

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700422

研究課題名(和文)重症筋無力症における抗MuSK抗体の認識分子同定

研究課題名(英文)Identification of target molecules against anti MuSK IgG in Myasthenia Gravis

研究代表者

伊藤 美佳子(Ito, Mikako)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60444402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：重症筋無力症(Myasthenia Gravis: MG)の約15%は抗MuSK抗体陽性の自己免疫疾患である。MuSKは神経筋接合部の筋肉側の膜貫通タンパクであり、細胞外領域に4つのIg1, Ig2, Ig3, Ig4と1つのC6 boxをもつ。5名の患者のMuSK抗体はMuSK-ColQ結合を阻害するのみならずMuSK-LRP4結合も阻害すること、また、MuSK抗体はIg1とIg4を認識し、LRP4はIg1以外にもIg4とも結合することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Myasthenia Gravis (MG) is autoimmune disease caused by an autoantibody to protein consisting of neuromuscular junction. Anti MuSK MG account for fifteen percent of MG, but it is unclear whether MuSK is membrane transfer protein of NMJ, and has Ig1, Ig2, Ig3, Ig4 and C6 box in extracellular region. In this study, it was demonstrated that anti-MuSK antibody from five persons inhibit both MuSK-ColQ and MuSK-LRP4 interaction. Moreover, MuSK antibody recognizes Ig1 and Ig4, and LRP4 also binds Ig1 and Ig4.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：重症筋無力症 MuSK Collagen Q LRP4

### 1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症(myasthenia gravis, MG)は神経筋接合部の分子に対する自己抗体により発症し、神経筋接合部の信号伝達が障害される自己免疫疾患である。MG 症例の 80%はアセチルコリン受容体(AChR)抗体に対する自己抗体による。2001 年、抗 AChR 抗体陰性の MG 患者血中から、運動終板に存在する筋特異的チロシンキナーゼ(muscle-specific receptor protein kinase, MuSK)に対する自己抗体が発見された。現在、抗 AChR 抗体陰性 MG 患者の 25-70%が MuSK に対する自己抗体陽性であることが知られている。AChR に対する自己抗体は、補体介在性に AChR を破壊するのに対し、抗 MuSK 抗体は補体を活性化しない IgG4 サブクラスに属する阻止抗体である。しかし、MuSK のどの機能を阻害しているか、その病態機序については明らかでない。

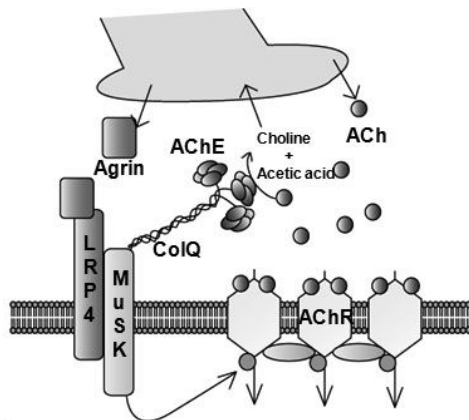


Fig.1 骨格筋の神経筋接合部では、agrin-LRP4-MuSK シグナル系により AChR のリン酸化が誘導される。また、MuSK は ColQ-AChE 複合体 と結合している。

MuSK は筋細胞膜のシナプス後膜特異的に存在する膜貫通型のタンパクであり、アセチルコリン受容体と隣接して存在する。MuSK について現在まで 2つの機能が知られている (Fig.1)。第 1 の機能は agrin-LRP4-MuSK シグナル系である。終板筋膜の LRP4 (low-density lipoprotein receptor)は MuSK と結合し、運動神経から放出されるリガンドである agrin が LRP4 と結合すると、MuSK のリン酸化が誘導される。続いて、シナプス後膜の AChR  $\alpha$ -subunit のリン酸化が起こり、AChR のクラスタリングが行われる。ゆえに MuSK は神経筋接合部の発生と維持に必要である。第 2 の機能は ColQ-MuSK の結合による AChE の集積である。神経筋接合部の基底膜では、12 分子のアセチルコリンエステラーゼ(AChE)と 3 分子の ColQ が非対称性 AChE 複合体を形成し、アンカリングしている。MuSK は ColQ の C

