acta Myol* 2007; 26: 185-191.
- 10) Shigemoto K, Kubo S, Jie C, et al: Myasthenia gravis experimentally induced with muscle-specific kinase. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1132: 93-98.
- 11) Glass DJ, Bowen DC, Stitt TN, et al: Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell* 1996; 85: 513-523.
- 12) 太田潔江, 阪上芳男, 小西哲郎: 坑 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の疫学と症状. *神経内科* 2006; 65: 333-339.
- 13) Wolfe GI, Oh SJ: Clinical phenotype of muscle-specific tyrosine kinase-antibody-positive myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1132: 71-75.
- 14) Vincent A, Leite MI, Farrugia ME, et al: Myasthenia gravis seronegative for acetylcholine receptor antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1132: 84-92.
- 15) Ohta K, Shigemoto K, Fujinami A, et al: Clinical and experimental features of MuSK antibody positive MG in Japan. *Eur J Neurol* 2007; 14: 1029-1034.
- 16) Nix EH, Kuks JB, Roep BO, et al: Strong association of MuSK antibody-positive myasthenia gravis and HLA-DR14-DQ5. *Neurology* 2006; 66: 1772-1774.
- 17) Bau V, Hanisch F, Hain B, et al: [Ocular involvement in MuSK antibody-positive myasthenia gravis]. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2006; 223: 81-83.
- 18) 本村政勝, 福田 卓, 吉村俊朗ほか: 新知見 Overview: MuSK と Dok-7. *日本臨床* 2008; 66: 1140-1148.
- 19) Punga AR, Flink R, Askmark H, et al: Cholinergic neuromuscular hyperactivity in patients with myasthenia gravis seropositive for MuSK antibody. *Muscle Nerve* 2006; 34: 111-115.
- 20) Evoli A, Bianchi MR, Riso R, et al: Response to therapy in myasthenia gravis with anti-MuSK antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1132: 76-83.
- 21) 川口直樹, 高橋宏和, 根本有子ほか: 坑 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の治療. *神経内科* 2006; 65: 360-363.
- 22) 小西哲郎: 血液浄化療法. *日本臨床* 2008; 66: 1165-1171.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) Konishi T, Ohta K, Shigemoto K, et al: Anti-alkaline phosphatase antibody positive myasthenia gravis. *J Neurol Sci* 2007; 263: 89-93.
- 26) Leite MI, Jacob S, Viegas S, et al: IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis. *Brain* 2008; 131: 1940-1952.
- 27) Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, Gallardo E, et al: Antibodies to AChR, MuSK and VGKC in a patient with myasthenia gravis and Morvan's syndrome. *Nat Clin Pract Neurol* 2007; 3: 405-410.
- 28) 若山吉弘, 吉村俊朗, 本村政勝: 坑 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の筋とシナプスの病理. *神経内科* 2006; 65: 353-359.
- 29) McConville J, Farrugia ME, Beeson D, et al: Detection

- and characterization of MuSK antibodies in seronegative myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2004; 55: 580-584.
- 30) Shiraishi H, Motomura M, Yoshimura T, et al: Acetylcholine receptors loss and postsynaptic damage in MuSK antibody-positive myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2005; 57: 289-293.
- 31) Cartaud A, Storchlic L, Guerra M, et al: MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 2004; 165: 505-515.
-

特集

Topics

KEY WORD

転倒危険者の早期発見から予防まで
—最新のエビデンスから—

●サルコペニア ●加齢性筋肉減少症
●介護予防 ●サテライト細胞

2. サルコペニア(加齢性筋肉減少症)とそのバイオマーカー

SUMMARY

■サルコペニア(加齢性筋肉減少症)は、認知症とともに高齢者のADLとQOLを損なう主要な原因である。早期発見とリハビリの効果を判定する客観的な指標は介護予防対策に必要であり、サルコペニアの病態メカニズムの解明と併せてバイオマーカーの開発が求められる。

