

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 C  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590998  
 研究課題名（和文） 重症筋無力症の発症機序：実験的抗 MuSK 抗体陽性動物モデルの検討  
 研究課題名（英文） Pathomechanism of myasthenia gravis using experimental autoimmune MuSK antibody-positive animal model

研究代表者：本村 政勝 (MOTOMURA MASAKATSU)  
 長崎大学・大学院医歯薬学統合研究科・講師  
 研究者番号：70244093

研究成果の概要：今回の実験では、ラットを用いており、抗 MuSK 抗体のサブクラスを決定するためのモノクロナル抗体が無く、抗 MuSK 抗体のサブクラスを解析することは、技術的に困難であった。免疫動物実験では、MuSK 免疫ラットでは、明らかな筋力低下症状ははっきりしなかった。抗 MuSK 抗体価は、コントロール免疫群と比較して、有意に上昇した。抗 MuSK 抗体陽性ラットの四肢筋の神経筋接合部では、運動終板の AChR・MuSK 量が共に減少しており、運動終板の形態学的異常が高頻度に認められた。また、補体の沈着を証明することが出来なかった。電子顕微鏡による微細構造で、運動終板破壊像はみられなかった。以上の結果は、このモデルの抗 MuSK 抗体は運動終板に対して病原性を示しており、抗 MuSK 抗体陽性 MG の発症機序を考慮する上で重要である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：(1)筋特異的チロシンキナーゼ (MuSK) (2)アセチルコリン受容体 (AChR)  
 (3)Dok-7 (4)重症筋無力症 (5)運動終板 (6)ラット  
 (7)電子顕微鏡 (8)自己抗体

## 1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) は、「神経筋接合部の後シナプス膜上にある標的抗原に対する自己抗体のために神経筋接合部の刺激伝導が障害される自己免疫疾患

である」と定義される。今日、MG は自己抗体の種類によって、(1)アセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor, AChR) 抗体陽性 MG、(2)筋特異的チロシンキナーゼ (muscle-specific tyrosine kinase, MuSK)

抗体陽性 MG、そして、前記の抗体が検出されない double seronegative MG に分類される。1970 年代に MG の原因物質は抗 AChR 抗体であると結論されたが、2001 年に抗 MuSK 抗体が見つけだされ、第 2 の原因抗体と考えられている。我々は、これまでに、本邦の MuSK 抗体陽性の seronegative MG の臨床像を明らかにするとともに、神経筋接合部生検の診断的意義について検討した。要約すると、抗 MuSK 抗体陽性 MG 患者では、胸腺腫を合併せず、クリーゼ・筋萎縮を起こしやすく、自己抗体のサブクラスが異なるが特徴である。

平成 17 年に開始された MuSK 動物モデルの本研究は、標的抗原の病原性を形態学的に証明することは出来たが、その病態がヒトの MG のそれと同じかどうかの分析が不十分であった。具体的には、動物で免疫後に産生された抗 MuSK 抗体の作用機序が補体介在性であるのか、あるいは、自己抗体のサブクラスは何かの検討が不十分であった。2006 年に、MuSK 動物モデルの論文が 2 つ出ているが、それらの内容においても、抗 MuSK 抗体のサブクラス解析が為されていない。その解析を今回の主たる目的とし、更に、MuSK 抗原で抗 MuSK 抗体を吸収した免疫グロブリンを動物に投与してその効果をみる passive transfer 実験を企画した。この実験が成功すれば、ヒトの抗 MuSK 抗体の病原性はさらに確実なものとなる。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、「抗 MuSK 抗体がどのような病態機序で、MG 症状を引き起こしているか？」の学問的な問いに答えることである。そのためには、抗 MuSK 抗体の疾患誘導動物モデルを作成するだけでなく、その病態を詳細に解析し、MG 患者の病態と詳細に比較検討する必要がある。具体的には、先ず、動物の抗 MuSK 抗体のサブクラス解析を行い、この問題に決着をつけたい。その後は、MuSK 蛋白のどの部分 (signal sequence, Ig-like domain, cysteine-rich domain, and kinase domain) に対する抗体が、病原性を有するかの研究を継続していきたいと考えている。

