

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 5 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591115

研究課題名（和文）抗コリンエステラーゼ剤の重症筋無力症治療の妥当性と運動終板構成蛋白

研究課題名（英文）Effects of the anticholinesterase drug to motor end-plates in myasthenia gravis and changes of the protein which constitutes motor end plate

研究代表者：吉村 俊朗（YOSHIMURA TOSHIRO）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80182822

研究成果の概要（和文）：

抗筋特異的チロシンキナーゼ（MuSK）抗体陽性重症筋無力症患者（MG）に抗コリンエステラーゼを投与した場合、運動終板の形態変化が生じるかを、ラットを対象に検討した。その結果は、抗 MuSK 自己抗体陽性 MG においても、通常使用量の抗コリンエステラーゼは、使用可能と判断した。MG の自己抗体としての LRP4 抗体陽性、抗 MuSK 自己抗体陽性、抗アセチルコリン受容体抗体陽性患者の運動終板の微細構造の差を明らかにした。抗 LRP4 抗体と抗 MuSK 自己抗体は、運動終板に同様の変化を生じうる。Co1Q 欠損マウスの運動終板は抗コリンエステラーゼ剤過剰投与時の変化と同様であった。

研究成果の概要（英文）：

We examined fine structural changes in motor end plates which anticholinesterase affected in rats with human anti-MuSK or anti-Acetylcholine receptor (AChR) antibodies. The results can usually use anticholinesterase of the consumption in MG with anti-MuSK autoantibody. We also studied the morphological changes in the MG patients with anti-LRP4, anti-MuSK autoantibody or anti-AChR antibodies as the causative autoantibody of MG, An anti-LRP4 antibody and the anti-MuSK autoantibody induce a same change in motor end plate. The motor end plates in the ColQ defect mouse appeared like a change at the time of the anticholinesterase drug overdosage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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・臨床神経形態学

キーワード：(1)アセチルコリン (2) MuSK (3) 抗体陰性 (4) 運動終板 (5) ラット
(6) 微細構造 (7) 重症筋無力症

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の収縮と弛緩を実現するために必要なアセチルコリンを介した神経伝達は、運動神経と骨格筋間において形成される神経筋接合部でなされる。神経筋接合部、運動終板を構成する蛋白は、アセチルコリンレセプター (AChRs), 運動神経終末端から分泌される糖タンパク質 agrin の受容体として考えられている筋特異的に発現する膜貫通型受容体 MuSK (muscle-specific kinase), ジストログリカン、ヘパリン結合成長関連分子、インテグリン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ラプシン、low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP4)、Dok-7 などが知られている。この運動終板の疾患として、重症筋無力症が代表的な疾患であり、骨格筋の易疲労性を特徴とし、血清中に抗アセチルコリン受容体抗体 (以下抗 AChR 抗体) が存在し、補体を介して、神経筋接合部でアセチルコリン受容体を破壊することにより臨床症状を呈する。現在まで、重症筋無力症の自己抗体として、上述の抗 AChR 抗体が 80% の患者に認められ、抗 AChR 抗体陰性で抗 MuSK 抗体陽性の患者が 7% に認められている。未だ約 10% の患者では自己抗体が陰性となっている。治療は血漿交換療法、免疫抑制剤、胸腺剔除が主流であるが、症状軽快の目的で抗アセチルコリンエステラーゼ剤の使用もなされている。一方、抗アセチルコリンエステラーゼ剤の投与で運動終板に形態変化が生じる (Engel, Neurology 1973) ことも報告されている。神経筋接合部の形成に必須とされる蛋白は agrin, MuSK, Dok-7, rapsin, LRP4 などが知られていて (Gautam, Cell 1996, DeChiara, Cell 1996, Okada, Science 2006, Gautam, Nature 1997, Weatherbee, Development 2006)、重症筋無力症の原因抗体の一つである抗 MuSK 抗体は、運動終板の維持、形成を阻害する。従って特に MuSK 抗体陽性重症筋無力症に抗アセチルコリンエステラーゼ剤を使用した場合、運動終板の形態に変化を及ぼし、病態を悪化させることが推定される。そこで、抗 AChR 抗体、抗 MuSK 抗体の存在下でアセチルコリンエステラーゼ阻害剤を投与した場合の運動終板の形態変化を確認し、治療薬であるアセチルコリンエステラーゼ阻害薬の使用に関する知見を得る。

