

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591255

研究課題名(和文)横紋筋細胞を用いた免疫沈降法による自己抗体検索の臨床応用に向けて

研究課題名(英文) Autoantibodies detection by immunoprecipitation assay using rhabdomyosarcome cellular extract

研究代表者

鈴木 重明 (SUZUKI, SHIGEAKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50276242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：免疫性筋疾患である重症筋無力症(MG)と炎症性筋疾患における自己抗体とその臨床的意義について研究を行った。抗体測定的主要な手法はアイソトープラベルした横紋筋細胞抽出液蛋白とRNAを抗原とする免疫沈降法である。抗Kv1.4抗体や抗SRP抗体の自己抗体検出は我々研究室の独自の手法である。国内外の多くの施設と共同研究を展開し、臨床的意義を解明した。

抗Kv1.4抗体はMGにおける重篤な合併症である心臓病変、胸腺腫関連MGにおける長期予後などに関連している。また抗SRP抗体陽性ミオパチーの臨床像を解明し、病型分類を提唱した。研究成果は多くの施設から自己抗体測定依頼を受け、臨床現場に還元している。

研究成果の概要(英文)：Anti-signal recognition particle (SRP) antibodies were first found in the serum from a patient with polymyositis and were classified as one of the myositis-specific antibodies. We advocate for clinical recognition of a chronic form of anti-SRP myopathy, usually progressed over one year.

Anti-Kv1.4 antibody was detected by an immunoprecipitation assay using 35S-labeled rhabdomyosarcome cellular extract as the antigen source. Patients with anti-Kv1.4 antibodies showed higher frequencies of thymoma recurrence and MG relapse compared to those without. Anti-Kv1.4 antibody is a useful predictor of the prognosis of thymoma-associated MG. In addition, 70 (10.8%) of 650 MG patients had anti-Kv1.4 antibodies and 60% of them had abnormal ECG findings with high frequencies of T-wave abnormality and QT prolongation. Myocarditis was found in 8 MG patients with anti-Kv1.4 antibodies. Most patients showed rapid deterioration with lethal arrhythmias and severe heart failure.

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：自己抗体 重症筋無力症 炎症性筋疾患 抗Kv1.4抗体 抗SRP抗体

1. 研究開始当初の背景

免疫性筋疾患である重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) と一部の筋炎の患者血中には複数の自己抗体が存在し、抗体測定により実地の臨床現場でより多くの情報が得られる可能性を有している。筋炎の診断には筋病理が基本であるが、その診断基準によると多発筋炎と診断できる症例は稀であり、多くは非特異的筋炎に含まれてしまう問題点がある。特にシグナル認識粒子 (signal recognition particle, SRP) に対する自己抗体である抗 SRP 抗体は、重篤な筋炎に関連するとの報告があるが、筋病理からは筋炎とは診断できない。また MG の診断では抗 AChR 抗体や抗 MuSK 抗体の測定が必須であるが、MG 患者の経過観察に有用な病型分類、治療法の選択、予後に関する適切な指標がないのが現状である。自己抗体検出により免疫性筋疾患が有する臨床上的問題点を解決する可能性がある。

2. 研究の目的

横紋筋細胞を用いた免疫沈降法による自己抗体検出の臨床応用にむけて、抗 SRP 抗体ならびに抗 Kv1.4 抗体の臨床的意義を多くの症例から証明する。抗 SRP 抗体についてはより簡便な測定系である ELISA 系を確立し、抗 Kv1.4 抗体については心筋に対する病態機序を解析する。更に MG におけるこれまで未定の自己抗原の解析を行う。

3. 研究の方法

(1) RNA 免疫沈降法は RD 抽出液と患者血清中の IgG を吸着させたプロテイン A -セファロース粒子と反応させる。形成された免疫沈降物から RNA をフェノール抽出し、7M 尿素-10% ポリアクリルアミドゲルで泳動のうえ銀染色で検出する。蛋白免疫沈降法は ³⁵S で標識した RD を抗原として、患者血清中の IgG を吸着させたプロテイン A -セファロース粒子と反応させる。形成された免疫沈降物は 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルで泳動のうえ BAS-5000 (富士写真フィルム) によるオートラジオグラフィで検出する。自己抗体の結果をもとに症状、重症度、筋や胸腺の病理、他の自己抗体との関連、治療、合併症を含む多面的な臨床像の解析を行う。

