

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07784

研究課題名(和文)重症筋無力症の治療方向性を規定する因子の探索

研究課題名(英文) Exploring for factors to determine the direction of treatment for myasthenia gravis

研究代表者

松井 尚子 (MATSUI, Naoko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授

研究者番号：10547954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：重症筋無力症(Myasthenia Gravis, MG)の病態と治療反応性を規定する因子について検討した。まず、正常ヒトの胸腺上皮細胞のRNAシーケンス解析を行い、マウスの髄質胸腺上皮細胞と皮質胸腺上皮細胞に特異的とされる遺伝子発現を確認した。また効率的な胸腺上皮細胞の単離方法を確立し、論文投稿中である。次に、末梢血単核球と胸腺細胞を用いたフローサイトメトリー解析により、MG患者の胸腺ではプラズマプラスト中のCXCR5の発現が増加し、プラズマプラストの割合はMGの重症度と相関を示すことを見出した。さらに難治例の患者において血中のプラズマプラストがバイオマーカーとなり得るか検証を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MG胸腺を用いたシングルセル解析の報告は数少なく、包括的な検討が十分に行われているとは言い難い。この度、効率的な胸腺上皮細胞(TEC)の単離方法を確立したことで、より精度の高いシングルセル解析が可能になると思われる。さらにMG胸腺のcTECやmTECにどのような分子機構が含有されているかを解明することで、MGの病態を明らかにしたい。また治療前のMG胸腺において、プラズマプラストがMGの重症度に関わっていることが明らかとなった。さらに血液中のプラズマプラストは治療後のバイオマーカーとなり得る可能性があり、今後さらなる検証を行うことで、難治MG患者における個別化医療を目指したい。

研究成果の概要(英文)：We investigated the factors that determine the pathology and therapeutic response of myasthenia gravis (MG). First, we performed RNA sequence analysis of normal human thymic epithelial cells and confirmed gene expression that is thought to be specific to medullary thymic epithelial cells and cortical thymic epithelial cells in mouse. We have also established an efficient method for isolating thymic epithelial cells and are currently submitting a paper. Next, flow cytometry analysis using peripheral blood mononuclear cells and thymocytes revealed that the expression of CXCR5 in plasmablasts was increased in the thymus of MG patients, and I found that the proportion of intrathymic plasmablasts correlated with the severity of MG. Furthermore, we are proceeding with further verification of whether plasmablasts in the blood can serve as a biomarker in patients with intractable cases.

研究分野：神経免疫

キーワード：重症筋無力症 胸腺上皮細胞 プラズマプラスト 難治例

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症(Myasthenia Gravis, MG)は神経難病のひとつであるものの、治療の選択肢が増えたことにより、死亡率は確実に減少した。その一方で、寛解率は1940年頃と比較しても変化しておらず、長期にわたり強力な免疫治療を必要とする難治例も存在する。診療現場では、発症年齢や胸腺病変の合併からみた病型により治療戦略を立てることが多いが、最適な医療を提供するには、個々の特性を予測するバイオマーカーが希求されている。

私たちは、ヒト胸腺の免疫組織染色やフローサイトメトリーによる方法論を確立するとともに、MG胸腺における病態解明を進めてきた。そこで、これまでの研究手法をさらに発展させ、難治例に対する新たな治療戦略を見出すため研究を開始した。

### 2. 研究の目的

ヒトの胸腺上皮細胞のRNAシーケンス解析の精度を改良し、MGの病態や治療反応性に関する因子を明らかにする。さらに抗体産生に関わる免疫細胞の解析を行い、難治例におけるバイオマーカーを探索する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト胸腺上皮細胞のRNAシーケンス解析

