

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461273

研究課題名(和文)重症筋無力症の骨格筋細胞内反応と病態に関する研究

研究課題名(英文) Intracellular Reaction of Skeletal Muscle in Myasthenia Gravis

研究代表者

岩佐 和夫 (Iwasa, Kazuo)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：10345613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：重症筋無力症(MG)患者の骨格筋において筋細胞内反応が機能していることを明らかにした。MGの病態解明と治療においてこの反応が重要であることを示した。

MGでは、骨格筋内において小胞体ストレス応答が働いており、骨格筋における免疫反応の調整および筋保護作用、また、筋再生のための情報伝達が行われている可能性を示した。さらに、MGの骨格筋において筋修復過程で見られる蛋白の発現亢進や骨格筋の再生に欠かせない筋芽細胞の活性化が、MG患者の骨格筋において機能していた。

つまり、MGでは障害された骨格筋の修復過程に筋細胞内反応が深く関わっており、MGの病態解明のためにさらなる研究が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In myasthenia gravis (MG), intracellular reaction of muscle was important for pathology and medication. We evaluated GRP78 (ER stress protein) upregulation in muscle with MG. ER stress in muscle is important for repair after injury. Upregulation of GRP78 in MG muscle plays an important role in muscle repair and improvement. An increase of GRP78 also plays immunoregulatory roles in MG, such as serving as a defense mechanism against immunological attack and modulating the immune system itself. Some MG muscles showed patchy/scarce caveolin-3 distribution. Partial loss of caveolin-3 expression was relatively common in MG. Caveolin-3 levels were higher in MG vs. non-myogenic patient. Caveolin-3 upregulation may be required for restoring MG muscle.

In summary, MG might have damage not only in the neuromuscular junction, but also in muscle intracellular areas. Our findings may help to understand the muscle response in MG. However, more studies are needed for elucidating the mechanisms.

研究分野：神経内科

キーワード：重症筋無力症 抗アセチルコリン受容体抗体 骨格筋 神経筋接合部 小胞体ストレス応答 カベオリン3 骨格筋再生機能 骨格筋免疫応答

1. 研究開始当初の背景

(1) 重症筋無力症 (MG) は神経筋接合部における標的抗原と自己抗体との反応が病態の本質であるが、自己免疫反応の背景に存在する骨格筋細胞内にも病態に關与する要因が存在すると仮定した。抗アセチルコリン受容体抗体は病態に關与する抗体であるが、抗体価と筋力低下などの病態は關連しない。神経筋接合部異常を電気生理学的に判断する反復神経誘発電位にて高度に減衰現象が見られても、筋力低下が見られない症例がある。逆に、減衰現象が見られないのに、著明な筋力低下をきたす症例がある。これらは、神経接合部以外に筋力低下に關わる部位があることを示しており、その場は骨格筋内である可能性が考えられる。

(2) MG 骨格筋では主要組織適合抗原複合体 (MHC class II) が発現しており、骨格筋そのものが抗原提示に關わる可能性が示されている。高齢発症 MG では胸腺は退縮脂肪化しており、胸腺が抗体産生に關与している可能性は低く抗体産生の場が解明されていない。また、高齢者 MG では骨格筋蛋白に対する自己抗体が出現する。これらは、胸腺のみでなく骨格筋にも抗原提示機能がある可能性を示していると考えられる。臨床症状が消失した寛解状態でも自己抗体は存在し神経筋接合部における抗原抗体反応は起きているが、寛解状態は如何に維持されているのか。治療効果には個人差があるが、筋力改善や抗体産生に影響を与える因子が存在しているのか。破壊された神経筋接合部の修復を促している反応はあるのか。これらを解く鍵も骨格筋にあると考える。

2. 研究の目的

重症筋無力症 (MG) の骨格筋細胞内反応およびこの反応が關与する MG の病態の解析を行い、MG の疾患背景に筋細胞内反応が深く關わっていることを解明する。

3. 研究の方法

(1) 対象：重症筋無力症 15 例、疾患コントロール 5 例の生検筋を用いて解析をおこなった。金沢大学医学倫理審査委員会の承認をえ

た研究計画に基づき、MG 患者の同意を得た上で胸腺摘除術の際に大胸筋の一部を採取した。疾患コントロールとして、骨格筋に所見を認めない感覚性末梢神経障害の患者等の生検筋を用いた。

(2) 方法：骨格筋の一般染色を行うとともに、骨格筋での蛋白発現を見るために免疫染色をおこなった。

骨格筋内の蛋白量を定量するため、骨格筋より蛋白を抽出し、ウェスタンブロットをおこなった。

発現の亢進している蛋白については、骨格筋細胞内での mRNA の発現について調べた。

この研究では、小胞体ストレス応答や免疫機能に關わる GRP78 蛋白および膜蛋白の輸送や骨格筋機能の維持、再生に關与するカベオリン-3 蛋白について検討した。

4. 研究成果

(1) MG 骨格筋において GRP78 に対する免疫染色を行ったところ、MG 骨格筋では GRP78 が筋細胞膜のみでなく細胞質内においても発現が亢進している症例が確認された。

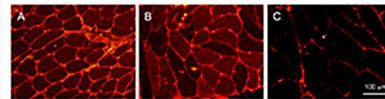


図 1. MG 骨格筋における GRP78 の発現
(A) 筋炎、(B) 重症筋無力症、(C) 末梢神経障害
(J.Neuroimmunol, 2014 より)

