

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591102

研究課題名（和文）MuSK 抗体重症筋無力症の疾患動物モデルの開発と基盤研究による原因解明

研究課題名（英文）Elucidation of pathogenic mechanisms of myasthenia gravis caused by MuSK antibodies using a new synchronized experimental animal model.

研究代表者

重本 和宏 (SHIGEMOTO KAZUHIRO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号：40284400

研究成果の概要（和文）：従来の治療法では難治性の抗 MuSK 抗体陽性の重症筋無力症は、患者の血清中に存在する自己抗体の大部分は補体活性化作用がないため、正確な発症機序が不明であった。MuSK-MG の発症機序を明らかにするため、自己抗体産生による疾患動物モデルを新たに作製することに成功してその病態を解明した。動物モデルは短期間で 100%発症して病態の進行は再現性が高く、発症メカニズムに基づく有効な治療薬を見いだした。

研究成果の概要（英文）： We generated a new animal model in which 100% of mice synchronously develop experimental animal model of myasthenia gravis after immunization with MuSK protein. Our model provides a valuable platform from which to evaluate the role of MuSK signaling in NMJ maintenance and the immune mechanisms and pathophysiology of MuSK-MG, and we propose that 3,4-DAP may be effective as a symptomatic therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：重症筋無力症、神経筋接合部、MuSK、動物疾患モデル、治療薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 超高齢社会を背景に重症筋無力症 (myasthenia gravis:MG) の患者数が増加している。2006 年申請者はウサギの疾患モデルを作成して、MuSK (muscle-specific kinase) 抗体で MG が発症することを世界で最初に報告した (Shigemoto et al. JCl. 2006)。

(2) しかしながら、一方で解決すべき課題がまだ多く残されており海外の研究グループ

からも指摘されていた。1. 従来の治療法に対して難治性の症例が多く、急速に筋萎縮に至る症例もありその機序を明らかにする必要がある。2. 患者の MuSK 抗体は IgG4 サブクラスの割合が多く (90%以上)、IgG4 は補体結合能がない。発病メカニズムを明らかにする必要がある。3. アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害薬でむしろ悪化する症例が多い。4. アセチルコリン受容体 (AChR) 抗体で発症する MG とはメカニズムが全く異なる

ため、MuSK-MG 患者に対して有効な治療法を探索する必要がある。

2. 研究の目的

(1) MuSK 抗体 MG 患者の病態に則した動物疾患モデルの開発

補体欠損マウスに MuSK 蛋白を免疫して MG 疾患動物モデルを開発する。シナプス(運動神経終末および筋側)の形態変化、など光学顕微鏡によるイメージング、透過型と走査型電子顕微鏡の解析を行う。MuSK 抗体価の上昇と MG 発症による筋力低下と筋萎縮にあわせて筋電図(neostigmin 検査)、微量電極法によるシナプスの電気生理学的解析を行い MG 患者の病態と比較検討する。MG を発症した補体正常マウスも同様に解析を行う。

(2) 臨床への橋渡し研究のための基盤整備

抗コリンエステラーゼ薬は MuSK-MG 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。摘出胸腺病理で異常がほとんどなく現時点で摘除の適応はない。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ため、免疫抑制薬や血液浄化療法に加え、新たな薬物治療の開発が望まれる。補体欠損マウスおよび補体正常マウスを使い有効な薬物投与のための科学的根拠となる研究基盤を整備する。

3. 研究の方法

(1) MuSK 抗原蛋白を免疫で C5 補体欠損マウス 4 系統(100%発症)、C57BL/6 の C3 補体ノックアウトマウス 1 系統(100%発症)、補体正常マウス 3 系統(100-75%発症)に免疫する。体重変化と筋電図変化を経時的に測定してモニターする。抗体価と IgG サブクラスを定量測定する。

(2) 発症したマウスの、シナプス(運動神経終末および筋側)の形態変化、運動神経細胞の変化。confocal による光学顕微鏡、透過型と走査型電子顕微鏡を使って明らかにする。

(3) 筋電図、動物モデルから摘出した横隔膜を使い、微量ガラス管電極法でナプス後膜(MEPP: 微量終板電位) およびシナプス前膜(QC: Quantal content)を測定する。

(4) 抗コリンエステラーゼ薬(ネオスティグミン)を動物モデルに投与して、筋力、筋電図で効果を解析する。動物モデルの神経筋接合部のコラーゲン Q と AChE の発現を蛍光抗体法で解析する。

