

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860734

研究課題名(和文)疾患動物モデルを用いた抗MuSK抗体陽性重症筋無力症の治療薬探索と病態機序の解明

研究課題名(英文) Examination of the treatment of myasthenia gravis with anti-MuSK antibodies using an experimental autoimmune animal model

研究代表者

森 秀一 (Mori, Shuuichi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：30508677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗MuSK抗体陽性重症筋無力症(MuSK-MG)は従来の治療法に対して難治性の症例が多く、急激に悪化して重症化する症例も報告されている。現在、重症筋無力症の治療としてはステロイド薬が第一選択とされているが、その多彩かつ重大な副作用を考慮して治療方針を構築するためには、ステロイド薬以外の免疫抑制薬をうまく活用する必要があると考えられる。本研究では、MuSK-MGの動物モデルを用いて、mTOR阻害薬のラパマイシンが新たな治療薬として有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Some patients with myasthenia gravis (MG) caused by antibodies against muscle-specific kinase (MuSK; MuSK-MG) apparently do not respond to immunosuppressive therapy and rapidly progress to life-threatening muscle atrophy. In addition, long-term administration of corticosteroids, which are first-line treatment of MG, is frequently responsible for severe adverse effect. Therefore, new effective and safe immunosuppressive drugs are urgently required. Here, we demonstrated that administration of rapamycin is able to act as a highly immunosuppressive drug in animal model of MuSK-MG and consequently improves clinical characteristics by maintaining NMJ structures and function. Moreover, our data strengthen the case for using rapamycin as a treatment of human MuSK-MG, although further large clinical trials are required to determine the exact use of rapamycin as a sole therapeutic or as an adjunctive treatment to other immunosuppressive drugs.

研究分野：神経筋生理学・生化学

キーワード：重症筋無力症 神経筋シナプス MuSK

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症は、神経筋シナプスのポストシナプス膜上の抗原タンパクに対する自己抗体によって、アセチルコリン (ACh) による神経筋伝達が阻害され、筋の易疲労性や脱力が生じる自己免疫疾患である。今日まで、重症筋無力症の原因となる自己抗原として根拠が確立されている分子は、ACh 受容体 (AChR) と筋特異的キナーゼ (muscle-specific kinase, MuSK) の2つである。現在、MuSK に対する自己抗体を有する患者の割合は約1割であり、約7割を占める抗 AChR 抗体を保有する患者と比較して頻度は低い。しかし、抗 MuSK 抗体による重症筋無力症 (MuSK-MG) は、しばしば治療に対して抵抗性を示し、急激に悪化して重症化する症例も報告されている。従って、MuSK-MG の病態機序に合わせて適切な治療方針を立てることは重症化を防ぐために必須である。

重症筋無力症の病態機序の解明と新規治療薬の探索において、疾患動物モデルはこれまで重要な役割を果たしてきた。しかしながら、抗 AChR 抗体陽性重症筋無力症 (AChR-MG) と比較して MuSK-MG の病態機序は複雑であり、疾患動物モデルの作成も困難であったことから、治療法の検討まで研究を進めることが厳しい状況であった。これに対して本研究チームでは、病態解明に加えて治療薬の効果判定や新たな治療薬・治療法の開発基盤として有用である、患者の臨床病態を忠実に反映する MuSK-MG の疾患動物モデルを作成した。

2. 研究の目的

本研究は現在の重症筋無力症の治療指針に対して新たな指針を提言するだけでなく、MuSK-MG の新たな病態機序の解明を介して新規治療法の確立につなげることを目的とした。

現在、重症筋無力症の免疫抑制薬としてはステロイド薬が第一選択とされているが、その多彩かつ重大な副作用を考慮して治療方針を構築するためには、ステロイド薬以外の選択肢をうまく活用する必要があると考えられる。しかし、重症筋無力症に保険適応を持つカルシニューリン阻害薬 (タクロリムス、シクロスポリン) は腎臓に対しての毒性が問題となることもある。本研究では、迅速な臨床研究への移行と疾患への適応認可を目指すため、海外で既に使用が認可され、免疫抑制作用が報告されている mTOR 阻害薬のラパマイシンの治療効果を MuSK-MG の動物モデルを用いて検討した。