MuSK は運動終板の形成維持に関与している。そして、抗 MuSK 抗体を有する重症筋無力症の運動終板の後終板の面積は保たれ、

synaptic fold の密度は保たれていることを報告した (Shiraishi, Ann Neurol 2006)。しかし、抗 MuSK 抗体がどのような機序で神経筋伝達障害を惹起しているのか不明である。

2. 研究の目的

(1) MuSK は運動終板の形成・維持に重要な役割を果たす。抗コリンエステラーゼは重症筋無力症の治療としてしばしば第一選択薬として使用される。一方、抗コリンエステラーゼ薬は、運動終板で postsynaptic fold の変性を来すことが知られている。そこで、抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症患者に抗コリンエステラーゼを投与する際、運動終板の形態変化がより生じやすいかを、ラットを対象に検討した。

(2) 運動終板でのアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 欠損症は、出生時より、著明な脱力、呼吸困難を生じ、運動発達が遅延し、約半数の患者で眼球運動不全麻痺を呈する疾患として知られる。運動終板では 12 個の AChE が collagen Q と結合し、シナプス基底膜で作用する。Collagen Q の欠損により AChE の作用がなくなり、シナプスでアセチルコリンが過剰となり臨床症状を呈する。先天性筋無力症である AChE 欠損症のモデルである Collagen Q 欠損マウスの運動終板の微細構造を観察した。

(3) 重症筋無力症の自己抗体として LRP4 抗体が注目されている。そこで、筋特異的チロシンキナーゼ (MuSK) 自己抗体を有する患者の運動終板、抗アセチルコリンレセプター抗体 (抗 AChR 抗体) のみを有する患者の運動終板との差を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 18 匹のメス Lewis ラット (200g~300g) を使用し、尾静脈からヒト抗 MuSK 抗体陽性 IgG (75mg/ml)、ヒト抗アセチルコリン抗体陽性 IgG、ヒト IgG を投与した。各 IgG を実験開始 1 日目、14 日目に投与、ラットには、臭化ネオスチグミン (0.1mg/Kg) を毎日、1 回皮下に投与した。コントロールには、生食を同量投与 28 日目に生検し、運動終板を観察した。

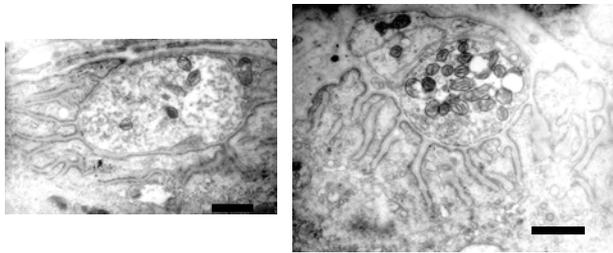
(2) Collargen Q ノックアウトマウス (Feng G et. al 2005) と Wild タイプのマウスの長趾伸筋とひらめ筋を摘出し、3% glutaraldehyde で固定後、脱水包埋し、電子顕微鏡にて写真撮影。最終倍率 22500 倍にて

運動終板を観察、計測した。

(3) LRP4 抗体陽性患者 1 名、MuSK 自己抗体のみ陽性の患者 9 名、抗 AChR 抗体のみ陽性の患者 6 名、コントロール 5 名の上腕二頭筋の運動終板領域から筋生検を行った。一部を凍結切片に、一部を 3%グルタールに固定し、運動終板を観察した。