(5) プレシナプスのアセチルコリン放出を促進する 3,4-DAP (3,4-diaminopyridine)を動

物モデルに投与して治療効果を、微量ガラス管電極法で MEPP と QC を測定して解析する。

4. 研究成果

(1) 補体欠損マウス(A/WySnJ)に、MuSK 蛋白の 2 回目の免疫後に全てのマウスが、筋力低下と筋萎縮を発症した。これらのマウスは 100%の確率で同調して体重減少(図 1)と重篤な症状、筋力低下を示す(図 2, 3) (Mori et al. Am J Pathology 2012)。

図 1 2 回の免疫後 100% 同調して体重減少する

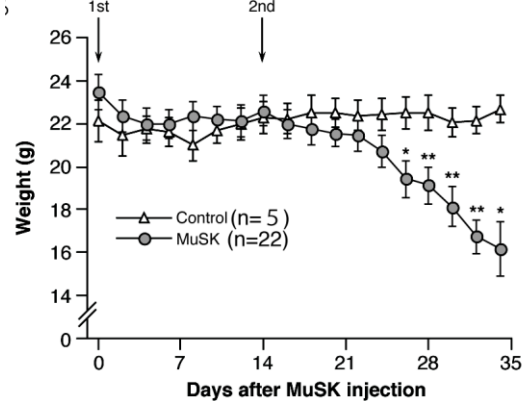


図 2 発症したマウスは顎が下がり、脊柱が湾曲す

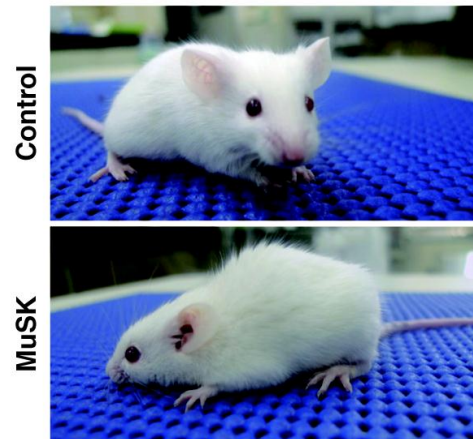
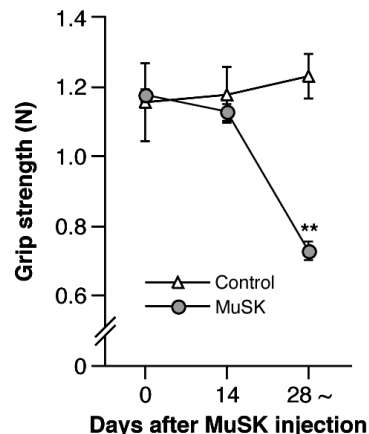


図 3 発症したマウスの筋力低下



(2) 発症したマウスでは抗 MuSK 抗体が上昇して(図 4)、IgG1 サブクラスが有意である(図 5). 患者は IgG4 サブクラスが顕著に有意であり、両者ともに Th2 依存性に産生されることから共通の自己免疫発症機構が関与すると予想される.

図4 MuSK 抗体価の上昇

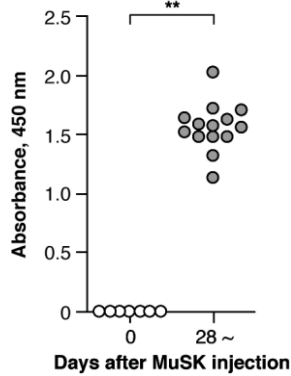
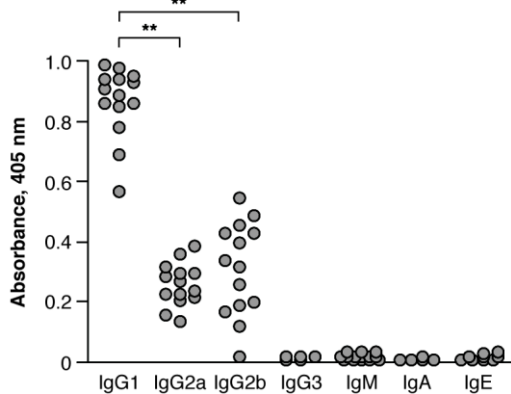


図5 MuSK 抗体のクラスと IgG サブクラス



(3) 神経筋シナプスのプレシナプスを抗シナプトフィジン抗体、ポストシナプスを抗アセチルコリン受容体抗体を使い蛍光免疫染色するとシナプス全体が縮小していた(図 6).

