

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：37301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09787

研究課題名(和文)小脳失調を合併したランバート・イートン筋無力症候群の血液脳関門は破綻している

研究課題名(英文)The blood-brain barrier of Lambert-Eaton myasthenic syndrome with paraneoplastic cerebellar degeneration has failed

研究代表者

本村 政勝 (MOTOMURA, MASAKATSU)

長崎総合科学大学・工学研究科・教授

研究者番号：70244093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目標は、傍腫瘍性小脳変性症を合併するLambert-Eaton筋無力症候群(PCD-LEMS)患者で、小脳失調の発症機序を解明することである。方法は、ヒト血液脳関門(BBB)・内皮細胞にPCD-LEMS患者とLEMS患者の免疫グロブリンG(IgG)を作用させ、細胞生物学的に検討した。その結果、PCD-LEMS患者IgGはBBBを破綻させたが、LEMS患者IgGでは変化が無かった。さらには、PCD-LEMS患者IgGからBBB機能に障害を与える抗体候補として、glucose-regulated protein 78(GRP78)抗体を同定した。(Shimizu et al, 2019)

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、これまで未解決であった傍腫瘍性神経症候群の発症機序を明解に解決できる点である。現時点では、血液脳関門(BBB)に障害を与える自己抗体は証明されておらず、多発性硬化症や視神経脊髄炎など神経難病の発症機序の解明に役立つ仕事になることが予想される。また、本研究の社会的意義は、治療困難なPCD-LEMSを含む傍腫瘍性神経症候群の治療を抜本的に変え、患者さんに多くの恵みをもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the pathogenic mechanism of cerebellar ataxia in patients with Lambert-Eaton myasthenic syndrome with paraneoplastic cerebellar degeneration (PCD-LEMS). The method was examined cytobiologically by reacting the endothelial cells of human blood-brain barrier (BBB) with immunoglobulin G (IgG) of PCD-LEMS patients and LEMS patients. As a result, IgG in PCD-LEMS patients disrupted BBB, but there was no change in IgG in LEMS patients. Furthermore, glucose-regulated protein 78 (GRP78) antibodies were identified as an antibody candidate that impairs BBB function from IgG in PCD-LEMS patients (Shimizu et al, 2019).

研究分野：神経免疫学

キーワード：ランバート・イートン筋無力症候群 傍腫瘍性小脳変性症 血液脳関門 GRP78抗体

## 1. 研究開始当初の背景

Lambert-Eaton 筋無力症候群(Lambert-Eaton myasthenic syndrome: LEMS)では約 10%に小脳失調を合併することが報告されており、傍腫瘍性小脳変性症(Paraneoplastic cerebellar degeneration: PCD)を合併した LEMS (PCD-LEMS)と定義されている<sup>1)</sup>。小脳失調の発症機序については、(1) PCD-LEMS 患者の脳脊髄液で抗 P/Q 型 VGCC 抗体が陽性となること<sup>2)</sup>、(2) PCD-LEMS 剖検症例では小脳分子層の P/Q 型電位依存性カルシウムチャンネル(P/Q-type voltage-gate calcium channel, P/Q 型 VGCC)量が減少していること<sup>3)</sup>(図 1)、(3) マウスの脳内に抗 P/Q 型 VGCC 抗体を受動免疫すると小脳失調症状が出現することより<sup>4)</sup>、などの報告より、「LEMS 症状を引き起こしている抗 P/Q 型 VGCC 抗体が血液脳関門(blood brain barrier: BBB)を通過して、小脳の分子層に高密度に分布する P/Q 型 VGCC に作用、down-regulation という機序で小脳失調を呈する。」という仮説が推測されている。しかし、これまでに LEMS-PCD 患者で実際に BBB 破綻が認められるかについての検証はなされていない。本研究では、ヒト BBB 構成内皮細胞に PCD-LEMS 患者と LEMS 患者の免疫グロブリン G (IgG) を作用させ、細胞生物学的見地からこの仮説を検討した。以下に、本研究仮説を分かりやすく説明する。

