

200935017B

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

重症筋無力症の病態解明と診断法および治療法の開発

平成19年度～平成21年度 総合研究報告書

研究代表者 重本和宏

平成22 (2010) 年 5月

目 次

I. 総合研究報告	
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	23
III. 研究成果の刊行物・別刷	24

厚生労働科学研究費補助金 (こころの健康科学研究事業)

(総合) 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

研究代表者 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

本課題のもと、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した。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、補体による組織破壊が無くても 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わかった。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。これまで使われてきた、重症筋無力症に対する治療指針を改定する必要があることを示した。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り、3,4-diaminopyridine が有効である可能性を示した。また、我々は独自に開発した高感度な抗 MuSK 抗体測定系を使い、我が国の MuSK 抗体-MG 患者の臨床病態像を明らかにした。加えて、MuSK および AChR 抗体が検出できない重症筋無力症の新しい診断法の開発に取り組んだ。

研究分担者

宇多野病院・院長

(平成 19 年度の研究分担者、20, 21 年度は協力

研究者)

太田 光熙 神戸薬科大学 病態生化学・教授

小西 哲郎 独立行政法人 国立病院機構

A. 研究目的

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6000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才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才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をはじめ、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。そして、2007年に開催された11th International Conference “Myasthenia Gravis and Related Disorders” (New York Academy of Science主催)でも、高齢者MGの増加とその臨床的特徴が注目された。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がちになる。

抗アセチルコリンレセプター抗体(AChR抗体)で発症する重症筋無力症は約30年前にLindstromらにより明らかにされている。一方で重症筋無力症の患者の約20%では、抗アセチルコリンレセプター抗体(AChR抗体)は検出されず、未知の自己抗体の存在が予想されたが未解明のままであった。2001年にHochらは原因不明の重症筋無力症の患者の2/3の血清中にMuSK(Muscle-specific kinase)抗体を検出したと報告した(Hoch et al., Nat. Med. 2001)。我々は重症筋無力症患者のMuSK抗体の正確な定量アッセイシステムを神戸薬科大学(太田)、国立療養所宇野病院と共同で開発した。それを使って我が国の患者血清を調べたところ、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(Ohta, Shigemoto et al., Neurology, 2004, 2005)。海外においても同様の報告がされている。我々はMuSK抗体の正確な定量アッセイシステムを開発し、現在まで国内大学病院や一般病院に対して確定診断として結果を提供している。本課題では、独自に開発したMuSK抗体測定法を使い、我が国のMuSK抗体-MG患者の臨床病像を明らかにすることを目的とした。加えて、AChR抗体とMuSK抗体の両方が陰性の重症筋無力症の新しい診断が必要であり開発に取り組んだ。

また、我々は、発病メカニズムと治療法の開発を目的としてマウスを使ったMuSK-MGの新しい疾患モデル動物の開発を行った。本課題の背景として、我々は既に世界で初めてウサギを使ってMuSK-MGの疾患モデルの作成に成功していた。これは以下のような意義があった。MuSK抗体が発見されたにも関わらず、重症筋無力症の発症原因であることを示す確かな証拠を、誰も提示することができなかつたため、「MuSK自己抗体が重症筋無力症の発症原因とは考えられない」、という強い疑問と激しい議論が起きた(Lindstrom, Engel, Neurology, 2004)。その後も決定的な証拠は出されず、いぜん因果関係は不明であった。2006年、研究代表者の重本は抗MuSK抗体により重症筋無力症が発症することを、疾患モデル動物を使って証明することができ、論争に終止符を打った(Shigemoto et al., J. Clin. Invest. 2006)。天疱瘡、ギランバレー症候群に続き、我が国で日本人の手により臓器特異的自己免疫疾患の原因を明らかにしている。しかしながら、ウサギは比較的大きな実験動物であり、疾患モデルとしては解析が難しいことや、精製したリコンビナント抗原が多量に必要であること、また発

症するには長期間(3ヶ月から一年)観察が必要であり、その時期も予測できないため症状が急激に悪化して解析に間に合わないケースも多い、という問題点が残されていた。

MuSK-MGの発症メカニズムについても解決しなければならぬ疑問があった。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、本課題で明らかにしたが(2007年度 太田分担報告書、Ohta, Shigemoto et al., Eur J Neurol 2007)、他の研究者からも同じ結果が報告された。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抗体陽性重症筋無力症(AChR-MG)とMuSK抗体陽性重症筋無力症(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なっている。我々は、本課題においてウサギのMuSK-MG疾患モデルを使って解析することで、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た(2007年、2008年度 研究総括報告書、投稿準備中)。しかしながら、ウサギを使った疾患モデルでは、発病への補体関与を完全に否定することができなかった。また、MuSK-MGに特徴的な筋麻痺、進

行性の筋萎縮、神経筋シナプス接合部の病態について補体が関与しないメカニズムを解明する必要があった

MuSK-MGの治療法の検討と開発についても本課題で取り組んだ。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。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AChR-MGのほとんどに対して有効であるが、MuSK-MG患者に対しては効果が薄くばかりでなく、むしろ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、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。胸腺摘出はMuSK-MGに対する有効性は我々の胸腺摘出の有効性に関して、我々や他の報告からも否定的であるのが現状である。以上のことから急速に悪化するケースの多いMuSK-MGに対する新しい治療法を開発する必要がある。

MuSK-MGの病態および治療法の開発には、その病態を忠実に反映する疾患モデル動物が有用である。またマウスを使った疾患動物モデルは、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、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かった

A/J)を使っても、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かった(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うことが可能となった。

B. 研究方法

本課題は動物発症モデルを作成して生命科学からのアプローチによる基盤研究と患者を対象とした臨床研究から構成される。

1. 重症筋無力症患者の自己抗体の検討

1-1. 重症筋無力症におけるMuSK抗体陽性患者の臨床的特徴およびMuSK抗

体の特性について

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

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

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

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

それぞれの抗原はHunterらのクロラミンT法により、¹²⁵I標識を行った。¹²⁵I-抗原溶液と被検血清を室温で反応させた後、抗ヒトIgG抗を添加し沈殿を洗浄後、放射活性をガンマカウンターで測定した。基準値:MuSK抗体価は、

