

令和元年6月3日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16111

研究課題名(和文) HMGB1を標的とした重症筋無力症の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of New treatment for myasthenia gravis targeting for HMGB1

研究代表者

金井 哲也 (Kanai, Tetsuya)

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：60748044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：HMGB1の病態関与を検討するため、重症筋無力症病態モデル(EAMG)ラットを用いて、血清学的、病理学的評価を同時に行った。血清学的評価においては、コントロール群と比較しても明らかな有意差は認めなかった。一方、病理学的検査においてはコントロール群と比較して、EAMG群ではアセチルコリン受容体の減少とHMGB1の上昇を認めた。これによりEAMGラットにおいて、HMGB1が重症筋無力症の病態に大きな関わりを持つことが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HMGB1はB細胞の活性化作用、炎症性サイトカインの分泌作用、Th17細胞の活性化、Treg機能異常が報告されており、MGにおける炎症病態と強く関連していることが証明された。そのためHMGB1抑制作用のある内服薬や抗HMGB1抗体がMGの新規治療薬として開発され、難治性の重症筋無力症治療の一助となる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：In examining the involvement of HMGB1 in pathological conditions, serological and pathological evaluations were simultaneously performed using experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) model rat. In the serological evaluation, no significant difference was found in comparison with the control group. On the other hand, in pathological examination, EAMG group had a decrease in acetylcholine receptor and an increase in HMGB1. This proves that HMGB1 has a major role in the pathogenesis of myasthenia gravis in EAMG rats.

研究分野：神経免疫

キーワード：重症筋無力症 HMGB1 EAMG 抗アセチルコリン受容体抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) は神経筋接合部を標的とした自己免疫性疾患であり、標的抗原としてアセチルコリン受容体 (Acetylcholine receptor; AChR) が知られている。抗 AChR 抗体は補体介在性に強い炎症を起こし、AChR の破壊を起こす。

その生体内からの侵襲に応答し、その障害部位由来の分子で、生体に免疫反応を誘導する分子は Alarmin と呼ばれ、その中で研究が最も進んでいるのが、high mobility group box 1 (HMGB1) である。これまで我々は HMGB1 が抗 AChR 抗体陽性 MG 患者の血清中で上昇していることを報告している。(J Neurol Neurosurg Psychiatry 2015;86: 695-697)。このことから神経筋接合部で補体介在性に障害された細胞から HMGB1 が放出され、炎症の慢性化を引き起こしていることが推測されているが、実際には HMGB1 の産生機序、及び MG における炎症誘導のメカニズムに関してはまだ十分に明らかにされていなかった。

以上より HMGB1 は MG の病態に大きく関係していると考えた。さらに MG の病態と HMGB1 の関連は非常に興味深く、新規治療ターゲットとして有望と考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

MG モデルラット (EAMG) において HMGB1 の動態を評価することで病態への関与を明らかにする。

- (1) Active model における HMGB1 の関係
- (2) Passive model における HMGB1 の関係

3. 研究の方法

(1) まず Active model を標準化された方法で作成した (Experimental Neurology. 2015;270:18- 28)。生後 7 週の Lewis ラットに Complete Freund's Adjuvant (CFA) と Torpedo californica から抽出した AChR を混合し投与した (Day0)。追加アジュバントとして、M tuberculosis を使用した。投与 3 週間後より筋無力症症状が発現 (Day 21) し、評価として、EAMG の clinical score と体重測定を行った。clinical score 3 点以上が 24 時間以上持続する場合には End point として、ラットを解剖し、神経筋接合部、胸腺についてそれぞれ病理学的な検討を加え、これにより EAMG ラットの神経接合部と胸腺での HMGB1 の分布を明らかにし、HMGB1 産生細胞の同定も行った。

免疫染色に関しては、HMGB1 以外にも AChR を染色し、AChR と HMGB1 との関連に関して病理学的な評価を行った。採血は抗原投与前では尾静脈から採血を行い、解剖時には心採血を行う。血清学的評価としては ELISA キットを用いて HMGB1 の濃度測定を行った。

(2) 次にまず Passive model を標準化された方法で作成した (Experimental Neurology. 2015;270:3- 10)。mAb35 抗体を精製するため TIB175 細胞を培養し、抗体を産出しその後カラムを用いて抗体を生成した。精製した抗体を生後 12 週の Lewis ラットに投与し、72 時間臨床スコアを測定した。Active model 同様に免疫染色に関しては、HMGB1 以外にも AChR を染色し、AChR と HMGB1 との関連に関して病理学的な評価を行う。採血は抗原投与前では尾静脈から採血を行い、解剖時には心採血を行う。血清学的評価としては ELISA キットを用いて HMGB1 の濃度測定を行った。

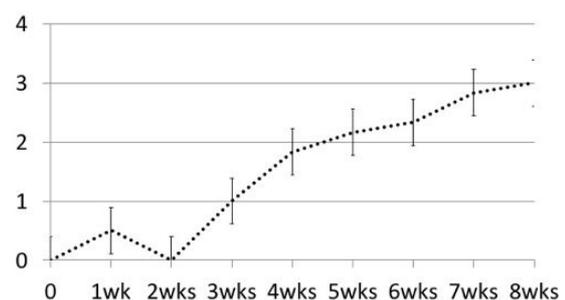
4. 研究成果

(1) EAMG の clinical score は下記図 1 の通りだった。

抗原投与後 8 週にて剖検を行い、心腔採血と脛骨筋をホルマリン固定した。採血上 HMGB1 については、個体差が大きく免疫化前後でも明らかな有意差を認めなかった。

これは採血手技による組織破壊、血球破壊が HMGB1 の上昇を誘因したものと推測された。また病理組織の検討ではコントロール群と比較して Active model でアセチルコリン受容体の数的減少を認めた。抗 HMGB1 抗体を用いた蛍光染色を行ったところ、HMGB1 の染色の局在が上手くいかなかった。これは筋組織を固定する際にホルマリン固定したため、組織破壊が進んだため推測された。

図 1; Clinical Score in EAMG rat



(2) Passive model での Clinical score は下記図 2 の通りであった。

血清 HMGB1 については、免疫化前後では免疫後に HMGB1 が高値となった(図 3)。これは免疫化前は尾静脈採血のため組織・血球破壊が大きく、免疫後は心腔への針刺入による採血だったため組織・血球破壊が最小限に抑えられたためと考えられた。

一方病理組織の検討では下記の図 4,5 のように EAMG ではコントロール群と比較して抗アセチルコリン受容体の発現が低下しており、HMGB1 の発現量が高いことが分かった。

このように病理組織学的には HMGB1 が MG の病態機序に大きく関係していることを示唆する所見であった。

図2. Clinical Score in Passive EAMG rat

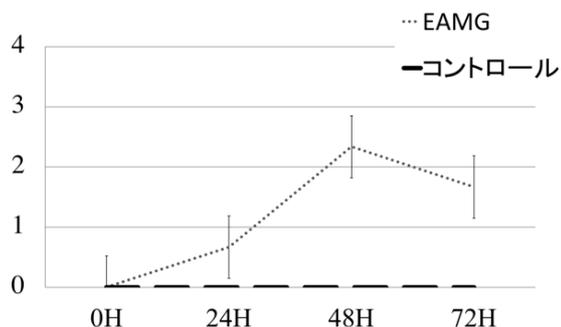
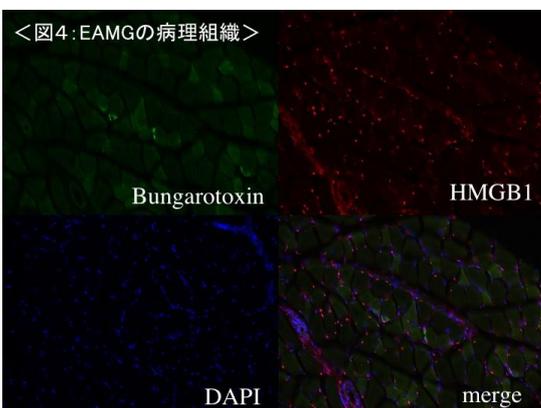
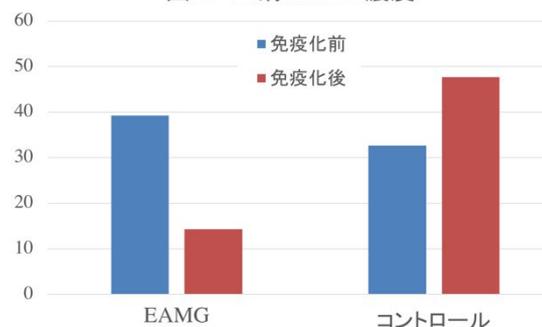
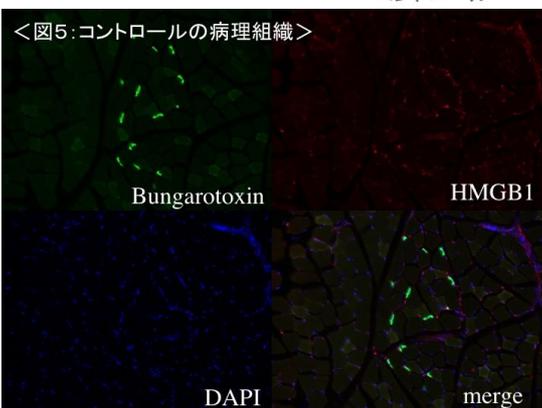


