

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461305

研究課題名(和文)自己免疫性自律神経節障害における自己抗体測定系の確立と臨床像解析

研究課題名(英文)Clinical features of autoimmune autonomic ganglionopathy and the detection of subunit-specific autoantibodies to the ganglionic acetylcholine receptor in Japanese patients

研究代表者

中根 俊成 (Nakane, Shunya)

熊本大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：70398022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性自律神経節障害(AAG)では自律神経節におけるアセチルコリン受容体(gAChR)に対する自己抗体が陽性になることが知られている。自律神経節に存在するAChRは3サブユニットと4サブユニットから構成され、交感神経・副交感神経いずれにおける節前後線維のシナプス伝達を仲介する。われわれはルシフェラーゼ免疫沈降システム(LIPS)による新規の抗gAChR抗体測定系を確立した。臨床像解析では起立性低血圧を初発症状とするものが多く、自律神経障害として頻度の高いものは消化管障害、起立性低血圧・起立不耐、排尿障害である。自律神経系外症状として内分泌障害や精神症状などに注意する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune autonomic ganglionopathy (AAG) is a rare acquired channelopathy that is characterized by pandysautonomia, in which autoantibodies to ganglionic nicotinic acetylcholine receptors (gAChR) may play a central role. Here, we developed luciferase immunoprecipitation systems (LIPS) to diagnose AAG based on IgGs to both the 3 and 4 gAChR subunits in patient serum. We reviewed the serological and clinical data of 50 Japanese patients who were diagnosed with AAG. With the LIPS testing, we detected anti-3 and -4 gAChR antibodies in 48% (24/50) of the patients. A gradual mode of onset was more common in the seropositive group than in the seronegative group. Patients with AAG frequently have orthostatic hypotension and upper and lower gastrointestinal tract symptoms, with or without anti-gAChR. In addition, we found a significant overrepresentation of endocrinological abnormalities as an occasional complication of AAG.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経内科学 神経免疫学 自律神経系 自己抗体

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性自律神経節障害 (AAG) はこれまで様々な病名で呼ばれ、疾患そのものの最初の報告は 1967 年にまで遡ることができる。しかし、この疾患が特異的自己抗体の介在する疾患であることが明らかになったのは 2000 年に Vernino らが報告したことによる (Vernino et al. N. Engl. J. Med. 343: 2000)。以降、同研究者のグループを中心としてその病態解析がなされている。特異的自己抗体である抗 ganglionic AChR 抗体測定も同研究者のグループによって開発・施行されており、世界中から検体が収集されている。本邦の症例も、測定を依頼しており、検体は郵送されている。当施設でも AAG の症例を経験しているが、診断にあたっては抗 ganglionic AChR 抗体測定が必要であり、米国の Vernino 研究室に検体を送付した。結果は陽性であり、その後の診療、とくに免疫治療を施行するにあたっては重要かつ有益な情報であったが、測定結果報告までには長い日数を要していた。海外への検体送付、米国内施設への測定依頼集中による結果判明までの長時間待機は時間的連続性が必要である臨床診療に即しているとは考えにくい。

AAG では約半数の症例に自律神経節に存在する ganglionic AChR に対する自己抗体が検出されることが報告されている。これまでもこの自己抗体が AAG の病因であることを証明する in vitro 実験が報告されている。ヒト培養細胞である IMR-32 細胞を用いて、パッチクランプ法により ganglionic AChR 電流を記録し、AAG 患者由来 IgG を加えた場合の電流の変化を調べる実験だ。結果としては、7 例の AAG 患者 IgG すべてがこの電流を抑制し、その効果は濃度依存性、

かつ温度依存性であった。一方、健常者や疾患対照 IgG ではこの抑制効果は認められなかった。つまり患者 IgG が AAG の原因である可能性が示唆され、ganglionic AChR の機能変化がその病態であると考えられた。抗 ganglionic AChR 抗体は病態に関わる重要な血清学的マーカーと言える。AAG では交感神経系・副交感神経系による症状のほか、腸管自律神経症状も呈すると報告されており、臨床症状は多彩であることから診断にしばしば苦慮する。血清学的マーカーを高い感度と特異性で、迅速に測定できるかがどこまで診断に寄与できるかが臨床的に重要である。

2. 研究の目的

われわれが独自に開発した自己抗体検出システムを利用し、安全、簡便、高感度、且つ定量性を担保できる新しい抗 ganglionic AChR 抗体検出技術を開発する。AAG に関するよりスピーディで正確な抗体診断法の確立を目指し、そして AAG の臨床像を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 検体収集

AAG の臨床診断は現時点では鑑別によるところが大きい。広範な自律神経障害を来す症例より採血を行い、それによって得られた血清が検体となる。検体収集は当院を中心として長崎県下の神経内科を有する計 10 施設でスタートしたが、現在では全国規模での検体依頼も受け付けている。臨床的に AAG が疑われる症例の血清における自己抗体の測定がまず行われるべきであるが、測定対象を AAG だけに限定すべきではなく、