3. 研究の方法

全ての動物実験は東京都健康長寿医療センター研究所の承認を得て行った。

(1) MuSK-MG の動物モデルの作成

精製した組換え体 MuSK タンパクを完全フロイントアジュバントと混合し、5 µg/匹を A/J マウス (4-5 カ月齢、) に麻酔状態で

免疫注射した。2週間後、不完全フロイントアジュバントと混合した MuSK タンパク (5 µg/匹) を再びマウスに免疫注射した。免疫したマウスは体重を経時的に記録し、顕著な体重低下とともに歩行障害など筋機能に異常を示した時点で病態の解析を行った。

(2) 免疫マウスへのラパマイシン投与

2回目の MuSK タンパクの免疫注射後にマウスを2群に分けた。麻酔からの覚醒後、ラパマイシン投与群には5 mg/kg の用量でラパマイシン溶液を腹腔内に投与した (5回/週)。コントロールとして、同用量の溶媒をもう1群に腹腔内投与した。

(3) 神経筋シナプスの形態解析

マウスのヒラメ筋を採取して免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。プレシナプス側の運動神経 (軸索線維および終末) の染色には抗 neurofilament 抗体と抗 synaptophysin 抗体を使用し、ポストシナプス側の AChR 凝集の染色には蛍光標識した α-bungarotoxin を使用した。

(4) 筋電図

麻酔状態のマウスの坐骨神経に最大上強度の反復刺激 (3 Hz) を行い、腓腹筋で生じる複合筋活動電位 (CMAP) の振幅の減衰率を測定した。

(5) 抗 MuSK 抗体価の測定

MuSK タンパクの免疫開始後、定期的に尾静脈から採血を行って回収した血清を用いた。精製した組換え体 MuSK タンパクを抗原とした ELISA を行い、血清中の抗 MuSK 抗体価を測定した。

4. 研究成果

MuSK の細胞外ドメインの組換え体タンパクを抗原としてマウスに2回免疫注射すると、産生された抗 MuSK 抗体によって重症筋無力症が発症し、約2週間後には全てのマウスで同調して筋萎縮・筋力低下を伴う体重減少が認められる (図1)。また、発症マウスの坐骨神経の反復刺激によって生じる腓腹筋 CMAP を測定すると、CMAP 振幅の漸減反応が認められ、神経筋シナプスの刺激伝達能が低下して筋が易疲労状態にあることが示された (図2A, C)。この発症マウスの神経筋シナプスの形態を共焦点顕微鏡で観察すると、ポストシナプスの AChR 凝集の散乱と顕著な減少が認められた。さらに、プレシナプス側の観察では、ポストシナプス側の縮退に対応して運動神経の形態異常 (神経終末の sprouting、神経終末の縮退) も認められ、これらの形態変化が神経筋伝達能の低下に寄与していると考えられた (図3)。しかし、2回目の MuSK タンパクを免疫注射した日からラパマイシンの腹腔内投与を開始すると、MuSK-MG の発症に伴う体重減少が有意に抑えられた (図

1)。さらに、ラパマイシン投与マウスの筋電図を測定すると、CMAPの減衰率の有意な低下が認められ、神経筋伝達能の低下が抑えられていると考えられた(図2B, C)。神経筋シナプスの形態観察では、ポストシナプスに多数のAChR凝集の存在が認められ、明確な以上は観察されなかった(図3)。また、血中の抗MuSK抗体価を経時的に測定すると、ラパマイシン投与4日後には抗体価の上昇が有意に抑えられていた(図4)。以上の結果から、ラパマイシンは抗MuSK抗体の産生を抑制することでMuSK-MGの発症を抑えていると考えられ、MuSK-MGの新たな治療薬として有用である可能性が示された。

