

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 年度から 2008 年度

課題番号：19590374

研究課題名 (和文) 重症筋無力症の原因究明と人体病理的解明

研究課題名 (英文) Analysis of pathogenic mechanisms of myasthenia gravis.

研究代表者 久保 幸穂 (kubo sachiho)

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団

東京都老人総合研究所・助手

研究者番号 00280769

研究成果の概要：

世界に先駆けてその作成に成功したウサギ疾患モデルとマウスを使い、抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の病態解明と治療法の開発を可能とした (*Ann N Y Acad Sci.* 2008). ウサギ疾患モデルの神経筋シナプスの形態変化を共焦点顕微鏡と透過型電子顕微鏡で詳細に明らかにした. 発症したウサギの神経筋シナプス全体の形態変化が観察され、自己抗体が MuSK によるシナプスの維持機構を阻害することで発症することが明らかとなった. またウサギモデルの血清に存在する抗 MuSK 抗体は、一価の抗原結合部位しかないにも関わらず MuSK の機能を抑制する. 発症したウサギのシナプス後膜に補体による破壊像が観察されない結果とあわせて、重症筋無力症が補体の関与がなくても発症することが明らかとなった. さらに、我々は抗 MuSK 抗体陽性患者の病態により近い疾患動物モデルの作成に成功した. 患者の血清に含まれる抗 MuSK 抗体の IgG のサブクラスは補体結合が欠如するタイプ 4 が大半を占めている. 我々は補体欠損マウスに、抗 MuSK 抗体で重症筋無力症を発症させることに成功した.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：重症筋無力症、MuSK、モデル動物、神経筋シナプス、AChR

1. 研究開始当初の背景

(1) 精製した MuSK 蛋白をウサギに免疫することにより、抗 MuSK 自己抗体により重症筋無力症を発症することを世界で初めて示すこ

とを報告した (*JCI.* 2006). これにより抗 MuSK 抗体が重症筋無力症の原因となることを証明して、神経筋疾患の新しい疾患概念を確立することに貢献した. 実験動物モデルを使った MuSK 抗体陽性重症筋無力症の病態解明が

可能となった。また、我々は定量性のある抗 MuSK 抗体測定法を開発して抗 MuSK 抗体陽性の重症筋無力症患者の確定診断法を確立した (*Neurology*, 2004, 2005)。我が国における抗 AChR 抗体および抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症患者の病態を詳細に比較検討することが可能となった。

(2) 抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症はしばしば急激に症状が悪化し、球筋や呼吸筋力の低下による重症化する。しかも治療に反応せず急速に悪化する症例もある。抗アセチルコリンエステラーゼ薬は抗 AChR 抗体陽性重症筋無力症のほとんどに対して有効であるが、抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症患者に対しては効果が薄いばかりでなく、むしろ抗コリン作動性クリーゼなど過敏性を示す症例も多いことが明らかとなった。胸腺摘出は抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症に対する有効性は我々の胸腺摘出の有効性に関して、我々や他の報告からも否定的であるのが現状である。発症のメカニズムと併せて難治性および重症化の原因を解明しなければならない。

(3) 抗 MuSK 抗体陽性の重症筋無力症患者血清に存在する抗 MuSK 抗体 IgG のサブクラスは圧倒的に IgG4 である。一部 IgG2 も検出することができるが大変少ない。ヒト IgG4 には補体活性化能はないことから、抗 MuSK 抗体による病態機序には補体による後シナプス膜破壊の関与はほとんどないことが示されておりモデル実験動物を使って発症メカニズムを明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

当該研究は、これまで原因が不明であった重症筋無力症の病態を解明し、診断法と治療法の開発基盤とすることを目的としている。患者を対象とした研究は倫理面の制約があり、患者と同じ病態を示す疾患モデル動物を作成する必要がある。抗 MuSK 抗体陽性患者は重症例が多く、進行性に筋萎縮に至るケースも報告されている。当該研究では世界に先駆けてその作成に成功したウサギ疾患モデルとマウスモデルを使い、抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の病態を明らかにする。我々の疾患動物モデルの筋電図所見や病理組織像は重症筋無力症と合致していることから、このモデル動物を使って自己抗体の標的部位である神経筋シナプスの病態変化を病理学的手法により解析する。また発症したウサギのシナプスでは AChR 凝集が抑制していることを明らかにしているが、そのメカニズムを疾患動物の抗 MuSK 抗体を使って分子メ