重本 和宏
丸山 直記

はじめに

筋力測定や日常生活の運動能力のスコアによる判定は、筋萎縮を既に伴うような筋力低下を検出することは容易であるが、早期発見と予防に対して有効とはいえない。サルコペニアの原因は以下の3種類に分類することができる。まず、筋と運動神経細胞を取り巻く体内環境全体の変化(ホルモン、炎症や筋分化因子の変化)による老化、幹細胞(サテライト細胞)とそれを維持する微少環境(ニッチ)の老化、さらに筋と運動神経細胞(中枢神経)の相互作用による維持システムの老化であり、これらの相互作用で病態を進行させると考えられる(図)。

体内環境の変化によるサルコペニア

加齢に伴い、慢性的分子炎症が生じて老化現象が顕在化する可能性が提案されている。分子炎症の指標としてIL-6、CRPや α_1 -antichymotrypsinなどがある。Shaapらは、上記の分子指標とサルコペニアに関連を検討した。その結果、血中IL-6量は握力と四肢の筋量と逆相関を示した。高IL-6(>5 pg/mL)や高CRP(>6.1 μ g/mL)は40%以上の筋力低下の危険率が2~3倍となる。また筋量の低下は少ない。高 α_1 -antichymotrypsin量は筋量のわずかな減少と相関する。加齢に伴う血中慢性炎症のマ

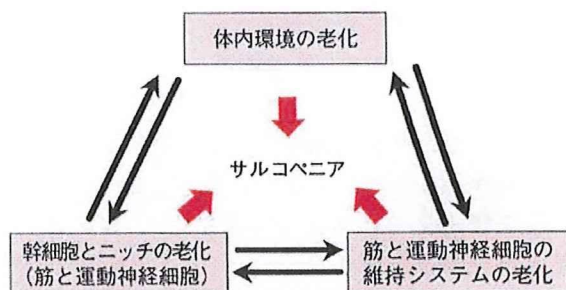


図 サルコペニアの原因

遺伝因子、環境要因、エピジェネティックの変化で誘発される3種類の経路。

カー量の増加は、その種類によっては筋力低下の程度と相関するが、筋量とは必ずしも相関しないと報告された。慢性炎症性マーカーがどのようなメカニズムで筋力低下に関与するかは、今後の解析が必要となる。しかし動物実験では、必ずしもヒトで認められた現象は追認されていないことも報告されている¹⁾。

疫学的調査により腎機能の低下がサルコペニアの出現と相関することが報告されている。Foleyら²⁾はサルコペニア発症とGFR低下の相関を報告している。ほかの要素として低所得、肥満、運動不足、栄養の偏り、高カルシウム血症、ビタミンDの低摂取、高拡張期血圧およびインスリン抵抗性がサルコペニアと関連すると報告された²⁾。加齢に伴い筋量が減少し、一方で脂肪量が増加するが、これは「sarcopenic obes-

■しげもと かずひろ(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) / まるやま なおき(地方独立行政法人 東京都健康長寿医療センター研究所副所長)

ity」と呼ばれて注目されている³⁾。脂肪組織、特に内臓脂肪組織から炎症性サイトカインが分泌され、筋肉組織での異化作用が亢進し sarcopenic obesity を誘導すると考えられている。Schrager らの疫学的解析から、高 IL-6、CRP、IL-1 受容体拮抗分子、可溶性 IL-6 受容体などが相関するとされている⁴⁾。炎症性サイトカインがサルコペニアを誘導する機序は今後の解析を必要とするが、サルコペニアのバイオマーカーとして利用できる可能性がある。

高齢マウスを使った実験から、体内環境でサテライト細胞の機能低下と筋の線維化を促進する因子として Wnt が報告された⁵⁾。高齢マウスと若いマウスの 2 匹の血管を縫合して血液循環を同じにして (parabiotic pairings)、筋の再生能を調べたところ、若いマウスとつながった高齢マウスの筋再生能は増強し、逆に若年マウスでは筋再生能が低下して筋の線維化が進んだ。その促進因子として Wnt を同定した⁵⁾。Wnt は、肺や肝臓の線維化の促進因子としても報告されている。さらに Klotho は Wnt と結合することで細胞老化を抑制するらしい⁶⁾。Wnt とその抑制因子はサルコペニアのバイオマーカーとなる可能性があり、ヒトにも応用できるかどうか今後の研究が注目される。

