

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：87302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08636

研究課題名(和文) 抗Lrp4抗体陽性運動ニューロン障害の臨床像および分子病態の解明

研究課題名(英文) Clinical features and molecular pathology of anti-Lrp4 antibody-positive motor neuron disorders

研究代表者

樋口 理 (Higuchi, Osamu)

独立行政法人国立病院機構長崎川棚医療センター(臨床研究部)・その他の研究科・研究員(移行)

研究者番号：50361720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患の1つである筋萎縮性側索硬化症(ALS)の患者血清中のLRP4抗体の探索を行った結果、40-50%の症例でLRP4抗体が陽性という結果を得た。マウス筋管細胞においてagrinが誘導するAChR誘導活性に対する阻害効果を調べたところ、LRP4抗体陽性重症筋無力症患者血清はその阻害効果を有していたが、LRP4抗体陽性ALS患者血清にはそれを認めなかった。今回の結果は疾患特異的なLRP4抗体のエピトープの違いを反映するものと推測される。ALS患者の血中に認められるLRP4抗体は将来的にALS発症や治療応答性を追跡可能なサロゲートマーカーとしての役割が期待できるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：As a result of searching for LRP4 antibody in patient serum of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) which is one of neurodegenerative diseases, LRP4 antibody was positive in 40-50% of cases. The inhibitory effect on agrin-induced AChR clustering activity in mouse myotube cells was examined. As a result, the serum of patients with LRP4 antibody positive myasthenia gravis had its inhibitory effect, but in sera of LRP4 antibody-positive ALS patients it did not find it. It is speculated that the results of this study reflect the difference in the epitope of the disease-specific LRP4 antibody. The LRP4 antibody found in the blood of ALS patients may be expected to play a role as a surrogate marker capable of tracking ALS onset and therapeutic responsiveness in the future.

研究分野：神経免疫学

キーワード：autoantobody ALS neuroimmunology surrogatemarker epitope

## 1. 研究開始当初の背景

申請者・樋口は 2011 年に免疫性神経疾患の 1 つである重症筋無力症 (MG) の第 3 の原因自己抗体として、低密度リポ蛋白質レセプター関連蛋白質 4 (Lrp4) に対する自己抗体・抗 Lrp4 抗体を発見した (Higuchi et al. Ann Neurol. 2011)。当該抗体は神経筋接合部の筋側に局在する膜貫通分子 Lrp4 を標的とし、アセチルコリンを介した神経筋伝達を阻害することで MG の発症に関与すると考えられている。しかし、Lrp4 は脳を筆頭とした中枢・末梢神経でも非常に高い発現レベルを示すため、抗 Lrp4 抗体陽性 MG (Lrp4 MG) 患者にて中枢神経系の異常所見が報告されていない点が謎とされている (図 2)。2012 年以降に当院を拠点とした MG 関連自己抗体検査サービスを開始した結果、我々は Lrp4 MG 症例に特異な臨床所見として、深部腱反射 (DTR) の異常を見出した。一般的に MG では DTR は正常かやや亢進するとされているが、我々が同定した抗 Lrp4 抗体型 MG の 9 症例中 4 例 (44.4%) が DTR の減弱・消失を示しており、血液神経関門の庇護下にない下位運動ニューロンの末梢神経異常を示唆する所見として我々は注目している (樋口ら、未発表)。しかし、これら症例は MG の臨床・検査所見が認められるため、運動ニューロン異常の実態を追求するには至っていないというのが現状である。他方で、2012 年にギリシャの研究グループが孤発性筋萎縮側索硬化症 (sporadic amyotrophic lateral sclerosis: sALS) と診断された症例のおよそ 20% 程度の血清中に抗 Lrp4 抗体が潜在することを報告した (Tzartos et al. Ann. Clin. Transl. Neurol. 2012)。彼らの報告の中で注目すべき点は 2 つある。1 つは、抗 Lrp4 抗体陽性 sALS は ALS 診断基準に照合するといずれもが definite ALS ではなく、probable もしくは possible ALS であった点であり、抗 Lrp4 抗体陽性 ALS 症例がその他の鑑別疾患である MMN / CIDP や MG の臨床的サブタイプである可能性を想起させる点で非常に興味深い。2 つめは、血清のみならず髄液中にも抗 Lrp4 抗体が検出されている点であり、抗 Lrp4 抗体が髄腔内に分布する脳神経系 Lrp4 を標的とする環境が一部の ALS 患者の体内に実在することを示唆している。

