

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16495

研究課題名(和文) 設計した人工受容体とiPS細胞を用いた重症筋無力症新規治療法開発に向けた基礎研究

研究課題名(英文) Basic research for the development of a new treatment for myasthenia gravis using designed artificial receptors and iPS cells

研究代表者

山下 愛美 (Yamashita, Manami)

大阪医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：80750637

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)：運動神経と筋肉間のシナプスである神経筋接合部における異常により、重症筋無力症という疾患が生じる。神経筋接合部では、運動神経からアセチルコリンが放出され、筋肉にあるアセチルコリン受容体が受け取ることで情報が伝えられ、正常な筋肉運動を行うことができる。自己免疫疾患である重症筋無力症患者は、自己抗体がアセチルコリン受容体を攻撃してしまうことにより、シナプス機能が損なわれ、その結果筋力低下等の異常が生じる疾患である。今までは免疫を抑制する方向で治療や研究が行われてきたが、まったく逆の発想で免疫に攻撃されない受容体を遺伝子導入することで治療法を新たに提案するための基礎研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究対象である重症筋無力症は重篤な症状をきたす神経疾患であり、特に今までの治療が奏効しない、もしくは治療法の変更を必要とする患者のために、新規の治療法を開発しようとするものである。重症筋無力症は国内だけでも2万名以上の患者がいると推定されており、年々数が増えている。また、ガン治療で大きな話題となっている免疫チェックポイント阻害剤でも副作用として重症筋無力症が発生することが報告されており、その意味でも臨床的意味付けは今後増大していくものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：An abnormality at the neuromuscular junction, the synapse between motor nerves and muscles, causes a disease called myasthenia gravis. At the neuromuscular junction, the motor nerve releases acetylcholine, which is received by acetylcholine receptors in the muscles, which transmit information and allow normal muscle movement. In patients with myasthenia gravis, an autoimmune disease, autoantibodies attack acetylcholine receptors, resulting in impaired synaptic function, which in turn causes muscle weakness and other abnormalities. Until now, treatment and research have been conducted in the direction of suppressing immunity, but we have conducted basic research to propose a new treatment method by gene transfer of receptors that are not attacked by the immune system, based on a completely new concept.

研究分野：生理学

キーワード：重症筋無力症 神経筋接合部 アセチルコリン受容体 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

神経細胞間や神経と筋肉間ではシナプスを介して情報が伝達されている。シナプスにおける機能が阻害されることで、様々な精神疾患や運動障害が生じることが知られている。本研究対象である神経筋接合部における異常により、重症筋無力症という疾患が生じる。神経筋接合部では、運動神経からアセチルコリンが放出され、筋肉にあるアセチルコリン受容体が受け取ることで情報が伝えられ、正常な筋肉運動を行うことができる。自己免疫疾患である重症筋無力症患者は、自己抗体がアセチルコリン受容体等のシナプス関連分子を攻撃してしまうことにより、シナプス機能が損なわれ、その結果筋力低下等の異常が生じる疾患である。重症化すると呼吸筋の麻痺により死に至ることもある。罹患者の約 80%はアセチルコリン受容体そのものを認識してしまう自己抗体を持っている。現在治療法としては、シナプス間隙におけるアセチルコリン濃度を上げる、コリンエステラーゼ阻害剤が広く用いられている。効果はあるが一過性であり、長期投与が必要である。また、自己抗体による攻撃を防ぐために、胸腺切除やステロイド内服、免疫抑制剤を用いる治療が普及し、長期予後は格段に改善されている。しかし、寛解率は依然として 20%未滿であり、ステロイド等による免疫抑制は副作用も多く、また投薬等による効果が見られない患者も 10-20%存在している(重症筋無力症診療ガイドライン 2014 参照)。そのため、新たな治療法の開発が望まれている。そこで、今までの副作用を引き起こしやすい免疫を抑制する方向からのアプローチではなく、免疫によって攻撃されない人工的なアセチルコリン受容体を遺伝子導入し、神経筋接合部のシナプスを正常に機能させるという新たな治療法を提案する。