カニズムの解析も行う。さらに補体欠損マウスにおいても抗 MuSK 自己抗体で重症筋無力症を発症するかどうか検討した。

3. 研究の方法

(1) 抗 MuSK 抗体による動物発症モデルを作成して、重症筋無力症の発症メカニズムを明らかにするためにシナプスの形態変化を指標にして解析を行った。また、抗 MuSK 抗体による AChR 凝集抑制のメカニズムをリコンビナント agrin で誘導される C2C12 培養筋管細胞の AChR 凝集アッセイシステムを使い検討した。

(2) 抗 MuSK 抗体で発症ウサギモデルのシナプス病理学的形態変化の解析動物実験計画は実験施設（東京都老人総合研究所）で承認された方法に従って行った。マウスの筋肉から精製した RNA から MuSK の cDNA を PCR 法でクローニングした。MuSK はリセプター型タイロシンカイネースであるが、その細胞外ドメインの発現ベクターを作成して Cos7 細胞にトランスフェクションの後、分泌リコンビナント蛋白として精製した。リコンビナント蛋白作成にあたって動物モデル作成、メカニズム解明、さらには抗体価を測定するための臨床検査システムを目的として、アルカリフォスファターゼ (AP)、ヒト免疫グロブリン IgG、His-tag とそれぞれ融合させた MuSK 蛋白を作成した。

ウサギに対して 1 回に 100-400 μg の精製した MuSK-Fc、-His-tag リコンビナント蛋白を 3 回以上免疫した。免疫したウサギは少なくとも 3 ヶ月以上観察し発症するかどうか観察した。発症したウサギからは、採血ののち血清を分離した。また、4%パラフォルムアルデヒド (0.1M リン酸バッファー, pH7.4) で環流固定の後、筋を採取して同じ固定液で 4 度にて 1 日インキュベーションした。筋を 10%, 20%, 30% ショ糖-PBS の溶液中に段階的に浸してインキュベーションしたのち、0. C. T. Compound と一緒にドライアイスで凍結した。凍結した筋組織を筋線維に対して平行に 30um 厚の凍結切片を作成してスライドガラスに固定した。a-bungarotoxin-rhodamin と一次抗体 (抗ニューロフィラメント抗体と抗シナプトフィジン抗体の 1 : 1 混合) で 4 度にて反応させ洗浄したのち、二次抗体 (Alexa488-抗ヒツジ抗体) で蛍光染色した。共焦点顕微鏡 (Nikon) で神経筋シナプスの形態変化を観察記録した。

透過型電子顕微鏡でウサギの神経筋シナプスを観察するために、4%パラフォルムアルデヒド(0.1M リン酸バッファー, pH7.4)で環流固定した筋をグルタル溶液で固定して透過型電子顕微鏡の観察用切片を作成した。

マウスに対しては一匹あたり 20-50 μg の精製した MuSK-His-tag リコンビナント蛋白をフットパッドに2回以上免疫した。補体欠損マウスにも同様に免疫した。発症したマウスの神経筋シナプスもウサギと同様に観察を行った。

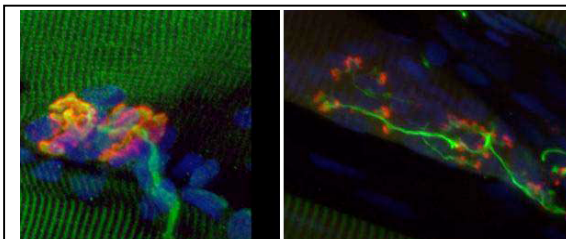
(2) 抗 MuSK 抗体の機能解析(発症の分子メカニズムの解明)