新生児を含む幼児の胸腺上皮細胞を単離し、RNAシーケンス解析による網羅的遺伝子発現解析を行う。

#### (2) 末梢と胸腺の免疫細胞の解析

健常16名とMG患者21名の末梢血、心臓手術(小児15名と成人10名)もしくは胸腺摘出術を受けた(MG非合併の胸腺腫患者12名とMG患者25名)際の胸腺を用いた。末梢血より、末梢血単核球(PBMC)を単離、胸腺よりリンパ球成分である胸腺細胞を分離し、ナイーブB細胞: CD3(-)CD19(+), CD27(-)、メモリーB細胞: CD3(-)CD19(+), CD27(+), プラズマブラスト: CD3(-)CD19(+), CD27(+), CD180(-), CD38<sup>high</sup>, B220<sup>high</sup> Thymic B細胞: CD19(+), B220<sup>high</sup> Tfh細胞: CD3(-)CD4(+), CXCR5(+), PD-1(+),もしくはCD3(-)CD4(+), CXCR5(+), ICOS(+)をフローサイトメトリーで解析した。またプラズマブラスト中のBAFF-RやCXCR5のMFIを評価した。さらにMG患者の臨床像(年齢、罹病期間、抗アセチルコリン受容体抗体価、MG-ADL、MG-ADL improvement rate)と異常のあるB細胞分画との相関をみる。さらに治療前に異常のみられた細胞分画が治療後どのように変化しているのかも確認する。

### 4. 研究成果

まず、新生児を含む幼児の胸腺からTECの単離に適した酵素処理を検証した。さらに単離したmTECとcTECを用いてRNAシーケンス解析を行い、ヒトの髄質胸腺上皮細胞(mTEC)に特異的な遺伝子(*CD80*, *CCL21*, *AIRE*, *FEZF2*)と皮質胸腺上皮細胞(cTEC)に特異的な遺伝子(*LY75*, *CCL25*, *PSMB11*, *PRSS16*)を確認した(図1:主成分分析、図2:クラスター階層と遺伝子発現のヒートマップ)、論文投稿中である。

次に、PBMCと胸腺細胞を用いたフローサイトメトリー解析では、MG患者の末梢血と胸腺ではプラズマブラストの増加がみられた。また、MG患者の胸腺ではプラズマブラスト中のCXCR5の発現が増加し、プラズマブラストの割合はMGの重症度と相関を示すことを報告した(Yamamoto Y, Matsui N, et al. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2021)。

その後、長期観察を行っているMG患者について、非難治例と難治例にわけ、プラズマブラストの割合をみたところ、非難治例と難治例間に有意差はなく、難治例では高めの群と低めの群に

分かれることを見出した。この結果より、一部の難治例患者では、プラズマプラスト産生を抑制する治療が有効である可能性があるものの、プラズマプラストが低めの患者については、補体阻害薬などが選択肢となり得ると考えられた。

図1

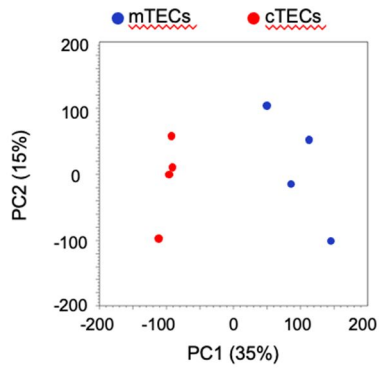
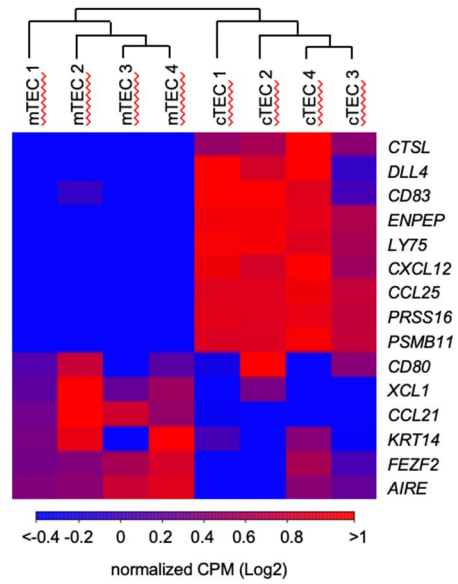