図 6 発症したマウスの神経筋シナプスの構造は縮小している

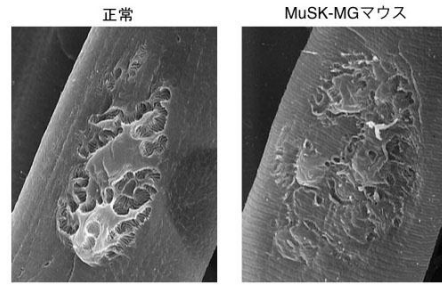
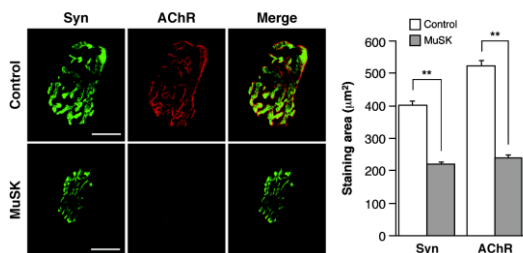


図7 発症した補体欠損マウスの神経筋シナプスの溝とひだの構造変化
走査型電子顕微鏡画像. 溝とひだの顕著な縮退が見られる.

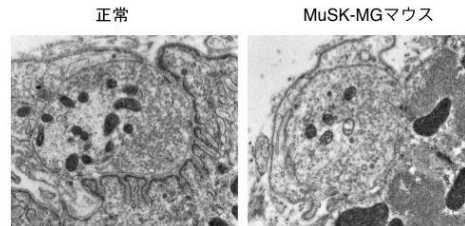
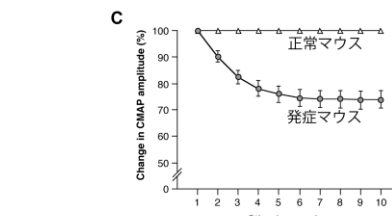
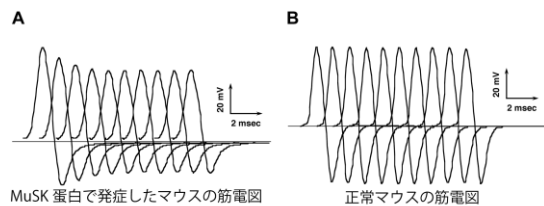


図8 発症した補体欠損マウスの神経筋シナプスのひだの構造変化
走査型電子顕微鏡画像. ひだの顕著な縮退が見られる.

(4) シナプスの形態を走査型電子顕微鏡(図 7), 透過型電子顕微鏡(図 8)で観察するとシナプス溝と襞の顕著な縮退が存在する.

(5) 疾患マウスの筋電図変化(漸減変化)は MG 患者と全く同じである(図 9). 発症したマウスの体重減少は、筋萎縮によるものと予想されたため、発症したマウスの筋の横断面を HE 染色して観察したところ、正常に比べ筋の太さが均一でないことがわかった. 一方、炎症細胞の進入や筋の核は筋線維の中央部には観察されなかった.



筋電図変化をグラフで表示

図 9 疾患モデルマウスの筋電図変化の測定結果
3Hz で座骨神経を刺激して腓腹筋の筋電図を測定した.
患者と同じ漸減変化を示す.

(6) ガラス微量電極法により筋萎縮を発症したマウスの横隔膜の膜電位を測定した. 微小終板電位 (MEPP) と終板電位 (EPP) の有意

な低下が測定された (図 10). MEPP の低下はシナプス後膜に伝導障害が存在することを示す. 計測した数値を使ってプレシナプスから放出される ACh の Quantal content (QC) を計算したところ有意な低下を認め、プレシナプスからの ACh の放出も障害されていることを明らかにした (図 10).