タープレートでRIA(radio immuno assay)法を使って測定した。

1-2. 重症筋無力症に特異的に検出された抗アルカリフォスファターゼ (AP) 抗体と

陽性患者の臨床的特徴

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

MuSK 細胞外ドメイン蛋白-AP リコンビナント蛋白に対して抗体陽性を示した AChR 抗体陽性 SPMG 4 例および SNMG 4 例を対象に、患者血清 (抗体) と AP による吸収実験を行った。加えて上記の 8 例を対象に、 ^{125}I -AP を用いて、先と同様の方法で特異性の検討を行った。臨床的指標が解析可能な SPMG 99 例 (抗 AP 抗体陽性 SPMG ; 10 例, AP 抗体陰性 SPMG ; 89 例) を対象に臨床像の解析をした。

2. 疾患モデル動物を使った病態解明

動物実験計画は実験施設 (愛媛大学、東京都老人総合研究所、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動物愛護の精神に基づいて行った。

2-1. MuSK 抗原の作成とウサギへの免疫

マウスの筋肉から精製した RNA から MuSK の cDNA を PCR 法でクローニングした。MuSK はリセプター型タイロシンカイネースであるが、その細胞外ドメインの発現ベクターを作成して Cos7 細胞にトランスフェクションの後、分

泌リコンビナント蛋白として精製した。リコンビナント蛋白作成にあたって動物モデル作成、メカニズム解明、さらには抗体価を測定するための臨床検査システムを目的として、ヒト免疫グロブリン IgG, His-tag とそれぞれ融合させた MuSK 蛋白を作成した。精製したリコンビナント MuSK 分泌蛋白をウサギには、マウス由来の MuSK 蛋白を 3 回以上免疫して 3 ヶ月以上の期間観察し、発症するのを待った。

2-2. 発症したウサギモデルを使ったシナプス病理学的形態変化の解析

発症したウサギからは、採血ののち血清を分離した。また、4%パラフォルムアルデヒド(0.1M リン酸バッファー, pH7.4)で環流固定の後、筋を採取して同じ固定液で 4 度にて 1 日インキュベーションした。筋を 10%, 20%, 30%ショ糖-PBS の溶液中に段階的に浸してインキュベーションしたのち、O. C. T. Compound と一緒にドライアイスで凍結した。凍結した筋組織を筋線維に対して平行に 30 μm 厚の凍結切片を作成してスライドガラスに固定した。 α -bungarotoxin-rhodamin と一次抗体(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(Nikon)で神経筋シナプスの形態変化を観察記録した。

透過型電子顕微鏡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 抗体の機能解析

MuSK 蛋白を免疫して発症したウサギ血清に含まれる 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。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。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 のチ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 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 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)によるウェスタン解析により検討した。C2C12 培養筋細胞のライゼートに対して MuSK 抗で免疫沈降サンプルを泳動し PVDF メンブレンに転写した。二次抗体は抗マウス peroxidase を使って発色

した。同じメンブレンを洗浄し、ウサギの抗 MuSK 抗体で MuSK 蛋白を検出した。AChR のリン酸化検出はライゼートをビオチン化した α -bungarotoxin とアビジン agarose で沈降して泳動し PVDF メンブレンに転写したのち抗リン酸化抗体(4G10 と PY20 抗リン酸化モノクローナル抗体)と抗 AChR -beta モノクローナル抗体によるウェスタン解析により検討した。

2-3. 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 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システムを調べたところ約 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 システム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。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。

2-4. 発症したマウスの病態解析

(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) 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。

(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、マウスからヒラメ筋を採取して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-抗ウサギ抗体)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(Co1Q)に対する一次抗体で染色し

た後、二次抗体(Alexa488-あるいはAlexa555-抗ウサギ抗体)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、マウスを麻酔下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。

(4) 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。

(5) 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-Lrp4-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 MuSK 抗体 IgG をパンペイン処理して 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 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 MuSK 抗体で MuSK 蛋白を検出した。

3. 疾患モデル動物を使った治療法の開発
AChE 阻害薬として neostigmine (37.5 μg/kg; Sigma) を、また 3, 4-diaminopyridine (3, 4-DAP) (8 mg/kg; Tokyo Kasei) を発症したマウスを麻醉下にて、腹腔に投与して筋力および筋電図を解析した。

B. 研究結果

1. 抗 MuSK-MG 患者の臨床病態像について
MuSK 抗体は SNMG 107 例中 29 例 (27 %) で検出された。SPMG では陽性例はみられなかった (図 1)。

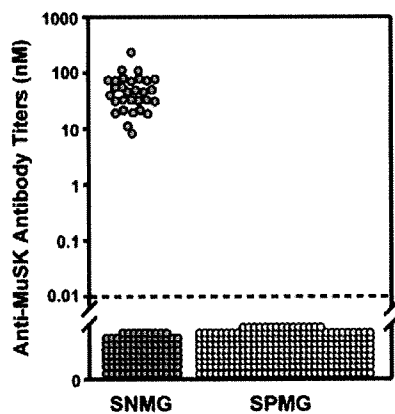


図1 SNMGおよびSPMGにおける抗MuSK抗体価
図中の破線(···)は基準値(0.01 nM)を示す。

MG以外の神経筋疾患・自己免疫疾患患者および健康者全例で MuSK 抗体は陰性であった (図 2)。

MuSK 抗体陽性検体全例で、MuSK 細胞外 domain の epitope は MuSK Ig1-2 domain が主であり、その割合は、全 MuSK 抗体価中の 68-97 % を示した。この

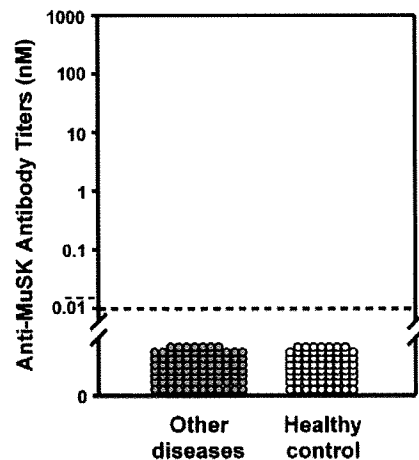


図2 MG以外の神経筋疾患・自己免疫疾患患者および健康者における抗 MuSK 抗体価
図中の破線(···)は基準値(0.01 nM)を示す。

うち 4 例については MuSK Ig3-4 domain にも 20-30 % の活性を示した (図 3)。MuSK 抗体陽性検体全例で、MuSK 抗体の IgG subclass は IgG4 が主であり、その割合は 45-100 % を示した。このうち、3 例のみ、IgG 4 の割合が 70 % 以下であり、IgG 1, 2 および 3

