

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07766

研究課題名(和文) アセチルコリン受容体部位特異的自己抗体産生による重症筋無力症モデルマウスの作成

研究課題名(英文) Induction of a mouse model of myasthenia gravis by acetylcholine receptor site-specific autoantibody production.

研究代表者

紺野 晋吾 (KONNO, SHINGO)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：50459765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：B57BL6/Jマウスにアセチルコリン受容体 1サブユニットの主要免疫原性領域に相当するペプチドとアジュバントで免疫した。免疫に使用したペプチドおよびアセチルコリン受容体 1サブユニットの組換え蛋白質に対する抗体は、免疫8週間後のマウスの血清中に検出された。免疫の前後で、免疫グロブリンのサブタイプIgG1、IgG2b、IgG2c、IgG3がそれぞれ増加した。ヒトアセチルコリン受容体抗体を含むIgG1画分に相当するIgG2cは、有意に増加した。腓腹筋のアセチルコリン受容体 1サブユニットの減少傾向が観察されたが、臨床的な衰弱は観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

このヒト重症筋無力症の病態に関連した動物モデルの作成は医学研究において重要な意義を持つ。マウスにアセチルコリン受容体 1サブユニットに対する抗体を免疫することで、免疫グロブリンの特定のサブタイプの増加やアセチルコリン受容体 1サブユニットの減少が観察された。これはヒト重症筋無力症の病態に関連する特徴的な免疫反応を再現した可能性を示唆する。このような動物モデルの作成と研究は、ヒト重症筋無力症の病態や免疫メカニズムの解明に寄与し、新しい治療法や予防策の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：B57BL6/J mice were immunized with a peptide corresponding to the major immunogenic region of the acetylcholine receptor 1 subunit and an adjuvant. Antibodies to the peptide used for immunization and to the recombinant protein of the acetylcholine receptor 1 subunit were detected in the serum of the mice after 8 weeks of immunization. Before and after immunization, the immunoglobulin subtypes IgG1, IgG2b, IgG2c, and IgG3 were increased, respectively. IgG2c, corresponding to the IgG1 fraction containing human acetylcholine receptor antibodies, significantly increased. Although a decrease in the acetylcholine receptor alpha1 subunit in the gastrocnemius muscle was observed upon immunization, clinical weakness could be observed.

研究分野：神経内科学

キーワード：重症筋無力症 AChR subunit

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)重症筋無力症 (myasthenia gravis : MG) の長期予後は副腎皮質ステロイド剤や免疫抑制剤などの免疫療法の普及により改善し、呼吸筋麻痺などの MG に関連する死亡は全体の 2% 以下である。日常生活に支障のない程度まで改善するものが 50% 以上であるが、寛解率は依然として 20% 未満にとどまっている。このような状況のため、症状の不十分な改善や副腎皮質ステロイド剤の長期内服による副作用で生活の質が阻害されている患者もいる。近年、全身型 MG の発症早期からの複数の免疫治療の併用治療が有効とされ、神経筋接合部においてアセチルコリン受容体を傷害する補体の活性化経路の 1 分子である C5 に対するモノクローナル抗体製剤 (Eculizumab) も難治例に対して有効であると報告された。MG 病態の解明は患者血清中に抗 AChR 抗体が検出された報告に始まる。この自己抗体による補体介在性に神経筋接合部でのアセチルコリン受容体の障害が症状を引き起こす。近年、主要免疫原性領域 (main immunogenic region : MIR) が同定され、この部位への自己抗体による病態が詳細に解明されつつある。

(2)MG の神経筋接合部での病態を再現するために、実験的自己免疫性重症筋無力症 (Experimental autoimmune MG : EAMG) が古くから有用な動物モデルとされてきた。標準的な EAMG はげっ歯類にシビレエイの発光器から抽出したアセチルコリン受容体分子を Complete Freund ' s adjuvant とともに免疫をして作製される。しかし、この方法で作製した EAMG には以下の問題点がある。抗原としてシビレエイ発光器由来のアセチルコリン受容体抽出物が推奨されているが、シビレエイの入手が困難であること、抽出物の精製法が煩雑で抽出物の純度が施設ごとに異なること。Whole アセチルコリン受容体を抗原とするためアセチルコリン受容体構造すべてが障害された状態の神経筋接合部の病態の評価しか行えないことなどである。本研究はアセチルコリン受容体 1 subunit の MIR 構造に注目し、それを模した人工合成ペプチドを用いてマウスに EAMG を誘導することで既存のモデルを用いた場合よりも更にヒト MG に近い病態を再現できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