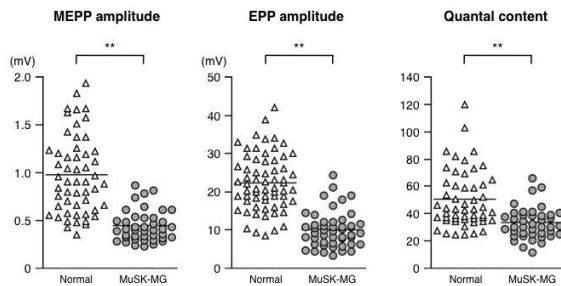


図 10 神経筋シナプスの前膜と後膜の両方で伝導障害が存在する

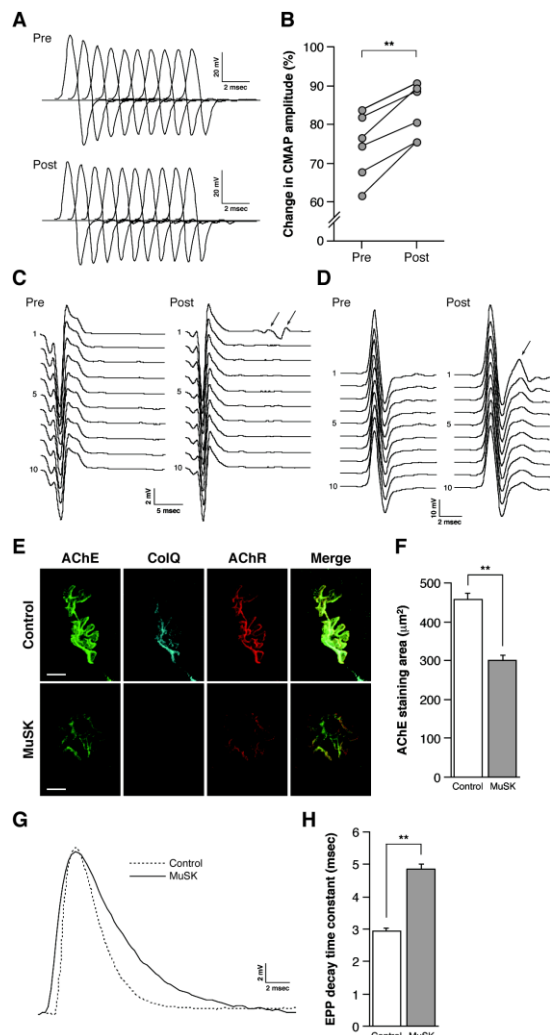


図 11 AChE 阻害剤はコリン過敏症を誘発する.

(7) 疾患モデルマウスに AChE 阻害剤 (neostigmine) を投与して筋電図を測定すると、筋電図変化 (漸減変化) の改善は限定的 (図 11A, B) である. さらに MuSK-MG 患者に

AChE 阻害剤を投与して観察される異常筋電図 (図 11C)、また先天性 AChE 欠損症の患者に投与したときに観察される異常筋電図 (図 11D) を計測した.

疾患モデルマウスの神経筋シナプスで発現するコラーゲン Q (ColoQ) と AChE を抗体で検出すると正常に比べ顕著に減少していた (図 11E, F). 微小電極法で EPP decay time constant の遅延を認め、電気生理学的に AChE の機能障害が確認された (図 11G, H). この結果から、MuSK-MG 患者の AChE に対する過敏性は同様に AChE 発現が減少しているために生じると予想される.

(8) 発症したマウスに 3,4-DAP を腹腔投与すると、複合筋活動電位の漸減反応を顕著に改善する (図 12A, B, C) だけでなく電位の増強をすることを発見した (図 12A, B, D). MuSK-MG 患者に対して 3,4-DAP が有効である可能性を示した.

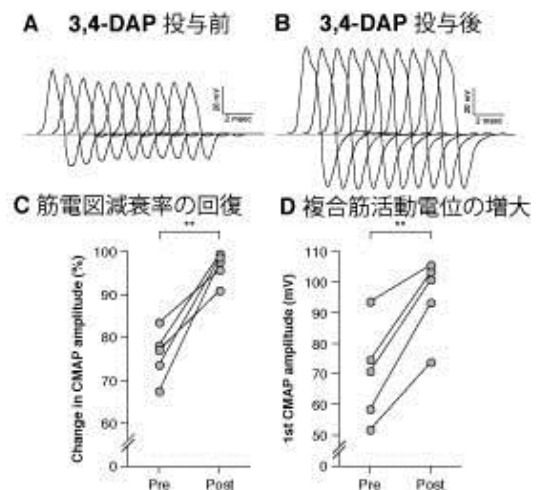


図 12 3,4-DAP は MuSK-MG のシナプス伝達を改善する

(9) C5 補体欠損マウス (A/WySnJ, A/J, DBA/2, FBV/N)、C3 ノックアウトマウス (C57BL/6) の全ての系統に MuSK-MG を 100% の確立で発症させることができた.