図2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 松井尚子、田中恵子、和泉唯信	4. 巻 80
2. 論文標題 Stiff-person syndrome, Progressive encephalomyelitis with rigidity and myoclonus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 355-360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki H, Matsui N, Takamatsu N, Yoshida T, Fukushima K, Takata T, Osaki Y, Tanaka K, Kubo Y, Izumi Y	4. 巻 32
2. 論文標題 Application of ultrasound in a case of eosinophilic fasciitis mimicking stiff-person syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuromuscul Disord	6. 最初と最後の頁 590-593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nmd.2022.05.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiramatsu Y, Okamoto Y, Yoshimura A, Yuan JH, Ando M, Higuchi Y, Hashiguchi A, Matsuura E, Nozaki F, Kumada T, Murayama K, Suzuki M, Yamamoto Y, Matsui N, Miyazaki Y, Yamaguchi M, Suzuki Y, Mitsui J, Ishiura H, Tanaka M, Morishita S, Nishino I, Tsuji S, Takashima H.	4. 巻 269
2. 論文標題 Complex hereditary peripheral neuropathies caused by novel variants in mitochondrial-related nuclear genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neurol	6. 最初と最後の頁 4129-4140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-022-11026-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yosuke Yamada, Djeda Belharazem-Vitacolonna, Hanibal Bohnenberger, Christel Weiss, Naoko Matsui, Mark Kriegsmann, Katharina Kriegsmann, Peter Sinn, Katja Simon-Keller, Gerhard Hamilton, Thomas Graeter, Gerhard Preissler, German Ott, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Pulmonary cancers across different histotypes share hybrid tuft cell/ionocyte-like molecular features and potentially druggable vulnerabilities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Death Dis	6. 最初と最後の頁 979-979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-022-05428-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamamoto Y, Matsui N, Uzawa A, Ozawa Y, Kanai T, Oda F, Kondo H, Ohigashi I, Takizawa H, Kondo K, Sugano M, Kitaichi T, Hata H, Kaji R, Kuwabara S, Yamamura T, Izumi Y	4. 巻 8
2. 論文標題 Intrathymic plasmablasts are affected in myasthenia gravis patients with active disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.0000000000001087.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Y, Matsui N, Uzawa A, Ozawa Y, Kanai T, Oda F, Kondo H, Ohigashi I, Takizawa H, Kondo K, Sugano M, Kitaichi T, Hata H, Kaji R, Kuwabara S, Yamamura T, Izumi Y	4. 巻 8
2. 論文標題 Intrathymic plasmablasts are affected in myasthenia gravis patients with active disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.0000000000001087.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 松井尚子、田中恵子、和泉唯信	4. 巻 73
2. 論文標題 ステイッフ・パーソン症候群	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain and Nerve	6. 最初と最後の頁 640-646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1416201808.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松井尚子、田中恵子、和泉唯信	4. 巻 73
2. 論文標題 ステイッフ・パーソン症候群	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain and Nerve	6. 最初と最後の頁 640-646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1416201808.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松井尚子、和泉唯信	4. 巻 -
2. 論文標題 多巣性運動ニューロパチー (MMN)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 最新ガイドラインに基づく 神経疾患 診療指針	6. 最初と最後の頁 296-299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松井尚子、和泉唯信	4. 巻 -
2. 論文標題 多巣性運動ニューロパチー (MMN)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 最新ガイドラインに基づく 神経疾患 診療指針	6. 最初と最後の頁 296-299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukumoto T, Miyamoto R, Fujita K, Murakami N, Matsui N, Izumi Y	4. 巻 421