サテライト細胞と微少環境の 老化によるサルコペニア

高齢による筋の再生能の低下は、サテライト細胞の微少環境の老化と関係するという報告がある。サテライト細胞の微少環境として、周囲の筋細胞や細胞外マトリックスなどがある。高齢マウスのサテライト細胞を若いマウスの筋に移植すると十分な再生能を示す。一方 Conboy らは、若いマウスのサテライト細胞を高齢マウス由来の筋と共培養すると、再生能が顕著に抑制することを示した⁷⁾。高齢マウスの筋の基底膜には TGF- β が増加していた。TGF- β はサテライト細胞の増殖を抑制した。またサテライト細胞の増殖刺激に必要な Notch シグナルは、逆に減少していた⁸⁾。前に紹介した体内環境と微

少環境(ニッチ)との関係は不明であるが、TGF- β のシグナルに関係する因子とサルコペニアの因果関係が注目される。

運動神経と筋の相互維持システムに着目した筋萎縮の早期バイオマーカーの探索

もともと健常筋には萎縮へと向かうカスケードが常在しているが、適切な運動習慣により、運動神経の終末と筋のつなぎ目である神経筋シナプスを介した筋と運動神経の相互作用が、萎縮カスケードに拮抗することで筋と運動神経の両方が保持する。これは、運動神経と筋のいずれかの原因によってこの維持メカニズムが阻害されると筋萎縮が進むことを示す。われわれは、この相互維持を担う分子は筋萎縮の早期発見のバイオマーカーになると考え研究を進めている。筋から産生されて運動神経を維持する因子は、その有力な候補である。運動神経と筋の維持メカニズムに立脚したバイオマーカーの発見は介護予防の指標となるだけでなく、筋萎縮性疾患の革新的な治療法の開発にもつながるであろう。

文 献

- 1) Mayot G et al : Systemic low-grade inflammation does not decrease skeletal muscle mass and protein synthesis in old rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 8 : 410-417, 2008.
- 2) Foley RN et al : Kidney function and sarcopenia in the United States general population : NHANES III. *Am J Nephrol* 27 : 279-286, 2007.
- 3) Roubenoff R : Sarcopenic obesity : does muscle loss cause fat gain? Lessons from rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci* 904 : 553-557, 2000.
- 4) Schrager MA et al : Sarcopenic obesity and inflammation in the InCHIANTI study. *J Appl Physiol* 102 : 919-925, 2007.
- 5) Brack AS et al : Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 317 : 807-810, 2007.
- 6) Liu H et al : Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 317 : 803-806, 2007.
- 7) Carlson ME and Conboy M : Loss of stem cell regenerative capacity within aged niches. *Aging*

Cell 6 : 371-382, 2007.
8) Carlson ME et al : Imbalance between pSmad3

and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. Nature 454 : 528-532, 2008.

(執筆者連絡先) 重本和宏 〒173-0015 東京都板橋区柴町 35-2 地方独立行政法人 東京都健康長寿医療センター研究所

The Immunopathogenesis of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis Induced by
Autoantibodies against Muscle-specific kinase (MuSK EAMG)

Kazuhiro Shigemoto M.D., Ph.D¹., Sachiho Kubo¹, Syuuichi Mori Ph.D¹., Shigeru
Yamada Ph.D¹., Tsuyoshi Miyazaki M.D., Ph.D¹., Takuyu Akiyoshi M.D.^{1,2}, and Naoki
Maruyama M.D., Ph.D¹.