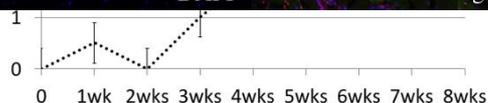
図3: 血清HMGB1濃度



<図4: EAMGの病理組織>



<図5:コントロールの病理組織>



[雑誌論文](計 5 件)

Homma M, Uzawa A, Tanaka H, Kawaguchi N, Kanai T, Nakajima K, Narita M, Hara Y, Maruyama H, Ogawa Y, Himuro K, Kuwabara S. "A Novel Fusion Protein, AChR-Fc, Ameliorates Myasthenia Gravis by Neutralizing Antiacetylcholine Receptor Antibodies and Suppressing Acetylcholine Receptor-Reactive B Cells." *Neurotherapeutics*. 査読有 14 巻, 2017, 191-198.

DOI: 10.1007/s13311-016-0476-9

Nagane Y, Murai H, Imai T, Yamamoto D, Tsuda E, Minami N, Suzuki Y, Kanai T, Uzawa A, Kawaguchi N, Masuda M, Konno S, Suzuki H, Aoki M, Utsugisawa K. "Social disadvantages associated with myasthenia gravis and its treatment: a multicentre cross-sectional study." *BMJ Open*. 査読有 7 巻 2017 年:e013278.

DOI: 10.1136/bmjopen-2016-013278

Kanai T, Uzawa A, Sato Y, Suzuki S, Kawaguchi N, Himuro K, Oda F, Ozawa Y, Nakahara J, Suzuki N, Takahashi YK, Ishibashi S, Yokota T, Ogawa T, Yokoyama K, Hattori N,

Izaki S, Oji S, Nomura K, Kaneko J, Nishiyama K, Yoshino I, Kuwabara S. "A clinical predictive score for postoperative myasthenic crisis." *Annals of Neurology*. 査読有 82 巻, 2017, 841-849.

DOI: 10.1002/ana.25087.

Kanai T, Uzawa A, Kawaguchi N, Oda F, Ozawa Y, Himuro K, Kuwabara S. "Predictive score for oral corticosteroid-induced initial worsening of seropositive generalized myasthenia gravis." *Journal of Neurological Science*. 396 巻, 2019, 8-11.

DOI: 10.1016/j.jns.2018.10.018.

Kanai T, Uzawa A, Kuwabara S. "Response to "regarding the article 'Predictive score for oral corticosteroid-induced initial worsening of seropositive generalized myasthenia gravis'". " *Journal of Neurological Science*. 399 巻, 2019, 229.

DOI: 10.1016/j.jns.2019.02.011

[学会発表](計 6 件)

Tetsuya Kanai, Akiyuki Uzawa, Naoki Kawaguchi, Keiichi Himuro, Fumiko Oda, Yukiko Ozawa, Satoshi Kuwabara. Risk Factors for initial worsening in myasthenia gravis. 2nd International Taiwanese Congress of Neurology(国際学会) 2017 年

Tetsuya Kanai, Akiyuki Uzawa, Naoki Kawaguchi, Keiichi Himuro, Fumiko Oda, Yukiko Ozawa, Satoshi Kuwabara Valproic acid treatment ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis. XXIII World Congress of Neurology(国際学会) 2017

金井 哲也, 鶴沢 顕之, 織田 史子, 小澤 由希子, 川口 直樹, 氷室 圭一, 桑原 聡 [眼筋型重症筋無力症に対する治療法の有効性の比較] 第 35 回神経治療学会総会 2017 年

金井 哲也, 鶴沢 顕之, 鈴木 重明, 川口 直樹, 織田 史子, 小澤 由希子, 氷室 圭一, 中原 仁, 鈴木則宏, 桑原 聡. [重症筋無力症術後クリーゼ予測スコアの確立] 第 28 回日本神経免疫学会総会 2017 年

金井 哲也, 鶴沢 顕之, 織田 史子, 小澤 由希子, 安田 真人, 川口 直樹, 氷室 圭一, 桑原 聡 [眼筋型重症筋無力症に対するメチルプレドニゾロン静注療法の有効性] 第 59 回日本神経学会学術大会 2018 年

Tetsuya Kanai, Akiyuki Uzawa, Naoki Kawaguchi, Keiichi Himuro, Fumiko Oda, Yukiko Ozawa, Eiko Murakami, Satoshi Kuwabara. "A comparative study of treatment for ocular myasthenia gravis." 14th International Congress of Neuroimmunology(国際学会) 2018 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名：鵜沢 顕之

ローマ字氏名：UZAWA Akiyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。