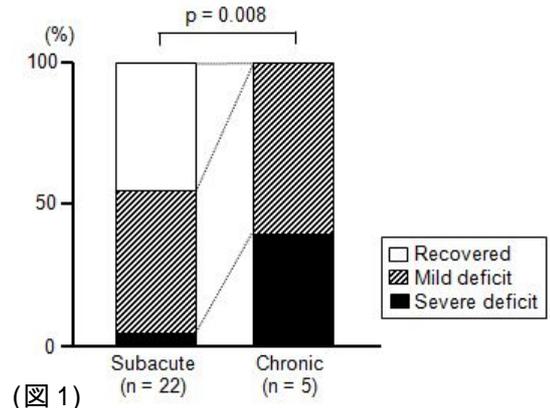
(2) 自己抗体の心筋に対する病態機序は連携研究者の馬場博士が確立した ex vivo の系を用いる (Baba A et al. Therapeutic Apheresis and Dialysis 12: 109, 2008)。ニワトリ 17 日齢卵を用いて、血清 (100 μL) を卵内に添加し、心エコー M-mode による心収縮測定 (Ejection fraction) を行う。すでに拡張型心筋症の患者血清で多くの症例で実施されており、血液浄化療法の適応を決め

る臨床的にも重要な実験系として注目されている。心抑制のある症例については、その病態機序を検証する目的で補体除去あるいはトリプトファンカラム吸着後の血清を使用して、心収縮機能の変化をみる。またニワトリ心臓における Kv1.4 発現を免疫組織的に確認する。

(3) 蛋白免疫沈降法では Kv1.4 以外にも未定の自己抗体が複数存在することが証明されている。その中で、220 kD と 95 kD は複数の MG 患者血清において沈降される抗原であり、これらを標的として affinity-purification の方法で抗原蛋白の解析を行う (J Neuroimmunol 170: 141, 2005)。すなわち患者血清中の IgG を吸着させたプロテイン A -セファロース粒子と抗原蛋白を通常の 50-100 倍のスケールで反応の上、電気泳動で展開する。クマシー染色し目標とするバンドをゲル上で切り出し、蛋白を精製する。質量分析を行い、ペプチド断端をデータベースサーチし候補蛋白を検索する。その中で分子量や横紋筋での発現から新規自己抗原と考え、抗体による immunoblot、目的蛋白を発現させた培養細胞との反応性からその傍証を追加していく。特に AChR や MuSK に対する自己抗体のない dual seronegative の患者血清を検討することで、MG の診断に有用な新規自己抗体を見出す。

4. 研究成果

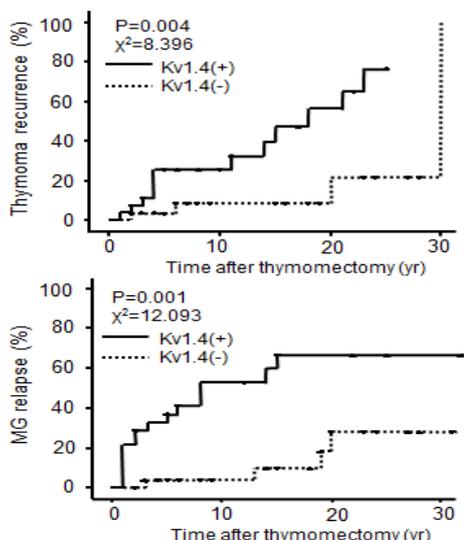
(1) 抗 SRP 抗体が陽性となる筋疾患は anti-SRP myopathy として筋炎とは異なる炎症性筋疾患と考えるべきであり、1 つの疾患概念として確立することができた。Anti-SRP myopathy には subacute form と chronic form が存在し、特に後者は若年で発症し、筋力低下と筋萎縮が強く、一見して筋ジストロフィーに類似した臨床像を呈することを報告した。特に chronic form は神経学的予後が不良であり、早期診断の上免疫治療を行う必要がある (下図)。研究成果は 2 年連続で神経学会総会のシンポジウムで指名され、あらゆる年代の筋疾患の鑑別に挙げる必要があり、治療可能な疾患として広く認知されるきっかけとなった。