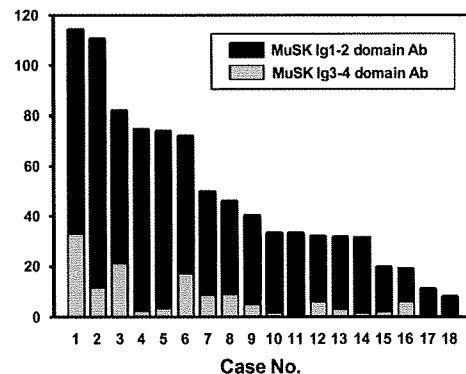


図3 抗MuSK抗体のMuSK細胞外Ig-domain epitope分析

の活性の割合が11-30%みられた。以上の結果は、欧米の患者と同様に、我が国でもMG患者のMuSK抗体は補体結合能の無いIgG4が主体であることが明らかとなった(図4, 2007年度 太田分担報告書、Ohta, Shigemoto et al., Eur J Neurol 2007)。MuSK自己抗体に対して補体が関与せずに、どのような機序によりMGが発病するのか明らかにする必要があり、本課題でそれについてさらに明らかにしたので後述する。

MuSK 抗体陽性患者は、女性優位(女性: 男性, 18:5)であった。発症年齢は、18-72

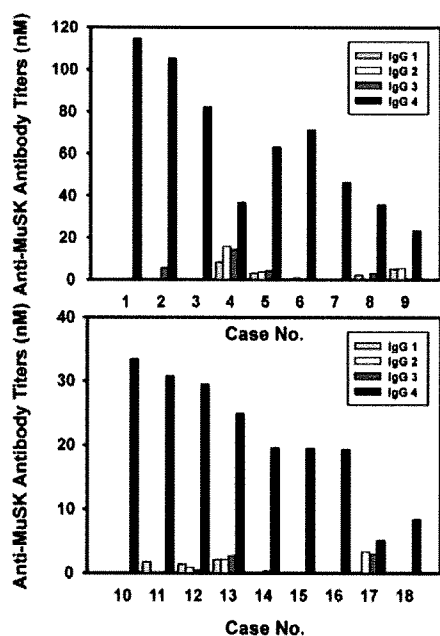


図4 抗MuSK抗体のIgG subclass

歳(平均45歳)であった。MG患者に特徴的な症状である筋力低下については、眼症状、球麻痺、および呼吸筋麻痺がSPMGと比較して多くみられ、症状も重症傾向にあった。一方、四肢筋力低下(52%)は、SPMGと比較して軽症であった。また、胸腺腫を合併している患者はならず、胸腺過形成(26%)も比較的少なかった。

ステロイド療法を行った患者では、MuSK抗体価の減少およびそれに関連した臨床的症状の改善がみられた(図5)。血漿交換療法を行った患者では、血漿交換を行った後、劇的な抗MuSK抗体価の減少および臨床的症状の改善がみられた(図6)。また、血漿交換により劇的に減少したMuSK抗体価は、その後のステロイド投与により維持された。しかし一人の患者は(図6, P7)、血漿交換によりMuSK抗体価が減少したものの、その後抗体価および臨床的重症度は治療前のレベルに戻り、プレドニゾロンおよびシクロスポリンの投与で改善された。胸腺

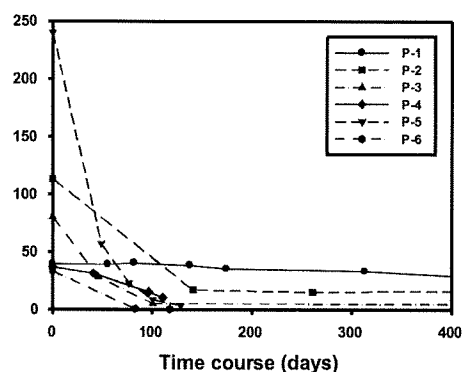


図5 ステロイド療法を行った患者の抗MuSK抗体価の経時変化

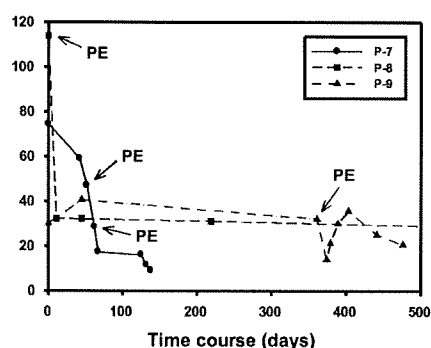


図6 血漿交換療法(PE)を行った患者の抗MuSK抗体価の経時変化

摘出術を行った患者では、胸腺摘出術後、抗MuSK抗体価の減少および臨床的改善がみられなかった。一人の患者では胸腺摘出術後むしろ

臨床的重症度が悪化した。その他2名の患者でも、胸腺摘出術後、MuSK抗体の減少および臨床的症状の改善がみられなかった。

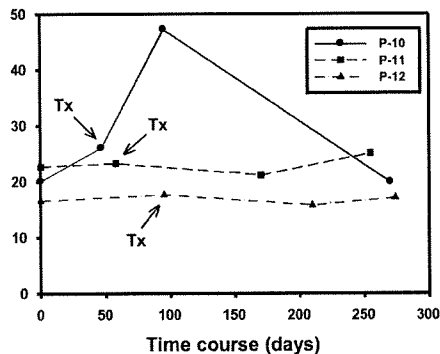


図7 胸腺摘出術(Tx)を行った患者の抗MuSK抗体価の経時変化

MG治療ガイドラインに示されているように、臨床の現場ではMuSK抗体の有無にかかわらずMGの治療薬としてAChE阻害薬が使用されている。しかし、宇多野病院においてMuSK抗体陽性MG(5例)と両抗体陰性MG(4例)に対して施行したテンシロン試験において、MuSK抗体MG患者の4例は5mg以下の少量の塩化エドロフオニウムの静注で顔面(眼輪・口輪)にfasciculationが出現、3例では咽頭の詰まる感を訴え、1例では眼瞼下垂の悪化がみられた。1例の患者では2mgの少量にもかかわらず、顔筋・舌のfasciculationと発語、開口困難および呼吸苦を訴えたため、それ以上の投薬を中止している。副作用がなく10mg投与できた患者は1例のみで、眼瞼下垂の改善を示し、テンシロン試験でも陽性を示した。いっぽう両抗体陰性4例では1例を除き5mg以下の静注ではfasciculationは誘発されず、全例が5mgを越えて投与可能で、眼瞼下垂は筋力の改善を示し、テンシロン試験でも陽性結果であった。