(10) まとめ

本助成のもと大きな成果を達成した. 補体欠損マウスを使い患者病態を忠実に反映する疾患動物モデル (マウス) の開発に成功した (Mori et al. Am J Pathology 2012). 発症したマウスは筋萎縮による体重減少、筋萎縮、MG の典型的な筋電図 (漸減反応) を示す. 補体が関与しなくとも MuSK-MG が発症することを世界で初めて体系的に証明することに成功した. MuSK は神経筋シナプスの後膜側に加え、前膜の機能維持に重要な役割を果たすことを示した. AChE 阻害剤投与後に患者と同じ筋電図を再現され、神経筋シナ

プスの AChE 発現が顕著に減少することを明らかにした。マウスの MuSK 抗体 IgG サブクラスは IgG1、患者は IgG4 サブクラスが顕著に有意で、両者ともに Th2 依存性に産生されることから共通の自己免疫発症機構が関与すると予想される。3,4-DAP が顕著に伝導障害を改善する (Mori et al. J. Neuroimmunol 2012a)。我々の結果を基に、欧米では 3,4-DAP が Lambert-Eaton 症候群で認可されていることから、MuSK-MG に対する臨床治験が開始されるであろう。またスペースの関係で省略したが、MusK-MG のウサギモデルを使い新たな発症メカニズムを提唱した (Mori et al. J. Neuroimmunol 2012b)。

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 12 件)

- ① Mori, S., Kishi, M., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Konishi, T., Maruyama, N., and Shigemoto, K. (2012). 3,4-Diaminopyridine improves neuromuscular transmission in a MuSK antibody-induced mouse model of myasthenia gravis. *Journal of neuroimmunology* 245, 75-78. (査読有)
DOI:10.1016/j.jneuroim.2012.02.010
- ② Mori, S., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Hotta, H., Desaki, J., Kishi, M., Konishi, T., Nishino, Y., Miyazawa, A., Maruyama, N., and Shigemoto, K. (2012). Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis. *The American journal of pathology* 180, 798-810. (査読有)
DOI:10.1016/j.ajpath.2011.10.031
- ③ Mori, S., Yamada, S., Kubo, S., Chen, J., Matsuda, S., Shudou, M., Maruyama, N., and Shigemoto, K. (2012). Divalent and monovalent autoantibodies cause dysfunction of MuSK by distinct mechanisms in a rabbit model of myasthenia gravis. *Journal of neuroimmunology* 244, 1-7. (査読有)
doi:10.1016/j.jneuroim.2011.12.005
- ④ Shigemoto, K., Kubo, S., Mori, S., Yamada, S., Akiyoshi, T., and Miyazaki, T. (2010). Muscle weakness and neuromuscular junctions in aging and disease. *Geriatr Gerontol Int* 10 Suppl 1, S137-147. (査読有)
DOI: 10.1111/j.1447-0594.2010.00608.x

- ⑤ 重本和宏, 森秀一, 宮崎剛, 久保幸穂. サルコペニアの発症機構. *神経内科*75(6): 584-588, 2011. (査読無)
- ⑥ 重本和宏, 森秀一, 宮崎剛, 久保幸穂 : シナプスを介したサルコペニアの発症メカニズムとバイオマーカー. *日本老年医学会雑誌*, 48 (1), 42-43, 2011. (査読無)
- ⑦ 重本和宏, 森秀一, 宮崎剛, 久保幸穂. : 運動神経細胞とサルコペニア. *Modern Physician*. 131, No. 11, 1308-11. 2011. (査読無)
- ⑧ 重本和宏, 森秀一, 宮崎剛, 久保幸穂. サルコペニアの発症機構. *神経内科* 75(6): 584-588, 2011. (査読無)
- ⑨ 大田潔江, 大田光熙, 重本和宏, (他一名). 抗MuSK抗体. *日本臨床. Vol. 68. Suppl. 633-6. 2010.* (査読無)
- ⑩ 重本和宏, 森秀一, 久保幸穂, 山田茂, 秋好沢諭, 宮崎剛. 神経筋接合部の異常と筋萎縮. *メジカルビュー社. 老年医学 update 2010-2011.* p135-p144, 2010. (査読無)
- ⑪ 重本和宏, 久保幸穂, 丸山直記. 神経筋接合部位の異常と筋力低下. *日本老年医学会雑誌.* 46(2):p106-113. 2009. (査読無)
- ⑫ 重本和宏, 丸山直記. サルコペニア (加齢性筋肉減少症) とそのバイオマーカー. *老年医学.* 47(6):p733-735. 2009. (査読無)

