

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07954

研究課題名(和文)重症筋無力症の革新的治療AChR-Fcの臨床応用へ向けた生体内での作用機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the action mechanism in vivo of AChR-Fc, a novel treatment for myasthenia gravis

研究代表者

鷗沢 顕之(Uzawa, Akiyuki)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10533317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では重症筋無力症(MG)の新規治療薬として開発した融合蛋白AChR-Fcの生体内での作用を明らかにするため、MGの病原性B細胞の同定方法の確立を目指した。MGの動物モデル(EAMG)の脾細胞、骨髄細胞、リンパ節細胞を用いて、FACS、ELISPOTで病原性B細胞の発現を解析した。EAMGの脾細胞では病原性B細胞の割合が正常ラットより多く、リンパ節細胞でより顕著であった。またEAMGの骨髄細胞においては、IgG2b陽性の病原性B細胞のspot数が正常ラットより多く見られ、EAMGにおける病原性B細胞の検出ができた。今後、治療介入による病原性B細胞の変化の解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果をもとに、今後さらにデータを積み重ねることで、自己抗体産生病原性B細胞の同定方法を完全に確立できれば、患者の血液検体を用いたMG病勢のモニタリングにも応用できる可能性がある。また融合タンパクAChR-Fcが生体内で自己抗体産生病原性B細胞の傷害活性を生じていることを証明できる可能性があり、融合蛋白AChR-FcがMGの有望な新規治療法として臨床応用できることにつながる。さらにFc融合技術は他の自己免疫疾患の新規治療としても応用できる可能性があり、社会的意義は大きい。

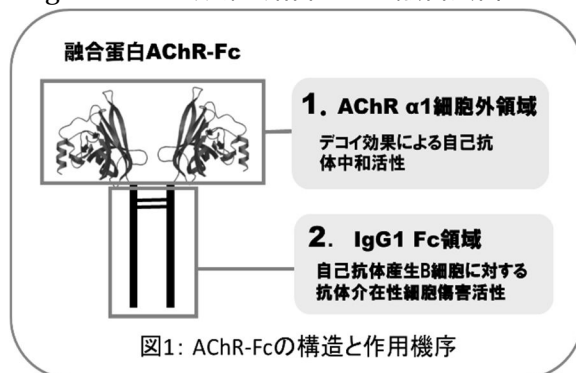
研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to establish a method for identifying pathogenic B cells of MG in order to clarify the action of the fusion protein AChR-Fc, which was developed as a novel therapeutic agent for myasthenia gravis (MG). The expression of pathogenic B cells were analyzed by FACS and ELISPOT using the cells from spleen, bone marrow, and lymph nodes of the MG animal model (EAMG). The proportions of AChR-positive B cells in splenocytes and lymph nodes cells of EAMG rats were higher than those of normal rats. In addition, a large number of spots of IgG2b-positive pathogenic B cells were also confirmed in bone marrow cells of EAMG rats. We were able to identify pathogenic B cells in MG animal model. It will be necessary to analyze changes in pathogenic B cells after therapeutic intervention.

研究分野：神経免疫学

キーワード：重症筋無力症 新規治療 B細胞 融合蛋白 動物モデル 自己抗体 自己免疫疾患

### 1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症は抗アセチルコリン受容体 (AChR) 抗体により神経筋接合部が障害される難治性の自己免疫疾患であり、既存治療では完全寛解が得られにくい。我々は重症筋無力症の新規治療薬候補として、標的抗原である AChR 構造に IgG1 の Fc 領域を結合させた融合蛋白である AChR-Fc を開発し、主に *in vitro* の系で抗 AChR 抗体の中和活性、抗 AChR 抗体産生病原性 B 細胞の傷害活性を有することを明らかにした。AChR-Fc は病原性自己抗体・病原性 B 細胞のみに作用し、正常の免疫グロブリンや B 細胞には影響しないことから有効性・安全性の両面から革新的治療となり、重症筋無力症を克服できる可能性を有している。しかし臨床応用のためには、*in vivo* での AChR-Fc の効果発現 (主に病原性 B 細胞傷害活性) についての解析がまだ不十分である。



### 2. 研究の目的

本研究の目的は、重症筋無力症の新たな治療薬として我々が開発した融合蛋白 AChR-Fc の作用機序の一つである病原性 B 細胞の傷害活性を生体内で証明することであり、そのために抗 AChR 抗体産生病原性 B 細胞の同定方法の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