## 3. 研究の方法

第一段階は、可溶化マウス MuSK 蛋白の調整し、その抗原を抗 MuSK 抗体陽性患者の自己抗体が認識することは、既に確認した。その

可溶化 MuSK 抗原を大量培養し、MuSK 蛋白量として、数 mg 単位まで精製する必要がある。次に、第 2 段階の動物実験に移行する。可溶化 MuSK 蛋白 (50-200  $\mu$ g) をマウス、あるいは、ラットに複数回免疫後に、採血を行う。動物の血清中の抗 MuSK 抗体価が上昇した所で、微小電極を用いた電気生理学的検討、神経筋接合部生検および電子顕微鏡による観察で MG の発症の有無について検討する。以下に具体的な方法を述べる。

(1) 溶性マウス MuSK 蛋白の調整：哺乳動物細胞における可溶性マウス MuSK (soluble mouse MuSK; smMuSK) -6xHis 発現ベクターの構築は既に完了している。分泌性組換え体蛋白質である smMuSK-6xHis は、野生型マウス MuSK の細胞膜貫通領域及び細胞内領域を全て欠損しており、代わりに 6 個のヒスチジン残基を C 末端に付加した構造を持つ。哺乳動物細胞における高い発現量を期待して、ニワトリ  $\beta$  アクチンのプロモーターの制御下に smMuSK-6xHis の cDNA を配置した。smMuSK-6xHis 組換え蛋白質の精製の手順は以下の通りである。I) まず、smMuSK-6xHis 発現ベクターをヒト胚腎臓由来細胞株 HEK293 に導入する。遺伝子導入法にはリン酸カルシウム法を利用する。II) 遺伝子導入から約 3 日後に、培養上清 (無血清合成培地・Opti-MEM; GIBCO-BRL 社) を回収する。III) 回収した培養上清を適当な緩衝液に対して透析した後、6xHis に親和性を示すニッケルセファロースを利用したアフィニティー精製を行う。IV) 得られた溶出画分に対して、さらにゲルろ過精製を行い、高純度の smMuSK-6xHis を回収する。現在までに、100 ml の培養上清中に約 1 mg の smMuSK-6xHis の分泌を確認しており、当該研究課題に必要十分量 (数 mg) の組換え体蛋白質を得る算段は既に整っている。抗 MuSK 抗体 (R&D 社) と、現在我々が行っている抗 MuSK 抗体測定法で、血清での吸収試験を行う。

## (2) 免疫動物実験

動物実験は、長崎大学先導生命科学研究所支援センター動物実験施設内で行う。今回の研究に関して、長崎大学動物実験委員会 (IACUC) の許可を得て行った。実際の具体的方法は以下に述べる。

1) 可溶化 MuSK 蛋白の免疫：雌のロイスラットおよびマウスをエーテル吸入によって

麻酔し、完全フロイント・アジュバントで調整した可溶性 MuSK 蛋白 (50-200  $\mu$ g) を皮内に免疫する。同時に百日咳菌を皮内投与する。コントロールとしては、6 個のヒスチジン残基を同じ方法で免疫する。

2) 臨床評価: 免疫後、一週間おきに、体重・筋力などを測定する。

3) 抗 MuSK 抗体測定: 一ヶ月に動物の尾より採血し、以下に述べる方法で抗 MuSK 抗体価を測定する。

4) 抗 MuSK 抗体が陽性になっていることを確認後、微小電極を用いた電気生理学評価へ、そして、動物の神経筋接合部生検を行う。

5) 実験終了後は、安楽死させる。

#### (3) 抗 MuSK 抗体測定

抗 MuSK 抗体測定法は、COS7 由来の rat recombinant MuSK を 125I で標識し、患者血清を加え、最後に抗免疫グロブリン抗体を入れ、免疫沈降法にてその放射活性を測定する。抗 MuSK 抗体価はラットおよびマウス血清 5  $\mu$ l が沈澱させうる特異結合量を nmol/l で表現する。

#### (4) 微小電極を用いた電気生理学評価

動物の横隔膜標本を用いて、従来の方法にて、微小終板電位 (MEPP) の計測を行う。これまでに、抗 MuSK 抗体陽性患者 IgG を用いて、passive transfer 実験を行っているが、これは抗 AChR 抗体と同じように、MEPP が有意に低下し、疾患モデルが成立する。