MuSK 蛋白を免疫して発症したウサギ血清に含まれる抗 MuSK 抗体がどのような機序により神経筋シナプスの AChR 凝集を抑制するか培養 C2C12 筋細胞を使って検討した。C2C12 細胞は筋芽細胞から筋管細胞へ分化誘導することができる。さらにリコンビナント agrin を培養細胞に添加すると 30 分以内に MuSK のタイロシンリン酸化が誘導するとともに、数時間以内に細胞表面の AChR 凝集を誘導する。この解析システムを使うことにより agrin-MuSK を介した AChR 凝集シグナル伝達の生化学的解析と機能解析を統合的に行うことが可能である。我々はこのアッセイシステムを使って、agrin と抗 MuSK 抗体を同時に C2C12 に添加して AChR 凝集抑制に伴う MuSK 活性化シグナルの変化を解析した。血清中の抗 MuSK 抗体の IgG サブクラスをプロテイン A で精製して解析に用いた。さらに精製した抗 MuSK 抗体 IgG をパパイン処理して Fab 分画を精製して同様に抑制実験に用いた。

MuSK のリン酸化は agrin を分化した C2C12 培養筋細胞に添加して 30 分後に作成したライゼートに対して、抗リン酸化抗体(4G10 と PY20 抗リン酸化モノクローナル抗体)によるウェスタン解析により検討した。C2C12 培養筋細胞のライゼートに対して抗 MuSK 抗で免疫沈降サンプルを泳動し PVDF メンブレンに転写した。二次抗体は抗マウス peroxidase を使って発色した。同じメンブレンを洗浄し、ウサギの抗 MuSK 抗体で MuSK 蛋白を検出した。AChR のリン酸化検出はライゼートをビオチン化した a-bungarotoxin とアビジン agarose で沈降して泳動し PVDF メンブレンに転写したのち抗リン酸化抗体(4G10 と PY20 抗リン酸化モノクローナル抗体)と抗 AChR β モノクローナル抗体によるウェスタン解析により検討した。

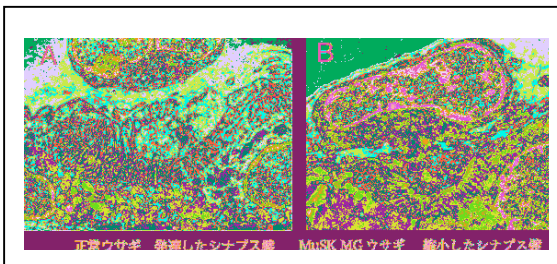
4. 研究成果

(1) 発症したウサギのシナプスの形態変化



我々はウサギ MG 発症動物の神経筋シナプスの解析から、MuSK 抗体はシナプスの後膜だけにとどまらず全体構造が縮退することを発見した(未発表)。(上図、左:正常ウサギ、右:発症したウサギ、緑:運動神経とシナプス前膜、赤 AChR:シナプス後膜)。

また透過電顕解析から正常マウスに比べ、発症したウサギのシナプス後膜襞(convolution と complexity)の顕著な減少が観察された(右上図、A:正常マウスのシナプス後膜襞、B と C:発症したウサギのシナプス後膜襞)。



我々は、精製した MuSK 蛋白をウサギに免疫することにより、抗 MuSK 自己抗体により重症筋無力症を発症させその病態を解析している。発症したウサギの神経筋シナプスでは AChR の凝集が減少していることを既に報告しているが、今回シナプスの形態変化を解析したところシナプス後膜の変化だけでなく、その病態はシナプス前膜まで及んでいることが明らかとなった。抗 MuSK 抗体は MuSK によるシナプス後膜の AChR 凝集だけでなく、おそらく MuSK を介したシナプス前膜への逆行性の維持シグナルも抑制することが考えられる。また透過型電子顕微鏡で、発症したウサギのシナプス後膜を観察したところシナプス襞の単純化や減少、さらには消失も観察された。一方で、抗 AChR 抗体発症する重症筋無力症のシナプス後膜で観察される補体による膜破壊像は全く観察されなかった。これらの結果から、我々が提唱している発症メカニズムの仮説をさらに裏付けることができた。その仮説とは、抗 MuSK 抗体が神経

筋シナプスに発現する MuSK と結合して (a) MuSK の機能を直接阻害する、 (b) MuSK 蛋白の発現減少 (antigenic modulation) の結果 MuSK の機能を抑制する。おそらく (a) と (b) の両者が作用していると考えられる。

