

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791009

研究課題名（和文）抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症の治療薬の探索
～新規モデル動物を用いた解析～

研究課題名（英文）Examination of treatment of myasthenia gravis with antibodies against muscle-specific kinase using experimental animal model.

研究代表者

森 秀一（MORI SHUJICHI）

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・研究員

研究者番号：30508677

研究成果の概要（和文）：本研究では、疾患動物モデルを用いて抗筋特異的キナーゼ（MuSK）抗体陽性重症筋無力症（MuSK-MG）に対して真に有効な治療薬を探索した。MuSK-MG は抗アセチルコリン受容体抗体陽性重症筋無力症とは発症機序が大きく異なるため、従来から対症治療薬として用いられているコリンエステラーゼ阻害薬の用量は可能な限り抑え、むしろ 3,4-ジアミノピリジンの使用を中心に変わっていくべきであるという治療方針の根拠が得られた。

研究成果の概要（英文）：This study examined the availability of a novel drug in the treatment of myasthenia gravis with antibodies against muscle-specific kinase (MuSK-MG) using experimental animal model. The results provided the evidence that only low-dose cholinesterase inhibitors should be used to avoid side effect, and that 3,4-diaminopyridine will be effective as a mainstay in the symptomatic therapy of MuSK-MG.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

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：神経分子病態学・神経筋シナプス・重症筋無力症・MuSK

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症は、神経筋シナプスのポストシナプス膜上の抗原タンパクに対する自己抗体によって、アセチルコリン（ACh）による神経筋伝達が阻害され、筋の易疲労性や脱力が生じる自己免疫疾患であり、厚生労働省によって特定疾患に指定されている。重症筋無力症の多くは軽快・寛解し、日常生活に復帰することが可能な疾患であるが、様々な条件が重なり、クリーゼが起こると、球筋や呼吸筋の筋力低下による呼吸困難が生じて重症化する場合もある。従って、病態に合わせて適切な治療方針を立てることは重症化を

防ぐために必須である。

今日までに、重症筋無力症の原因となる自己抗原としての根拠が確立されている分子は ACh 受容体（AChR）と筋特異的キナーゼ（MuSK）の 2 つである。抗 MuSK 抗体陽性重症筋無力症（MuSK-MG）の病態は抗 AChR 抗体陽性重症筋無力症（AChR-MG）のものと比較して多様であり、従来の治療法に対しても難治性であると報告されている。動物モデルを用いた研究から、MuSK-MG と AChR-MG の発症機序は大きく異なることが明らかとなってきており、今後は臨床病態の機序を説明した上で、適切な治療方法の確

立を目的とした研究を展開することが求められている。

2. 研究の目的

現在、重症筋無力症患者全体に占める MuSK-MG の割合は約 1 割であり、約 7 割を占める AChR-MG と比較して頻度は低い。しかし、MuSK-MG はしばしば急激に症状が悪化して重症化するために早急に治療の方針計画を立てる必要がある。にもかかわらず、治療に反応せず急速に悪化する症例も報告されている。AChR-MG と MuSK-MG の発症機序が異なることを考慮すると、区別して治療に当たる必要があると考えられる。

本研究は現在の重症筋無力症に対して新たな指針を提言するだけでなく、MuSK-MG の新たな病態機序の解明を介して新規治療法の確立につなげるため、以下のことを目的とした。

- (1) 疾患動物モデルを用いて、MuSK-MG に対して真に有効な治療薬を探索・検討する。
- (2) 疾患モデル動物から得られた病原性抗体を用いて、発症機序の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) MuSK-MG の動物モデルの作製

全ての動物実験は実験施設（東京都健康長寿医療センター研究所）の承認を得て行った。精製した組換え体 MuSK タンパクをアジュバントと混合し、20 $\mu\text{g}/\text{匹}$ を 2 週間毎に補体欠損マウス (A/WySnJ) に注射した。免疫したマウスは体重を経時的に記録し、顕著な体重低下とともに歩行障害など筋機能に以上を示した時点で病態の解析を行った。