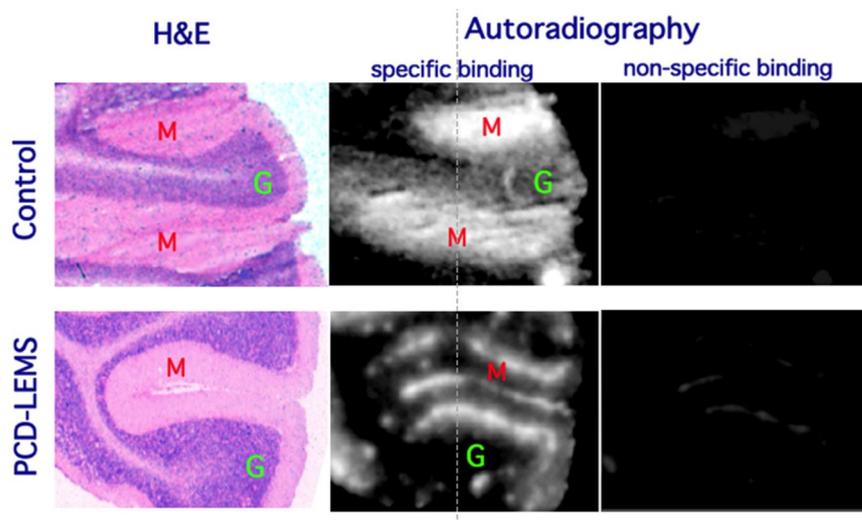
LEMS-PCD 患者における BBB 破綻の仮説

LEMS-PCD 患者は、**BBB を破綻させる自己抗体が生じる。**

BBB 破綻の結果、LEMS-PCD 患者の血液中 P/Q 型 VGCC 抗体が小脳に作用し小脳症状を起こす。

PCD-LEMS 患者の小脳では、分子層(M)の P/Q 型 VGCC 量が著名に減少している。

図 1:PCD-LEMS 患者・剖検小脳切片における P/Q 型 VGCC 量の検討。



## 2. 研究の目的

傍腫瘍性小脳変性症を合併した Lambert-Eaton 筋無力症候群 (PCD-LEMS)患者での小脳失調の発症機序として、「LEMS 症状を引き起こしている抗 P/Q 型 VGCC 抗体が血液脳関門(BBB)を通過して、小脳の分子層に高密度に分布する P/Q 型 VGCC に作用し小脳失調を呈する」という仮説が推定されている<sup>3)</sup>。今回、我々は、ヒト BBB 構成内皮細胞に PCD-LEMS 患者と LEMS 患者の免疫グロブリン G (IgG) を作用させ、細胞生物学的見地からこの仮説を検討した。その結果、PCD-LEMS

患者 IgG は BBB を破綻させたが、LEMS 患者 IgG では変化が無かった。よって、BBB 破綻の有無が PCD-LEMS と LEMS の臨床病型を規定している可能性が考えられた。本研究では、その仮説の証明を行い、さらには、BBB に障害を与えている IgG の同定を行いたいと考えている。