[学会発表] (計 13 件)

- ① Shigemoto, K.: A new synchronized model of myasthenia gravis caused by anti-MuSK antibodies. *International Conference on Nervous System Autoimmunity.* 2012. 1.27-30. Bangalore, India (招待講演)
- ② Mori S, Kubo S, Yamada S, Miyazaki T, Shigemoto K. Distinct mechanisms between divalent and monovalent MuSK antibodies involved with dysfunction of MuSK leading to myasthenia gravis. *Society for Neuroscience 2011,* 11.12-16. Washington, D.C.
- ③ Shigemoto K, Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T. Complement activation is dispensable for myasthenia gravis caused by MuSK antibodies. *10th International Congress of Neuroimmunology 2010,* 26030, Barcelona, Spain.
- ④ Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Shigemoto K. Strategy to treatment of myasthenia gravis caused by MuSK antibodies using a synchronized experimental animal model. *Society for Neuroscience 2010,* 2010, 11/17 San Diego.

- ⑤ Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Shigemoto K. Activation of complement is indispensable for myasthenia gravis caused by MuSK antibodies. Society for Neuroscience 2009, 2009, 10/17 Chicago.
- ⑥ 森秀一, 久保幸穂, 岸雅彦, 小西哲郎, 重本和宏. 抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の発症メカニズムに基づく治療薬の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012, 5/25, 東京.
- ⑦ 重本和宏. サルコペニアのメカニズム解明に向けて. 第 33 回日本基礎老化学会シンポジウム. 2011. 10. 8-9. 野田.
- ⑧ 森秀一, 重本和宏. MuSK と Dok-7 の相互作用は神経筋シナプスの維持に重要である. 第 66 回日本体力医学会大会 2011. 9. 17 下関.
- ⑨ Mori S, Kubo S, Yamada S, Miyazaki T, Shigemoto K. Distinct mechanisms between divalent and monovalent MuSK antibodies involved with dysfunction of MuSK leading to myasthenia gravis. 第 34 回日本神経科学学会大会 2011. 9. 15 横浜.
- ⑩ Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Shigemoto K. New strategy to treatment of myasthenia gravis caused by MuSK antibodies using a synchronized experimental animal model. 第 33 回日本神経科学学会大会, 2010, 9/3 神戸
- ⑪ 森秀一, 久保幸穂, 秋好沢諭, 山田茂, 宮崎剛, 重本和宏. 筋は逆行性シグナルにより筋・運動神経を維持する 第 33 回日本基礎老化学会大会. 2010, 6/18 名古屋.
- ⑫ Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Shigemoto K. Activation of complement is indispensable for myasthenia gravis caused by MuSK antibodies. 第 32 回日本神経科学大会. 2009, 9/19 名古屋.
- ⑬ 森秀一, 久保幸穂, 秋好沢諭, 山田茂, 宮崎剛, 重本和宏. MuSK は神経筋シナプスの維持に重要である ~研究モデル動物の確立~ 第 32 回日本基礎老化学会大会. 2009, 6/27 横浜.

[図書] (計 1 件)

- ① Shigemoto, K. Kubo, S. Mori, S. Yamada, S. Miyazaki, T. Akiyoshi, T and Maruyama, S. The Immunopathogenesis of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis Induced by Autoantibodies against Muscle-specific kinase. *Book title: Myasthenia gravis Diseases Mechanisms and Immune Intervention.* Editor: Premkumar Christadoss. Linus Publication, Inc. In Chapter 17, p304-323. 2009.

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
The Jackson Laboratory, USA
http://jaxmice.jax.org/news/2012/Myasthenia_gravis.html

The Jackson Laboratory, USA
Podcast
<http://jaxmice.jax.org/multimedia/podcasts/20120524-Shigemoto.mp3>

東京都健康長寿医療センター研究所
老年病研究チーム 運動器医学
http://www.tmghig.jp/J_TMIG/j_research/DA33.html

6. 研究組織
(1) 研究代表者
重本和宏 (SHIGEMOTO KAZUHIRO)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長
研究者番号: 40284400

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者
小西 哲郎 (KONISHI TETSURO)
独立行政法人国立病院機構宇多野病院・神経内科・院長
研究者番号: 50426508