## 2. 研究の目的

我々は「血液脳関門 (BBB) や血液神経関門 (BNB) が破綻し、髄液中に侵入、あるいは、髄腔内で抗 Lrp4 が産生されると、脳神経系に分布する Lrp4 が抗 Lrp4 抗体の標的となり、運動ニューロン障害を引き起こす」という仮説の着想に至った。我々はパイロット研究として、sALS を対象として抗 Lrp4 抗体の探索を実施した。その結果、47 例中 4 例の陽性 (8.5%) が認められた。さらに、sALS 以外にも多巣性運動ニューロパチー (MMN)、慢性炎症性脱髄性多発根神経炎 (CIDP) といった代表的な運動ニューロン障害が鑑別に挙がる運動ニュー

ロン障害例を対象とした抗 Lrp4 抗体検査の結果、11 例中 4 例で陽性 (陽性率 36.3%) と判明した。特筆すべきは、臨床的には ALS が鑑別に挙がる症例ではあるが、免疫療法の効果が認められたケースに抗 Lrp4 抗体陽性例が多く検出される点は上述した我々の仮説を支持する結果とも考えられる (樋口ら、未発表)。そこで、本研究では、我々の仮説を実証するエビデンスのさらなる集積を図るため、「抗 Lrp4 抗体陽性運動ニューロン障害の臨床像解析」と「抗 Lrp4 抗体介在性運動ニューロン障害モデル動物の作出・解析」を二本の柱に据え、臨床と基礎の両面から取り組む。

## 3. 研究の方法

sALS を代表とする神経変性疾患と免疫性神経疾患の範疇とされる MMN や CIDP を含む多様な運動ニューロン障害の生体試料と臨床情報を大規模に集積する。独自の自己抗体解析技術・LIPS を駆使し、抗 Lrp4 抗体検査を実施する。臨床情報の精緻な分析により、抗 Lrp4 抗体陽性運動ニューロン障害の臨床像を分析する。運動ニューロンを標的とした抗 Lrp4 抗体の作用機序を想定した動物実験モデルを作出・解析することで、抗 Lrp4 抗体陽性運動ニューロン障害の分子病態を解明する。

## 4. 研究成果

ALS 患者由来の血清中の LRP4 抗体の出現頻度を解析した結果、50% 弱で陽性という結果となった。集積した臨床情報を精査した結果、家族性と孤発性に関わらず、LRP4 抗体が検出された。また、ALS の臨床定義からは除外される下位運動ニューロン徴候のみ、あるいは、上位運動ニューロン徴候のみの MND 疑い例においても LRP4 抗体が検出された。ALS の場合、その症状や臨床所見から possible, probable, definite と主に 3 つのカテゴリーに分類されるが、そのいずれにおいても LRP4 抗体は検出された。興味深いことに、LRP4 抗体は ALS のみならず、パーキンソン病、多系統萎縮症といった神経変性疾患においても 20% 程度の頻度で観察された。さらに、LRP4 抗体陽性 MG 患者血清が、agrin 誘導性の AChR 凝集阻害活性を示したのに対して、LRP4 抗体陽性 ALS 患者血清には同阻害活性は認めなかった。この結果は、MG と ALS (その他の非 MG 疾患も同様) で産生される LRP4 抗体とでは、LRP4 に関するエピトープに差異があることを示唆した。おそらく、LRP4 細胞外領域が 1500 程度のアミノ酸から構成されているため、複数のエピトープが存在し、LRP4 抗体の生物活性の多様性に影響をもたらしている可能性が考えられる。最近では、ALS のような神経変性疾患でも神経炎症や全身性炎症が起きているという認識が確立してきており、LRP4 抗体はそういった炎症の副産物の 1 つである可能性が考えられる。今後は、ALS を含めた神経変性疾患の病勢や治療応答性の追跡

に LRP4 抗体をサロゲートマーカーとして利用可能かどうかを見極める必要がると考える。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1) Isolated bilateral abducens paralysis without ptosis in an anti-LDL receptor-related protein 4 antibody-positive patient treated effectively with steroid-pulse therapy.

Kazuhiro Ishii, Zenshi Miyake, Hidenori Matsuo, Osamu Higuchi, Akira Tamaoka.

Journal of the Neurological Sciences  
IF=2.295 accepted 2018, 4月

2) Double-seropositive myasthenia gravis with acetylcholine receptor and low-density lipoprotein receptor-related protein 4 antibodies associated with invasive thymoma

Hidehiro Ishikawa <sup>a,\*</sup>, Akira Taniguchi <sup>a</sup>, Yuichiro Ii <sup>a</sup>, Osamu Higuchi <sup>b</sup>, Hidenori Matsuo <sup>c</sup>, Shunya Nakane <sup>d</sup>, Masaru Asahi <sup>a</sup>, Atsushi Niwa <sup>a</sup>, Hidekazu Tomimoto <sup>a</sup>

Neuromuscular Disorders (IF\_2015: 3.107)  
2017; 27: 914-7.