抗 MuSK 抗体陽性の重症筋無力症患者血清に存在する抗 MuSK 抗体 IgG のサブクラスは圧倒的に IgG4 である (一部 IgG2 も検出することができるが大変少ない)。ヒト IgG4 には補体活性化能はないことから、抗 MuSK 抗体による病態機序には補体による後シナプス膜破壊の関与はほとんどないことが示されており、我々の疾患モデル動物はヒトの病態に近いことがわかった。ウサギだけでなく正常と補体欠損マウスを使った発症動物モデルを作成することに成功した。抗 MuSK 抗体による重症筋無力症発症のメカニズム、有効な治療法や予防法の開発には動物モデルが必要であるが、我々の作成した疾患動物モデルは重症筋無力症の病理病態を反映していることが明らかとなった。

抗 MuSK 抗体は重症筋無力症患者の神経筋シナプス後膜の AChR 凝集維持だけでなく、シナプス構造全体の維持にも必要で自己抗体はその機能を阻害することで発症するために難治性であると考えられる。我々の疾患動物モデルは抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の病態解明や治療法の開発に有用であることが示された。

(2) 抗 MuSK 抗体による発症の分子病態の解析。

抗 MuSK 抗体はウサギの神経筋シナプスの AChR を減少させ筋麻痺を発症させるにもかかわらず、MuSK 蛋白のタイロシンリン酸化活性をむしろ誘導することを明らかにしている。そして抗 MuSK 抗体が、培養 C2C12 細胞の AChR 凝集に抑制効果があるかどうか検討したところ、抗 MuSK 抗体は agrin による AChR 凝集を強く抑制することが明らかになっている (Shigemoto et al. JCI 2006)。これは、生体内で抗 MuSK 抗体が MuSK の機能を直接阻害してシナプス後膜の AChR 凝集抑制を誘導することを示唆していた。そこで、この抗 MuSK 抗体の IgG をパパインで処理して抗原結合部位が一価のみ有する Fab フラグメントを作成して、もとの二価の IgG と同様に agrin による AChR 凝集を抑制するかどうか検討した。その結果、二価の抗 MuSK 抗体と同様に agrin による AChR 凝集を強く抑制することを明らかにした。次に抗原結合部位が一価しかない Fab フラグメントが、抗 MuSK-IgG 抗体と同様に agrin が無くても C2C12 細胞の

MuSK を活性化するかどうか検討した。その Fab フラグメントは MuSK のリン酸化を誘導しないことが明らかとなった。抗 MuSK 抗体は agrin と同様に MuSK のタイロシンリン酸化を活性化するが、一価の抗原結合部位しか持たない Fab 分画は MuSK の活性は無い。しかし二価の抗体と同様に agrin による AChR 凝集を抑制することから、抗体が MuSK 細胞外ドメインに結合することで機能を抑制していることが強く示唆された。

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 3 件)

- ① Kimura, Y., Kubo, S., Koda, H., Noguchi, Y., Sawabe, M., Maruyama, N., and Kitamura, K. 2007. Quantitative analysis of mRNA in human temporal bones. *Acta Otolaryngol* 127:1024-1030.
- ② Shigemoto, K. Kubo, S., Jie, C., Hato, N., Abe, Y., Ueda, N., Kobayashi, N., Kameda, K., Mominoki, K., Miyazawa, A., et al. 2008. Myasthenia gravis experimentally induced with muscle-specific kinase. *Ann N Y Acad Sci* 1132:93-98.
- ③ 重本和宏、久保幸穂、丸山直記。神経筋結合部位の異常と筋力低下。日本老年医学会雑誌。Vol:46, No.2:p106-113. 2009

[学会発表] (計 2 件)

- ① K. Shigemoto, S. Kubo, N. Maruyama, J. Chen, M. Ohta, T. Konishi, and S. Matsuda. : The pathogenic roles of MuSK antibodies in myasthenia gravis. The Society for Neuroscience 38th Annual Meeting, USA. 2008
- ② 重本和宏、久保幸穂、丸山直記、小西哲郎、太田光熙 : MuSK 抗体による重症筋無力症発症の分子メカニズム 第 51 回日本神経化学会 2008. 9. 13 富山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 幸穂

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団
東京都老人総合研究所・助手
研究者番号 00280769

(2) 連携研究者

丸山 直記

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団
東京都老人総合研究所・副所長
研究者番号 00115940