2. AChR-MG 血清中の新規自己抗体の発見。(抗体価と病態についての解析)

本課題の遂行により、AChR-MGの血清中に新しい自己抗体、抗アルカリフォスファターゼ抗体(AP抗体)を発見し報告した(Konishi, Ohta, Shigemoto et al. J Neurol Sci 2007, 2007年度小西分担報告書)。AP抗体はSPMG 249例中22例(9%)で検出された(図8)。

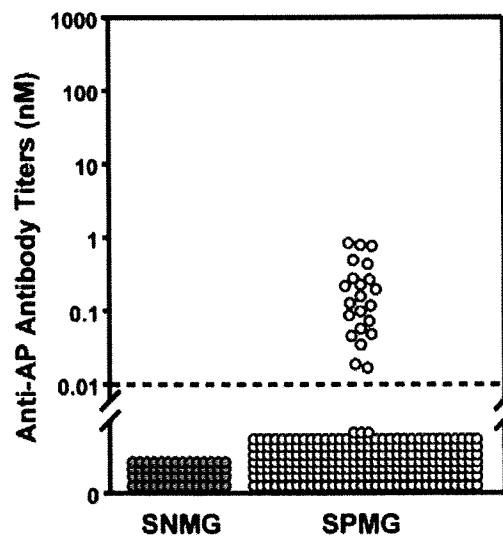


図8 SNMGおよびSPMGにおける抗AP抗体価

図中の破線(----)は基準値(0.01 nM)を示す。

一方、SNMGでは陽性例はみられなかった。MG以外の神経筋疾患・自己免疫疾患患者および健康者全例でAP抗体は陰性であった(図9)。

AP抗体はSPMGにおいて極めて特異的に検出されることを発見した。これまでMGにおいてAP抗体が検出されたという報告はなく、新規の自己抗体と考えられる。AP抗体陽性患者は、女性のみにもみられた。(女性:男性, 10:0), AP抗体陰性患者(女性70%)よりその割合は高かった。最重症時のMGFA分類は、AP抗体陽性患者において重症例が多く、眼筋型MG(class

I) はみられなかった。特に、AP 抗体陽性患者の半数は呼吸器装着が必要な患者群であった

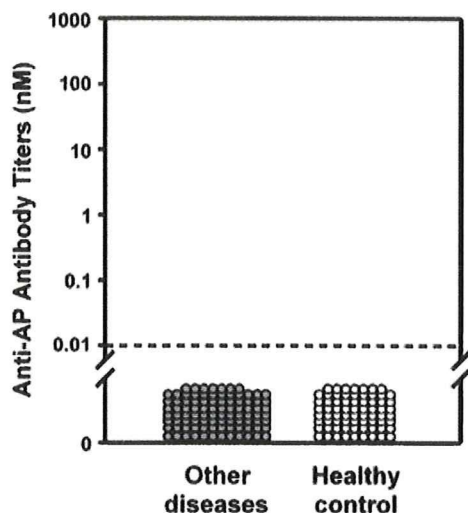


図9 MG以外の神経筋疾患・自己免疫疾患患者および健常者における抗AP抗体価

図中の破線 (----) は基準値 (0.01 nM) を示す。

表1 抗AP抗体陽性および陰性SPMGの臨床的特徴

	抗AP抗体陽性患者	抗AP抗体陰性患者
症例数	10例	89例
女性:男性	10:0	62:27
発症年齢	24-67歳 (平均 49歳)	1-85歳 (平均 38歳)
罹病期間	3-35年 (平均 22年)	1-51年 (平均 18年)
最重症時 MGFA分類		
class I	0	15
class II	0	20
class III	4	29
class IV	1	7
class V	5	18
胸腺腫例数	2 (20%)	27 (30%)
胸腺摘出術例数	10	79
免疫抑制剤使用例数	8	74
抗AChR抗体価	0.4-1750 nM (平均 209 nM)	0.2-400 nM (平均 25.3 nM)

3. ウサギ疾患モデルを使った発症メカニズムに関する研究

3-1. 形態病理学的解析

我々はウサギMG発症動物の神経筋シナプスの解析から、MuSK抗体はシナプスの後膜だけにとどま

らず全体構造が縮退することを発見した(図10, 2008年度 総括報告書、投稿準備中)。

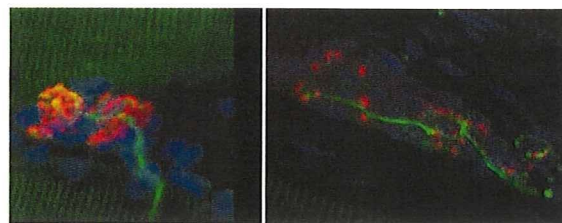


図10 運動神経とシナプス前膜の構造変化
左: 正常ウサギ, 右: 発症したウサギ,
赤 AChR シナプス後膜
緑 運動神経線維と終末部(シナプス前膜)

透過電顕解析から正常マウスに比べ、発症したウサギのシナプス後膜襞(convolutionと complexity)の顕著な減少が観察された(図11)。

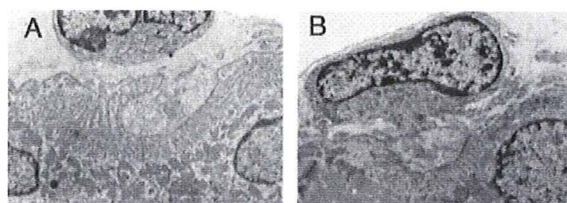


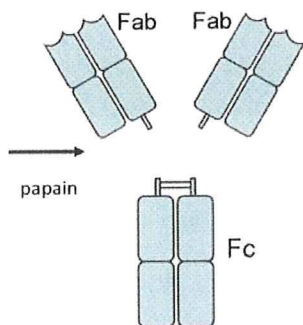
図11 発症したウサギのシナプスひだの構造変化 (透過型電子顕微鏡)
左: 正常ウサギ, 右: 発症したウサギ,

3-2. 自己抗体の機能的解析

MuSK 抗体はウサギの神経筋シナプスのAChRを減少させ筋麻痺を発症させるにもかかわらず、MuSK 蛋白のチロシンリン酸化活性をむしろ誘導することを明らかにしている。そして抗MuSK抗体が、培養C2C12細胞のAChR凝集に抑制効果があるかどうか検討したところ、抗MuSK抗体は agrin による AChR凝集を強く抑制することが明らかにしている(Shigemoto et al. JCI 2006)。これは、生体内で抗MuSK抗体がMuSKの機能を直接阻害してシナプス後膜のAChR凝集抑制を誘導することを示唆していた。そこで、このMuSK抗体のIgGをパンプインで処理して抗原結合部位が一価のみ有するFabフラグメントを作成して、もとの二価のIgGと同

様に agrin による AChR 凝集を抑制するかどうか検討した(図 12).