3) Double Seronegative Myasthenia Gravis with Anti-LRP4 Antibodies Presenting with Dropped Head and Acute Respiratory Insufficiency.

Beck G, Yabumoto T, Baba K, Sasaki T, Higuchi O, Matsuo H, Mochizuki H.

Intern Med. 2016;55(22):3361-3363.  
(IF\_2015: 0.904)

4) Myasthenic symptoms in anti-low-density lipoprotein receptor-related protein 4 antibody-seropositive amyotrophic lateral sclerosis: two case reports.

Takahashi H, Noto YI, Makita N, Kushimura-Okada Y, Ishii R, Tanaka A, Ohara T, Nakane S, Higuchi O, Nakagawa M, Mizuno T

BMC neurology 2016; 16: 229. (IF\_2015: 1.961)

5) Ocular myasthenia gravis with anti-MuSK antibodies: a case report and review of literature. (Case Report)

Masaki Kamada<sup>1</sup>, Shunya Nakane<sup>2,3</sup>, Yuishin Izumi<sup>1</sup>, Osamu Higuchi<sup>2</sup>, Waka Sakai<sup>1,3</sup>, Naoko Matsui<sup>1</sup>, Hidenori Matsuo<sup>3</sup>, and Ryuji Kaji<sup>1</sup>

Clin. Exp. Neuroimmunol. (IF\_2014/2015: -)  
2016; 7: 168-73.

6) 抗 LRP4 抗体重症筋無力症

中根俊成・樋口理・高松孝太郎・松尾秀徳・安東由喜雄

臨床神経生理学 46 巻, 95-100, 2018

7) Antibody Update 2018: 重症筋無力症と自己抗体～重症筋無力症の分子標的治療薬開発に向けて

樋口理

Brain and Nerv. Vol.70, 419-426.

8) 重症筋無力症と自己抗体

樋口理

Annual Review 神経 2016 213-7. 中外医学社

〔学会発表〕(計 22 件)

1) LRP4 抗体陽性患者 5 名の報告

尾上祐行, 乗峯苑子, 小川知宏, 沼畑恭子, 吉澤健太, 赤岩靖久, 横田隆子, 樋口理, 松尾秀徳, 宮本智之

日本内科学会雑誌 107 263 2018 年 2 月

2) VGCC 抗体/抗 LRP4 抗体陽性 Myasthenia gravis Lambert-Eaton overlap syndrome の検討  
高真守, 小上修平, 中谷公美子, 神崎和紀, 樋口理, 松尾秀徳, 本村政勝, 本村政勝, 岩橋吉史, 村田晋一, 伊東秀文  
日本神経学会学術大会プログラム・抄録集 59th 445 2018 年

3) ペムプロリズマブ投与後に重症筋無力症・筋炎を併発した一例  
野田智子, 蔭山遥, 松本美紀, 田村拓也, 伊藤宏樹, 福島曜, 野田成哉, 室慶直, 樋口理, 松尾秀徳, 鈴木重明  
日本神経学会学術大会プログラム・抄録集 59th 415 2018 年

4) 抗 LRP4 抗体陽性重症筋無力症患者の臨床的特徴  
尾上祐行, 乗峯苑子, 小川知宏, 沼畑恭子, 吉澤健太, 横田隆子, 滝口義晃, 赤岩靖久, 樋口理, 松尾秀徳, 宮本智之  
日本神経学会学術大会プログラム・抄録集 59th 474 2018 年

5) その後の LRP4 抗体陽性筋無力症を考える  
中根俊成, 樋口理, 安東由喜雄  
臨床神経生理学 45(5) 326 2017 年 10 月

6) Agrin シグナル阻害抗体群が潜在する非古典的重症筋無力症  
樋口理  
Neuroimmunology 22(1) 69 2017 年

7) repetitive CMAP を認め, 神経筋接合部の微細構造を解析し得た抗 LRP4 抗体陽性重症筋無力症の一例  
光武明彦, 平賢一郎, 荒川晶, 佐藤達哉, 勝又淳子, 関大成, 前川理沙, 日出山拓

人, 石浦浩之, 内尾直裕, 清水潤, 樋口理, 松尾秀徳, 椎尾康  
Neuroimmunology 22(1) 156 2017 年

8) Luciferase immunoprecipitation systems を用いた抗 Muscle specific receptor tyrosin kinase 抗体測定の確立  
前田泰宏, 前田泰宏, 樋口理, 中根俊成, 松尾秀徳, 松尾秀徳  
Neuroimmunology 22(1) 94 2017 年