(2) 抗 Kv1.4 抗体陽性 MG の臨床像は本邦のみならず、Norway の Dr. Romi と共同研究を行い西洋人での抗 Kv1.4 抗体陽性 MG の臨床特徴を明らかにした。日本人 MG と陽性率はほぼ同様であるが、眼筋型の症例も含まれや軽症な傾向にあった。

(3) 蛋白免疫沈降法では Kv1.4 以外にも未同定の自己抗体が複数存在する。その中で、95kD のバンドをターゲットとして、affinity-purification の方法を用いて抗原蛋白の解析を行った。質量分析により NCBI データベースからヒットする蛋白を候補とする新規自己抗体を検索する研究を行い、heat shock protein の 1 つである Grp94 を同定することに成功した。本抗体が陽性である MG 患者は陰性例と比べて他の自己免疫疾患を合併する頻度が高率であり、多彩な自己免疫疾患の共通の病態機序と考えられる。

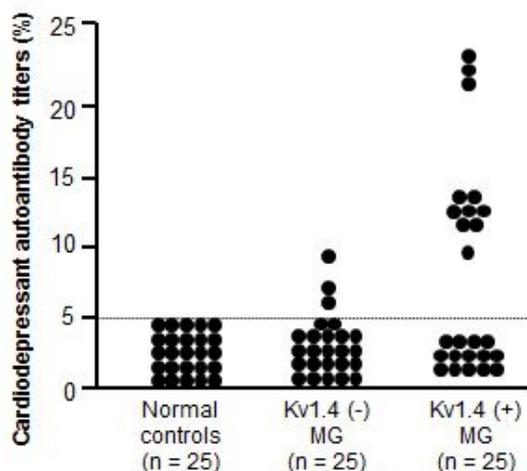
(4) 胸腺腫関連 MG56 例を抗 Kv1.4 抗体陽性と陰性の 2 群に分け、胸腺腫と MG の臨床経過について比較した。胸腺腫再発や MG 再燃の頻度は抗 Kv1.4 抗体陰性例にくらべて陽性例で有意に高いことが証明された(図 2)。抗 Kv1.4 抗体検出は胸腺腫関連 MG の長期にわたる予後判定に有用であることが証明できた。



(図 2)

(5) MG 650 例の中で 70 例 (11%) が抗 Kv1.4 抗体陽性であった。抗 Kv1.4 抗体陽性の 71% が胸腺腫関連 MG であり、67% が MGFA stage III 以上の重症例であった。また 60% で T 波異常や QT 延長などの心電図異常を認めた。MG 全体の 8 例 (1.2%) で心筋炎を認め、いずれも抗 Kv1.4 抗体が陽性であった。心筋炎を呈した 8 例 (M:F = 3:5, 44-80 歳、平均 56 歳) は 7 例が胸腺腫関連 MG であり、6 例はクリーゼの既往があった。心筋炎は心室頻拍、洞不全症候群、AV ブロックなど致死的な不整脈が急速に進行し、また心不全を呈する症例もあった。免疫療法などにより 4 例は救命できた

が、4 例が死亡した。心筋に対する抑制効果は抗 Kv1.4 抗体陰性群に比べて陽性群で高率であった(図 3)。また血清中の補体を不活化した場合には心筋抑制効果に変化はなかったが、TR350 により免疫吸着をおこなった場合には心筋抑制抗体価は低下した。



(図 3)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

1. Suzuki S, Baba A, Kaida K, Utsugisawa K, Kita Y, Tsugawa J, Ogawa G, Nagane Y, Kuwana M, Suzuki N: Cardiac involvements in myasthenia gravis associated with anti-Kv1.4 antibodies. *Eur J Neurol* 21: 223-230, 2014 (査読有、DOI: 10.1111/ene.12234)
2. Suzuki S, Nishimoto T, Kohno M, Utsugisawa K, Nagane Y, Kuwana M, Suzuki N: Clinical and immunological predictors of prognosis for Japanese patients with thymoma-associated myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 258: 61-66, 2013 (査読有、DOI: 10.1016/j.jneuroim.2013.03.001)
3. Suzuki S, Utsugisawa K, Suzuki N: Overlooked non-motor symptoms in myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84: 989-994, 2013 (査読有、DOI: 10.1136/jnnp-2012-304057)
4. Kabasawa C, Shimizu Y, Suzuki S, Masuda M, Nagane Y, Utsugisawa K, Suzuki Y, Utsumi H, Fujihara K, Suzuki N, Uchiyama S: Taste disorders in myasthenia gravis: a multicenter cooperative study. *Eur J Neurol* 20: 205-207, 2013 (査読有、DOI: 10.1111/j.1468-1331.2012.03713.x)