#### (5) 神経筋接合部生検および電子顕微鏡による観察

神経筋接合部生検は、動物をエーテル吸入によって麻酔し、皮膚切開し目的の筋肉を露出し、起止から停止部まで切断し、創部は縫合・消毒する。上肢では、FDE 筋、下肢では EDL 筋を用いる。凍結切片で免疫染色と行い、免疫グロブリン・補体の沈着の有無、そして、運動終板のアセチルコリン受容体の定量を行う。また、グルタル固定で電子顕微鏡による観察を行う。今回は、抗 MuSK 抗体の機序を解明するために、以下の免疫染色を行う。免疫組織染色: 1) peroxidase-labeled  $\alpha$ -bungarotoxin, 2) peroxidase-protein A, 3) anti-complement 3, GARa/C3/PO [Nordic] 免疫蛍光染色: 1) Alexa594- $\alpha$ -bungarotoxin, anti-MuSK antibody (R&D, goat)+Alexa488-anti-goat IgG (donkey), 2) anti-synaptophysin (monoclonal) antibody+Alexa594-anti-mouse IgG antibody, 3) anti-complemen

t3, GARa/C3c/FITC [Nordic]

以上の染色により、アセチルコリン受容体、MuSK、免疫グロブリン、そして、補体を染色して、運動終板で障害を起こしている自己抗体の作用機序を検討する。また、今回は、MuSK を活性化することで重要な蛋白である Dok-7 を免疫染色して、その病態を深く検討する。

(6) MuSK 抗原で抗 MuSK 抗体を吸収した免疫グロブリンを用いた passive transfer 実験

大量の MuSK 抗原をリガンドとして、アフィニティーカラムを作製する。具体的には、HiTrap Columns (GEヘルスケアバイオサイエンス社) を用いて、MuSK 蛋白をカラムに固定化する。抗 MuSK 抗体陽性患者の血清及び血漿から精製した免疫グロブリン分画を、その MuSK カラムに流して、抗 MuSK 抗体を吸着させる。その後、前述の (3) 抗 MuSK 抗体測定で、抗 MuSK 抗体が吸収されたことを確認する。今回のこの実験のコントロールとしては、抗 MuSK 抗体を吸着しないトリプトファン吸着カラム、イムソーバ TR350 (旭メディカル) を用いる。その後、(4) 微小電極を用いた電気生理学評価を行う。この実験では、既に抗 MuSK 抗体陽性の免疫グロブリンでは、電気生理学的に疾患モデルが成立するので、抗 MuSK 抗体を吸収させた免疫グロブリン分画で電気生理学的に異常が起きなければ、抗 MuSK 抗体の病原性を直接証明することになる。

#### 4. 研究成果

その結果を以下に述べる。

(1) ラット抗 MuSK 抗体のサブクラス解析: 今回の実験では、ラットを用いており、抗 MuSK 抗体のサブクラスを決定するためにモノクロナル抗体が無く、技術的に困難であった。

#### (2) 免疫動物実験:

1) MuSK 免疫ラット (n=6) では、コントロール群 (n=6) と比較すると体重減少が認められたが、明らかな筋力低下症状ははっきりしなかった。

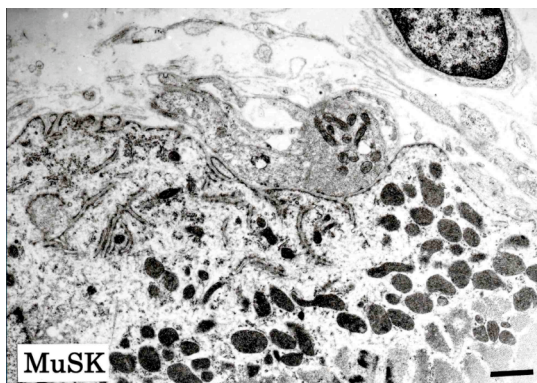
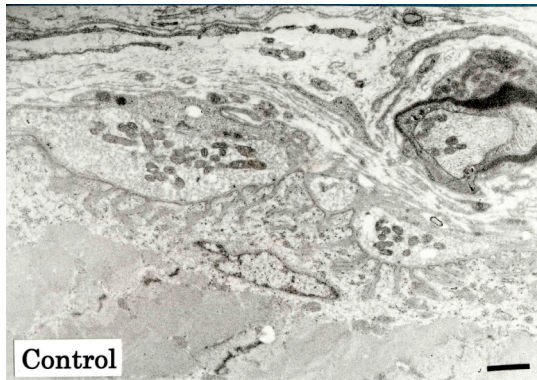
2) 抗 MuSK 抗体価は、コントロール免疫群と比較して、有意に上昇した。一方、抗 AChR 抗体価は、両群間で差はなかった。