末端ドメインと結合し、Pler1can と共に、シナプス間隙での AChE の集積に関与している。さらに ColQ の MuSK への結合は agrin-LRP4-MuSK シグナル系を活性化することが今年報告をされている。

### 2. 研究の目的

本研究は抗 MuSK 抗体がこれら 2つの MuSK の機能にどのような影響を与えるかを解明する。

現在、抗 MuSK 抗体は MuSK-LRP4 間の結合を阻害し、第 1 の機能である agrin-LRP4-MuSK シグナル系を障害し AChR のクラスタリング異常を起こすと考えられている。患者血清を用いたマウスの受動免疫モデルでは AChR クラスタ数が増加し、MuSK の数が減少している。また、C2C12 筋管細胞の agrin 誘導 AChR クラスタ形成においても、抗 MuSK 抗体を培地添加すると、AChR のクラスタ数の減少が見られたことが、この仮説を支持している。一方、抗 MuSK 抗体は agrin-LRP4-MuSK のシグナル伝達の阻害ではない 4 種類の知見がある。(1) 患者の筋生検の電顕観察では、AChR は欠損しておらず、AChR 密度やシナプス後膜の形態は保たれている。(2) 抗コリンエステラーゼ剤は抗 MuSK 陽性患者に無効である。(3) 患者の MEPC 減衰時間が 2 倍に延長しており、repetitive CMAP が見られる。(4) 患者の筋生検において神経筋接合部での AChE 活性が減少している。以上の所見から抗 MuSK 抗体は ColQ-MuSK の結合を阻害し、終板 AChE 欠損症を引き起こすと考えられる。

抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症患者で筋力低下が起こる抗 MuSK 抗体の生理病態メカニズムについては、自己抗体が何かしら病態に関与しているのだが、十分に解明されていない。一方 MuSK と ColQ の結合については 2004 年に報告されて以来注目されておらず、病態への関与に関する報告はない。本研究により、ColQ が抗 MuSK 抗体の阻害分子であり、終板 AChE 欠損症を引き起こしているなら、本疾患の病態に新しい見解を提供することができる。本疾患は抗コリンエステラーゼ剤が無効の難治性疾患であり、免疫抑制剤の使用や血漿交換を行わざるを得ない。本疾患が終板 AChE 欠損症の知見が得られれば、AChE 欠損病態に有効な AChR チャンネルブロッカーである ephedrine が有効である可能性があり、新規治療法の解明につながると期待される。

### 3. 研究の方法

患者抗 MuSK 抗体が MuSK と ColQ の結合を阻害することの検証と、抗 MuSK 抗体の agrin-LRP4-MuSK シグナル伝達系に与える影響を明らかにするため、5 種類のアッセイを行う。(1) マウス筋切片に対する *in vitro* transplantation 法にて、抗 MuSK 抗体存在下で ColQ-MuSK の結合を調査する。(2) *in vitro* plate binding 法を用いて抗 MuSK 抗体の MuSK-ColQ 結合阻害実験を行う。(3) 患者抗 MuSK 抗体を用いて受動免疫マウスモデルを作成し、筋組織切片の AChE 活性染色、骨格筋中での AChE-ColQ 複合体の定量を行い、抗 MuSK 抗体の影響を調べる。(4) Agrin 存在下での LRP4 と MuSK の *in vitro* 結合実験と、MuSK-IgG の LRP4-MuSK 結合への影響を調査する。(5) MuSK 抗体の MuSK エピトープ解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト ColQ-tailed AChE はカエル NMJ・マウス NMJ に結合することが *in vitro* で示されている。そこで、*in vitro* overlay assay を用いて MuSK-IgG の ColQ-tailed AChE のマウス NMJ への結合への影響を調べた。ColQ ノックアウトマウス筋切片を MuSK-IgG と一晩反応させ、その後ヒト ColQ-tailed AChE を加え、AChR と ColQ を免疫組織染色によって観察した。Control 1 のコントロール IgG 存在下では、ColQ と AChR のシグナルの局在が一致していたが、patient 1-4 の MuSK-IgG 存在下では ColQ のシグナルはマウス NMJ に全く観察されなかった。