- 自律神経障害を呈するニューロパチー
- 重症筋無力症などの神経筋接合部疾患
- シェーグレン症候群など膠原病に併発

するニューロパチー

● 悪性腫瘍に併発するニューロパチー

は病態の異同を議論されており測定は行う必要がある。また神経変性疾患の診断がなされている症例，原因不明の自律神経症状（起立性低血圧，腸閉塞など）を呈している症例も測定の対象となり得る。

2) カイアシルシフェラーゼ免疫沈降法を利用した抗 ganglionic AChR 抗体検出系の確立

新しいタンパク質間相互作用解析法であるこの自己抗体測定系はすでに確立できており，その方法は下記に示す。今後もこの抗体測定系のチューンアップを必要に応じて行っていきたいと考えている。ヒト AChR α 3 サブユニットに対する抗体を測定する場合，まず，ヒト AChR α 3 の C 末端に GL が融合したりポーター(AChR α 3-GL)を作成する。次に，AChR α 3-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 α 3-GL を強制発現させる。引き続き，AChR α 3-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 α 3-GL を精製する。精製した AChR α 3-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 α 3-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 ganglionic AChR 抗体量を算定する（カットオフ値は健常人血清にて決定）。

同様の方法論でヒト AChR α 4 サブユニットに対する抗体も測定可能である。

3) 臨床像解析

臨床像は発症年齢，性別，臨床経過，自律神経症状，随伴する神経症状，自律神経機能検査などの諸検査結果，導入された治療に対する反応性（免疫治療・対症療法）について検討することを計画している。当院における

測定申込書は測定依頼と調査票を兼ねており，この文書への記入・集積・検討が臨床像解析につながる。

4. 研究成果

亜急性から慢性までさまざまな経過パターンがある。抗 gAChR 抗体陽性 AAG 症例でも急性～亜急性と慢性の経過両方が存在する。本邦における抗 gAChR 抗体陽性 AAG 症例では起立性低血圧を初発症状とするものが多い。最終的に呈する自律神経障害として頻度の高いものから順に述べると，消化管障害（特に便秘），起立性低血圧・起立不耐，排尿障害（特に尿閉），発汗障害，眼球および/もしくは口腔内の乾燥，である。これら広範な自律神経障害をきたす症例もあればごく部分的な自律神経障害しかきたさない症例もある。発作性咳嗽も一部のケースで認められる。アカラシアを呈していた症例も存在し，いまだ原因不明の自律神経障害とされている本症における抗 gAChR 抗体の関与について検討する必要がある⁶⁾。他の神経学的診察所見では筋力や深部腱反射などは正常であることが多いが，感覚障害を訴えるケースが一定の割合で存在するのは AAG という疾患概念を考慮する上で重要かつ興味深い。他覚的感覚障害よりも自覚的な感覚障害として「チクチクする」「ジンジンする」などのしびれ感を訴える症例があり，AASN の疾患概念との連続性を考えると今後の研究課題である。また本邦の AAG では emotional instability や childish behavior などの精神症状の発現が報告されている。抗 gAChR 抗体陽性 AAG 症例においてもアパシーや認知様様の症状を呈するケース、上述のような精神症状をきたす症例など中枢神経系症状を呈することが経験されている。神経系外の症状もしくは合併しやすい疾患としては下記の3つを挙げておく必要がある

う .

内分泌症状の出現:これまでの抗体陽性 AAG では無月経や抗利尿ホルモン不適合分泌症候群, 汎下垂体機能低下の合併がある. これらは丁寧な病歴の聴取や電解質をはじめとして血液生化学的検査におけるスクリーニングで疑われる場合がある .

膠原病など自己免疫・炎症を背景とする疾患の合併: 抗体陽性 AAG と抗体陰性症例 (AAG もしくは AAG が疑われるもの) では自己免疫疾患合併の頻度が有意に異なる . 抗体陽性 AAG ではシェーグレン症候群に始まり, 全身性エリテマトーデス, 関節リウマチ, 強皮症などの代表的な膠原病のほかにも原発性胆汁性肝硬変, 橋本病やバセドウ病などの甲状腺疾患, サルコイドーシスなどの合併症例がある. 神経疾患でも視神経脊髄炎や stiff person 症候群で自律神経障害を呈し, さらに本抗体陽性を示した症例も存在し, 自己免疫を背景とする疾患との合併があり得ることを示している .

悪性腫瘍の合併: 傍腫瘍性神経症候群の一部に自律神経障害を呈するケースがあるのはすでに知られているが, 著者らの測定経験においても肺小細胞癌や卵巣腫瘍の併発例がある. 悪性腫瘍の検索も重要であることが示唆される .

