

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：23302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07421

研究課題名（和文）重症筋無力症の新規病態：免疫チェックポイント分子と補体制御因子および治療への発展

研究課題名（英文）Novel pathogenesis of myasthenia gravis: immune checkpoint molecules and complements regulatory molecules and their development into therapy

研究代表者

岩佐 和夫（Iwasa, Kazuo）

石川県立看護大学・看護学部・教授

研究者番号：10345613

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では重症筋無力症の骨格筋に補体制御因子が発現し病態に関与していることを明らかにした。骨格筋における補体制御因子の発現は神経筋接合部に集簇化して発現していることが明らかとなった。また、重症筋無力症においては補体制御因子の発現量と臨床症状のスコアとの間に負の相関を見いだすことができた。これは、骨格筋の神経筋接合部における補体制御因子の発現が重症筋無力症の病態に関与していることを示しており、重症筋無力症の新たな病態を見いだすこととなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は重症筋無力症の骨格筋において、病態に関わる神経筋接合部の破壊を制御する補体制御因子の発見となった。この発見は、重症筋無力症の新たな病態の理解を深めたのみでなく、新規治療法の開発につながることを期待でき、今後の治療に向けた更なる研究が望まれる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated that the expression of the complement regulatory proteins in the skeletal muscle of myasthenia gravis was involved in the pathogenesis of the disease. The expression of complement regulatory proteins in skeletal muscle was found to be clustered at the neuromuscular junction. In myasthenia gravis, a negative correlation was found between the expression level of the complement regulatory proteins and the clinical symptom score. This indicates that the expression of the complement regulatory proteins at the neuromuscular junction of skeletal muscle is involved in the pathogenesis of myasthenia gravis and provides a new insight into the pathogenesis of myasthenia gravis.

研究分野：神経免疫学

キーワード：重症筋無力症 骨格筋 補体制御因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症 (MG) が自己免疫疾患であることは、Parrick ら (*Science*, 1973) が患者血清を動物に投与し MG モデル動物の作製に成功したことで証明された。1976 年には Lindstrome ら (*Neurol*, 1976) の研究により患者血清中に抗アセチルコリン受容体 (AChR) 抗体が存在することが証明された。その後、MG において多くの自己免疫に関するメカニズムの研究が進み、自己抗体産生には胸腺における自己寛容を逃れた自己反応性 T 細胞が自己抗体産生 B 細胞に情報を伝え、B 細胞およびプラズマブラストにより自己抗体が産生されることが明らかとなった。また、抗 AChR 抗体の作用の主体は補体の古典経路の活性化により形成された膜侵襲複合体 (MAC) が神経筋接合部のシナプト後膜の膜破壊を引き起こすことであることが 1980 年 Sahashi ら (*J Neuropathol Exp Neurol*, 1980) によって確認されている。MG における治療戦略は、これらの研究を背景に考案されており、これまでの研究による成果が MG の病態改善に大きな役目を果たしてきた。

一方、これらの研究成果を背景に考案された治療法は有用であることが証明されているが、その効果発現には個体差が大きいことが臨床の現場では常識となっている。しかし、この病態に関しては個体差という理解で、踏み込んだ議論を行う根拠が得られていない。また、抗 AChR 抗体の作用の最終経路である補体の活性化も全例で確認されているが、病態が安定すると神経筋接合部における抗原-抗体反応およびそれに引き続く補体の沈着が引き起こされるにも関わらず、神経筋接合部の機能が保持される状態となる。つまり MG のシナプト後膜において補体による膜破壊を抑制する病態があると推定されるが、この病態についても説明できる機構を明らかにすることが求められている。

我々は、MG における治療反応性の個体差およびシナプト後膜における補体活性化の制御機構について、生体 (骨格筋) に内在する自己免疫反応調整機構という新たな病態仮説を学術的な問いとして提唱した。その仮説の本質は、MG の骨格筋における自己免疫チェックポイント因子のリガンドの発現 (Iwasa, *J Neuroimmunol*, 2018) と骨格筋における補体制御因子の発現である。

2. 研究の目的

本研究では MG の病態における補体制御因子の関与について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MG および非筋原性疾患の骨格筋における補体制御因子 (CD59) の発現：免疫組織染色
MG 患者 16 例 (含胸腺腫合併 9 例) および非筋原性疾患患者 6 例の骨格筋を用いて免疫組織染色をおこなった。CD59 の同定には CD59 モノクローナル抗体および神経筋接合部の同定には - プンガロトキシンを用いた。それぞれ異なる蛍光色素にて二重染色をおこなった。