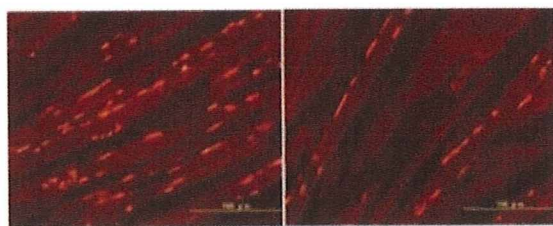
MuSK Fabは抗原結合部位が1価である



MuSK antibodies(IgG)

図12 ウサギMuSK IgG抗体のFab
パペインによる切断

agrin添加 によるAChR凝集誘導



無添加

添加

抗MuSK-IgG Fabフラグメント

図13 ウサギMuSK IgG抗体のFabは agrin
によるAChR凝集を抑制する。
C2C12筋培養細胞を使った機能実験

その結果、二価の MuSK 抗体と同様に agrin による AChR 凝集を強く抑制することを明らかにした(図 13, 14).

AChR clusters

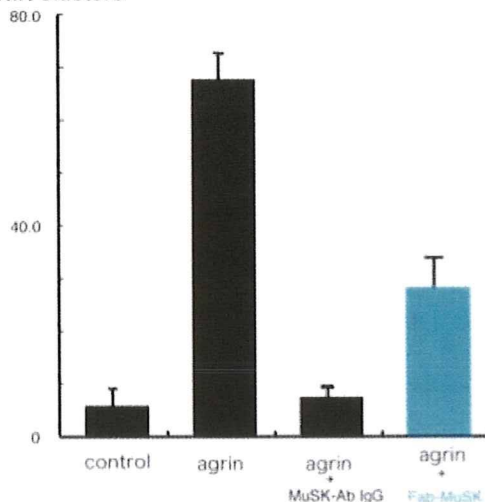


図14 ウサギMuSK IgG抗体のFabは2価のIgGと同様に agrin によるAChR凝集を抑制する。
C2C12筋培養細胞を使った機能実験の集計

4. 補体欠損マウスを使った新しい疾患モデル動物による病態解明と治療法の開発

「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(2009年度 総括報告書、論文投稿準備中)。驚くことに100%の確率で同調して重篤な症状を示す、MuSK-MGを発症させることができる(図 15A, 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15B)。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 15C)。血中のMuSK抗体も発症したマウスで顕著に上昇していた(図15D)。発症したマウスの体重減少は、筋萎縮によるものと予想されたため、