抗アセチルコリン受容体抗体は疾患特異的抗体であるが、その抗体価は必ずしも疾患重症度と比例しない。一方でアセチルコリン受容体 1 subunit の N 末端外側部にある MIR に対する自己抗体の力価は重症度と関連することが知られている。そのため、MIR に対する自己抗体により発症する動物モデルの解析は MG の治療法の進展に貢献すると考えられる。既成の MIR 抗体を投与しラットに MG を発症惹起させる受動免疫モデルでは症状が一過性で軽快し、ヒト MG にみられる慢性経過と一致しない。In vivo で MIR に対する自己抗体を産生し MG を発症するモデルを作製できれば、ヒト MG と同様の病態を再現できると考えられる。そこで我々はマウスアセチルコリン受容体 1 サブユニットの MIR に相当する a67-76 アミノ酸配列を持ち、しかも 3 次元構造にも相似性を持たせた人工合成ペプチドを考案した。これをアジュバントと共にマウスに免疫して、臨床症状と免疫動態を検証しヒト疾患モデルとしての有用性を検証する。

### 3. 研究の方法

#### 1) マウスの免疫

C57BL/6J マウス (6-7 週齢、メス) にアセチルコリンレセプター 1 subunit の MIR 部位に相当するアミノ酸配列 (ヒト a67-76 部またはシビレエイ a62-77) を原型とし、同配列内の NPD もしくは NPA 部位に三次元ループ構造を再現したペプチドで免疫をおこなった。使用したアミノ酸配列は以下の通りである。

ペプチド 1 : CKGGLRWNPDDYGGVK(Ac)KC (K<sup>76</sup> 側鎖アセチル化、Cys1-Cys18 間ジスルフィド結合)

ペプチド 2: KKCDYNLKWNPDDYGGV(K<sup>76</sup> H)KC(Cys1-Cys18 間ジスルフィド結合)、ペプチド 3 : KKCDVRLRWNPADYGGIKKC (いずれもキャリアタンパクとして KLH をコンジュゲート)

合成コポリマー (CRL-8300<sup>®</sup>) をアジュバントとし 1:1 でエマルジョンを作製し尾部基部に初回 200  $\mu$ l (ペプチド量として 100 $\mu$ g) 注射し 2、4、6 週間後 100 $\mu$ l (ペプチド量として 50 $\mu$ g) を追加投与した。

#### 2) 免疫グロブリンサブクラスの解析

各ペプチドを免疫し 8 週間後に採血を採取した。免疫前と免疫後の血清を次の解析に使用した。血清中の免疫グロブリンサブクラス解析を ELISA にて調べた。C57BL/6J は IgG2a を持たないため IgG1、IgG2b、IgG3 を定量できるものと IgG2c のみを測定する ELISA を用いた。免疫 8 週後に腓腹筋中での IgG2c の定量も ELISA にて行った。

#### 3) 免疫グロブリンとペプチドとの反応性の検討

免疫後の血清との免疫に使用したペプチドを BSA でコンジュゲートしたもの、アセチルコリン受容体 1 サブユニットの細胞外分子に相当するリコンビナント蛋白を抗原として固相化したプレートをもちいて反応性を ELISA にて調べた。

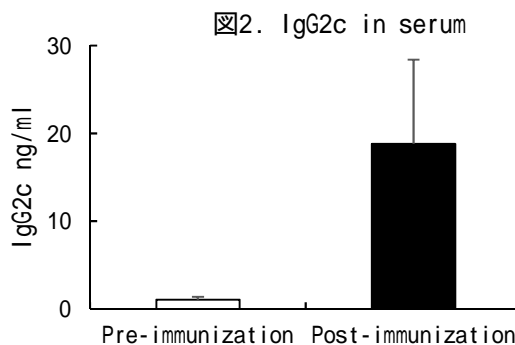
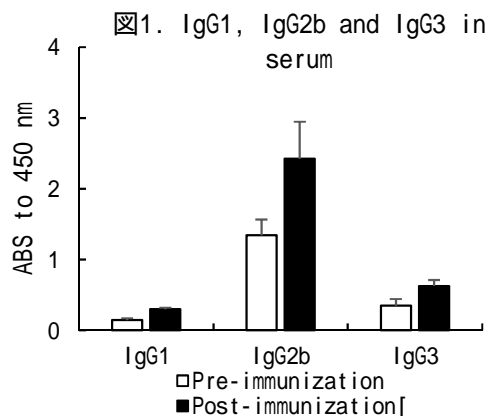
#### 4) 骨格筋中のアセチルコリン受容体 1 サブユニットの定量

免疫 8 週間後にマウスの腓腹筋を採取しホモジネートし、その上清をもちいて骨格筋中のアセ

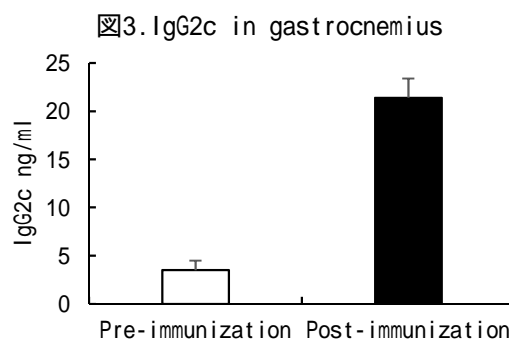
チルコリン受容体 1 サブユニットの定量について ELISA を用いて行った。非免疫群 (n=4) と免疫群 (n=4) において比較を行った。