(2) 補体制御因子 (CD59) タンパクの発現：ウェスタンブロットによる解析

MG 患者 16 例および非筋原性疾患患者 6 例の骨格筋の一部からタンパクを抽出した。抽出したタンパクは電気泳動を行い、PVDF 膜に転写した。転写後、インターナルコントロールとして GAPDH を染色し、また、CD59 についてもモノクローナル抗体を用いて染色をおこなった。CD59 タンパクの発現量については、GAPDH を基準とした相対的な発現量を計算し解析をおこなった。

(3) 補体制御因子 (CD59) mRNA の発現：RT-PCR による解析

MG 患者 16 例および非筋原性疾患患者 6 例の骨格筋の一部から mRNA を抽出した。CD59 mRNA の発現量は Taq-Man プローブを使用した RT-PCR にて行い、Ct 法、2⁻ Ct 法にて解析した。インターナルコントロールとして GAPDH を用いた。さらに、CD59 mRNA の発現量とアセチルコリン受容体 (AChR) mRNA の発現量との関連は下記の計算式を用いて解析した。

$$Ct_{CD59/AChR} = AChR Ct - CD59 Ct$$

(4) 補体制御因子 (CD59) とアセチルコリン受容体の発現関係と臨床スコアとの関連

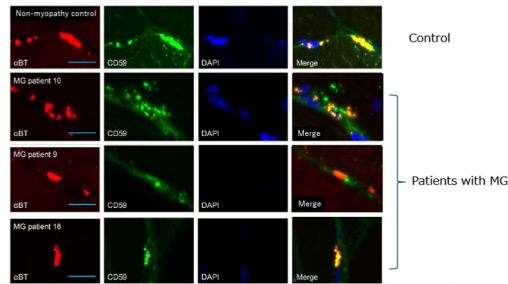
MG 患者 15 例 (1 例は AChR の単一塩基多型により mRNA の検出ができなかった) において Ct_{CD59/AChR} と MG 臨床スコアとの関連を調べた。MG 臨床スコアには、MG-ADL スコア、QMG スコア、MGFA 分類を用いた。

4. 研究成果

(1) 重症筋無力症骨格筋における補体制御因子 (CD59) の発現：免疫組織染色

MG 患者および非筋原性疾患患者において CD59 は筋膜に発現が認められた。さらに、CD59 の発現の一部は集簇していることが確認された。- プンガロトキシンにて神経筋接合部を同定したところ、CD59 の集簇発現は神経筋接合部に一致していることが確認された。骨格筋における CD59 の発現の特異性は本研究で初めて確認された。

骨格筋におけるCD59の発現

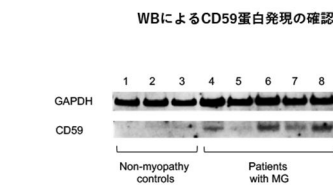
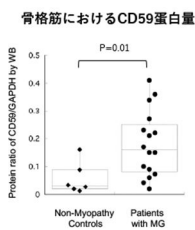


Iwasa K, Yoshikawa H, et al. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2022;10(1):e200057.

(2) 重症筋無力症における補体制御因子 (CD59) の発現：ウェスタンブロット法による解析
MG 患者の骨格筋に発現する CD59 タンパクの発現量をウェスタンブロット法にて定量化したところ、非筋原性疾患患者に比べ発現量が有意に増加していることが示された ($p=0.01$)。

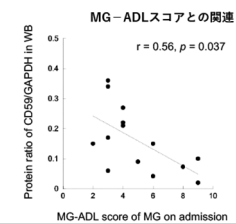
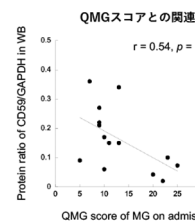
CD59 タンパクの発現量と MG 臨床スコアである QMG スコアおよび MG-ADL スコアとの関連を検討したところ有意な相関を示した (QMG スコア $r=0.54, p=0.043$; MG-ADL スコア $r=0.56, p=0.037$)。 (ただし、クリーゼを起こした症状は外れ値が大きいため検討から外した。)

CD59 蛋白の発現量



Iwasa K, Yoshikawa H, et al. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2022;10(1):e200057.

CD59蛋白発現量と臨床スコアとの関連



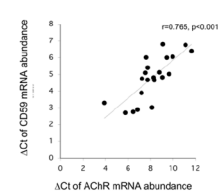
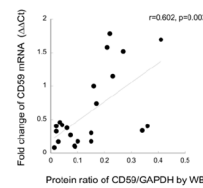
クリーゼを起こした症例を除いて解析
Iwasa K, Yoshikawa H, et al. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2022;10(1):e200057.