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核は筋線維の中央部には観察されなかった(図15E)。

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。

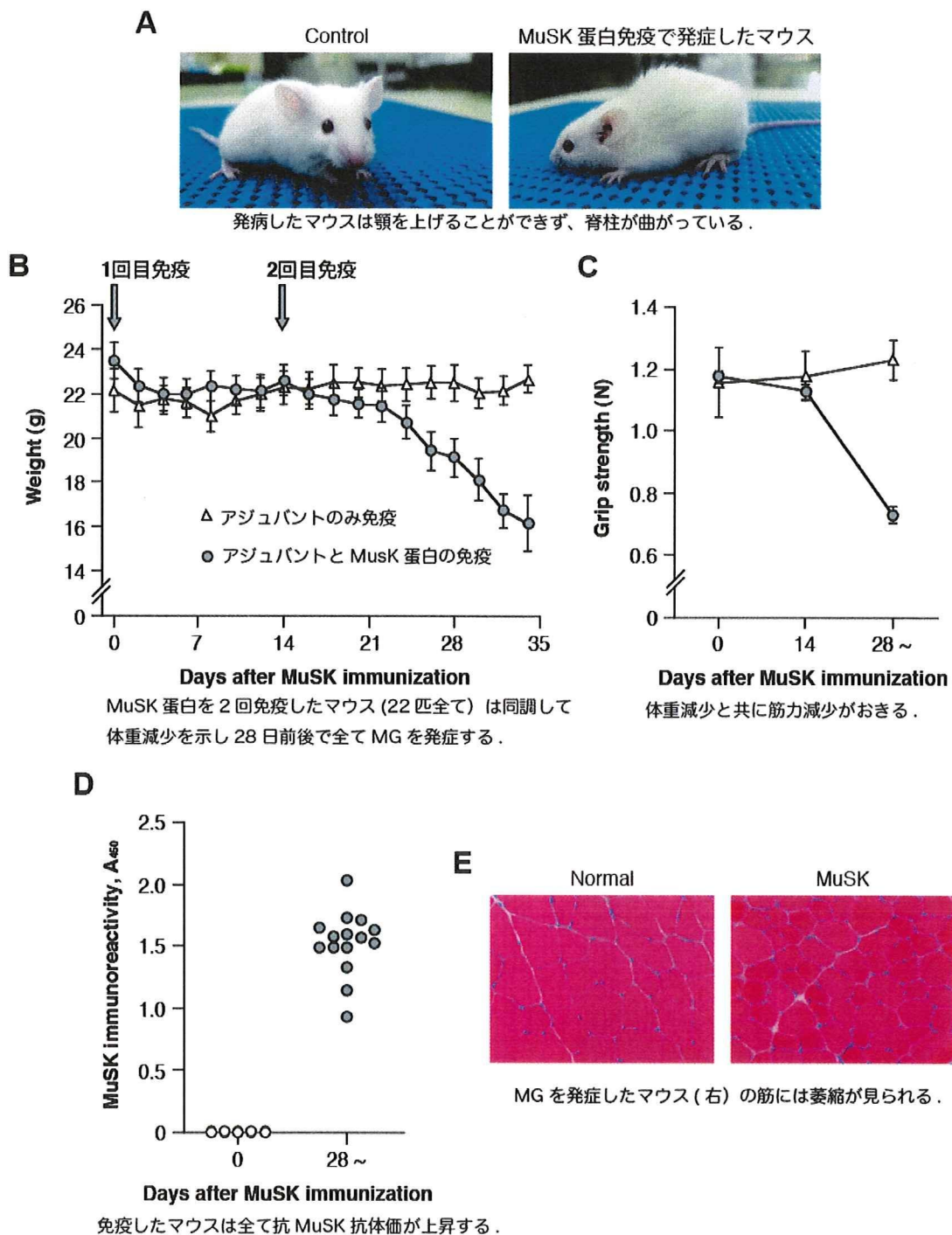


図 15 補体欠損マウスによる MuSM MG 疾患モデルの作成

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16)

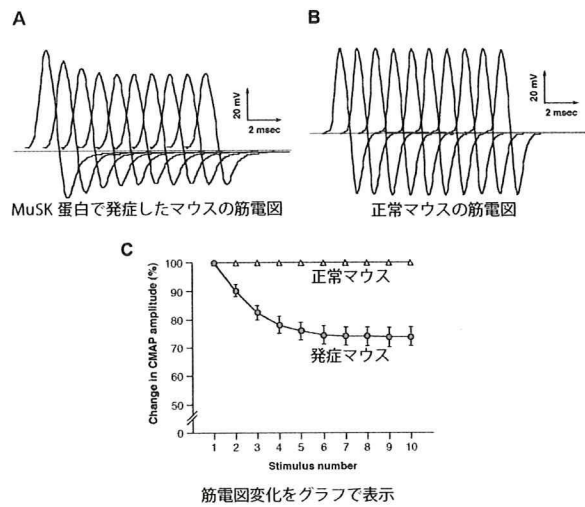


図 16 疾患モデルマウスの筋電図変化の測定結果
3Hz で座骨神経を刺激して腓腹筋の筋電図を測定した。患者と同じ漸減変化を示す。

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 17, 18, 19)。運動神経終末の sprouting も顕著である(図 17, 19)。

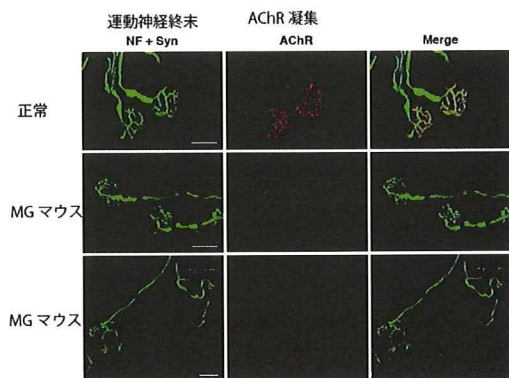


図 17 発症した MG マウスの神経筋接合部の変化(ひらめ筋)
運動神経終末の縮小、sporuting、さらに AChR 凝集の顕著な減少。

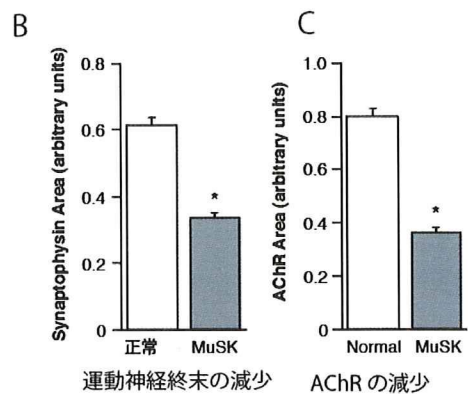
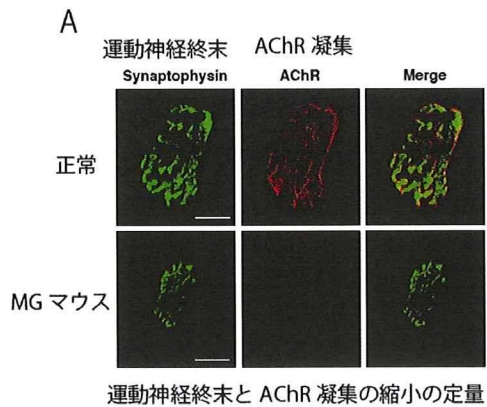


図 18 発症したマウスの NMJ の形態変化
AChR 凝集だけでなく運動神経終末も縮小

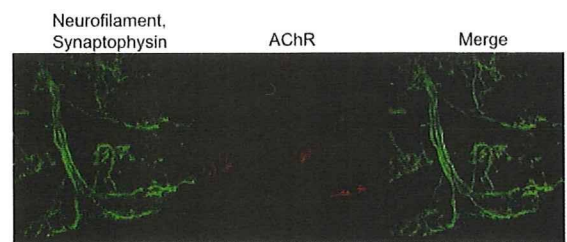


図 19 MG を発症した補体欠損マウスの運動神経終末の sprouting と AChR 凝集の減少

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20、21). このようなシナプスの変化はMuSK-MG患者でも同様な変化がおきていると予想される.

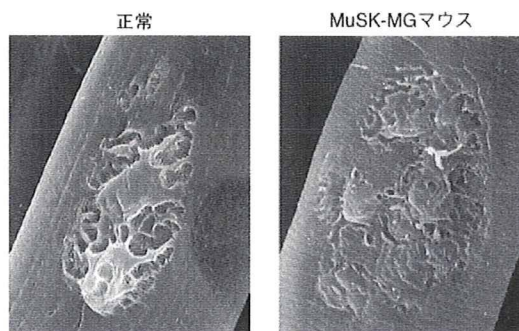


図20 発症した補体欠損マウスの神経筋シナプスの溝とひだの構造変化走査型電子顕微鏡画像. 溝とひだの顕著な縮退が見られる.

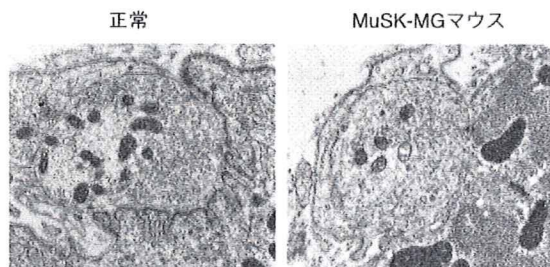


図21 発症した補体欠損マウスの神経筋シナプスのひだの構造変化走査型電子顕微鏡画像. ひだの顕著な縮退が見られる.