¹Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Research Team for Geriatric Medicine
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 Geriatric Medicine

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

Introduction

Myasthenia gravis (MG) is the most common disorder of neuromuscular synapses and well-recognized for such characteristic clinical features as ptosis, fatigue and muscular weakness. Ptosis and diplopia occur early in most of these patients. With passing time, when the weakness of bulbar and respiratory muscles worsens, the disease becomes life-threatening so that intubation with mechanical ventilation is required. In 1905, Buzzard postulated that a circulating "autotoxic agent" causes the muscle weakness as lymphocytes infiltrate muscles and tumors of the thymus gland. He also believed that such muscle degeneration was closely related to Graves disease and Addison disease, both of which are now regarded as autoimmune diseases. In 1960, Simpson and, independently, Nastuk et al. proposed that MG is caused by an autoimmune mechanism.

In 1973, seminal studies done by Patrick and Lindstrom first demonstrated that autoantibodies against nicotinic acetylcholine receptors (AChRs) at neuromuscular junctions (NMJs) cause MG. This conclusion came from their work with an animal model they called experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) (1). To develop this model, they inoculated rabbits with AChR protein purified from electric eels and showed that the resulting AChR antibodies induced muscle weakness and paralysis. In fact, these antibodies produced in response to the eel AChR protein cross-reacted with rabbit AChRs at the NMJs. The flaccid paralysis and results from electrophysiological studies of animals with EAMG closely resembled manifestations in patients with MG. In 1976, Lindstrom used the newly developed immunoprecipitation assay of that sera with

radio-labeled human AChRs and discovered that approximately 80% of patients with MG had serum antibodies to AChRs (2). Further, histological and functional studies of NMJs in both MG patients and animals with AChR EAMG demonstrated a loss of AChR numbers and function and failure of neuromuscular transmission leading to muscle weakness (3, 4). However, ~20% of MG patients' autoantigens were never identified, although accumulating evidence showed the existence of autoantibodies against NMJs. MG patients bearing the latter autoantibodies responded well to plasma exchange and immunosuppressive therapies (5). Additionally, passive transfer of plasma immunoglobulin from such MG patients into mice caused a failure of neuromuscular transmission as shown by electrophysiological studies (6).

In 2001, Hoch and Vincent found autoantibodies against muscle-specific kinase (MuSK) in 70% of generalized MG patients who lacked antibodies to AChRs and demonstrated that MuSK antibodies in the sera inhibited MuSK functions in culture myotubes (7). MuSK is indispensable for neuromuscular development, as proven when MuSK knockout mice failed to form AChR clusters or differentiate postsynaptic regions and, therefore, died perinatally (8). Considering its performance of such functions in developing NMJs, MuSK seemed to be the long-sought autoantigen in MG patients; nevertheless, the pathogenic role of anti-MuSK antibodies has been unclear. First, no experimental animal model of MG has been induced by MuSK (9). Second, passive transfer of MuSK antisera from MG patients does not generate the equivalent disease in mice. Apparently the pathogenicity of anti-MuSK antibodies still requires proof by establishing an EAMG like that incited by AChRs (9).

In 2006, for the first time, the inoculation of rabbits with purified MuSK protein caused a loss of AChRs and muscular weakness by disrupting neuromuscular transmission (10). Next, MuSK EAMG was also successfully established in mice (11, 12). In 2008, passive transfer of a large amount of MuSK antibodies from MG patients into mice caused EAMG (13). Therefore, the pathogenicity of MuSK antibodies has now been proven by inciting MG experimentally via active immunization with MuSK and also by passive transfer of MuSK antibodies from patients with MG.

However, if we turn our attention to the clinical studies of MG patients with anti-MuSK antibodies (termed MuSK-MG patients), several complex issues remain unresolved. First, no significant loss of AChRs at NMJs was observed in biopsies from biceps brachii muscles of MuSK-MG patients (14). Second, MuSK antibodies are mainly in the IgG4 subclass, which does not activate complement (15-17), yet complement-mediated damage to postsynaptic membranes is considered a major source of pathogenicity in MG patients with AChR antibodies. Third, a number of clinical studies have shown that MuSK MG constitutes a distinct subclass of the disease (18-20). MuSK-MG patients more often develop severe muscle weakness and eventual atrophy than AChR-MG patients, and the former respond differently to therapy than persons in the latter group. Fourth, although antibodies to AChR in MuSK-MG sera have barely been detected using routine radio-immunoprecipitation assays, low affinity IgG and IgM antibodies to AChR were detected with an immunofluorescent technique in some MuSK-MG patients by using human embryonic kidney cells expressing recombinant AChR subunits on the cell surface (21). Studies of MuSK EAMG will contribute to

understanding both the pathogenicity of anti-MuSK antibodies and the clinical features of MG patients.