4. 研究成果

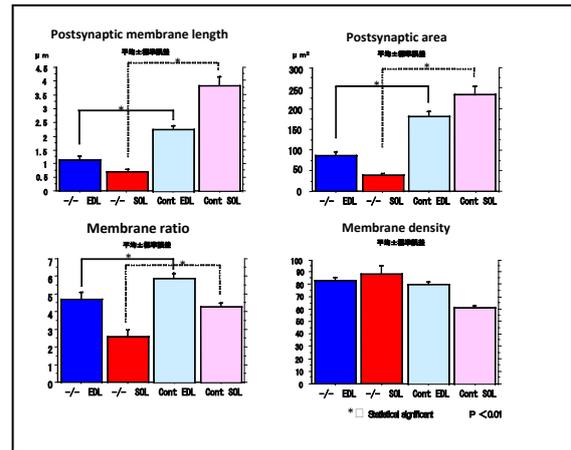
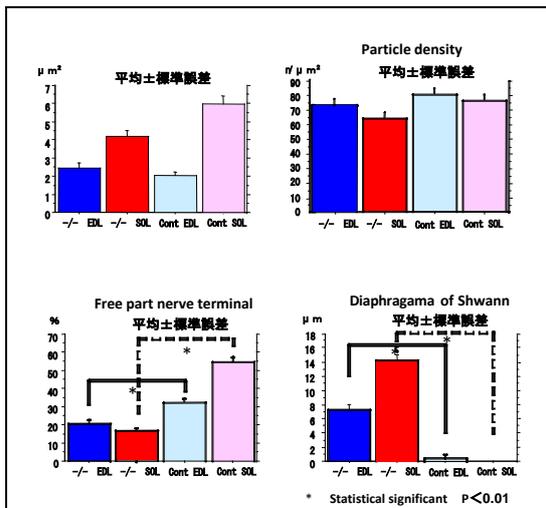
(1) 抗 MuSK 抗体陽性 IgG、抗 AChR 抗体陽性 IgG ともに、アセチルコリン受容体の減少は観察されず、補体の沈着もなかった。微細構造の変化では、臭化ネオスティグミンが投与されたラットの運動終板のシナプス間隙に結合織の浸潤が観察されたが、シナプスの変性はなかった。抗 MuSK 自己抗体陽性 MG においても抗コリンエステラーゼは、使用可能であろう。(下記写真)



Normal IgG+Neostigmin

MuSK IgG+ Neostigmin

(2) 神経終末のアセチルコリン小胞と ミトコンドリアの面積には変化なく、神経終末はシュワン細胞に覆われ、神経筋接合をつくらぬ神経終末が増加していた。神経終末の free part nerve terminal 長の減少、postsynaptic fold の短小や Postsynaptic area の狭小が観察された。(下記グラフ)



(3) 抗 LRP4 抗体陽性、抗 MuSK 抗体陽性患者、抗 AChR 患者ともに終板面積は小さくなる。抗 LRP4 抗体陽性患者 MuSK 抗体陽性患者ともに神経終末に対するシナプス襞の密度は減少していた。抗 AChR 抗体陽性患者に比較して、異常を認めなかった。抗 LRP4 抗体と抗 MuSK 自己抗体は、運動終板に同様の変化を生じうる。

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 51 件)

- Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K: Protein-anchoring Strategy for Delivering Acetylcholinesterase to the Neuromuscular Junction. Molecular Therapy. 査読有 accept. 2011
- Satoh K, Nakaoka R, Nishiura Y, Tsujino A, Motomura M, Yoshimura T, Sasaki K, Shigematsu K, Shirabe S, Eguchi K: Early detection of sporadic CJD by diffusion-weighted MRI before the onset of symptoms. J Neurol Neurosurg Psychiatry 査読有 82(8): 942-943, 2011
- Masuda T, Ota R, Ando T, Maeda N, Horie Y, Yoshimura T, Motomura M, Kawakami A: False-positive accumulation of metaiodobenzylguanidine in a case with acute intermittent porphyria. Intern Med 査読有 50(9): 1029-1032, 2011
- Origuchi T, Sakai T, Sakamoto J, Nakano J, Okita M, Yoshimura T, Eguchi K, Kawakami A: Effects of continuous passive motion on the expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in rat immobilized muscles. Health Science Research 査読有 23(2): 1-6, 2011
- 吉村俊朗, 川崎涼子, 中野治郎, 栢田智

子, 徳田昌紘, 中田るか, 片岡英樹, 佐賀里昭, 沖田 実: 【油症とPCB及びダイオキシン関連化合物に関する研究 報告集 第23集】 事件発生時、生後から思春期と成人であったカネミ油症検診者の骨密度の差. 福岡医学雑誌 査読有 102(4): 130-133, 2011

6. 磯本恵理子, 渋谷亜矢子, 木下郁夫, 大坪まゆみ, 吉村俊朗: 歩行障害精査中に発見された無症候性筋サルコイドーシス. 内科 査読有 108(3): 545-548, 2011

7. 吉村俊朗, 本村政勝, 辻畑光宏: 【神経筋接合部 基礎から臨床まで】 神経筋接合部病態の定性・定量的評価 超微形態と組織化学. BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩 査読無 63(7): 719-727, 2011

8. Nakamura H, Okada A, Kawakami A, Yamasaki S, Ida H, Masuda T, Fukuda T, Satoh K, Yoshimura T, Nakashima M, Hayashi T, Eguchi K: Rheumatoid vasculitis of crural muscles confirmed by muscle biopsy in the absence of inflammatory myopathy: histologic and MRI study. Rheumatology international 査読有 30(10): 1381-1383, 2010

9. Sakai M, Tsujino A, Eguchi H, Sato K, Shirabe S, Tateishi Y, Sato A, Tsujihata M, Yoshimura T, Eguchi K: A single-nucleotide polymorphism of PARK2 affects the phenotype in sporadic parkinson disease. Acta Medica Nagasakiensia 査読有 54(3): 67-71, 2010

10. 本村政勝, 吉村俊朗: 【シナプス 形態・機能・病態】 シナプスの病態 重症筋無力症(解説/特集) Clinical Neuroscience 査読有 28(8) 931-933, 2010

11. 横山真吾, 本田祐一郎, 近藤康隆, 片岡英樹, 坂本淳哉, 中野治郎, 沖田実, 吉村俊朗: 関節不動によるラットヒラメ筋のコラーゲンタイプの変化が足関節可動域に与える影響. 理学療法学 査読有 37(Suppl 2): 511, 2010

12. Sakamoto J, Origuchi T, Okita M, Nakano J, Kato K, Yoshimura T, et al.: Immobilization-induced cartilage degeneration is mediated through the expression of hypoxia-inducible factor-1?, vascular endothelial growth factor and chondromodulin-1. Connective Tissue Research 査読有 50(1): 37-45, 2009

13. Okita M, Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J, Origuchi T, Yoshimura T: Effects of therapeutic ultrasound on joint mobility and collagen fibril arrangement in the endomysium of immobilized rat soleus muscle. Ultrasound in Medicine and Biology 査読有 35(2): 237-244, 2009

14. Nakano J, Kataoka H, Sakamoto J,

Origuchi T, Okita M, Yoshimura T.: Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. Experimental Physiology 査読有 94(9): 1005-15, 2009

15. Fukuda T, Shiraishi H, Nakamura T, Tanaka K, Nakamura H, Tsujino A, Nishiura Y, Yoshimura T, et al: Efficacy of tacrolimus in Sjögren's syndrome-associated CNS disease with aquaporin-4 autoantibodies. Journal of Neurology 査読有 256(10): 1762-4, 2009

16. 吉村俊朗, 中野治郎, 柘田智子, 徳田昌紘, 榎原淳, 片岡英樹, 沖田実: 油症とPCB及びダイオキシン関連化合物に関する研究報告集 第22集】 カネミ油症検診者の骨密度とPCB、PCQ、PCDF. 福岡医学雑誌 査読有 100(5): 136-140, 2009

17. 本村政勝, 柘田智子, 徳田昌紘, 吉村俊朗: 【神経難病 神経と免疫のかかわり】 重症筋無力症 病態と治療 update. BIO Clinica 査読無 24(9): 809-815, 2009