#### 4. 研究成果

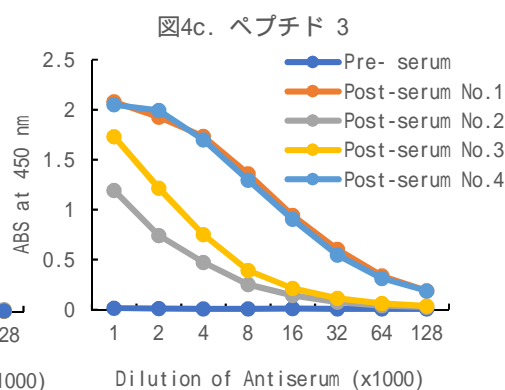
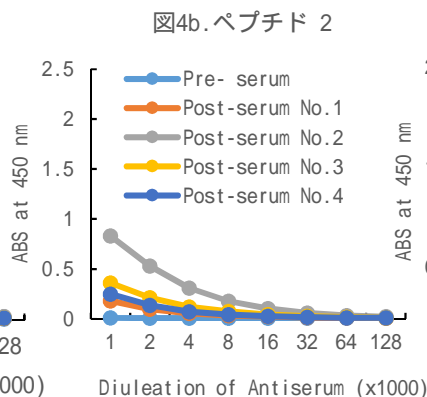
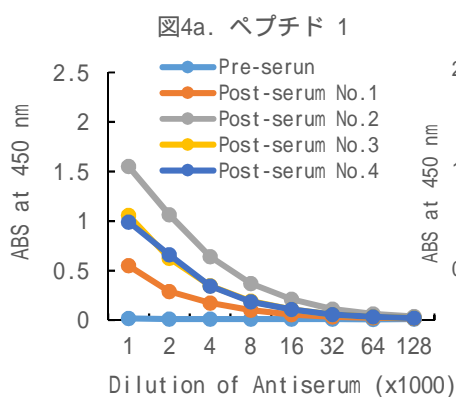
- 1) マウスの免疫後の 8 週間の観察において体重減少は確認されず、他覚的にも活動性の低下はみられなかった。
- 2) 免疫グロブリンサブクラスの解析は IgG1、IgG2b、IgG2c、IgG3 の中では IgG2b と IgG2c が免疫後に優位に上昇していた (図 1、図 2)。



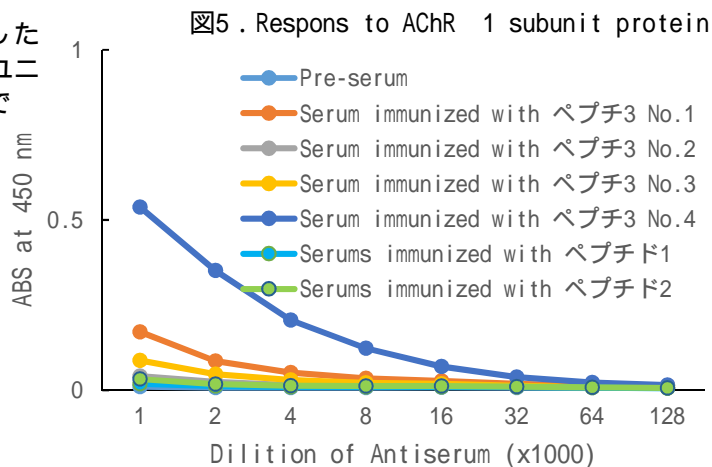
- 2) 骨格筋中の IgG2c は免疫後有意に上昇していた (図 3)。



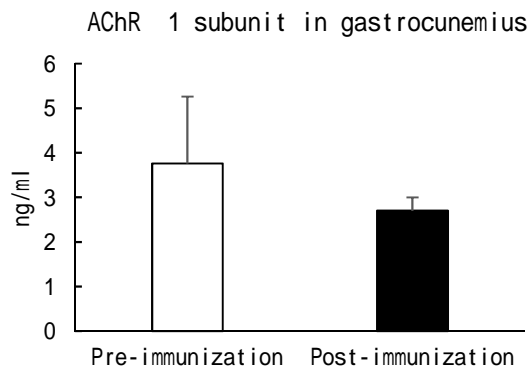
- 3) ペプチド 1、2、3 によって免疫したマウス血清と BSA コンジュゲートを行った各ペプチドを固相化した ELISA にて反応ではペプチド 3 による免疫が最も抗体価が高かった (図 4a、4b、4c)。



- 3) ペプチド 1、2、3 によって免疫したマウス血清とアセチルコリン受容体 1 サブユニットリコンビナント蛋白を固相化した ELISA での反応性はペプチド 1、2 では反応をみとめなかったがペプチド 3 で免疫した血清では反応がみられた (図 5 ペプチド 3 No. 1-4.)。



4) ペプチド 3 で免疫したマウスの骨格筋中のアセチルコリン受容体 1 サブユニットの定量は非免疫群より免疫後のマウスで低い傾向を示した。



今後の課題としてはペプチド 3 により産生された免疫グロブリン分画がアセチルコリン受容体のどこの部分に結合しているかを組織学的に検討し、本モデルの抗体産生に関連するサイトカインプロファイルを明らかにすることである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------