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 5 件)

1. Nakane S, Higuchi O, Koga M, Kanda T, Murata K, Suzuki T, Kurono H, Kunimoto M, Kaida K, Mukaino A, Sakai W, Matsuo H. Clinical features of autoimmune autonomic ganglionopathy and detection of subunit-specific autoantibodies to the

ganglionic acetylcholine receptor in Japanese patients. *PLoS One*. 10: e0118312, 2015

2. Kuki I, Kawawaki H, Okazaki S, Hattori Y, Horino A, Higuchi O, Nakane S. Autoimmune autonomic ganglionopathy in a pediatric patient presenting with acute encephalitis. *Brain Dev*. 2015 Dec 28. pii: S0387-7604(15)00277-6.
3. Maeda Y, Migita K, Higuchi O, Mukaino A, Furukawa H, Komori A, Nakamura M, Hashimoto S, Nagaoka S, Abiru S, Yatsunami H, Matsuo H, Kawakami A, Yasunami M, Nakane S. Association between Anti-Ganglionic Nicotinic Acetylcholine Receptor (gAChR) Antibodies and HLA-DRB1 Alleles in the Japanese Population. *PLoS One*. 2016 Jan 25;11(1):e0146048
4. Mukaino A, Nakane S, Higuchi O, Nakamura H, Miyagi T, Shiroma K, Tokashiki T, Fuseya Y, Ochi K, Umeda M, Nakazato T, Akioka S, Maruoka H, Hayashi M, Igarashi SI, Yokoi K, Maeda Y, Sakai W, Matsuo H, Kawakami A. Insights from the ganglionic acetylcholine receptor autoantibodies in patients with Sjögren's syndrome. *Mod Rheumatol*. 2016 2:1-8.
5. Nakane S, Higuchi O, Hamada Y, Maeda Y, Mukaino A, Sakai W, Kusunoki S, Matsuo H. Ganglionic acetylcholine receptor autoantibodies in patients with Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol*. 2016;295-296:54-9

[学会発表] (計 3 件) * 最終年度のみ

1. 中根俊成, 樋口理, 前田泰宏, 松屋合歓, 権藤雄一郎, 永石彰子, 福留隆泰, 安東由喜雄, 松尾秀徳. 抗 ganglionic アセチルコリン受容体抗体による自律神経節障

害について .第 112 回日本内科学会 ,Apr 12 , 2015 , 京都

2. 中根俊成 ,樋口理 ,前田泰宏 ,向野晃弘 ,安東由喜雄 ,松尾秀徳 .Clinical features of autoimmune autonomic ganglionopathy in Japanese patients. 第 56 回日本神経学会 , May 20 , 2015 , 新潟
3. 中根俊成 ,樋口理 ,向野晃弘 ,前田泰宏 ,松尾秀徳 ,安東由喜雄 .抗 gAChRb4 抗体のみ陽性を示す症例に関する臨床的検討 .第 27 回日本神経免疫学会 ,Sep 16 , 2015 , 岐阜

〔図書〕(計 6 件)

1. 中根俊成 . 自己免疫性自律神経節障害 autoimmune autonomic ganglionopathy .臨床神経学 53: 1071-1073, 2013
2. 中根俊成 . 自己免疫性自律神経節障害 (AAG)の病態と免疫療法 .日本アフェレシス学会雑誌 32: 198-203, 2013
3. Nakane S , Higuchi O , Matsuo H. Autoimmune autonomic ganglionopathy. Neuroimmunological Diseases. Springer, Tokyo (in press)
4. 中根俊成 ,樋口理 . 自己免疫性自律神経節障害 .アクチュアル脳・神経疾患の臨床「免疫性神経疾患 病態と治療のすべて」, 中山書店 , 東京 , pp347-354 , 2016
5. 中根俊成 , 樋口理 , 松尾秀徳 . 抗 ganglionic アセチルコリン受容体抗体検査 . 自律神経機能検査 , 文光堂 , 東京 , pp448-451 , 2015
6. 中根俊成 . 自己免疫性自律神経節障害 . 【免疫症候群 (第 2 版) -その他の免疫疾患を含めて-】臓器特異的自己免疫疾患 免疫性神経・筋疾患 , 日本臨床 , 大阪 , pp76-81, 2015

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

熊本大学神経内科 : <http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/neurology/>
熊本大学医学部附属病院神経免疫疾患抗体測定センター : <http://www.kuh.kumamoto-u.ac.jp/dept/i04.html>
長崎川棚医療センター : <http://nkmc.jp>
長崎川棚医療センター臨床研究部フェイスブックページあり

6 . 研究組織

(1)研究代表者 : 中根俊成 (NAKANE, Shunya)
熊本大学・医学部附属病院・寄附講座教員
研究者番号 : 70398022

(2)研究分担者 : 樋口 理 (HIGUCHI, Osamu)
独立行政法人国立病院機構長崎川棚医療センター・臨床研究部・その他
研究者番号 : 50361720

(3)連携研究者

()

研究者番号 :