(2) MuSK-IgG のヒト ColQ とヒト MuSK に対する影響を定量化するために、*in vitro* plate-binding assay を行った。そのために、ヒト MuSK 細胞外ドメインに myc タグを付けた hMuSKect-myc とヒト LRP4 細胞外ドメインに FLAG タグを付けた hLRP4N-FLAG を作成した。hMuSKect-myc でコーティングしたプレートに 1 pg から 100 μg の濃度のコントロール IgG もしくは MuSK-IgG を反応させ、さらにそこに一定量の ColQ-tailed AChE を反応させた(Fig.2A)。その結果、2 つのコントロール IgG は 100 μg でも AChE 活性を抑制しなかった。それに対して、4 名の患者 MuSK-IgG では濃度が増加するほど AChE 活性が低下しており、ColQ-tailed AChE の結合量低下が示唆された(Fig.2B)。

(3) これまでに、能動免疫もしくは受動免疫 MuSK-IgG モデルマウスでは NMJ の AChR が減少することが報告されているが、ColQ-tailed AChE に対する MuSK-IgG の影響は報告されていない。そこで、control 2 と patient 2 の IgG を C57BL/6J メスマウスに

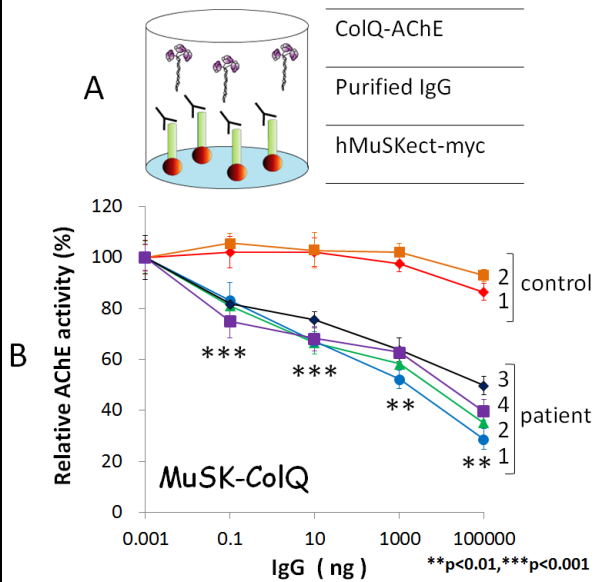


Fig.2 ColQ-MuSK 結合の定量解析 (A) *In vitro* plate-binding assay の概略図

(B) MuSK-IgG の量依存的に、プレートにコートされた hMuSKect-myc への ColQ-tailed AChE の結合は減少した。ColQ-tailed AChE の結合量は AChE 活性で定量化した。

15 日間投与し、大腿四頭筋における AChR, ColQ, MuSK, AChE の発現量を調べた。その結果、MuSK-IgG 受動免疫マウスにおいて ColQ と AChE のシグナル強度は著明に減少した。一方、AChR と MuSK のシグナル強度の減少は軽度であった。蛍光シグナルの定量解析を行ったところ、MuSK-IgG 受動免疫マウスにおける ColQ のシグナル面積、強度、密度はコントロール IgG 受動免疫マウスに対してそれぞれ 10%、9%、17%と著明な低下が認められた。それに対して、AChR のシグナル面積、強度、密度はコントロール IgG 受動免疫マウスに対してそれぞれ 66%、55%、84%と軽度な低下が認められるのみであった。AChR と MuSK の密度の減少がわずかであることから、AChR と MuSK の面積と強度の低下はマウス NMJ のサイズが小さくなったためと考えられる。さらに、AChR に対する MuSK の数が基本的に同じであるのに対して、ColQ の数は明らかに少なかった。以上のことから、MuSK-IgG は ColQ-tailed AChE の NMJ への結合を阻害すること、また NMJ のサイズを小さくすることにより MuSK と AChR の発現量を軽度抑制することが示された。

(4) MuSK 抗体の MuSK-LRP4 結合への影響を *in vitro* plate binding assay にて解析した。hMuSK ect (extracellular domain)-myc と hLRP4ect-FLAG を精製し、hMuSK をプレートに結合した。agrin, LRP4 を加え、MuSK 抗体の MuSK-LRP4 結合阻害を定量