2. 研究の目的

本研究は、重篤な症状をきたす神経疾患をターゲットとし、特に今までの治療が奏効しない、もしくは治療法の変更を必要とする患者のために、新規の治療法を開発しようとするものである。重症筋無力症は国内だけでも 2 万名以上の患者がいると推定され、罹患による経済的損失は大きい。また、現存の治療に反応しなくなった患者などに対しての新規治療法の可能性は大きい。また、ガン治療で大きな話題となっている、免疫チェックポイント阻害剤(2018 年ノーベル生理学医学賞)でも、副作用として重症筋無力症が発生することが報告されており、その意味でも本研究が成功した場合、臨床的意味付けは今後増大していくものと考えられる。また、今までは免疫を抑える方向で治療する方針の研究が進められてきたが(Behin and Panse, J Neuromuscul Dis, 2018)、本研究は免疫で抑えられない人工受容体を導入するというまったく新しい発想を取り入れた新規治療法提供のための研究である。

3. 研究の方法

ヒトのアセチルコリン受容体遺伝子を改変して、自然界には存在しない受容体を人工的に作成する事により、重症筋無力症の新しい治療法の開発を目指す。アセチルコリン受容体に異常があるような遺伝性疾患の場合とは異なり、重症筋無力症では患者血清中に受容体に対する抗体が存在しており、単に受容体の遺伝子を導入しても、合成された受容体タンパク質は再び抗体によって攻撃されて消失してしまうことが予想される。そこで以下の 2 つの条件(図 1)をみたす人工的な受容体の開発を目指す。受容体中のエピトープ(抗体認識)部位を改変す

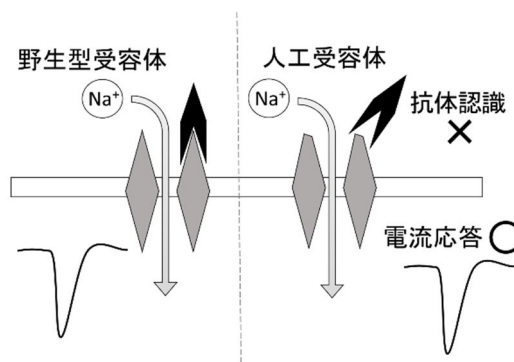


図 1 人工受容体が目指す 2 条件
 患者の自己抗体に認識されない
 正常に機能する(電流応答が出る)

ることにより、重症筋無力症患者の血清中に存在する抗体がアセチルコリン受容体を認識しないこと。アセチルコリンが受容体に結合して正常な電流を流し、筋肉の興奮を引き起こせること。この2条件を満たす、人工的にアミノ酸配列を変換した受容体を、ヒト培養細胞およびマウス骨格筋細胞に発現させ、性質を調べる。また、開発した遺伝子が将来の実際の治療にまで結びつくよう、実際のシナプス内でも他のタンパク質と正しく相互作用して機能することを確かめる。さらに、重症筋無力症患者の血清を投与すると、元々あるアセチルコリン受容体は機能不全に陥る一方、人工受容体は機能を維持することが期待される。

4. 研究成果

(1) 条件を満たす人工受容体の探索

ヒトの骨格筋から、アセチルコリン受容体の5量体を構成するサブユニット、 $\alpha 1 \cdot \beta 1 \cdot \gamma$ の遺伝子をクローニングして、ヒト培養細胞である HEK 細胞に発現させた。電気生理学的手法を用いて、HEK 細胞からホールセル記録を行い、電位固定下でアセチルコリンの投与によって流れる電流を確認した後、 $\alpha 1$ サブユニット遺伝子の中の MIR(Main Immunogenic Region)とよばれる部位の配列を改変し、作成された人工遺伝子を発現させ、免疫組織化学法を用いて、アセチルコリン受容体 $\alpha 1$ サブユニットの MIR に対して、幅広い種で反応するモノクローナル抗体、mAb35 抗体が人工受容体に結合するかをテストし、抗体に認識されないもの、アセチルコリンに反応して電流を発生するもの、を選んだ。MIR は比較的短い領域だが、 $\alpha 1$ サブユニットタンパク質の細胞膜外領域に存在し、重症筋無力症患者の抗アセチルコリン受容体抗体の大部分はこの部位をエピトープとして認識する(Vincent, Nat Rev Immunol, 2002)。複数種の人工受容体を作製し、すべての人工受容体で mAb35 に認識はされないが、電流は発生することを確認できた。