3) 抗 MuSK 抗体陽性ラットの四肢筋の神経筋接合部では、運動終板の AChR・MuSK 量が共に減少しており、運動終板の形態学的異常

が高頻度に認められた。また、補体の沈着を証明することが出来なかった。

4) 電気生理学的には、MuSK免疫ラットでは control と比較して、横隔膜運動終板から記録された MEPP 振幅および quantal content に差が無かった。

5) 電子顕微鏡による微細構造で、運動終板破壊像はみられなかった。さらには、コントロールと比較しても、明らかな形態異常を認めなかった(図1の control と MuSK を参照)。



以上の結果は、このモデルの抗 MuSK 抗体は運動終板に対して病原性を示しており、抗 MuSK 抗体陽性 MG の発症機序を考慮する上で重要である。

#### 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 24 件)

1. Tsuda E, Imai T, Matsumura A, Hisahara S, Nonaka M, Shiraishi H, Motomura M, Shimohama S. Thyrotoxic myopathy mimicking myasthenic syndrome associated with thymic hyperplasia. Intern Med 47:445-447, 2008. 査読有

2. Nakamura H, Usa T, Motomura M, Ichikawa T, Nakao K, Kawasaki E, Tanaka M, Ishikawa K, Eguchi K. Prevalence of interrelated autoantibodies in thyroid diseases and autoimmune disorders. J Endocrinol Invest 31:861-865, 2008. 査読有

3. Nakamura M, Yabe I, Sato K, Nakano F, Yaguchi H, Tsuji S, Shiraishi H, Yoneda M, Tanaka K, Motomura M, Sasaki H. Transient subacute cerebellar ataxia in a patient with Lambert-Eaton myasthenic syndrome after intracranial aneurysm surgery. Clin Neurol Neurosurg 11:480-483, 2008. 査読有

4. 本村政勝, 福田 卓, 吉村俊朗, 辻畑光宏. レセプターへの自己免疫からみた神経筋接合部障害: 重症筋無力症をモデルとして. MSD 34:22-25, 2008. 査読無

5. 本村政勝. 特集2 重症筋無力症 重症筋無力症の病態 抗 MuSK 抗体を中心に・・・新たな抗体の発見. 脳 21 11:232-237, 2008. 査読無

6. 本村政勝. 重症筋無力症の診療に役立つ話. 医学と薬学 59:533-543, 2008. 査読無

7. 本村政勝, 福田 卓, 吉村俊朗, 辻畑光宏. 特集: 免疫性神経疾患 Update 各論 重症筋無力症 新知見 Overview: MuSK と Dok-7. 日本臨床 66:1140-1148, 2008. 査読無

8. 佐藤克也, 本村政勝. 【透析患者診療のための診断基準・重症度スコア 適切な病態評価のために】 臨床所見・徴候からのアプローチ 麻痺 臨床透析 24:814-816, 2008 査読無

9. 本村政勝. 傍腫瘍性神経症候群 診断と治療の進歩【障害部位・病態による臨床病型 神経筋接合部の障害. 日本内科学会雑誌 97:1778-1783, 2008. 査読無

10. 吉村俊朗, 本村政勝, 辻畑光宏. 【重症筋無力症-病態解明と診療の進歩】 診断 Motor point 筋生検. Clinical Neuroscience 26:1000-1001, 2008. 査読無

11. 本村政勝, 吉村俊朗, 白石裕一, 辻畑光宏. 【重症筋無力症-病態解明と診療の進歩】 病型別臨床像 抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症. Clinical Neuroscience 26:983-985, 2008. 査読無