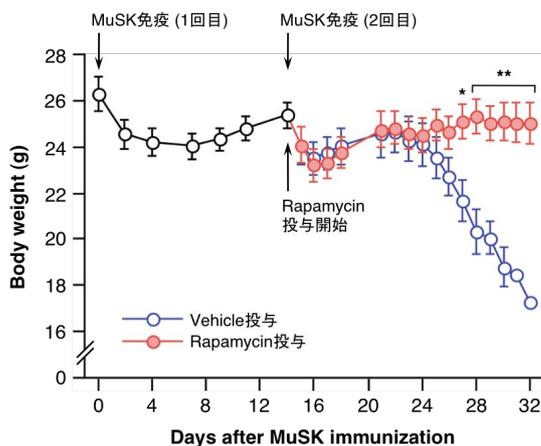


図1. 体重の変化

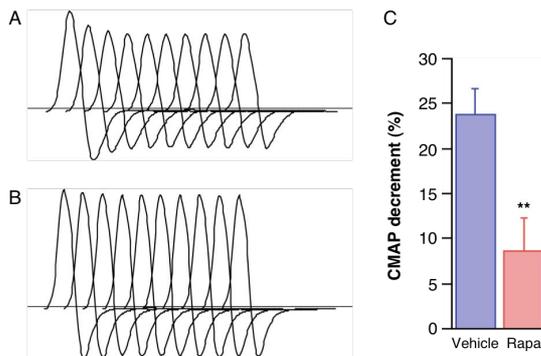


図2. 筋電図

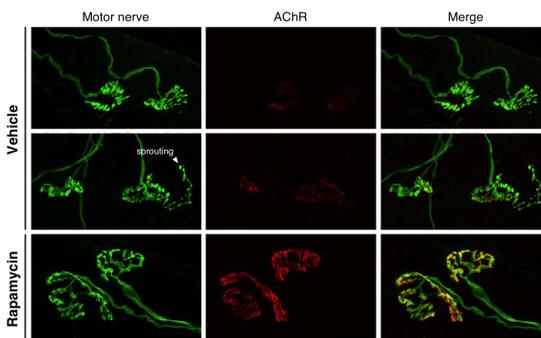


図3. 神経筋シナプスの形態

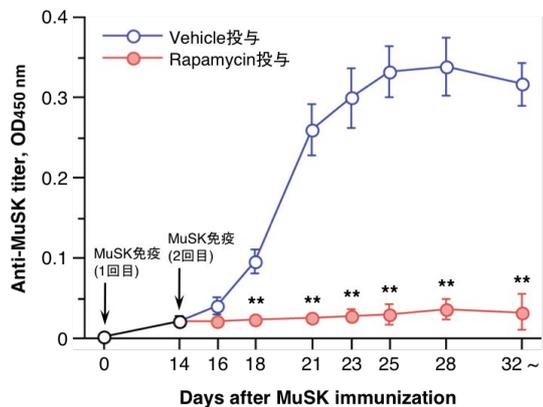


図4. 抗MuSK抗体の変化

近年、重症筋無力症の発症機序に関して、過剰な免疫反応を抑制する制御性T細胞の機能が注目されるようになってきた。さらに、ラパマイシンはmTORのシグナルを抑制して胸腺での制御性T細胞への分化を亢進し、免疫寛容を誘導するという研究がいくつか報告されている。本研究で示したMuSK-MGの発症抑制においても、制御性T細胞の細胞数増加または機能改善が関与している可能性が高く、今後の研究を進めていく上で着目すべき点である。

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11件)

- (1) Shigemoto K, Motohashi N, Mori S. Metabolic plasticity in sarcopenia. *J Phys Fitness Sports Med* 4: 347-350, 2015 (査読あり)
DOI: 10.7600/jpfsm.4.347
- (2) 重本 和宏, 森 秀一. サルコペニアの基礎. *日本医師会雑誌* 144: S184-S186, 2015 (査読なし)
- (3) 森 秀一. 運動能力と遺伝子-チャンピオン遺伝子. *臨床整形外科* 50: 252-254, 2015 (査読なし)
- (4) 重本 和宏, 森 秀一, 高嶋 留美, 本橋 紀夫. サルコペニアに関する筋肉基礎科学. *整形・災害外科* 58: 145-153, 2015 (査読なし)
- (5) 森 秀一, 高嶋 留美, 小西 哲郎, 重本 和宏. 動物モデルによる重症筋無力症の病態機序の解明. *神経内科* 80: 475-483, 2014 (査読なし)
- (6) Mori S, Koshi K, Shigemoto K. The important role of the neuromuscular junction in maintaining muscle mass and strength. *J Phys Fitness Sports Med* 3: 111-114, 2014 (査読あり)
DOI: 10.7600/jpfsm.3.111
- (7) 重本 和宏, 越 勝男, 森 秀一. サルコ

