

平成21年 4月 30日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：平成18年度 ～ 平成20年度  
 課題番号：18590950  
 研究課題名（和文） 抗アセチルコリンレセプター抗体陰性の全身型筋無力症患者の病態  
 研究課題名（英文） Pathophysiology of generalized myasthenia gravis without anti-acetylcholine receptor anti-body  
 研究代表者 吉村俊朗（YOSHIMURA TOSHIRO）  
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
 研究者番号 80182822

研究成果の概要：抗アセチルコリン受容体抗体（抗 AChR 抗体）および抗筋特異的チロシンキナーゼ抗体（抗 MuSK 抗体）共に陰性で筋無力症が疑われる患者の中に筋萎縮性側索硬化症もある。誘発筋電図でも Waning が認められ、テンシロンテストも陽性と判断されることがあり、抗体陰性の重症筋無力症の鑑別に重要と結論した。運動終板に補体 C 3 の沈着が認められ、postsynaptic fold の減少も認められた。 $\alpha$ バンガロトキシンの減少も認められる例もある。意義付けが困難であるが、眼筋型 MG では、AChR 抗体が陰性のことが多く補体の沈着があることがある。測定感度以下の AChR 抗体が関与する可能性や、AChR 抗体以外の抗体の関与が考えられる。補体の沈着もなく、postsynaptic fold の減少があり、臨床像は、四肢近位筋の筋力低下があり、他の抗体もしくは、先天性の可能性など、今後の検討が必要である。

ヒト抗 MuSK 抗体は、ラットの再生筋の運動終板においても、ヒト運動終板と類似の変化をもたらす。抗 MuSK 抗体は Postsynaptic area の形成に影響を及ぼす。抗ラミン抗体は抗体陰性の筋無力症の原因でありうる可能性を否定できないが、電気生理学的な検討も含めて、今後の検討が必要である。ラミンも運動終板の形成に関与している可能性がある。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	1,200,000	0	1,200,000
19年度	1,200,000	360,000	1,560,000
20年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科・臨床神経形態学

キーワード：アセチルコリン(2) MuSK (3) 抗体陰性 (4) 運動終板(5) ラット (6) 微細構造 (7) 重症筋無力症

## 1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症（以下MG）患者の約20%では、血清抗アセチルコリン受容体抗体（以下抗AChR抗体）が検出されず，**sero-negative MG**としてその病態機序の解明が進められている。2001年，Hochらは、運動終板に存在する筋特異的チロシンキナーゼ（muscle specific tyrosine kinase, MuSK）蛋白をsero-negativeMGの標的抗原と考え、抗体測定を行った。その結果，sero-negative MG患者の50~70%で抗MuSK抗体が検出されると報告している。本邦では、30名の抗AChR抗体陰性重症筋無力症のうち、10名の抗MuSK抗体陽性患者がいた（33%にMuSK抗体陽性）。しかし、残り67%のseronegative MG患者の自己抗体は依然として不明である。一方、運動終板を構成している蛋白はアセチルコリンレセプター（AChRs）,MuSK,ジストログリカン（DG）、ラミニン（ $\alpha 2, \alpha 4, \alpha 5, \beta 2$ ）、ヘパリン結合成長関連分子（HB GAM）,インテグリン、ヘパリン硫酸プロテオグリカンなどが、シナプス後膜の細胞外に存在していて、運動終板を構成している。AChRsは、重症筋無力症の抗原として認められている。また、MuSKを抗原とする抗体も報告されている。しかし、重症筋無力症の症状を呈しながら、抗AChR抗体陰性で、抗MuSK抗体陰性の患者も依然、存在する。これらの患者は、運動終板の構成蛋白に対する抗体が存在する可能性がある。

## 2. 研究の目的

四肢筋の筋力低下があり、反復誘発筋電図で10%以上の減衰を認める患者を対象とす

る。患者に検査の目的、合併症、診断的価値を十分説明し、同意を文書でとったあと、上腕二頭筋からの筋生検で運動終板微細構造の形態的变化を確認し、補体沈着の有無などに関して病理学的検討を行う。

次に、運動終板の構成にラミニンの関与も認められることから、抗ラミニン抗体を有するラットでの運動終板の変化および、電気生理学的に神経筋伝達の障害が生じるかどうかを検討する。同時にウエスタンブロットの手法を用いて、抗AChR抗体陰性かつ抗MuSK抗体陰性の患者血清で抗ラミニン抗体の有無を検索し、筋無力症の病因となる新しい自己抗体の発見を目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) 抗Musk抗体陰性、抗AChR抗体陰性、誘発筋電図で10%以上のWaningが認められた。4例の患者の運動終板を検討した。
- (2) 重症筋無力症(MG)は自己抗体と補体が関与する自己免疫疾患であり、約80%の患者でニコチンアセチルコリンレセプター（AChR）抗体が検出される。しかし、全身型のMGの20%でAChR抗体の検出がなされない。この33%で抗筋特異的チロシンキナーゼ（MuSK）自己抗体陽性の患者が存在する。筋特異的チロシンキナーゼ（MuSK）自己抗体を有する患者の運動終板では、運動終板後膜のシナプス密度は保たれ、終板面積が狭小化していることを報告した。ヒト抗MuSK抗体がラットの運動終板形成に及ぼす影響に関して、ヒトと類似しているかを検

討する。8週齢のオスルイスラット (200g) を3匹用いた。エーテルで麻酔したラットのひらめ筋に塩酸ブピバカイン0.8mlを投与し、壊死、再生を生じさせた。ヒト抗 MuSK 抗体を有する2名の患者抗体価 10.5pmol/L と 15.4pmol/L) の IgG を抽出し、ラットに尾静脈から投与した(濃度 70mg/ml と 71mg/ml)。マーカー投与後、3日目に第一回、17日目に第2回目を投与した。コントロールとして、ヒト IgG(濃度 70mg/ml)を使用した。4週目にひらめ筋を剔出し、一部を凍結切片に、一部を3%グルタルールに固定し、運動終板を観察した。凍結切片で、抗 C3 抗体を用いて、運動終板の染色ペルオキシダーゼでラベルした  $\alpha$  バンガロトキシンを使用し、AChR の染色を行った。エポキシに包埋後、電子顕微鏡で運動終板を3000倍、10000倍で写真撮影後、NIH イメージを使用して運動終板の計測を行った。また、ラットの抗 MuSK 抗体の測定も測定した。

(3) 運動終板には MuSK をはじめとしてラミニン、アグリン、ラプシンなどがあり、その構成成分となっている。現在 MuSK に対するの自己抗体が注目され、アセチルコリンレセプター抗体陰性の重症筋無力症の病因として提唱されている。

実験的な多発筋炎・皮膚筋炎のモデルがラミニンの免疫でも生じることを報告した (J Neuropathol Exp Neurol 2005)。そこで、ラミニンが運動終板にも存在するため、アセチルコリンレセプター抗体陰性の重症筋無力症の病因としての可能性の有無を検討するため、運動終板の形態を観察した。ルイス系ラット 6匹(7週齢、雌、体重:180~200g、対照群3匹、実験群3匹)を用い、実験群には、マウス Engelbreth-Holm-Swarm 由来ラミニン (1mg/ml、Sigma) とフロイント完全アジュバント ( Freund's complete

Adjuvant : 以下、CFA) の混合液を3回(1回/2週)皮内注射 (0.3ml/回) した。凍結切片を作成し、運動終板の部の C3 沈着の有無、及びペルオキシダーゼでラベルしたバンガロトキシンを用いて、アセチルコリンレセプターの減少の有無、カルパイン抗体を用いて免疫染色し、観察した。また、運動終板の微細構造も観察した。

#### 4. 研究成果

(1) 2名は、筋病理学的に著明な神経原性筋萎縮を呈し、運動終板に、補体の沈着はなく、 $\alpha$  バンガロトキシンの減少もなかった。運動終板は、postsynaptic fold の破壊像もなく、むしろ、hypertrophic になっていた。これらの所見からは、神経原性の変化が疑われた。その後、臨床診断は筋萎縮性側索硬化症の診断となった。筋萎縮性側索硬化症は、誘発筋電図でも Waning が認められ、テンシロンテストも陽性と判断されることがあり、抗体陰性の重症筋無力症の鑑別に重要と結論した。1名の運動終板には補体 C3 の沈着が認められ、postsynaptic fold の減少も認められた。 $\alpha$  バンガロトキシンの減少も認められた。

意義付けが困難であるが、眼筋型MGでは、AChR 抗体が陰性のことが多く補体の沈着があることがある。測定感度以下の AChR 抗体が関与する可能性や、AChR 抗体以外の抗体の関与が考えられる。1例は補体の沈着もないが、postsynaptic fold の減少があり、臨床像は、四肢近位筋の筋力低下があり、他の抗体もしくは、先天性の可能性など、今後の検討が必要である。

(2) 抗 MuSK 抗体陽性 IgG では、運動終板の

AChR 受容体の減少は観察されず、補体の沈着もなかった。微細構造の変化では終板面積は減少し、postsynaptic membrane 密度は保たれていた。ヒト抗 MuSK 自己抗体は、ラットの再生筋の運動終板においてもヒト運動終板と類似の変化をもたらした。抗 MuSK 自己抗体は Postsynaptic area の形成に影響を及ぼす。

(3) ラミニンを免疫することにより、筋炎が発生した (図 1)。運動終板でのカルパインの活性が高まっている可能性がある。アセチルコリンレセプターの減少はなく、補体も染まらない。微細構造では、著変ないものの、統計的には Postsynaptic Area の減少が認められた (図 2)。ラミニンの免疫により、筋炎が生じる。運動終板での蛋白分解は亢進している可能性があるが、運動終板の微細構造は保たれていた。抗ラミニン抗体が抗体陰性の筋無力症の原因でありうる可能性は否定できないが、電気生理学的な検討も含めて、今後の検討が必要である。ラミニンも運動終板の形成に関与している可能性がある。

図 1

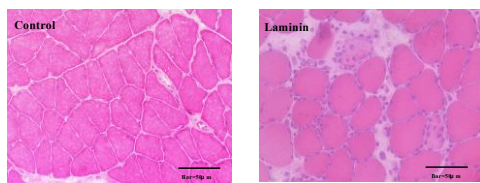
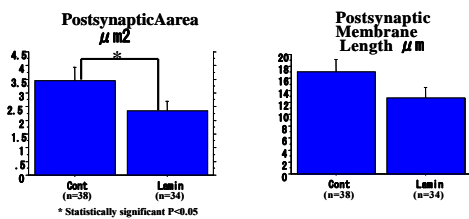


図 2 Morphometric Data



## 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 22 件)

1. 吉村俊朗、中野治郎、耕田智子、徳田昌紘、榊原淳、片岡英樹、沖田実：カネミ油症検診者の骨密度と PCB, PCQ, PCDF。福岡医学 in press 査読あり
2. Sakamoto J, Origuchi T, Okita M, Nakano J, Kato K, Yoshimura T, Izumi Komori, Nakamura H, Ida H, Kawakami A, Eguchi K; Immobilization-induced cartilage degeneration is mediated through the expression of hypoxia-inducible factor-1?, vascular endothelial growth factor and chondromodulin-1. Connect Tissue Res 50(1):37-45, 2009 査読あり
3. Okita M, Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Yoshimura T, Effects of therapeutic ultrasound on joint mobility and collagen fibril arrangement in the endomysium of immobilized rat soleus muscle. Ultrasound in Medicine and Biology 35(2):237—244, 2009 査読あり
4. 片岡英樹, 中野治郎, 坂本淳哉, 西川正悟, 坂井孝行, 近藤康隆, 吉村俊朗, 沖田実：【理学療法探求 Update】温熱刺激による廃用性筋萎縮の進行抑制効果について動物実験の結果から。理学療法探求 11:15-21, 2009 査読あり
5. 本田裕之, 佐藤聡, 吉村俊朗, 木下郁夫, 辻畑光宏：皮疹を認めず、口唇、末梢神経、骨格筋に類上皮肉芽腫性病変を認めた Hansen 病の 1 例。神経内科 69(3):261-265, 2008 査読あり
6. 吉村俊朗, 本村政勝, 辻畑光宏：【重症筋無力症-病態解明と診療の進歩】診断 Motor point 筋生検。Clinical Neuroscience 26(9):1000-1001, 2008 査読無
7. 本村政勝, 吉村俊朗, 白石裕一, 辻畑光

宏：【重症筋無力症-病態解明と診療の進歩】  
病型別臨床像 抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症。Clinical Neuroscience 26(9):983-985, 2008 査読無

8. 本村政勝, 福田卓, 吉村俊朗, 辻畑光宏：【免疫性神経疾患 Update】重症筋無力症新知見 Overview MuSK と Dok-7。日本臨床 66(6):1140-1148, 2008 査読無

9. 本村政勝, 徳田昌紘, 吉村俊朗：【神経科学の進歩と神経疾患治療】重症筋無力症の最近の進歩と最新治療。医薬ジャーナル 44(2):694-699, 2008 査読無

10. 本村政勝, 福田卓, 吉村俊朗, 辻畑光宏：【神経と免疫の接点からみた神経難病の病態】レセプターへの自己免疫からみた神経筋接合部障害 重症筋無力症をモデルとして。Medical Science Digest 34(1):22-25, 2008 査読無

11. 本村政勝, 吉村俊朗, 白石裕一, 辻畑光宏：【重症筋無力症-病態解明と診療の進歩】病型別臨床像 抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症。Clinical Neuroscience 26(9):983-985, 2008 査読無

12. 本村政勝, 福田卓, 吉村俊朗, 辻畑光宏：【免疫性神経疾患 Update】重症筋無力症新知見 Overview MuSK と Dok-7。日本臨床 66(6):1140-1148, 2008 査読無

13. 本村政勝, 福田卓, 吉村俊朗, 辻畑光宏：【神経と免疫の接点からみた神経難病の病態】レセプターへの自己免疫からみた神経筋接合部障害 重症筋無力症をモデルとして。Medical Science Digest 34(1):22-25, 2008 査読無

14. Y Yakushiji,; H Mizuta,; K Kurohara, ; H Onoue,; R Okada,; T Yoshimura,; Y Kuroda,.; Vasculitic Neuropathy in a Patient with Hereditary C1 Inhibitor Deficiency Arch Neurol. 64:731-733, 2007

査読有り

15. 本村政勝, 白石裕一, 吉村俊朗, 辻畑光宏：【薬物と神経筋障害 診断と治療の進歩】筋肉・末梢神経に影響を及ぼす薬物 神経・筋接合部に影響を及ぼす薬物. 日本内科学会雑誌 96(8):1604-1607, 2007 査読無

16. 本村政勝, 白石裕一, 吉村俊朗, 辻畑光宏：基礎研究の新たな方向性を解く 疾患解明 Overview 重症筋無力症患者の病因・病態 新たな標的抗原を求めて。実験医学 25(11):1740-1746, 2007 査読無

17. 本村政勝, 白石裕一, 吉村俊朗, 辻畑光宏：抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の病態機序。神経内科 65(4):p353-359, 2006 査読無

18. 若山吉弘, 吉村俊朗, 本村政勝：抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の筋とシナプスの病理。神経内科 65(4):p345-352, 2006 査読無