以上の結果は、大変興味深いことに、我々が世界で初めて作成に成功したウサギ(補体機能は正常)の病態と同じであった(図10、11比較参照).

補体欠損マウスで作成した疾患動物モデルは、MuSK-MG患者の病態を再現できることを示すことが次の実験でさらに裏付けられた. 発症したMuSK-MGマウスに、AChE阻害剤 neostigmineの効果を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2、図22).

	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%

表2 Neostigmine投与後の筋活動電位の減衰率の改善度

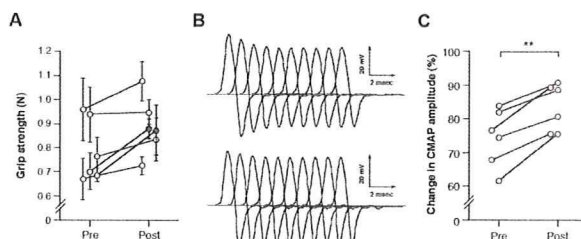


図22 AChE阻害剤(neostigmine)の投与による筋力および筋電図(3Hz)の変化 neostigmineの効果は限定的であることがわかった.

- A. 筋力は6匹のうち2匹のマウスで回復
- B. neostigmine投与前(上)と投与後(下)の筋電図
- C. 漸減反応の改善度

また、補体欠損マウスモデルを使って、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検出することに成功した(図23).

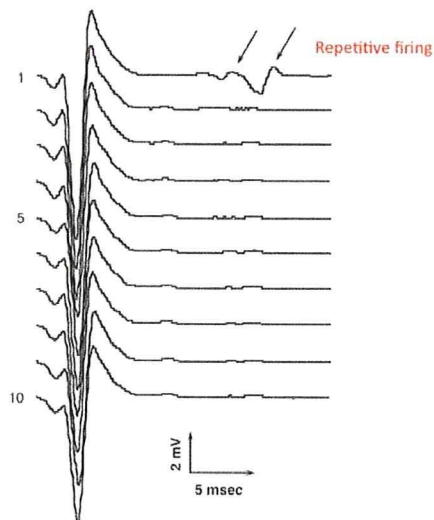


図23 Neostigmine投与に検出された異常筋電図の変化(repetitive firing).

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、AChE 欠損で発症する先天性筋無力症の患者で検出される異常筋電図も検出した (図 24). (参考文献; Bestue-Cardiel et al, Neurology, 2005)

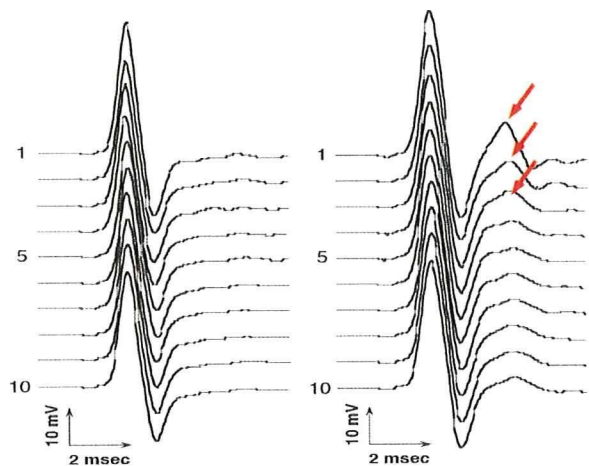


図 24 Neostigmine 投与後に検出された異常筋電図 (Repetitive Compound Muscle Action Potential(CMAP))
Repetitive CMAP も漸減反応を示すのが特徴.
左: 投与前、右: 投与後

MuSK-MG 患者でも、この異常波形が検出される可能性がある。

次に、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 は投与した MuSK-MG マウスの全てにおいて(5 匹)、筋電図を顕著に改善することを発見した(表 3, 図 25).

	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%

表 3 3,4-DAPによる筋活動電位の減衰率の改善度

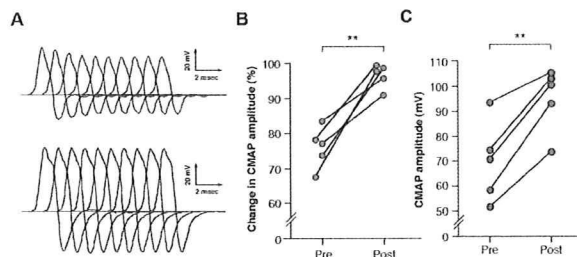


図 25 3,4-DAP は MuSK-MG モデルマウスの筋電図 (3Hz) 変化を顕著に改善する。
A. 投与前 (上) と投与後 (下) の筋電図. 漸減反応を改善するだけでなく CMAP の振幅も増大する. B. 3,4-DAP を投与した 5 匹全ての CMAP 漸減反応を改善する. C. 同様に CMAP の振幅の増大が顕著である.