### 3. 研究の方法

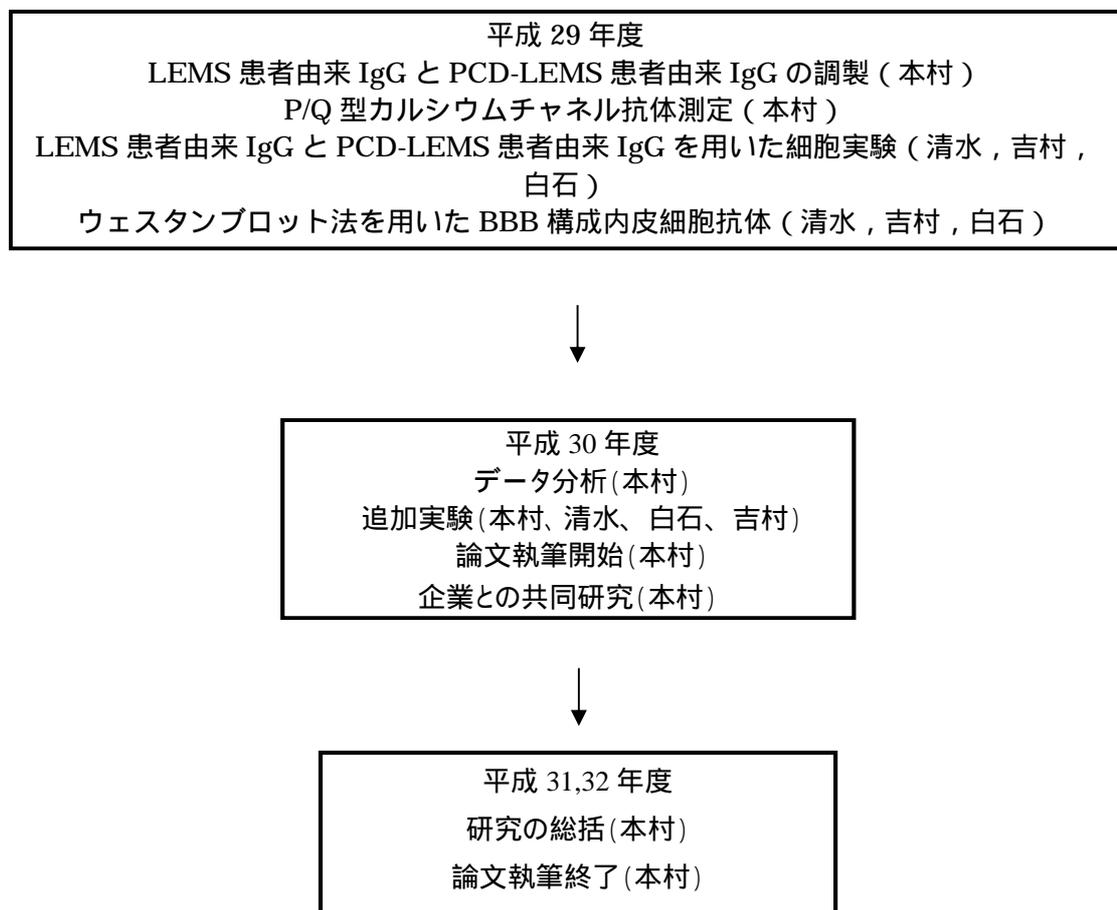
この研究計画では、「LEMS 症状を引き起こしている抗 P/Q 型 VGCC 抗体が血液脳関門(BBB)を通過して、小脳の分子層に高密度に分布する P/Q 型 VGCC に作用し小脳失調を呈する」という仮説を証明するために、ヒト BBB 構成内皮細胞に LEMS-PCD 患者と LEMS 患者の免疫グロブリン G (IgG) を作用させ、細胞生物学的見地からこの仮説を検討する。

研究計画の進め方として、以下にフローチャートで示した。

1) LEMS 患者由来 IgG と PCD-LEMS 患者由来 IgG の調製、P/Q 型カルシウムチャンネル抗体測定：臨床症状と電気生理検査により LEMS と診断され、抗 P/Q 型 VGCC 抗体陽性が確認された LEMS-PCD 患者と LEMS 患者の IgG を用いた。IgG は血漿交換療法により回収した血漿成分から精製した。

2) LEMS 患者由来 IgG と PCD-LEMS 患者由来 IgG を用いた細胞実験：ヒト BBB 構成内皮細胞株 (TY09)を用いる。(実験 1) LEMS-PCD 患者由来 IgG と LEMS 患者由来 IgG を TY09 に作用させ、バリアー機能の指標となる claudin-5, occludin 蛋白量と電気抵抗値を測定する。

3) ウェスタンブロット法を用いた BBB 構成内皮細胞抗体



### 4. 研究成果

今回、我々は、ヒト BBB 構成内皮細胞に PCD-LEMS 患者と LEMS 患者の免疫グロブリン G (IgG)

を作用させ、細胞生物学的見地からこの仮説を検証した。その結果、PCD-LEMS 患者 IgG (n=4) は BBB を破綻させたが、LEMS 単独患者 IgG (n=4) では変化が無かった。本研究では、PCD-LEMS の症例を増やし、その結果の再現性を確認することを第一段階とする。そのためには、LEMS 患者と PCD-LEMS 患者血清をさらに収集することが必要である。そして、それらの検体から得られた IgG で、BBB バリアー機能の指標となる claudin-5、occludin 蛋白量と電気抵抗値を測定する。それらの結果を統計学的に解析し、その有意差を証明した。その後、BBB に障害を与えている IgG の抗原の一つとして、Glucose-regulated protein 78 (GRP78)を同定した<sup>5)</sup>。その結果は、PCD-LEMS の IgG で GRP78 自己抗体を検出したが (83.3%、n = 18)、LEMS 患者ではより少なく観察され (6.6%、n = 15)、コントロール被験者では観察されなかった (n = 8)。これらの結果は、GRP78 自己抗体が、PCD-LEMS と LEMS 間の表現型の違いに直接的な意味があることを示唆した<sup>5)</sup>。今後も、更に PCD-LEMS 症例数を増やして、GRP78 抗体の臨床的意義を検討して行きたい。