5. Masuda M, Utsugisawa K, Suzuki S, Nagane Y, Kabasawa C, Suzuki Y, Shimizu Y, Utsumi H, Fujihara K, Uchiyama S, Suzuki N: The MG-QOL15 Japanese version: validation and associations with clinical factors. Muscle Nerve 46: 166-173, 2012 (査読有、DOI: 10.1002/mus.23398)

6. Romi F, Suzuki S, Suzuki N, Petzold A, Plant G, Gilhus NE. Anti-voltage-gated potassium channel Kv1.4 antibodies in myasthenia gravis. J Neurol 259: 1312-1316, 2012 (査読有、DOI: 10.1007/s00415-011-6344-y)

7. Suzuki S, Hayashi YK, Kuwana M, Tsuburaya R, Suzuki N, Nishino I: Myopathy associated with antibodies to signal recognition particle: disease progression and neurological outcome. Arch Neurol 69: 728-732, 2012 (査読有、DOI: 10.1001/archneurol.2011.1728)

8. Suzuki S, Utsugisawa K, Iwasa K, Satoh T, Nagane Y, Yoshikawa H, Kuwana M, Suzuki N: Autoimmunity to endoplasmic reticulum chaperone GRP94 in myasthenia gravis. J Neuroimmunol 237: 87-92, 2011 (査読有、DOI: 10.1016/j.jneuroim.2011.06.011)

9. Suzuki S, Utsugisawa K, Nagane Y, Suzuki N: Three types of striational antibodies in myasthenia gravis. Autoimmune Dis, 740583, 2011 (査読有、DOI: 10.4061/2011/740583)

〔学会発表〕(計 27 件)

1. Suzuki S, K. Utsugisawa, Y. Nagane, Suzuki N: Clinical and immunological predictors of prognosis for Japanese patients with thymoma-associated myasthenia gravis. The 21st World Congress of Neurology 2013.9/21 Wien.

2. 鈴木重明: 眼筋型 MG 治療の現状 (Japan MG registry 2012)と提言。シンポジウム「MG 治療の現状を知り、今後を考える」第 54 回日本神経学会総会、2013.6/1 東京

3. 鈴木重明: 抗 SRP 抗体陽性ミオパチー：筋炎との相違点。シンポジウム「ここまで分かった筋疾患」第 53 回日本神経学会総会、2012.5/24 東京

4. 鈴木重明: 心筋・骨格筋を標的とした重症筋無力症の新たな疾患概念。シンポジウム「重症筋無力症の新たな病態と疾患概念」第

53 回日本神経学会総会、2012.5/25 東京

5. Suzuki S, Hayashi YK, Kuwana M, Tsuburaya R, Suzuki N, Nishino I: Myopathy associated with antibodies to signal recognition particle: disease progression and neurological outcome. 64th Annual Meeting of the American Academy of Neurology 2012.4/26 New Orleans

6. 鈴木重明: 抗横紋筋抗体。「重症筋無力症の最近の話題」第 41 回日本臨床神経生理学学会学術大会、2011.11/11 静岡

〔図書〕(計 7 件)

1. 鈴木重明: 「重症筋無力症診療ガイドライン 2014」作成委員会編集、南光堂、東京、計 10 ページ、2014.

2. 鈴木重明: Lambert-Eaton 筋無力症行群 (LEMS)。別冊日本臨床、神経症候群 (第 2 版)、日本臨床社、東京、pp788-792, 2014.

3. 鈴木重明: Anti-SRP myopathy. 「Annual Review」, 中外医学社、東京、pp246-252, 2013.

4. 鈴木重明: 重症筋無力症。「今日の治療指針 2012」, 医学書院、東京、pp807-809, 2012.

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

多施設共同研究: Japan MG Registry Study Group (平成 21 年 9 月より、<http://mg.kenkyukai.jp>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
鈴木重明 (Suzuki Shigeaki)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 50276242

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
馬場彰泰 (Baba Akiyasu)
北里大学・医学部附属病院・研究員
研究者番号: 60296572