In this chapter, we will first describe the EAMG caused by anti-MuSK antibodies and discuss the possible pathogenic roles of the antibodies associated with the clinical features of MuSK-MG patients. Finally, we suggest the wisdom of using animals with MuSK EAMG for the development of more effective medication.

1. Induction of MuSK EAMG in animals

The first piece of evidence that active immunization with MuSK protein induced MG-like muscle weakness in animals came from experiments with rabbits (10). The muscle weakness of such rabbits resembled that observed when purified AChR was first used to induce EAMG in rabbits (1). After anti-MuSK antibodies were generated by inoculating rabbits with recombinant soluble MuSK protein, the recipients developed flaccid paralysis. Even before Hoch and Vincent reported the existence of anti-MuSK antibodies in the sera of generalized MG patients (7), the ability of these antibodies to inhibit MuSK functions had been serendipitously studied. Recombinant proteins from the extracellular portion of mouse MuSK were generated as antigens. The extracellular segment of MuSK comprised five distinct domains, i.e., four immunoglobulin-like domains and one cysteine-rich region. The fusion protein expression construct, which consisted of the mouse MuSK ectodomain with His-tag, was generated and transfected into COS-7 cells (Figure 1). The secreted recombinant MuSK-His proteins were purified by using histidine affinity columns. New Zealand White rabbits were then immunized

with 100 to 400 μg of the purified MuSK recombinant protein. After three to four injections of MuSK

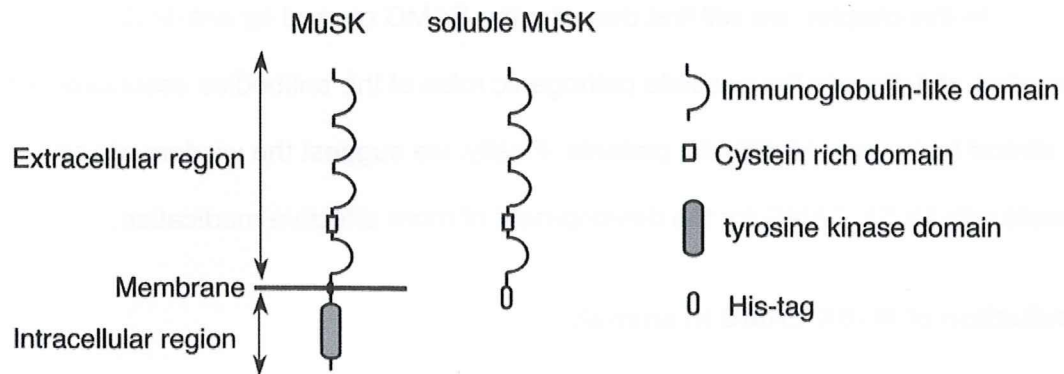


Figure 1. Schematic representation of MuSK proteins. Soluble recombinant protein of MuSK contains His-tag at the C-terminal end.

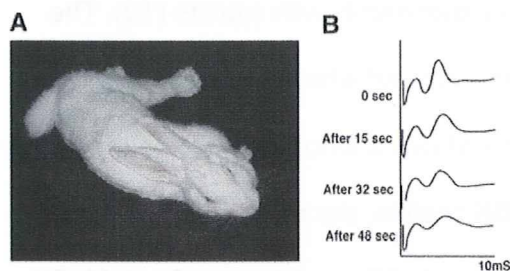


Figure 2. A rabbit manifested MG-like paresis after immunization with soluble MuSK protein (A). Electromyograms of the paretic rabbit show a decline in compound muscle action potential (CMAP) during repetitive nerve stimulation. (Reprinted with permission from Shigemoto et al., *J Clin Invest* 116:1016-1024, 2006)

were positive for anti-MuSK antibodies (7, 10). In repetitive electromyograms from one of these paretic rabbits, the retroauricular branch of the facial nerve was stimulated at 20 Hz, and recordings were taken from adjacent retroauricular muscle. The compound muscle action potential (CMAP) showed a decremental pattern, consistent with the typical MG (Figure 2B). However, injections of acetylcholinesterase inhibitor (Neostigmine) did not significantly reverse either the CMAP defect or the paralytic symptoms in the rabbit EAMG.