(2) 重症筋無力症患者血清を用いた研究

人工受容体が患者血清に含まれる自己抗体に認識されるか否かを免疫染色により確認したところ、予想に反して患者血清は人工受容体に結合することが判明した。理論的には結合しないはずの再度設計し直した人工受容体にも結合することが確認されたため、患者血清に含まれる抗体は MIR と呼ばれる病気の重症度に関係するアセチルコリン受容体の一部以外にも同時に結合することが示唆された。その場合、人工受容体に患者由来の自己抗体が結合しても、病気が引き起こされない可能性が考えられる。そのため、ヒト iPS 細胞由来の運動神経と培養筋肉細胞を共培養し、シナプスを形成させ、患者血清を投与する実験を行い、野生型受容体が発現している場合にはシナプス機能が損なわれるが、人工受容体が発現している場合にはシナプス機能が維持されることを期待して実験を行うことにした。

(3) iPS 細胞から分化させた運動神経と骨格筋細胞の共培養

ヒト iPS 細胞から分化させた運動神経と、分化させた培養骨格筋細胞とを共培養することで、正常なシナプスが形成され、正常に機能することを確認する実験を行った。図2に示すように、ヒト iPS 細胞由来の運動神経から筋肉上に突起がのびる様子が観察された。この結果より、形態学的には運動神経終末と筋肉に正常なシナプスが形成されたことが示唆された。さらに、骨格筋細胞を単独で培養していてもほとんど筋収縮は起こらないが、共培養することで骨格筋が収縮することを確認できた。このように形態的・機能的に神経筋接合部を再現することができた。

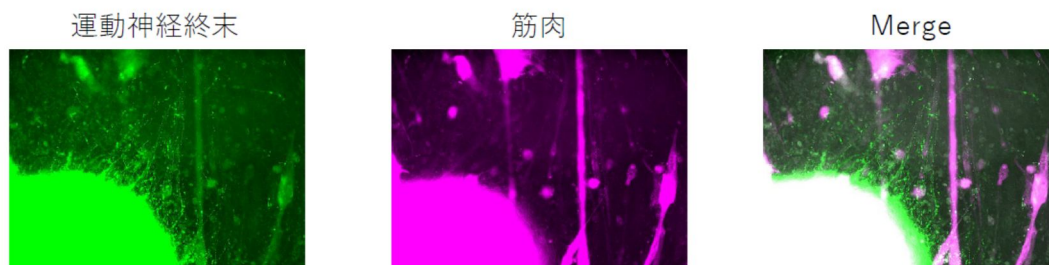


図2 iPS 細胞から分化させた運動神経と分化させた培養骨格筋細胞の共培養による神経筋接合部再現を免疫染色したもの

共培養により筋収縮が引き起こされる条件下で、mAb35 および患者血清を投与し、コントロールの血清では筋収縮が維持される一方、mAb35 および患者血清を投与することで筋収縮が抑えられることが確認できた。これは再現した神経筋接合部において重症筋無力症を引き起こすことに成功したと言える。今後、培養骨格筋細胞に人工受容体を発現させ、mAb35 および患者血清を投与しても、筋収縮を引き起こせることを確認したい。

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

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 人工アセチルコリン受容体ポリペプチド	発明者 山下 愛美	権利者 大阪医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-060926	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------