(2) MG 骨格筋において GRP78 蛋白の mRNA の発現についても検討したところ、MG 骨格筋ではこの mRNA の発現も亢進していることが確認できた。

(3) GRP78 蛋白は、小胞体ストレス応答によりその発現が亢進することが報告されている。MG 骨格筋にて認められた GRP78 蛋白の発現亢進は、小胞体ストレス応答により誘導された可能性が考えられ、MG 骨格筋における神経筋接合部の障害が MG 骨格筋にも影響を及ぼしていると考えられた。骨格筋における GRP78 の発現は、障害を受けた骨格筋細胞の排除、または保護に關与している可能性が考えられた。さらに GRP78 蛋白の機能の一つとして免疫制御機能があり、MG の免疫学的な調

整機能と骨格筋における細胞内反応との関連について考察する上で興味もたれ、さらなる研究が必要と考えられた。

(4) MG 骨格筋においてカベオリン-3 蛋白の発現について検討したところ、一部の MG 骨格筋ではカベオリン-3 の筋細胞膜への発現が欠損している症例が認められた。

(5) 一方、カベオリン-3 の筋細胞膜への発現が亢進している部位も確認された。カベオリン-3 の発現が亢進している MG 症例は、カベオリン-3 の筋細胞膜への発現が欠落している症例でも認められた。

(6) MG 骨格筋におけるカベオリン-3 蛋白および mRNA の発現について調べたところ、MG 骨格筋ではカベオリン-3 の蛋白量や mRNA の発現が亢進していた。

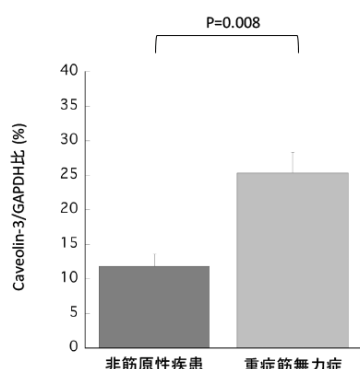


図2. 重症筋無力症骨格筋におけるカベオリン蛋白の発現亢進(ウェスタンブロットによる解析)

(7) カベオリン-3 は膜タンパクをゴルジ体から細胞膜に輸送する際に機能することがわかっており、輸送される蛋白にはアセチルコチン受容体や MuSK 蛋白も含まれる。重症筋無力症では、ゴルジ体から膜に輸送された時点で抗アセチルコチン受容体抗体と膜に発現したアセチルコチン受容体が反応し変性する過程でカベオリン-3 も巻き込まれ、カベオリン-3 の脱落が発生した可能性がある。

(8) カベオリン-3 は、筋芽細胞が筋細胞に分化する際に機能することも報告されている。MG の骨格筋では、カベオリン-3 の発現が亢進しており、神経筋接合部の障害を修復する過程で筋芽細胞の分化が誘導され、カベオリン-3 の発現が亢進している可能性が考

えられた。

(9) GRP78 蛋白やカベオリン-3 蛋白は、骨格筋を保護する機能も有している。MG の骨格筋において、これらの蛋白の発現が亢進していることから、MG の骨格筋では筋細胞への障害を細胞内部から保護する機能が働いている可能性も考えられた。

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 1 件)

1. Iwasa K, Nambu Y, Motozaki Y, Furukawa Y, Yoshikawa H, Yamada M. Increased skeletal muscle expression of the endoplasmic reticulum chaperone GRP78 in patients with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 273:72-76, 2014 (査読あり)

[学会発表](計 5 件)

1. 岩佐和夫、吉川弘明、古川裕、山田正仁：重症筋無力症における骨格筋融合シグナル蛋白 mRNA の発現亢進について。第 57 回日本神経学会学術大会、神戸、2016.5.18
2. Kazuo Iwasa, Yutaka Furukawa, Hiroaki Yoshikawa, Masahito Yamada
The partial loss and irregular overexpression of caveolin-3 in muscle cell membrane is detected in myasthenia gravis patients. Myology 2016 - 5th International Congress of Myology, Lyon, France, March 14-19, 2016
3. 岩佐和夫、吉川弘明、古川裕、山田正仁：重症筋無力症における骨格筋融合シグナル蛋白 mRNA の発現亢進について。第 27 回日本神経免疫学会、岐阜、2015.9.15-16
4. 岩佐和夫、吉川弘明、古川裕、山田正仁：重症筋無力症骨格筋における caveolin-3 の発現について。第 56 回日本神経学会学術大会、新潟、2015.5.20

5. 岩佐和夫、吉川弘明、古川裕、山田正仁：重症筋無力症骨格筋における caveolin-3 の発現について。第 26 回神経免疫学会、金沢、2014.9.4-6
6. Iwasa K, Nambu Y, Motozaki Y, Furukawa Y, Yoshikawa H, Yamada M: Increased skeletal muscle expression of the endoplasmic reticulum chaperone GRP78 in patients with myasthenia gravis. 13th International Congress on Neuromuscular Disease, Nice France, July 5-10,2014

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩佐 和夫 (IWASA, Kazuo)
金沢大学・医薬保健研究域医学系・准教授
研究者番号：10345613

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

吉川 弘明 (YOSHIKAWA, Hiroaki)
金沢大学保健管理センター・教授
研究者番号：10272981

(4)研究協力者

古川 裕 (FURUKAWA, Yutaka)
本崎 裕子 (MOTOZAKI, Yuko)