ペニア発症における神経系の関与. *医学のあゆみ* 248: 691-695, 2014 (査読なし)

- (8) Mori S, Shigemoto K. Mechanisms associated with the pathogenicity of antibodies against muscle-specific kinase in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev* 12: 912-917, 2013 (査読あり)
DOI: 10.1016/j.autrev.2013.03.005
- (9) 重本 和宏, 森 秀二, 福永 大地, 宮崎 剛. 筋肉と神経の老化 (サルコペニア) の基礎研究. *日本老年医学会雑誌* 50: 349-351, 2013 (査読なし)
- (10) 重本 和宏, 越 勝男, 森 秀二. サルコペニアの病因と疾患メカニズム. *アンチエイジング医学* 9: 536-540, 2013 (査読なし)
- (11) 宮崎 剛, 森 秀二, 重本 和宏. サルコペニア発症のメカニズム. *腎と骨代謝* 26: 99-107, 2013 (査読なし)

〔学会発表〕(計 11 件)

- (1) 森 秀二. 実験モデルでの治療開発の検討 (MG 分科会). Novartis Neuro Science Forum 2016, 2016.1.28, グランドプリンス新高輪 (東京都・港区)
- (2) 森 秀二. 筋量・筋力委の維持における神経筋シナプスの役割の解明. 第2回日本サルコペニア・フレイル研究会発表会, 2015.10.4, 東京大学伊藤国際学術研究センター (東京都・文京区)
- (3) 森 秀二. 抗Lrp4抗体陽性重症筋無力症の自己免疫動物モデルの作成. 第1回日本筋学会学術集会, 2015.8.8, 国立精神・神経医療研究センター (東京都・小平市)
- (4) 森 秀二. Lrp4 は神経筋シナプスの維持に重要である～神経筋シナプスの病態モデルの作成～. 第38回日本基礎老化学会大会, 2015.6.12-14, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- (5) Mori S. Therapeutic effect of rapamycin in experimental model of MuSK-MG. 第56回日本神経学会学術大会, 2015.5.20-23, 新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市)
- (6) Mori S. Generation of experimental model of myasthenia gravis with antibodies against LRP4. Society for Neuroscience 2014, 2014.11.15-19, Washington D.C. (United States of America)
- (7) 森 秀二. LRP4 は神経筋シナプスの維持に重要である. 第69回日本体力医学学会大会, 2014.9.19-21, 長崎大学文教キャンパス (長崎県・長崎市)
- (8) 森 秀二. 抗LRP4抗体による重症筋無力症の動物モデル作成と病態機序の解明. 第55回日本神経学会学術大会,

2014.5.20-24, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

- (9) 森 秀二. 前シナプス (神経終末側) 説と agrin/Lrp4/MuSK のシグナルの障害説 (MuSK 抗体陽性重症筋無力症の基礎・臨床研究-若手のチャレンジ-). 第55回日本神経学会学術大会, 2014.5.20-24, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
- (10) Mori S. Ubiquitin-proteasome pathway plays essential roles in maintenance of neuromuscular junctions. 第35回内藤コンファレンス, 2013.7.9-12, シヤトレゼ ガトーキングダム サッポロ (北海道・札幌市)
- (11) 森 秀二. 抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の発症に関与する分子機序の解明. 第54回日本神経学会学術大会, 2013.5.29-6.1, 東京国際フォーラム (東京都・千代田区).

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 重本 和宏, 高嶋 留美, 本橋 紀夫, 森 秀二. 重症筋無力症の動物モデル. *免疫性神経疾患-基礎・臨床研究の最新知見-* (日本臨床社) p97-p104, 2015
- (2) 重本 和宏, 森 秀二. サルコペニアの基礎. *ロコモティブシンドロームのすべて (診断と治療社)* p184-p186, 2015

〔その他〕

ホームページ等

http://www.tmgig.jp/J_TMIG/topics/topics_201509.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 秀一 (MORI SHUICHI)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号: 30508677

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: