

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790904

研究課題名(和文) 生物発光を利用した重症筋無力症関連自己抗体の包括的測定法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the comprehensive assay of myasthenia gravis-related autoantibody using bioluminescence

研究代表者

白石 裕一 (SHIRAIISHI, Hirokazu)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：40423644

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)：我々は、従来法とは異なるカイアシルシフェラーゼ免疫沈降法(GLIP法)を利用した重症筋無力症自己抗体測定法の開発を計画した。MuSK抗体測定については従来法と同様の結果が得られたが、AChR抗体測定は十分に検出感度がすぐれているとは言えなかった。これと並行し、cell based assayによる高感度抗AChR抗体、MuSK抗体測定法にも着手し、Oxford大学の協力のもと測定環境が整った。

研究成果の概要(英文)：We planned the establishment of myasthenia gravis-related antibody using Gaussia luciferase Immunoprecipitation (GLIP), different from the conventional RIA method. MuSK antibody assay was successful as well as the conventional method, however, we could not detect AChR antibody sufficiently. We also set up cell-based assay in corporation with University of Oxford.

研究分野：神経内科学

キーワード：重症筋無力症 アセチルコリン受容体抗体 MuSK抗体

## 1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) は神経筋接合部に対する自己抗体により、その神経筋伝達が障害される自己免疫疾患であり、その代表的な病因はアセチルコリン受容体 (AChR) に対する自己抗体である。

抗 AChR 抗体の検出には

radioimmunoprecipitation assay (RIA) 法が汎用されてきたが、最近 RIA 法の検出感度を上回る cell-based assay (CBA) が注目されている。高感度抗 AChR 抗体測定法により全身型 seronegative MG の約 70% が affinity の低い抗 AChR 抗体をもつことが示された。現時点では、多くの

seronegative MG 症例は affinity の低い抗 AChR 抗体が原因となる MG と抗 MuSK 抗体、および抗 Lrp4 抗体陽性 MG に分類され、患者血清を用いてこれらの抗体を検出できれば、MG 患者の大部分が診断可能となる。

現在、高感度抗 AChR 抗体測定は Oxford 大学が唯一の測定機関であり、間接蛍光染色法による抗体測定法が用いられている。しかしながら、海外への検体送付、結果判定までにはどうしても長い期間が必要である。またこの測定法には定量性に乏しいという欠点がある。すなわち、診断には有用であるが、治療効果の判定には適していないとも推測される。抗 MuSK 抗体、抗 Lrp4 抗体は本邦でも測定可能ではあるが施設が異なっている。このため seronegative MG の診断のために計 3 施設へ貴重な検体を送付する必要があり、本邦で集約的に測定できる施設が切望されている。

## 2. 研究の目的

本研究では抗体検出に関する基盤技術として、海洋性プランクトン・カイアシ (Gausia princeps) 由来の分泌性ルシフェラーゼを利用した簡便かつ高感度な抗体検出法を採用する。

本法は、連携研究員である樋口が独自に

開発した新しい抗体検出法であり、これを用いて重症筋無力症の新規自己抗体である抗 Lrp4 抗体を世界に先駆けて発見した (Higuchi et al. Ann. Neurol. 2011)。抗 MuSK 抗体の検出においても汎用されている RIA 法と比較した結果、本法が検出感度が約 50 倍も優れていることをすでに報告している (Higuchi et al. Ann. Neurol. 2011)。

本研究では上記方法を用い、感度が高く、簡便で定量可能な新しい抗 AChR 抗体測定法を確立する。

さらに抗 MuSK 抗体、抗 Lrp4 抗体を一括して測定し、seronegative MG の早期診断を行い、その臨床像を明らかにする。

## 3. 研究の方法

ヒト AChR 1 の C 末端に GL が融合したりポーター (AChR 1-GL) を作成する。次に、AChR 1-GL 発現ベクターをヒト胎児腎臓由来株細胞 HEK293 に遺伝子導入し、AChR 1-GL を強制発現させる。引き続き、AChR 1-GL 発現細胞を適切な界面活性剤 (Triton など) で可溶化した後に適切なカラム操作を行い、AChR 1-GL を精製する。精製した AChR 1-GL、ヒト血清、そしてプロテイン G セファロースの三者を混合し、カイアシルシフェラーゼ免疫沈降を実施する。免疫沈降物中に含まれる AChR 1-GL 活性をルミノメーターにより測定し、得られた発光量を基にヒト血清中の抗 AChR 抗体量を算定する。同様の手法を用いて、MuSK 抗体および Lrp4 抗体測定も行う。

高感度抗 AChR 抗体測定法について、収集された検体をもとに感度、特異度、再現性などの評価を行う。

従来の RIA 法による抗 AChR 抗体測定法と抗体価の比較を行い、特にその検出感度の優位性について確認する。

## 3. 研究成果

AChR 抗体測定については、各 AChR サブユニットに関するリポーターの作製を行った。次に AChR サブユニット特異的リポーター発現ベクターをヒト細胞株・293F に遺伝子導入し、その発現を生化学的に確認すると

ともに、GL 活性の確認を行った。各 AChR サブユニットに対する既製抗体を入手し、各リポーターを使用した GLIP を実施し、GLIP 法が成立する確認作業に取り組んだ。しかしながら、十分に検出感度がすぐれているとは言えなかった。

GLIP 法による MuSK 抗体測定は、健常人 62 名、RIA 法にて抗 MuSK 抗体陽性と判定された MG 患者 29 名、抗 AChR 抗体陽性 MG 患者 30 名を対象とし測定を行った。健常者群、AChR 抗体陽性群ではすべて陰性で、MuSK 抗体陽性群全例で同様に陽性となった。RIA 法と GLIP 法のそれぞれの測定結果を比較し、相関係数を算出した結果、 $R^2=0.5228$  となり、正の相関が確認された。この結果、GLIP 法を用いた MuSK 抗体測定法は従来の RIA 法とほぼ同等の測定感度、精度があると考えられた。

(この結果は第 53 回日本神経学会学術大会にて、発表を行った)

これと並行し、最終年度は cell based assay による高感度抗 AChR 抗体、MuSK 抗体測定法に着手した。具体的には、HEK293 細胞に AChR の各サブユニットと AchR のクラスタリングを誘導するラブシンを transfection し、細胞表面に AChR を高密度に発現させる、患者血清を加え、ホルマリンで固定後、二次抗体を加える、蛍光顕微鏡で評価を行う。これについては、Oxford 大学の協力のもと測定環境が整った。

MG に関する多施設共同研究グループである Japan MG registry (JAMG-R) の国内 11 施設に通院中の 539 例の連続症例で、RIA 法で AChR 抗体、MuSK 抗体いずれも陰性であった seronegative MG (SNMG) 65 例の血清を用いて、Oxford 大学の協力のもと、Cell based assay 法による MuSK 抗体測定を行っ

た。SNMG 患者 65 例のうち、MuSK 抗体は 3 例で Cell based assay 法で陽性であった。RIA 法で陽性の 15 例 (2.7%) と合わせ MuSK 抗体陽性症例は 18 例 (3.3%) となった。3 例のうち 2 例は女性、1 例は男性で、内 2 例の症例で球麻痺症状を伴っていた。MGFA は 2 と軽症でクリーゼは全例で見られず、胸腺腫合併はなかった。CBA 法により、これまで RIA 法で検出出来なかった MuSK 抗体を検出できることが判明した。

(この結果は、第 112 回日本内科学会総会にて、発表を行った)。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

白石裕一 樋口理 中根俊成  
本村政勝 柘田智子 松尾秀徳  
生物発光を利用した重症筋無力症関連自己抗体測定法の確立  
第 53 回日本神経学会学術大会  
平成 24 年 5 月 22 ~ 25 日、東京国際フォーラム (東京都)

長岡 篤志, 白石 裕一, 中田 るか, 檜澤 公明, 長根 百合子, 鈴木 重明, 村井 弘之, 本村 政勝, 川上 純, 辻野 彰  
Cell based assay を用いた高感度 MuSK 抗体測定法の臨床的意義: JAMG-R 多施設共同コホート研究  
第 112 回日本内科学会総会  
平成 27 年 4 月 10 ~ 12 日、みやこめっせ (京都府)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 裕一 (SHIRAIISHI, Hirokazu)  
長崎大学・病院 (医学系)・講師  
研究者番号: 40420904

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

樋口 理 (HIGUCHI, Osamu)  
国立病院機構長崎川棚医療センター・  
臨床研究部・研究員  
研究者番号: 50361720

本村政勝 (MOTOMURA, Masakatsu)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・  
客員研究員  
研究者番号: 70244093