protein, all of six rabbits manifested flaccid paralysis (Figure 2A). Sera from the paretic rabbits contained a high titer of anti-MuSK antibodies that reacted specifically with MuSK molecules on the surfaces of C2C12 myotubes as observed in sera from MG patients who

Inoculation of MuSK protein also successfully caused MG-like weakness in mice (11, 12). In certain mouse strains, these injections with a recombinant rat-MuSK extracellular domain elicited clinical signs resembling those seen in MG patients. Additionally, the muscle weakness of MuSK-injected mice was similar to that observed in rabbits injected with purified AChR or MuSK (1, 10) and was accompanied by electrophysiological changes that resembled those of MG (Figure 3A). Injections of Neostigmine only partially reversed the CMAP defect (Figure 3B).

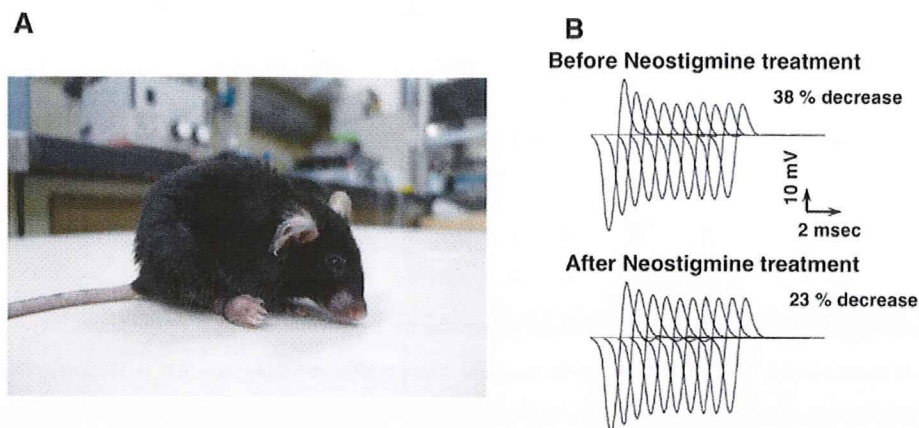


Figure 3. Injection of soluble MuSK protein into mice induces MG-like muscle weakness (A). Electromyograms of the paretic mice show a decline in CMAP during repetitive nerve stimulation (B). Treatment of acetylcholine-esterase inhibitor (Neostigmine) can only partially improve the decremental response to repetitive nerve stimulation.

To assess susceptibility to muscle weakness caused by MuSK immunization in mice, four different strains of mice were injected with the same dose of MuSK proteins (11). Mice of the following strains: C57/BL6 (B6, n =25), A/J (n =15), B6.C-H-2^{bm12} (bm12, n =10) and BALB/c (n =5) were injected on days 0 and 28 with MuSK (10 μ g/mouse) followed by a third injection at day 56 for mice without severe disease (23 B6, 6 A/J, 10 bm12 and 5 BALB/c mice). Muscle weakness was evaluated by an exercise test (Table 1). In three strains, B6, A/J and bm12, the majority of MuSK-injected mice

responded with at least mild signs of fatigable muscle weakness after the second injection and severe signs of weakness after the third injection (Table 1).