18. 片岡英樹, 中野治郎, 坂本淳哉, 西川正悟, 坂井孝行, 近藤康隆, 吉村俊朗, 沖田実: 【理学療法探求Update】 温熱刺激による廃用性筋萎縮の進行抑制効果について動物実験の結果から. 理学療法探求 査読有 11: 15-21, 2009

19. 柘田智子, 本村政勝, 福田卓, 徳田昌紘, 吉村俊朗: 【呼吸器症候群(第2版) その他の呼吸器疾患を含めて】 腫瘍性疾患上皮性(原発性)腫瘍 Lambert-Eaton筋無力症候群を伴う腫瘍. 日本臨床 別冊呼吸器症候群 III 査読無 2-15, 2009

[学会発表] (計 68 件)

1. 吉村俊朗, 伊藤美佳子, 片岡英樹, 福留隆泰, Krejci Eric, 岡田尚己, 武田伸一, 本村政勝, 辻野彰, 吉村俊祐, 柘田智子, 中田るか, 徳田昌紘, 福田卓, 大野欽司: コリンエステラーゼ阻害剤投与マウスとCollagenQ欠損マウスの運動終板の微細構造の比較. 第52回日本神経学会学術大会 2011.05.18-5.20, 名古屋

2. Yoshimura T, Ito M, Honda Y, Fukudome T, Eric K, Okada N, Takeda S, Motomura M, Tsujino A, Masuda T, Fukuda T, Yoshimura S, Ohno K. Significance of fine structures in motor end-plate in mice with a collagenous sub-unit called Q(Co1Q)-deficient mutant mice. 12th International Congress on Neuromuscular Diseases. 2010.07.17-22, Naples.

3. Motomura M, Nakata R, Masuda T, Tokuda M, Eguchi K, Yoshimura T, Shiraishi H. MuSK-antibody positive Myasthenia Gravis

and associated autoimmune diseases. 12th International Congress on Neuromuscular Diseases. 2010. 07. 17-22, Naples.

4. Masuda T, Motomura M, Nakata R, Tokuda M, Fukuda T, Eguchi K, Yoshimura T, Tsujihata M, Utsugisawa K. Antibodies against main immunogenic region (MIR) of the nicotinic acetylcholine receptor and ocular Myasthenia Gravis. 12th International Congress on Neuromuscular Diseases. 2010. 07. 17-22, Naples.

5. 吉村俊朗, 伊藤美佳子, 福留隆泰, Eric Krejci, 岡田尚己, 武田伸一, 本村政勝, 辻野彰, 大野欽司. CollargenQ欠損マウスの運動終板の微細構造の変化. 日本神経学会総会 2010. 05. 20-05. 22 東京

6. 吉村俊朗, 中野治郎, 徳田昌紘, 榊原淳, 本村政勝, 福田卓, 栢田智子, 辻野彰, 江口勝美.

MuSK 抗体と抗コリンエステラーゼ剤のラット運動終板形成に及ぼす影響. 日本神経学会総会 2009 年 5 月 20 日~22 日 仙台

[図書] (計 5 件)

1. 本村政勝, 白石裕一, 吉村俊朗: 南山堂出版、病氣と薬 パーフェクトBOOK 2012、2012、6
2. 本村政勝, 白石裕一, 吉村俊朗: 南山堂出版、病氣と薬 パーフェクトBOOK 2011、2011、6
3. 本村政勝, 白石裕一, 吉村俊朗: 南山堂出版、病氣と薬 パーフェクトBOOK 2010、2010、6
4. 本村政勝, 白石裕一, 吉村俊朗: 南山堂出版、病氣と薬 パーフェクトBOOK 2009、2009、6
5. 吉村俊朗, 中野治郎, 沖田実, 北村 喬: 九州大学出版会、油症研究II 治療と研究の最前線、2009、24

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村俊朗 (YOSHIMURA TOSHIRO)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 80182822

(2) 研究分担者

本村政勝 (MOTOMURA MASAKATSU)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号: 70244093

(3) 連携研究者

()

研究者番号: