

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15703

研究課題名(和文)小児重症筋無力症の免疫学的病態の解明～新規免疫抑制療法の開発に向けて～

研究課題名(英文) Research for immunological background in patients with childhood-onset myasthenia gravis (preliminary step toward novel immunosuppressive therapy)

研究代表者

本林 光雄 (Motobayashi, Mitsuo)

信州大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：90747940

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)：25名の小児重症筋無力症患者(全身型[GMG] 8名、眼筋型[OMG] 17名)および13名の対照患者を対象とし、血清BAFF値を測定した。治療前OMG群は対照群と比べて有意にBAFFが高かったが、治療前GMG群と対照群との間には有意差が見られなかった。OMG群では治療後に血清BAFF値が低下したが、GMG群では治療前後で有意な低下はなかった。今回の研究から小児OMGではBAFFが病態に関与していることが示唆されたのに対し、小児GMGにおけるBAFFの関与は不明であった。成人ではGMGでも血清BAFF値の上昇が報告されており、小児と成人におけるMGの病態の差異に影響していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児OMGでは血清BAFFが病態・病勢に関与していることが再確認された一方で、小児GMGでは血清BAFFが病態・病勢に関与している可能性が低いことを新たに示した。今後、小児MGに対する抗BAFF抗体など新規分子標的治療の導入を検討していく上で、重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Blood samples were obtained from eight patients with generalized myasthenia gravis (GMG), seventeen with ocular myasthenia gravis (OMG), and thirteen age-matched control subjects. I assayed serum concentrations of B cell-activating factor (BAFF). Serum BAFF levels were significantly higher before immune-suppressive therapy in patients with childhood-onset OMG than in controls and decreased after immunosuppressive treatment. On the other hand, there were no significant differences between GMG patients with no immune-suppressive therapy and control subjects. These results suggested that BAFF may play a key role in the pathogenesis of pediatric OMG as well as adult OMG. Furthermore, unlike adult patients with GMG, the elevation of circulating BAFF levels was not correlated with pathophysiology of childhood-onset GMG.

研究分野：小児神経学

キーワード：重症筋無力症 B細胞活性化因子 小児

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症 (MG) は、アセチルコリン受容体 (AChR) など骨格筋の神経筋シナプスに關与する分子に対する自己免疫疾患である。MG の病態の中心と考えられている獲得免疫系では、感染などを契機として生じた自己反応性 T 細胞依存性に B 細胞から自己抗体が産生される。T 細胞による細胞性免疫は、Naïve T 細胞から分化したエフェクター T 細胞 (Th1、Th2、Th17 細胞) と制御性 T 細胞 (Treg) のバランスによって成り立っている。成人 MG では、Th17 細胞の上昇や Treg の低下が病態に關与していることが報告されている。B 細胞活性化因子 (BAFF) はマクロファージ、樹状細胞等の骨髄系細胞から分泌され、B 細胞のアポトーシスに対して抑制的に働く分子である。成人 MG や全身性エリテマトーデス (SLE) では血清 BAFF 値の上昇が報告されており、SLE では BAFF を標的とした分子標的療法も臨床応用されている。¹⁻⁴

小児 MG は稀な疾患だが、視機能障害や筋力低下等の後遺症を残すことがあり、迅速かつ適切な治療を要する重要な疾患である。MG に対する免疫抑制療法はプレドニゾロン (PSL) が第一選択である。しかし、PSL の副作用として、成人と同様の副作用の他に小児では成長障害が問題となる。また、小児は成人と比べて免疫が未熟であり、易感染性も成人より問題となることがある。そのため、より副作用の少ない免疫抑制療法の開発が望まれている。

さらに、小児 MG は成人 MG と多くの相違点がある (眼筋型が多い、自己抗体陰性例が多い、胸腺腫が少ない、性差がない、自然寛解が多い) もの、小児と成人の免疫学的病態の相違は不明であった。申請者らは、小児眼筋型 MG (OMG) の免疫学的病態についていくつかの知見を報告し、MG の免疫学的背景について研究を進めてきた。^{5,6} しかし、申請者らの報告を含めたこれまでの研究では、小児全身型 MG (GMG) を含めた多数例での研究がないことが問題であった。

2. 研究の目的

本研究では、これまで解析の進んでいなかった小児 GMG を含めた小児 MG 症例を集積し、BAFF を中心とした免疫学的病態を解明することで、より有効で合併症の少ない治療の標的となりうる分子を明らかにすることを目的とした。小児 MG において BAFF など B 細胞性免疫の異常が明らかとなれば、抗 BAFF 抗体や抗 CD20 抗体といった分子標的療法を検討する根拠となりうる。また、成人 MG と小児 MG との差異を調べることで小児 MG の特殊性・独自性を明らかとし、将来的により副作用の少ない治療プロトコルの確立に寄与することを目的として本研究を計画した。

3. 研究の方法

2018 年 4 月 1 日 ~ 2020 年 3 月 31 日の期間に、当院および研究協力施設から小児 MG 患者 28 名および対照患者 13 名 (感染症や免疫疾患のないてんかんおよび神経発達症の患者) を登録した。MG 群は GMG 8 名、OMG 20 名であった。OMG のうち 3 名は、必要な臨床所見および検体量が足りず適切な解析ができなかったため除外し、最終的には 25 名 (GMG 8 名、OMG 17 名) を対象とした。臨床所見 (年齢、性別、一般身体所見、神経学的所見など)、一般血液検査所見 (抗 AChR 抗体など)、画像検査所見 (胸腺腫・胸腺過形成の有無などの評価) について、診療録および研究協力施設からの臨床データシートを用いて評価した。検体保存については、血清は採取した血液を速やかに遠心分離し、24 時間以内に -30 で冷凍保存した。末梢血単核球は、専用試験管を用いて血液を採取し、24 時間以内に -80 で冷凍保存した。リンパ球分画は、末梢血単核球をフローサイトメトリー法で解析した。サイトカイン・ケモカインは (IL-1、2、4、7、8、9、10、12、13、15、17、Eotaxin、FGF-basic、G-CSF、GM-CSF、IFN-、IP-10、MCP-1、MIP-1、MIP-1、RANTES、TNF-、VEGF) は、血清を CBA 法で解析した。BAFF は、血清を ELISA 法で解析した。結果は連結可能な匿名化をした上でネットワークから切り離れたコンピュータを用意し、被検者の秘密保護に配慮した上で保存した。統計学的解析は SPSS および 4steps エクセル統計を用いて行い、小児 MG の病型間 (OMG と GMG) 病期間 (免疫抑制療法前と寛解後) および小児 MG と対照群との間で比較を行った。三群間のデータの比較には Steel-Dwass 検定を、病期間のデータの比較には Paired *t* 検定を、2 つのパラメーター間の相関関係には Spearman の順位相関係数検定をそれぞれ用いた。抗 AChR 抗体価および血清サイトカイン値については、検出限界未満の場合は 0.1 として統計学的解析を行った。研究の実施にあたっては、当院倫理委員会にて承認を得た。

4. 研究成果

(1) 患者背景

対象となった MG および対照患者群の臨床情報を表 1 に示す。OMG 群は免疫抑制療法前の患者が 17 名 (年齢中央値 4.0 歳 [1.8~13.1 歳] 男 5 名、女 12 名) で、そのうち 8 名 (年齢中央値 5.4 歳 [1.8~10.4 歳] 男 2 名、女 6 名) は寛解後の検体も得られた。GMG 群は免疫抑制療法前の患者が 8 名 (年齢中央値 10.6 歳 [2.2~18.8 歳] 男 2 名、女 6 名) で、そのうち 4 名 (年齢中央値 9.2 歳 [2.4~13.7 歳] 男 2 名、女 2 名) は寛解後の検体も得られた。対照群の患者は 13 名で、年齢中央値は 7.4 歳 (2.6~11.8 歳) 男 5 名、女 8 名であった。

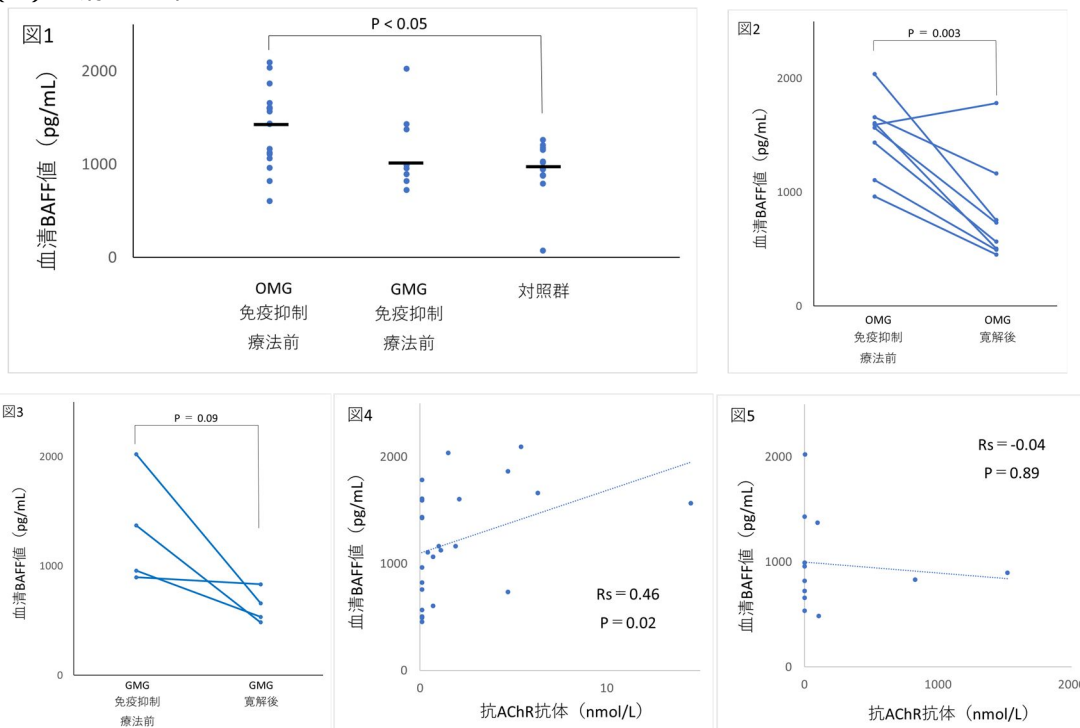
表 1. 対象患者の臨床情報

	眼筋型重症筋無力症群		全身型重症筋無力症群		対照群
	免疫抑制療法前 中央値 (範囲) または n	寛解後 中央値 (範囲) または n	免疫抑制療法前 中央値 (範囲) または n	寛解後 中央値 (範囲) または n	中央値 (範囲) または n
n	17	8	8	4	13
年齢 (歳)	4.0 (1.8-13.1)	5.4 (1.8-10.4)	10.6 (2.2-18.8)	9.2 (2.4-13.7)	7.4 (2.6-11.8)
男/女	5/12	2/6	2/6	2/2	5/8
経口抗 ChE 薬	4	4	0	0	0
免疫抑制療法					
PSL	0	3	0	0	0
Tac	0	0	0	1	0
PSL + IAPP	0	1	0	0	0
PSL + Tac	0	2	0	2	0
PSL + CyA	0	0	0	1	0
なし	17	1	8	0	0
胸腺腫/胸腺摘除	0	0	1	0	0
抗 AChR 抗体 (nmol/L)	0.7 (N.D.-14.5)	N.D. (N.D.-4.7)	0.9 (N.D.-1.520)	55.0 (0.7-829)	N.A

AChR : アセチルコリン受容体、ChE : コリンエステラーゼ、CyA : シクロスポリン A、IAPP : 免疫吸着療法、N.A : 検査未施行、N.D : 検出限界未満、PSL : プレドニゾロン、Tac : タクロリムス

経口抗コリンエステラーゼ阻害薬を服用していたのは OMG 群の 4 名のみで、免疫抑制療法前から寛解後まで継続していた。プレドニゾロン (PSL) のみの患者は OMG 寛解後の 3 名、タクロリムス (Tac) のみは GMG 寛解後の 1 名、PSL + 免疫吸着療法は OMG 寛解後の 1 名、PSL + Tac は OMG 寛解後 2 名、GMG 寛解後 2 名、PSL + シクロスポリン A は GMG 寛解後の 1 名であった。免疫抑制療法を行わず自然寛解した患者は OMG 群の 1 名であった。胸腺腫に対する胸腺摘除は GMG 群の 1 名で行われていたが、術後約 6 年で無治療時に再発がみられた。抗 AChR 抗体の中央値は OMG 免疫抑制療法前群が 0.7nmol/L (範囲<0.3~14.5nmol/L、陽性者 10 名)、OMG 寛解後群が 0.1nmol/L (範囲<0.3~4.7nmol/L、陽性者 2 名)、GMG 免疫抑制療法前群が 0.9nmol/L (範囲<0.3nmol/L、陽性者 5 名)、GMG 寛解後群が 55.0nmol/L (範囲 0.7~829nmol/L、陽性者 4 名)であった(表 1)。

(2) 血清 BAFF 値



OMG 免疫抑制療法前群、GMG 免疫抑制療法前群、および対照群の血清 BAFF の中央値は、それぞれ 1,436pg/mL (506~2,094pg/mL)、974pg/mL (722~2,023pg/mL)、および 950pg/mL (72~1,259pg/mL)であった。OMG 免疫抑制療法前群と対照群との間に有意差を認めた ($p < 0.05$) (図 1) もの、GMG 免疫抑制療法群と対照群の間には有意差を認めなかった。OMG 患者における免疫抑制療法前と寛解後との比較では、8 名中 7 名で血清 BAFF 値の低下が見られ、有意差を認めた ($p = 0.003$) (図 2)。一方、GMG 患者では免疫抑制療法前と寛解後との比較では 4 例全例で血清 BAFF 値の低下を認めたものの、統計学的有意差は見られなかった ($p = 0.09$) (図 3)。血清 BAFF

値と抗 AChR 抗体との相関について検討したところ、OMG 患者では両者に統計学的に有意な正の相関がみられた ($R_s = 0.46$, $p = 0.02$) (図 4) もの、GMG 患者では明らかな相関関係は認めなかった ($R_s = -0.04$, $p = 0.89$) (図 5)。

(3) 血清サイトカイン値

各群の血清サイトカイン値を表 2 に示す。群間で統計学的有意差は見られなかった。

表 2 . 血清サイトカインプロファイル

サイトカイン (pg/mL)	眼筋型重症筋無力症群		全身型重症筋無力症群		対照群 (n = 13) 中央値 (範囲)
	免疫抑制療法前 (n = 17) 中央値 (範囲)	寛解後 (n = 8) 中央値 (範囲)	免疫抑制療法前 (n = 8) 中央値 (範囲)	寛解後 (n = 4) 中央値 (範囲)	
Eotaxin	N.D (N.D-54.3)	12.9 (N.D-36.7)	52.9 (N.D-67.9)	60.9 (N.D-69.9)	15.6 (6.7-39.6)
IFN- γ	N.D (N.D-14.7)	N.D (N.D)	N.D (N.D-14.8)	N.D (N.D-10.2)	N.D (N.D)
IL-1 β	N.D (N.D-12.3)	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)
IL-2	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)
IL-4	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)
IL-6	N.D (N.D-151.7)	N.D (N.D)	N.D (N.D-41.0)	N.D (N.D)	N.D (N.D-15.6)
IL-8	N.D (N.D-1348.1)	N.D (N.D-69.7)	26.8 (N.D-788.0)	78.8 (N.D-278.9)	N.D (N.D-696.3)
IL-10	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)
IL-12p70	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)
IL-17A	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D-15.9)	N.D (N.D)	29.7 (N.D-55.7)
MIP-1 α	N.D (N.D-24.2)	N.D (N.D)	N.D (N.D-27.7)	N.D (N.D)	N.D (N.D-32.3)
MIP-1 β	17.9 (N.D-85.7)	N.D (N.D-12.7)	N.A	N.A	28.5 (12.6-147.0)
TNF- α	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)	N.D (N.D)
VEGF	36.7 (N.D-405.7)	28.4 (N.D-44.7)	N.A	N.A	22.8 (N.D-62.2)

IL : インターロイキン、IFN : インターフェロン、MIP : マクロファージ炎症蛋白、N.A : 検査未施行、N.D : 検出限界未満、TNF : 腫瘍壊死因子、VEGF : 血管内皮成長因子

(4) 考察

今回の研究では、これまでほとんど検討されて来なかった小児 GMG を含めた患者群において血清 BAFF 値および血清サイトカインプロファイルを評価した。サイトカインプロファイルでは群間で統計学的な有意差はみられなかったが、血清 BAFF 値は OMG が対照群と比べて高値であり、免疫抑制療法により寛解した後に有意に低下していた。抗 AChR 抗体と血清 BAFF 値との間には有意な正の相関を認めており、血清 BAFF が小児 OMG 患者の病態・病勢に関与していることが既報告^{5,6} 同様示された。一方、GMG 群においては、血清 BAFF 値は対照群と比べて上昇はなく、治療前後での低下は証明されず、抗 AChR 抗体との相関も明らかでなかった。これらの結果から、小児 OMG では血清 BAFF が病態に関与しているのに対し、小児 GMG では血清 BAFF が病態や病勢に関与しているかどうか分からないという結果であった。成人での報告では GMG でも血清 BAFF 値が上昇していることが報告されており、小児と成人における MG の病態の差異に影響している可能性が示唆された。成人 SLE では抗 BAFF 抗体が分子標的療法として用いられている。³ 今回の結果からは、小児 MG においては GMG では BAFF が病態に関与している可能性は低い可能性が考えられるため、GMG における抗 BAFF 抗体の導入は慎重に判断されるべきであることが示唆された。

今回の研究では、申請者の研究環境の変化もあり予定した症例が集積できなかった。また、測定機器の問題もあり表面マーカーや APRIL の測定もできなかった。今後、さらに症例を集積し、今回測定できなかったパラメーターも含めて詳細な解析を行っていきたい。

(5) 結論

小児 OMG では血清 BAFF が病態・病勢に関与していることが再確認された一方で、小児 GMG では血清 BAFF が病態・病勢に関与している可能性が低いことを示した。今後、抗 BAFF 抗体など新規分子標的治療の導入を検討していく上で、重要な知見が得られた。

< 引用文献 >

- [1] Stohl W, Scholz JL, Cancro MP. Targeting BlyS in rheumatic disease: the sometimes-bumpy road from bench to bedside. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:305-10.
- [2] McGrogan A, Sneddon S, de Vries CS. The incidence of myasthenia gravis: a systematic literature review. *Neuroepidemiology* 2010;34:171-83.
- [3] Espinosa G, Cervera R. Belimumab, a BlyS-specific inhibitor for the treatment of systemic lupus erythematosus. *Drugs Today (Barc)* 2010;46:891-9.
- [4] Chiang LM, Darras BT, Kang PB. Juvenile myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2009;39:423-31.

- [5] Motobayashi M, Nishimura T, Inaba Y. Usefulness of Circulating B-cell-Activating Factor Serial Monitoring in Childhood-Onset Ocular Myasthenia Gravis. *Pediatr Neurol* 2016;63:e1-e2.
- [6] Motobayashi M, Inaba Y, Nishimura T, Kobayashi N, Nakazawa Y, Koike K. An increase in circulating B cell-activating factor in childhood-onset ocular myasthenia gravis. *Pediatr Neurol* 2015;52:404-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------