Strains	No. of injections	No. of mice	Muscle weakness				% mice showing EAMG	Average grade of all mice
			MG grade					
			0	1	2	3		
B6 (H2 ^b)	2	25	8	6	8	3	68	1.24
	3	23	3	4	7	9	87	1.96
A/J (H2 ^a)	2	15	1	1	3	10	93	2.47
	3	6	0	1	1	4	100	2.50
bm12(H2 ^{bm12})	2	10	2	4	4	0	80	1.20
	3	10	2	2	3	3	80	1.70
BALB/c (H-2 ^d)	2	5	5	0	0	0	0	0.00
	3	5	5	0	0	0	0	0.00

Table 1. Quantitative assessment of muscle weakness in four mouse strains after the second and third injections of MuSK.

Mice received injections of MuSK on days 0, 28 and 58. Grades for muscular strength were as follows: Grade 0, no weakness after exercise test consisting of 20 consecutive paw grips on cage-top steel grids; Grade 1 (moderately decreased activity), mild muscle fatigue after exercise; Grade 2 (markedly decreased activity), hunched posture at rest; Grade 3 (severe generalized weakness), loss of weight and inability to ambulate. (Reprinted from *J Neuroimmunol.* Jha et al., 175:107-117.2006 with permission from Elsevier.)

Susceptibility to MG clearly differed among mouse strains. B6 and bm12 mice were highly susceptible, which coincided with their higher anti-MuSK-antibody responses. However, A/J mice were even more susceptible, and the most severely affected had lower titers of anti-MuSK antibodies compared to B6 and bm12 strains, which were clinically less affected (Table 1, Figure 4). The B6 and bm12 strains differ by only 3 amino acids in the β chain of the I-A subregion. We must note that A/J is one of the strains that develop a late onset (four to five months) progressive muscular dystrophy as a result of a homozygous retrotransposon insertion in the dysferlin (*Dysf*)

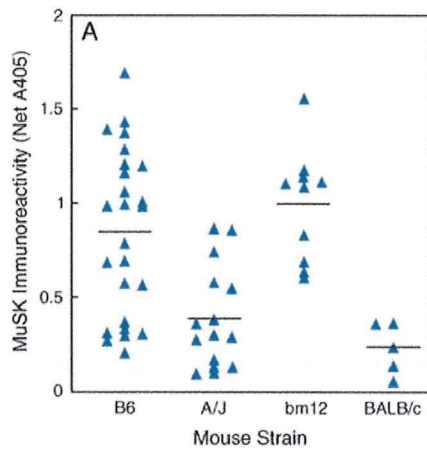


Figure 4. Immunoreactivity to MuSK of antisera (dilution, 1:100,000) obtained after a second MuSK injection from individual mice. B6 and bm12 mice produced the largest amount of anti-MuSK antibodies, followed by A/J and then by BALB/c mice. Antisera obtained after a third injection showed similar results. (Reprinted from *J Neuroimmunol.* Jha et al., 175:107-117, 2006 with permission from Elsevier.)

weakness after MuSK immunization (Table 1, Figure 4); therefore, genetic factors other than the *Dysf* gene must play a role in the regulation of this autoimmune disease in mice. An association with HLA-DR14-DQ5 (odds ratio 8.5) was found in 23 Dutch Caucasians with MuSK-MG (23), thus one genetic factor determining susceptibility or resistance to this disease might be MHC-subclass II genes, which control antibody production in mice as well as humans. Additionally, MHC-subclass II (H-2A) genes mediate immune responsiveness to AChRs in mice with EAMG (24, 25), whereas AChR MG of humans is associated with polymorphism of the HLA-DQ genes (26)

Although active immunization of rabbits and mice with the extracellular domain of MuSK protein clearly demonstrated the pathogenicity of anti-MuSK antibodies in EAMG (10-12), the failure to incite EAMG by passive transfer of human anti-MuSK antibodies into adult mice still challenged the idea that anti-MuSK antibodies can cause MG in humans. Previous studies showed that passive transfer of anti-AChR-negative sera from MG patients into adult mice did not reduce AChRs at the postsynaptic membrane

gene, and phenotypes with such a mutation are natural models for limb girdle muscular dystrophy 2B (22). Thus, the A/J strain is genetically prone to muscle weakness even when myasthenia is not induced with MuSK immunization. Intriguingly, the BALB/c strain is highly resistant to both anti-MuSK-antibody production and manifestations of muscle

or cause myasthenia, but electrophysiological changes were present such as a reduction in miniature endplate potential amplitudes and endplate potential quantal content, which suggested the impairment of both pre- and post-synaptic transmission (5, 6, 27). In 2008, passive transfer of a large amount of IgG from MuSK MG patients into adult mice induced myasthenia with a significant reduction of AChR in the postsynaptic membrane and a decremental electromyographic trace on repetitive nerve stimulation (Figure 5) (13).