2. 論文標題 Reversible mixed perfusion on 123 I-IMP SPECT in anti-AMPA receptor encephalitis: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neurol Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2020.117306.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukumoto T, Miyamoto R, Fujita K, Murakami N, Matsui N, Izumi Y	4. 巻 421
2. 論文標題 Reversible mixed perfusion on 123 I-IMP SPECT in anti-AMPA receptor encephalitis: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neurol Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2020.117306.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiramatsu Y, Okamoto Y, Yoshimura A, Yuan JH, Ando M, Higuchi Y, Hashiguchi A, Matsuura E, Nozaki F, Kumada T, Murayama K, Suzuki M, Yamamoto Y, Matsui N, Miyazaki Y, Yamaguchi M, Suzuki Y, Mitsui J, Ishiura H, Tanaka M, Morishita S, Nishino I, Tsuji S, Takashima H	4. 巻 -
2. 論文標題 Complex hereditary peripheral neuropathies caused by novel variants in mitochondrial-related nuclear genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neurol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-022-11026-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiramatsu Y, Okamoto Y, Yoshimura A, Yuan JH, Ando M, Higuchi Y, Hashiguchi A, Matsuura E, Nozaki F, Kumada T, Murayama K, Suzuki M, Yamamoto Y, Matsui N, Miyazaki Y, Yamaguchi M, Suzuki Y, Mitsui J, Ishiura H, Tanaka M, Morishita S, Nishino I, Tsuji S, Takashima H	4. 巻 -
2. 論文標題 Complex hereditary peripheral neuropathies caused by novel variants in mitochondrial-related nuclear genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neurol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-022-11026-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松井尚子	4. 巻 -
2. 論文標題 抑制性シナプスに対する自己免疫疾患	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 自己免疫性脳炎・関連疾患 ハンドブック	6. 最初と最後の頁 187-194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松井尚子、大東いずみ、和泉唯信	4. 巻 98
2. 論文標題 重症筋無力症と胸腺摘出	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 823-828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松井尚子、和泉唯信	4. 巻 -
2. 論文標題 多巣性運動ニューロパチー (MMN)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 最新ガイドラインに基づく神経疾患 診療指針2023-2024	6. 最初と最後の頁 337-340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松井尚子、田中恵子、和泉唯信	4. 巻 75
2. 論文標題 スティッフパーソン症候群	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 749-754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1416202410.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松井尚子	4. 巻 41
2. 論文標題 T細胞によるMGの病態	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1475-1478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsui N, Tanaka K, Ishida M, Yamamoto Y, Matsubara Y, Saika R, Iizuka T, Nakamura K, Kuriyama N, Matsui M, Arisawa K, Nakamura Y, Kaji R, Kuwabara S, Izumi Y; Japanese SPS Study	4. 巻 32
2. 論文標題 Prevalence, clinical profiles, and prognosis of Stiff-person syndrome in Japanese nationwide survey	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXI.000000000200165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -



〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoko Matsui
2. 発表標題 Recent advances in neuroimmunological diseases
3. 学会等名 14th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2021) on joint with 11th Taiwan-Japan-Korea Nanomedicine Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本遥平、松井尚子、大東いずみ、近藤和也、和泉唯信
2. 発表標題 重症筋無力症患者の胸腺におけるB細胞分画と濾胞性ヘルパーT細胞の解析
3. 学会等名 第39回日本胸腺研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本遥平、松井尚子、織田史子、小澤由希子、金井哲也、鶴沢顕之、大東いずみ、近藤和也、桑原聡、山村隆、和泉唯信
2. 発表標題 重症筋無力症患者の胸腺ではプラズマブラストが増加している
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井尚子、山本遥平、大東いずみ、近藤和也、和泉唯信
2. 発表標題 重症筋無力症患者の胸腺ではプラズマブラストが増加している
3. 学会等名 第40回日本胸腺研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松井尚子、望月歩、武藤浩平、山本有雄貴、和泉唯信
2. 発表標題 当院における難治MG例の検討
3. 学会等名 第35回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------