19. 本村政勝, 白石裕一, 吉村俊朗：Lambert-Eaton 筋無力症候群。Clinical Neuroscience 24(1):p79-82, 2006 査読無 [学会発表] (計 54 件)

1. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Masuda A, Yoshimura T, Takeda S, Krejci E, Ohno K.: Adeno-associated virus serotype 8-mediated targeting of asymmetric acetylcholinesterase to the synaptic basal lamina at the neuromuscular junction. 38th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington DC, USA Nov 15-19, 2008

2. Suzuki Y, Ito M, Okada T, Takeda S, Fukudome T, Yoshimura T, Krejci E, Ohno K.: Recombinant extracellular matrix protein expressed in a limited number of cells propagates to the target organ throughout the body using its nascent tissue-targeting signal. 13th Congress of

the International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry, Gdansk, Poland Aug 23-27, 2008

3. Motomura M, Shiraisih H, Eguchi K, Nakano J, Yoshimura T, Fukudome T, Matsuo H, Tsujihata M. :Experimental autoimmune MuSK antibody-induced myasthenia gravis. 8th International Congress of Neuroimmunology 2006.10.15-10.19 Nagoya, Japan

4. Motomura M, Shiraisih H, Yoshimura T:Clinical characteristics and pathophysiology of the biopsied neuromuscular junction in Japanese MuSK antibody-positive myasthenic patients. 8th International Congress of Neuroimmunology 2006.10.15-10.19 Nagoya, Japan

5. Yoshimura T, Nakano J, Fukudome T, Matuo H, Kamei S, Sakakibara A, Motomura M, Shiraishi H, Tsujino A, Eguchi K, Tsujihata M :Morphological study of motor end-plate in laminin-induced myositis in rats. XI International Congress on Neuromuscular Diseases 2006.07.02-07.07 Istanbul, Turkey

6. Nakano J, Yoshimura T, Kamei S, Motomura M, Sakakibara A, Matuo H, Shiraishi H, Tsujihata M, Eguchi K : Autoantibody against various type of laminin is detected in serum of patient with Polymyositis. XI International Congress on Neuromuscular Diseases 2006.07.02-07.07 Istanbul, Turkey

7. 吉村俊朗, 中野治郎, 福留隆泰, 本村政勝, 白石 裕一, 辻野 彰, 江口 勝美 : ラミン免疫によって生じたラットの筋炎の運動終板の検討。第 47 回日本神経学会総会

2006.05.11-05.13 東京

〔図書〕 (計 4 件)

1. 病気と薬 パーフェクト BOOK 2009 重症筋無力症 Page831-835 南山堂、監修・編集：横田千津子、池田宇一、大越教夫、共著者：本村政勝, 白石裕一, 吉村俊朗 2009.3.24

2. 病気と薬 パーフェクト BOOK 2008 重症筋無力症 Page831-835 南山堂、監修・編集：横田千津子、池田宇一、大越教夫、共著者：本村政勝, 白石裕一, 吉村俊朗 2008.3.

3. Annual Review 神経 2006 巻筋疾患 抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症患者の診断と治療。中外医学社 Page276-284 編集柳沢信夫、篠原幸人、岩田誠、清水輝夫、寺本明共著者：本村政勝, 白石裕一, 吉村俊朗, 辻畑光宏 平成 18 年 1 月

4. 臨床病態学 1 巻 筋疾患—重症筋無力症。Page177-184 ヌーベルヒロカワ 総編集：北村聖共著者：本村政勝, 白石裕一, 吉村俊朗 平成 18 年 11 月

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 俊朗(80182822) 長崎大学・  
大学院医歯薬学総合研究科・教授

(2) 研究分担者

中野 治郎(00380834)長崎大学・  
大学院医歯薬学総合研究科・助教  
本村 政勝 (70244093) 長崎大学・

大学院医歯薬学総合研究科・講師

(3) 連携研究者