12. 本村政勝, 石飛進吾, 徳田昌紘, 立石洋平, 福田 卓, 佐藤克也, 西浦義博, 辻野 彰, 江口勝美, 吉村俊朗. 重症筋無力症の嚥下機能評価に関する検討. 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業) 免疫性神経疾患に関する調査研究 平成19年度総括・分担研究報告書 150-151, 2008. 査読無

13. 本村政勝, 神崎昭浩, 田中義人, 好永順二, 徳田昌紘, 立石洋平, 福田 卓, 辻野 彰, 江口勝美, 吉村俊朗. 一過性新生児重症筋無力症が疑われた抗 MuSK 抗体陽性母児例. 厚生

労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）免疫性神経疾患に関する調査研究 平成19年度総括・分担研究報告書156-157, 2008. 査読無

14. 本村政勝, 徳田昌紘, 立石洋平, 福田 卓, 佐藤克也, 西浦義博, 辻野 彰, 江口勝美, 吉村俊朗. ヒト抗MuSK自己抗体がラット運動終板再生に及ぼす影響. 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）免疫性神経疾患に関する調査研究 平成19年度総括・分担研究報告書158-160, 2008. 査読無

15. 松尾秀徳, 福留隆泰, 本村政勝. 抗MuSK抗体陽性MG患者IgGの作用の検討 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）免疫性神経疾患に関する調査研究 平成19年度総括・分担研究報告書161-162, 2008. 査読無

16. 辻野 彰, 本村政勝, 江口勝美, 調 漸 治験の実施に関する研究 [酢酸リュプロレリン]. 厚生労働科学研究費補助金（治験推進研究事業）平成19年度総括・分担研究報告書 98-99, 2008. 査読無

17. Takamori M, Motomura M, Fukudome T, Yoshikawa H. Autoantibodies against M1 muscarinic acetylcholine receptor in myasthenic disorders. Eur J Neurol 14 : 1230-1235, 2007. 査読有

18. Hara K, Mashima T, Matsuda A, Tanaka K, Tomita M, Shiraishi H, Motomura M, Nishizawa M. Vocal cord paralysis in myasthenia gravis with anti-MuSK antibodies. Neurology 68 : 621-622, 2007. 査読有

19. Nakata M, Kuwabara S, Kawaguchi N, Takahashi H, Misawa S, Kanai K, Tamura N, Sawai S, Motomura M, Shiraishi H, Takamori M, Maruta T, Yoshikawa H, Hattori T. Is excitation-contraction coupling impaired in myasthenia gravis? Clin Neurophysiol 18 : 1144-1148, 2007. 査読有

20. 本村政勝, 白石裕一, 福田 卓, 江口勝美, 吉村俊朗, 福留隆泰, 松尾秀徳, 辻畑光宏. 抗MuSK抗体陽性重症筋無力症の合併症の検討. 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）免疫性神経疾患に関する調査研究 平成18年度総括・分担研究報告書 127-128, 2007. 査読無

21. 松尾秀徳, 福留隆泰, 本村政勝, 渋谷統壽. 抗MuSK抗体が神経筋伝達に及ぼす作用の検討. 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）免疫性神経疾患に関する調査研究 平成18年度総括・分担研究報告書144-145, 2007. 査読無

22. 本村政勝, 白石裕一, 吉村俊朗, 辻畑光宏. 重症筋無力症患者の病因・病態：新たな標的抗原を求めて. 実験医学 25:1740-1746, 2007.

23. 松島理明, 矢口裕章, 岸本利一郎, 辻 幸子, 矢部一郎, 佐々木秀直, 中館 恵, 白石裕一, 本村政勝. 3,4-diaminopyridine が効果的であった肺小細胞癌合併 Lambert-Eaton 筋無力症候群の1例. 日本内科学会雑誌 96 : 1709-1711, 2007. 査読無

24. 本村政勝, 白石裕一, 吉村俊朗, 辻畑光宏. [薬物と神経筋障害：診断と治療の進歩] II. 筋肉・末梢神経に影響を及ぼす薬物 3. 神経・筋接合部に影響を及ぼす薬物 日本内科学会雑誌 96 : 1604-1607, 2007. 査読無