#### 引用文献

- 1) Mason WP, Graus F, Lang B, Honnorat J, Delattre JY, et al: Small-cell lung cancer, paraneoplastic cerebellar degeneration and the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Brain*. 1997 120:1279-300
- 2) Graus F, Lang B, Pozo-Rosich P, Saiz A, Casamitjana R, Vincent A.: P/Q type calcium-channel antibodies in paraneoplastic cerebellar degeneration with lung cancer. *Neurology*. 2002 59:764-6
- 3) Fukuda T, Motomura M, Nakao Y, Shiraishi H, Yoshimura T, et al: Reduction of P/Q-type calcium channels in the postmortem cerebellum of paraneoplastic cerebellar degeneration with Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Ann Neurol* 2003 53: 21-28
- 4) Liao YJ, Safa P, Chen YR, Sobel RA, Boyden ES, Tsien RW. Anti-Ca<sup>2+</sup> channel antibody attenuates Ca<sup>2+</sup> currents and mimics cerebellar ataxia in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(7):2705-10
- 5) Shimizu F, Takeshita Y, Sano Y, Hamamoto Y, Shiraishi H, Sato T, Yoshimura S, Maeda T, Fujikawa S, Nishihara H, Kitanosono H, Tsujino A, Motomura M, Kanda T. GRP78 antibodies damage the blood-brain barrier and relate to cerebellar degeneration in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Brain*. 2019 142(8):2253-2264

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Shimizu F, Takeshita Y, Sano Y, Hamamoto Y, Shiraiishi H, Sato T, Yoshimura S, Maeda T, Fujikawa S, Nishihara H, Kitano H, Tsujino A, Motomura M, Kanda T.	4. 巻 142
2. 論文標題 GRP78 antibodies damage the blood-brain barrier and relate to cerebellar degeneration in Lambert-Eaton myasthenic syndrome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain.	6. 最初と最後の頁 2253-2264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/brain/awz168.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 北之園 寛子, 本村 政勝, 富田 祐輝, 岩永 洋, 岩永 直樹, 入岡 隆, 白石 裕一, 辻野 彰	4. 巻 71
2. 論文標題 ランバート・イートン筋無力症候群を合併する傍腫瘍性小脳変性症 がん治療が著効した1症例報告と本邦PCD-LEMS症例の系統的文献検索	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BRAIN and NERVE	6. 最初と最後の頁 0167-0174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1416201237.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takasugi J, Shimamura M, Koda T, Kishikawa T, Hanamoto A, Inohara H, Sato K, Morii E, Motomura M, Sakaguchi M, Nakatsuji Y, Mochizuki H.	4. 巻 57
2. 論文標題 Paraneoplastic Cerebellar Degeneration and Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome Associated with Neuroendocrine Carcinoma of the Oropharynx.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 587-590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.9333-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 3件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北之園 寛子, 本村 政勝, 中岡 賢治朗, 金本 正, 太田 理絵, 島 智秋, 長岡 篤志, 吉村 俊祐, 宮崎 禎一郎, 白石 裕一, 立石 洋平, 入岡 隆, 矢部 一郎, 佐藤 聡, 辻畑 光宏, 辻野 彰
2. 発表標題 本邦のLEMSを合併する傍腫瘍性小脳変性症の臨床的特徴
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 入岡 隆, 本村 政勝, 内原 俊記, 新宅 洋, 石川 欽也, 五十嵐 奨, 馬嶋 貴正, 高橋 祐子, 岩瀬 遼, 大谷 泰, 北之園 寛子, 白石 裕一, 津浦 幸夫, 横田 隆徳
2. 発表標題 Clinicopathological study of a patient with calcium channels antibody-associated cerebellar ataxia
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	白石 裕一 (SHIRAIISHI HIROKAZU) (40423644)	長崎大学・病院(医学系)・講師  (17301)	削除：2020年7月8日
研究分担者	吉村 俊祐 (YOSHIMURA SHUNSUKE) (70746635)	長崎大学・病院(医学系)・助教  (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------