(3) 重症筋無力症における補体制御因子 (CD59) の発現：RT-PCR による mRNA 発現の解析

MG 骨格筋における *CD59* mRNA の発現量を RT-PCR にて定量化した。*CD59* mRNA の発現量は非筋原性疾患との比較では有意差は見られなかったが MG において高値を示す傾向が認められた。

CD59 タンパク発現量と *CD59* mRNA 発現量は有意に相関していた ($r=0.062, p=0.003$)。 *CD59* mRNA 発現量と *AChR* mRNA 発現量は強い相関関係にあることが示された ($r=0.765, p<0.001$)。他の補体制御因子と *AChR* mRNA 発現量との関連を追加で検討したが、これらの因子との相関関係は見られなかった。 *CD59* mRNA 発現量と MG 臨床スコアとの関連についても相関は見られなかった。

CD59 mRNA 発現量と蛋白量、AChR mRNA の発現量との関連

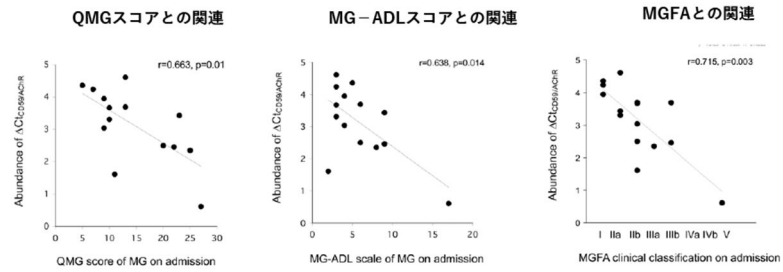


Iwasa K, Yoshikawa H, et al. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2022;10(1):e200057.

(4) 補体制御因子 (CD59) とアセチルコリン受容体の発現関係と臨床スコアとの関連

CD59 の発現が神経筋接合部に集簇していること、*CD59* mRNA 発現量と *AChR* mRNA 発現量が高い相関関係にあることから、CD59 の発現が神経筋接合部の保護作用を有している可能性を考えた。つまり、*AChR* 抗体が *AChR* に結合後におこる抗体-補体反応における補体カスケードの最終経路において、膜侵襲タンパク複合体 (MAC) の形成を制御しているとの仮説を考えた。この可能性を示すため、*AChR* mRNA 発現量に対する *CD59* mRNA 発現量を計算 ($Ct_{CD59/AChR}$) し、MG 臨床スコアとの関連をしらべたところ、QMG スコア ($r=0.663, p=0.01$)、MG-ADL スコア ($r=0.638, p=0.014$)、MGFA ($r=0.715, p=0.003$) と有意な相関を確認することができた。

AChRmRNAに対する CD59mRNA発現量と臨床スコアとの関連



Iwasa K, Yoshikawa H, et al. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2022;10(1):e200057.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwasa K, Furukawa Y, Yoshikawa H, Yamada M, Ono K.	4. 巻 10 (1)
2. 論文標題 CD59 Expression in Skeletal Muscles and Its Role in Myasthenia Gravis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurology Neuroimmunology and Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 e200057
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1212/NXI.000000000200057	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岩佐和夫, 古川裕, 吉川弘明, 山田正仁, 小野賢二郎
2. 発表標題 重症筋無力症骨格筋における補体制御因子発現に関する検討
3. 学会等名 第34回日本神経免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩佐和夫, 古川裕, 吉川弘明, 山田正仁, 小野賢二郎
2. 発表標題 重症筋無力症患者骨格筋における補体制御因子発現に関する検討
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩佐和夫
2. 発表標題 重症筋無力症患者骨格筋における補体制御因子発現
3. 学会等名 第9回日本筋学会学術集会および第10回筋ジストロフィー医療研究会合同開催（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuo Iwasa, Yutaka Furukawa, Hiroaki Yoshikawa, Masahito Yamada, Kenjiro Ono
2. 発表標題 CD59 cluster at the neuromuscular junction in skeletal muscles and its role in Myasthenia Gravis
3. 学会等名 26th World Congress of Neurology (国際学会)
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
研究分担者	吉川 弘明 (Yoshikawa Hiroaki) (10272981)	金沢大学・保健管理センター・教授 (13301)	
研究分担者	古川 裕 (Furukawa Yutaka) (50881033)	金沢大学・附属病院・助教 (13301)	
研究分担者	野崎 一郎 (Nozaki Ichiro) (60736495)	金沢大学・附属病院・助教 (13301)	

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
---------	---------