した。その結果、5名の患者のMuSK抗体は量依存的にMuSK-LRP4結合を阻害した。MuSK抗体はMuSK-ColQ結合を阻害するのみならずMuSK-LRP4結合も阻害することが証明された。

(5) hMuSKect-myc から各Igを欠失させた4つのコンストラクト(Ig1, Ig2, Ig3, Ig4)を作成し、それぞれタンパクを精製した。MuSK抗体の各欠失hMuSKectへの結合能を*in vitro* plate binding assayにより定量した。その結果、3名のMuSK抗体でIg1への結合が有意に減少し、5名全てのMuSK抗体でIg4への結合が有意に減少した。つまり、MuSK抗体はIg1とIg4を認識している。LRP4はMuSKのIg1と結合することが報告されているが、Patients 4, 5の結果より、LRP4はIg4とも結合することが示唆された。

以上の実験結果から、患者MuSK抗体はMuSK-ColQ結合を阻害するのみならずMuSK-LRP4結合も阻害することが証明された。また、MuSK抗体はIg1とIg4を認識していた。LRP4はMuSKのIg1と結合することが報告されており、MuSK抗体がIg1と結合することによりLRP4が結合阻害を受けると結論づけられる。

#### 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20件)

Ohkawara, B., Cabrera-Serrano, M., Nakata, T., Milone, M., Asai, N., Ito, K., Ito, M., Masuda, A., Ito, Y., Engel, A. G. and Ohno, K. LRP4 third -propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated musk signaling in a position-specific manner, *Hum. Mol. Genet.* (in press) 査読有り (2014)  
Mano, Y., Kotani, T., Ito, M., Nagai, T., Ichinohashi, Y., Yamada, K., Ohno, K., Kikkawa, F. and Toyokuni, S. Maternal molecular hydrogen administration ameliorates rat fetal hippocampal damage by in utero ischemia-reperfusion, *Free Radic. Biol. Med.* (in press) 査読有り (2014)  
Takamatsu, A., Ohkawara, B., Ito, M., Masuda, A., Sakai, T., Ishiguro, N. and Ohno, K. Verapamil protects against cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting Wnt/ -catenin signaling, *PLOS ONE* (in press) 査読有り (2014)  
Ohno, K., Ito, M. and Kawakami, Y. Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia

and for dissecting the mechanisms of anti-MuSK myasthenia gravis. *J. Mol. Neurosci.* (in press) 査読有り (2014)  
Matsushita, M., Kitoh, H., Ohkawara, B., Mishima, K., Kaneko, H., Ito, M., Masuda, A., Ishiguro, N. and Ohno, K. (2013) Meclozine facilitates proliferation and differentiation of chondrocytes by attenuating abnormally activated FGFR3 signaling in achondroplasia. *PLoS ONE*, 8(12): e81569 査読有り  
Rahman, M. A., Masuda, A., Ohe, K., Ito, M., Hutchinson, D. O., Mayeda, A., Engel, A. G. and Ohno, K. (2013) HnRNPL and hnRNPLL antagonistically modulate PTB-mediated splicing suppression of CHRNA1 pre-mRNA, *Sci. Rep.* (3):2931 査読有り  
Nakata T, Ito M, Azuma Y, Otsuka K, Noguchi Y, Komaki H, Okumura A, Shiraishi K, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Ohno K. Mutations in the C-Terminal Domain of ColQ in Endplate Acetylcholinesterase Deficiency Compromise ColQ-MuSK Interaction. *Hum Mutat.* 2013 34 (7): 997-1004. 査読有り  
Iio A, Ito M, Itoh T, Terazawa R, Fujita Y, Nozawa Y, Ohsawa I, Ohno K, Ito M. Molecular hydrogen attenuates fatty acid uptake and lipid accumulation through downregulating CD36 expression in HepG2 cells. *Med Gas Res.* 2013 Mar 1;3(1):6. 査読有り  
Yamamoto R, Matsushita M, Kitoh H, Masuda A, Ito M, Katagiri T, Kawai T, Ishiguro N, Ohno K. Clinically applicable antianginal agents suppress osteoblastic transformation of myogenic cells and heterotopic ossifications in mice. *J Bone Miner Metab.* 2013 Jan;31(1):26-33. 査読有り  
Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Krejci E, Engel A.G Specific binding of collagen Q to the neuromuscular junction is exploited to cure congenital myasthenia and to explore bases of myasthenia gravis *Chem Biol Interact.* 2013 25;203(1):335-340. 査読有り  
Yamashita Y, Matsuura T, Shinmi J, Amakusa Y, Masuda A, Ito M, Kinoshita M, Furuya H, Abe K, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. Four parameters increase the sensitivity and specificity of the exon array analysis and disclose 25 novel aberrantly spliced exons in myotonic dystrophy. *J Hum Genet.* 2012 57(6):368-74. 査読有り

Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K Protein-anchoring strategy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. *Molecular Therapy* 2012 20 (7):1384-1392 査読有り  
Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, Ohno K CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay, *Scientific Reports* 2012; 2: 209. 査読有り  
Ito M, Hirayama M, Yamai K, Goto S, Ito M, Ichihara M and Ohno K Drinking hydrogen water and intermittent hydrogen gas exposure, but not lactulose or continuous hydrogen gas exposure, prevent 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats *Medical Gas Research* 2012 2:15 査読有り  
Hirayama M, Nakamura T, Watanabe H, Uchida K, Hama T, Hara T, Niimi Y, Ito M, Ohno K, Sobue G. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine correlate with hallucinations rather than motor symptoms in Parkinson's disease, *Parkinsonism Relat Disord* 2012 17: 46-49 査読有り  
Ito M, Ibi T, Sahashi K, Ichihara M, Ito M, Ohno K. Open-label trial and randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of hydrogen-enriched water for mitochondrial and inflammatory myopathies. *Medical Gas Research* 2011 1:24. 査読有り  
Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, Nishida H, Mabuchi N, Engel A.G, Ohno K Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology* 2011 77(20):1819-26 査読有り  
Kaneko H, Kitoh H, Matsuura T, Masuda A, Ito M, Mottes M, Rauch F, Ishiguro N, Ohno K Hyperuricemia cosegregating with osteogenesis imperfecta is associated with a mutation in *GPATCH8*. *Human Genetics* 2011 130(5):671-683 査読有り  
Itoh T, Hamada N, Terazawa R, Ito M, Ohno K, Ichihara M, Nozawa Y, Ito M. Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon c-induced nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 411:143-149 査読有り  
Fu Y, Masuda A, Ito M, Shinmi J, Ohno K AG-dependent 3'-splice sites are predisposed to aberrant splicing due to a mutation at the first nucleotide of an exon. *Nucleic Acids Res*. 2011 39: 4396-4404 査

読有り

〔学会発表〕(計4件)

Mutations in the C-terminal domain of ColQ in endplate acetylcholinesterase deficiency compromise ColQ-MuSK interaction  
Ito M, Nakata T, Azuma Y, Otsuka K, Noguchi Y, Komaki H, Okumura A, Shiraishi K, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Ohno K XIV International symposium on Cholinergic Mechanisms 2013 May 6, Hangzhou China ポスター発表  
Protein-anchoring therapy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K. 11th Cholinesterase meeting 2012 June 7 Kazan Russia ポスター発表  
水素水飲用をシミュレーションする水素ガス間欠投与は、水素ガス持続投与よりもパーキンソンモデルラットに対して有効である 伊藤美佳子、市原正智、伊藤雅史、大野欽司 2012 2月9日 第3回分子状水素医学シンポジウム 北里大学薬学部コンベンションホール 東京都港区 口頭発表  
PROTEIN-ANCHORING THERAPY FOR DELIVERING ACETYLCHOLINESTERASE TO THE NEUROMUSCULAR JUNCTION Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K 2011 7月16日 日本遺伝子治療学会 九州大学医学部百年講堂 福岡市 ポスター発表

〔図書〕(計1件)

Kinji Ohno, Mikako Ito, Andrew G. Engel (2012) *Myopathy*, InTech (ISBN 978-953-51-0696-8) Congenital Myasthenic Syndromes – Molecular Bases of Congenital Defects of Proteins at the Neuromuscular Junction – 270 (175-200)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 美佳子 (Mikako Ito)

名古屋大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：60444402

(2)研究分担者 なし