9) 反復刺激試験で repetitive CMAP を認め, 先天性筋無力症と鑑別を要した抗 LRP4 抗体陽性重症筋無力症の 1 例  
光武明彦, 荒川晶, 佐藤達哉, 勝又淳子, 関大成, 前川理沙, 日出山拓人, 石浦浩之, 樋口理, 椎尾康  
日本内科学会関東支部関東地方会 634th 42 2017 年

10) 筋炎に好発する ER 型 LRP4 抗体  
樋口理, 中根俊成, 清水潤, 松尾秀徳  
日本臨床免疫学会会誌 39(4) 417 2016 年 8 月

11) 重症筋無力症における抗 MuSK 抗体および抗 Lrp4 抗体と胸腺異常  
松尾秀徳, 樋口理, 中根俊成, 中根俊成, 前田泰宏, 成田智子, 酒井和香  
日本胸腺研究会プログラム・抄録集 35th 52 2016 年 1 月

12) エピトープ特性が異なる 2 つの LRP4 抗体の同定  
樋口理, 中根俊成, 前田泰宏, 松尾秀徳  
Neuroimmunology 21(1) 130 2016 年

13) 当院の筋萎縮性側索硬化症患者における抗 LRP4 抗体の有無での臨床像の検討第 2 報  
前田泰宏, 前田泰宏, 樋口理, 成田智子, 成田智子, 権藤雄一郎, 権藤雄一郎, 永

石彰子, 永石彰子, 福留隆泰, 福留隆泰,  
松尾秀徳, 松尾秀徳

Neuroimmunology 21(1) 136 2016年

14) 抗 MuSK 抗体陽性の眼筋型重症筋無力症

鎌田正紀, 中根俊成, 松井尚子, 樋口理,  
酒井和香, 藤田浩司, 和泉唯信, 松尾秀徳,  
梶龍児

Neuroimmunology 21(1) 172 2016年

15) LRP4 抗体の臨床および病態的意義  
樋口理

Neuroimmunology 21(1) 73 2016年

16) 抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症および抗 LRP4 抗体陽性重症筋無力症における胸腺異常

松尾秀徳, 樋口理, 中根俊成, 前田泰宏,  
酒井和香, 成田智子

日本神経学会学術大会プログラム・抄録集 57th 424 2016年

17) 節萎縮性側索硬化症患者における抗 LRP4 抗体とその臨床像の検討

前田泰宏, 前田泰宏, 樋口理, 酒井和香,  
成田智子, 権藤雄一郎, 永石彰子, 福留隆泰,  
松尾秀徳, 松尾秀徳

日本神経学会学術大会プログラム・抄録集 57th 656 2016年

18) 当院における抗 LRP4 抗体陽性重症筋無力症の臨床的特徴

高松孝太郎, 中根俊成, 山川詩織, 増田曜章,  
三隅洋平, 小阪崇幸, 軸丸美香, 植田光晴,  
中島誠, 石崎雅俊, 樋口理, 安東由喜雄

日本神経学会学術大会プログラム・抄録集 57th 579 2016年

19) LRP4 抗体関連症候群

樋口理, 松尾秀徳

日本神経学会学術大会プログラム・抄録集 57th 208 2016年

20) 抗 AChR 抗体と抗 LRP4 抗体の二重陽性を呈した浸潤性胸腺腫合併重症筋無力症 2 例の検討

石川英洋, 谷口彰, 伊井裕一郎, 樋口理,  
松尾秀徳, 中根俊成, 朝日理, 丹羽篤, 富本秀和

日本神経学会学術大会プログラム・抄録集 57th 579 2016年

21) 網膜剥離術後に眼瞼下垂と複視が出現した抗 Lrp4 抗体陽性症例の検討

大井長和, 林紗葵, 黒川歳雄, 小林ルミ,  
上田直子, 三村治, 樋口理

神経眼科 32 61 2015年 10月

22) 抗 AChR 抗体, 抗 Lrp4 抗体陽性であった運動ニューロン疾患(MND)と考えた 1 例

前田泰宏, 樋口理, 酒井和香, 権藤雄一郎,  
永石彰子, 福留隆泰, 中根俊成, 松尾秀徳

神経治療学 32(5) 754 2015年 9月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年 :

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6．研究組織  
(1)研究代表者  
樋口理（50361720）

研究者番号：

(2)研究分担者  
中根俊成（70398022）

研究者番号：

(3)研究協力者  
瀬筒秀樹（70342805）