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。

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 26)。

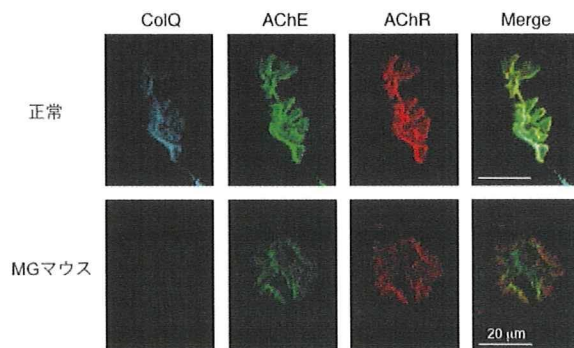


図 26 抗MusK抗体MGではAChR凝集に加えて、AChEとコラーゲンの発現が顕著に減少している。

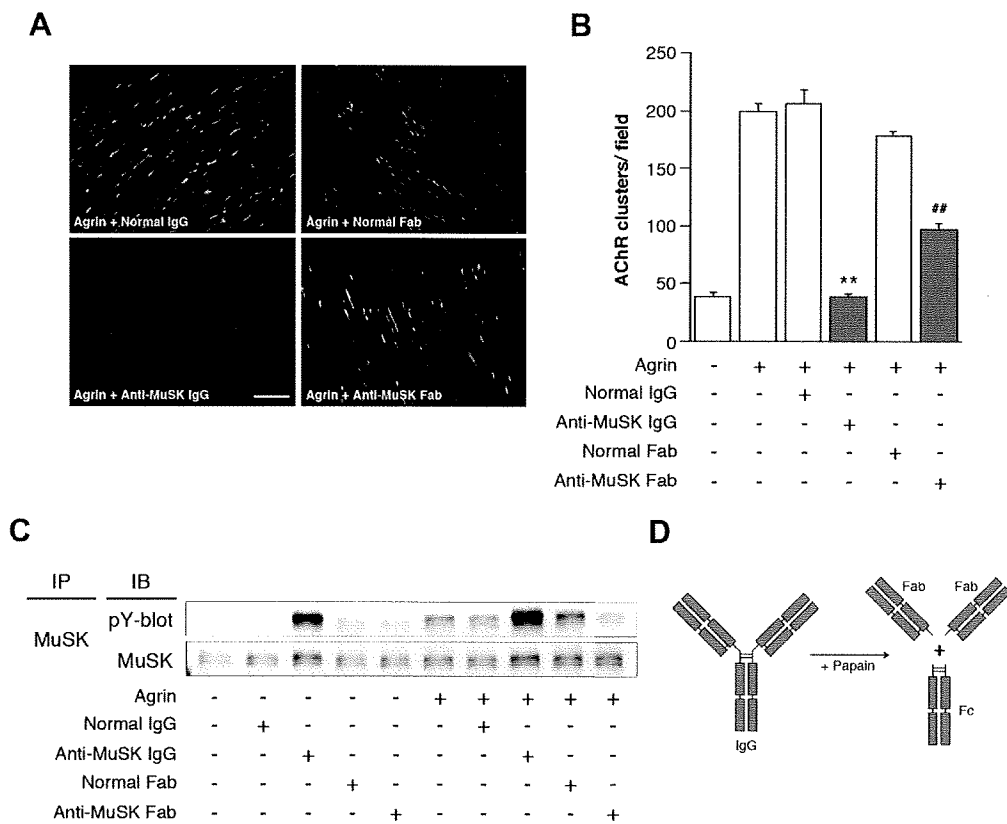


図 27. 補体欠損マウスの MuSK 抗体 (IgG およびその Fab) は agrin による AChR 凝集を抑制する。

培養 C2C12 筋細胞に agrin と共に MuSK 抗体 IgG あるいは MuSK 抗体 Fab を加えた。対照コントロールとして未免疫マウス由来 IgG とその Fab を使う。

A ; C2C12 細胞の AChR 凝集, **B** ; 定量結果, **C** ; MuSK 抗体は単独で agrin と同様に MuSK のチロシンリン酸化 (pY) を誘導する。MuSK 抗体 Fab は単独では MuSK のチロシンリン酸化を誘導しないし、agrin による MuSK の活性化を抑制する。**D** ; パパイン切断による MuSK 抗体 Fab 作成。

補体欠損マウスの MuSK 抗体の IgG をパパインで処理して抗原結合部位が一価のみ有する Fab フラグメントを作成して(図 27D)、もとの二価の IgG と同様に agrin 添加による C2C12 細胞の AChR 凝集誘導を抑制することがわかった (図 27A, B)。MuSK 抗体はウサギモデルと同様に、神経筋シナプスの AChR を減少させ筋麻痺を発症させるにもかかわらず、MuSK 蛋白のチロ

シンリン酸化をむしろ誘導することがわかった(図 27C)。さらに MuSK 抗体 IgG は agrin と同様に単独で MuSK の活性化(自己チロシンリン酸化)を誘導するが、その Fab は MuSK の活性化を誘導することはできず、また agrin による MuSK 活性化も抑制することが明らかとなった (図 27C)。

5. 原因不明 MG 診断法の開発

MGがAChR抗体、MuSK抗体で発症することが明らかになったが、MG 全体の約10%にあたる原因不明のMGについてその診断法の開発を進める必要がある。我々は、Vincentらが報告した鋭敏な方法によるAChR抗体とMuSK抗体に加え、agrinの受容体でMuSKの活性化に必要な受容体蛋白であるLRP4(LDL受容体)に対する自己抗体の有無を検出するための新しいアッセイシステムの開発を行った。LRP4遺伝子の細胞内部の末端部に蛍光蛋白遺伝子(Cherry red)を付加して、293培養細胞で発現させた(図28)。同様にAChRの ϵ サブユニットに蛍光蛋白(chery red)を挿入して、 α , β , γ サブユニットとrapsyn遺伝子(CFPとの融合)を同時に293細胞に発現させた。またMuSK遺伝子の細胞内末端部位にCherry redを融合させて発現することができた。以上の方法を使って原因不明のMG患者の臨床研究を進めるために、倫理委員会への申請を行っている。

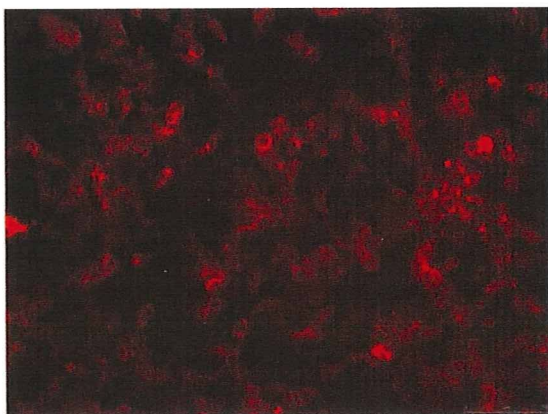


図28 LRP4遺伝子の細胞内末端部にCherry red蛋白を付加した遺伝子を293細胞で発現させた。

D. 考察

独自に開発したMuSK-MGの診断法を使って、我が国の患者を対象とした臨床研究を行った。さらに画期的な疾患モデルの開発に成功した。そし

て、MuSK-MGの発病メカニズムと治療法の開発を進めることができた。特に、以下の点においてMusk-MGの疾患動物モデルは画期的な成果である。

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できる。

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。MuSK抗体陽性の重症筋無力症患者血清に存在する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。この疾患モデルを使ってMuSK-MG患者の原因解明が可能となった。

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。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29)。また透過型電子顕微鏡で、発症した疾患動物(ウサギと補体欠損マウスの両