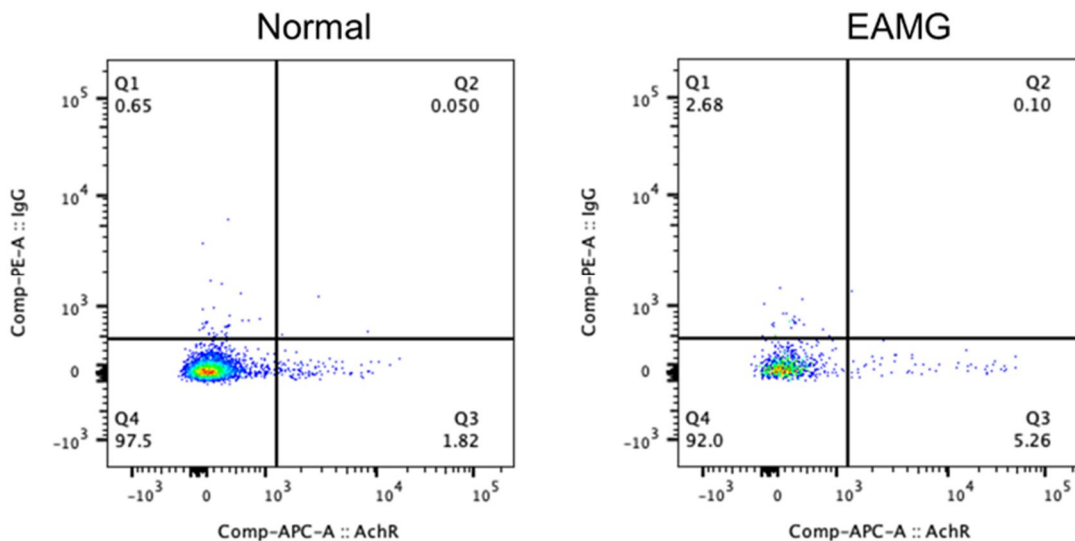
Lewis rat に Torpedo AChR を免疫した 5-8 週後の EAMG rat と同週齢の Control rat から脾臓、リンパ節、骨髄を採取し、Flowcytometry、ELISPOT で病原性 B 細胞の発現を解析した。

Flowcytometry では B 細胞 (CD11b-/IgM-/B220+)、memory B 細胞 (CD27+/CD38+ B cell)、Germinal Center B 細胞 (CD27-/CD38- B cell) とし、精製した Torpedo AChR を Biotin 化し、脾臓、リンパ節での病原性 B 細胞の検出を試みた。

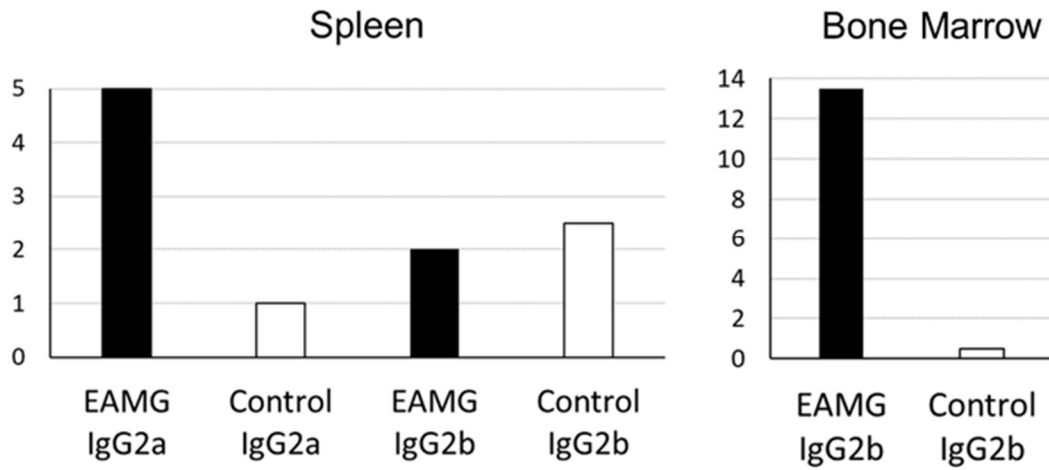
ELISPOT では脾細胞・骨髄細胞を用いて Torpedo AChR に反応する病原性形質細胞を IgG サブクラス別に検出を試みた。

### 4. 研究成果

脾細胞の検討では EAMG で AChR 陽性 B 細胞 (5.3% vs. 1.8%) および IgG+AChR 陽性 B 細胞の割合が高く (0.1% vs. 0.05%)、病原性 B 細胞の増加を反映していることが示唆された。また、少数例の検討では AChR 陽性 memory B cell は脾臓よりリンパ節で多くみられており、今後リンパ節での検討も含め多数例で検討する必要があると考えられた。



ELISPOT では脾細胞・骨髄細胞を用いて Torpedo AChR に反応する病原性 B 細胞（形質細胞）の検出を試みた。EAMG の脾細胞では IgG2a に反応する spot が control 群より多く確認された（5 vs 1 spot）。骨髄細胞においては、EAMG において IgG2b 陽性病原性 B 細胞の spot 数がコントロールより多く見られ、病原性 B 細胞の検出に有用な可能性が示された（13.5 vs 0.5 spot）。今後 n 数を増やした解析が必要である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小澤由希子、鶴沢顕之、安田真人、Bibinu Maimaitiming、小島雄太、山下潤二、成田匡邦、中島謙治、千種誠史、桑原聡
2. 発表標題 AChR-Fc融合蛋白による治療がMG動物モデルのサイトカイン動態に与える変化
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鶴沢顕之
2. 発表標題 A possible new treatment for MG: Fc fusion protein, AChR-Fc
3. 学会等名 日本神経学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鶴沢 顕之, 山下 潤二, 桑原 聡	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 6
3. 書名 Fc融合蛋白による重症筋無力症の革新的治療	

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院医学研究院脳神経内科学  
<https://www.m.chiba-u.ac.jp/dept/neuro1/>

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	桑原 聡  (Kuwabara Satoshi)  (70282481)	千葉大学・大学院医学研究院・教授    (12501)	

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