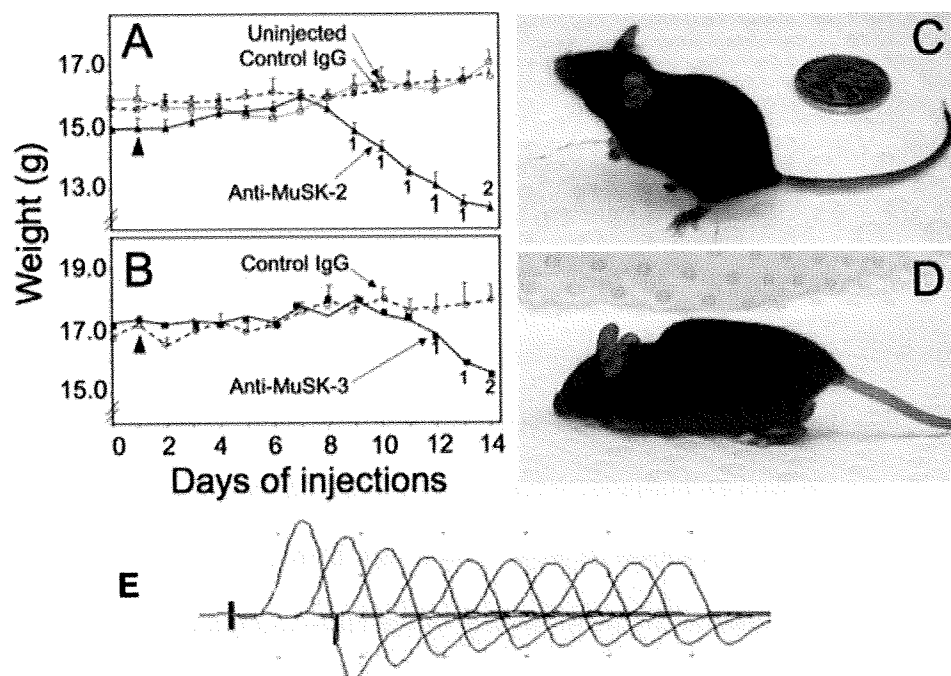


Figure 5. MG-like muscle weakness and weight loss in C57BL/6J mice after injection with anti- MuSK IgG purified from MuSK-MG patients. Mice injected with IgG from anti-MuSK-positive Patient 2 began to lose weight and develop muscle weakness from 9 to 12 days after the start of daily injections. Control IgG-injected and uninjected mice were not affected. Numbers beside symbols refer to the muscle weakness grading scale as described in Table 1. (B) In a separate experiment, mice injected with IgG from anti-MuSK-positive Patient 3 similarly lost weight and became weak. (C) Mouse after 14 days of injections with control IgG, showed no sign of weakness after the standard exercise regimen. Coin diameter was 28mm. (D) Mouse after 14 days of injections with IgG from anti-MuSK-positive Patient 2 showed muscle deterioration with chin down, flaccid tail and limb weakness. Note also the characteristic hump in the upper back. (E) Electromyography recorded from the gastrocnemius muscle of a C57BL/6J mouse injected for 14 days with IgG from anti-MuSK-positive Patient 2. Data represent means \pm standard error of the mean for n=3 mice for all groups except for mice injected with Patient 3 IgG. (B); the amount of IgG available was limited, so n=2. (Reprinted with permission from Cole et al., *Ann Neurol* 63:782-789, 2008)