[学会発表] (計 19件)

1. 本村政勝. Dok-7/MuSKと神経疾患：新しい筋無力症の発見. 第20回日本神経免疫学会. 2008. 04. 17-18 新潟

2. 本村政勝. 重症筋無力症の診療に役立つ話. 第49回日本神経学会総会. 2008. 05. 15-17 横浜

3. 徳田昌紘. 特異的チロシンキナーゼ (MuSK) 抗体の運動終板再生に与える影響. 第49回日本神経学会総会. 2008. 05. 15-17 横浜

4. 本村政勝. 重症筋無力症の嚥下機能評価に関する検討. 第49回日本神経学会総会. 2008. 05. 15-17 横浜

5. 畑中裕己. 首下がり主訴の double seronegative MG5 症例：板状筋 SFEMG の有用性. 第49回日本神経学会総会. 2008. 05. 15-17 横浜

6. 鈴木重明. 筋炎・心筋炎を合併する重症筋無力症の臨床像と自己抗体の検討. 第49回日本神経学会総会. 2008. 05. 15-17 横浜

7. 村井弘之. 重症筋無力症全国臨床疫学調査：第二報. 第49回日本神経学会総会. 2008. 05. 15-17 横浜

8. 佐藤克也. タクロリムス長期投与中に赤芽球癆を合併した重症筋無力症 (MG) の1例. 第182回日本神経学会九州地方会. 2008. 06. 14 鹿児島

9. 住友直文. 血漿交換療法のみが有効であった seronegative myasthenia gravis の34歳女性例. 第554回日本内科学会関東地方会. 2008. 06. 14 東京

10. 本村政勝. 症例報告：発症20年目で血清アセチルコリン受容体抗体が陽性化した眼筋型重症筋無力症の一例. 第19回日本神経免疫学会. 2007. 04. 12-13 石川

11. 本村政勝. Seronegative MG の治療. 第48回日本神経学会総会. 2007. 05. 16-18 愛知

12. 本村政勝. 重症筋無力症の合併症：抗AChR抗体陽性MGと抗MuSK抗体陽性MGの比較. 第48回日本神経学会総会. 2007. 05. 16-18 愛知

13. 吉村俊朗. ヒトMuSK抗体がラット運動終板形成に及ぼす影響. 第48回日本神経学会総会. 2007. 05. 16-18 愛知

14. 徳田昌紘. SLEに合併した抗MuSK抗体陽性

性・重症筋無力症 (MG) の一例. 第 178 回日本神経学会九州地方会. 2007. 06. 09 熊本

15. 本村政勝. 重症筋無力症性クリーゼにおける嚥下障害の検討 (症例報告) 第 25 回日本神経治療学会総会. 2007. 06. 21-22 宮城

16. 池田将樹. 首下がりと呼吸不全が目立ち、二重膜濾過血漿交換療法が有効であった抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の 1 例. 第 25 回日本神経治療学会総会. 2007. 06. 21-22 宮城

17. 内藤清香. 抗 MuSK 抗体陽性眼筋型重症筋無力症の治療経過. 第 25 回日本神経治療学会総会. 2007. 06. 21-22 宮城

18. 松本圭代. ステロイドパルス療法により播種性胸腺腫の縮小を認めた重症筋無力症の一例. 第 180 回日本神経学会九州地方会. 2007. 12. 08 大分

19. 藤田信也. 発症 14 年間の抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の臨床経過. 第 19 回日本神経免疫学会. 2007. 04. 12-13 石川

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本村政勝 (MOTOMURA MASAKATSU)  
長崎大学・大学院医歯薬学統合研究科・  
講師  
研究者番号 : 70244093

### (2) 研究分担者

江口 勝美 (EGUCHI KATUMI)  
長崎大学・大学院医歯薬学統合研究科・  
教授  
研究者番号 : 30128160

福留 隆泰 (FUKUDOME TAKAYASU)  
長崎大学・大学院医歯薬学統合研究科・  
准教授  
研究者番号 : 30380976

吉村 俊朗 (YOSHIMURA TOSHIRO)  
長崎大学・大学院医歯薬学統合研究科・  
教授  
研究者番号 : 80182822

### (3) 連携研究者