(2) MuSK-MG 発症マウスの病態解析

神経筋シナプスの形態を観察するため、筋を採取して免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。加えて、*in vivo* と *ex vivo* で神経筋シナプスの刺激伝達能を検討した。*In vivo* では坐骨神経の反復刺激によって生じる腓腹筋の複合筋活動電位 (CMAP) の減衰率を測定し、*ex vivo* では微小ガラス管を用いて、摘出した横隔膜の神経筋シナプス近傍の膜電位を測定した。

(3) MuSK-MG 発症マウスを用いた薬剤の効能評価

コリンエステラーゼ阻害薬のネオスチグミン (37.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、K チャネル阻害薬の 3,4-ジアミノピリジン (8 mg/kg) を発症マウスの腹腔内に投与し、反復神経刺激による筋電図を測定した。また、3,4-ジアミノピリジン (100 μM) は *ex vivo* での効果も検討した。

(4) *In vitro* での抗 MuSK 抗体の機能解析

発症マウスの血清から精製した抗 MuSK 抗体を C2C12 筋管細胞の培養系に添加し、AChR の凝集、MuSK のリン酸化レベルに及ぼす影響を検討した。また、IgG 抗体をパインで処理して Fab fragment を作製し、一価の抗 MuSK 抗体の機能を同様に解析した。

4. 研究成果

(1) 薬剤による副作用の発生機序の解明

MuSK-MG 患者の特徴の一つとして、コリンエステラーゼ (ChE) 阻害薬の効果が乏しいばかりでなく、むしろコリン作動性クリーゼなど過敏反応が現れやすいということがある。MuSK-MG 発症マウスの神経筋シナプスの観察では、ポストシナプス膜上で MuSK と関連しているコラーゲン Q とアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の発現低下が認められた (図 1A)。それ故、MuSK-MG に対する ChE 阻害薬の使用は AChE の過度な機能抑制を引き起こすため、神経筋シナプスで過剰な神経活動が生じてコリン作動性クリーゼが現れやすくなると考えられた。実際に、発症マウスに ChE 阻害薬であるネオスチグミンを投与すると CMAP の減衰率は穏やかに低下するものの、コリン作動性クリーゼを示した MuSK-MG 患者と類似した筋電図所見が認められた (図 1B)。

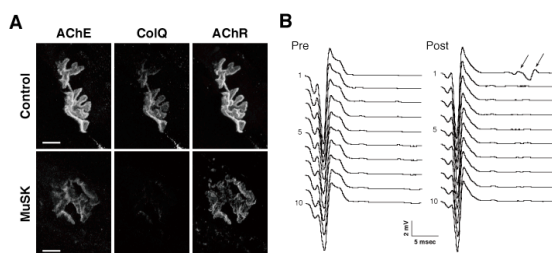


図 1 MuSK-MG の発症による AChE の機能低下

(2) MuSK-MG の新たな候補治療薬の検討

運動神経終末の K チャネルを阻害することで ACh の放出量を増加させる 3,4-ジアミノピリジン を候補治療薬とし、MuSK-MG 発症マウスの神経筋伝達能に与える影響を検討した。麻酔下の発症マウスの腹腔内に 3,4-ジアミノピリジン (8 mg/kg) を投与し、反復神経刺激による筋電図を測定すると、約 20 分後には CMAP の減衰率の低下と振幅の増大が認められた。それ故、神経筋シナプスの刺激伝達能の回復によって筋の易疲労性が改善し、最大随意筋力が上昇していると考えられた (図 2)。

また、発症マウスから採取した横隔膜の神経筋標本に 3,4-ジアミノピリジン (100 μM) を添加すると、運動神経終末からの ACh 放出量の顕著な上昇による終板電位の振幅と曲線下面積の増大が認められた。以上の結果か

ら、3,4-ジアミノピリジンは主にプレシナプスの機能を賦活し、発症マウスの神経筋伝達能を改善させていると示された。

約30年前には、AChR-MGの対症療法においてアミノピリジン類はChE阻害薬を補助する薬剤としての有用性が報告されていた。しかし、本研究の結果を考慮すると、MuSK-MGの対症療法ではChE阻害薬の用量は可能な限り抑え、むしろ3,4-ジアミノピリジンの使用を中心とした方針に変えていくべきであると考えられる。現在、我が国では3,4-ジアミノピリジンは未認可の薬剤であるが、本研究の成果を生かして迅速に臨床研究が進むことを期待したい。

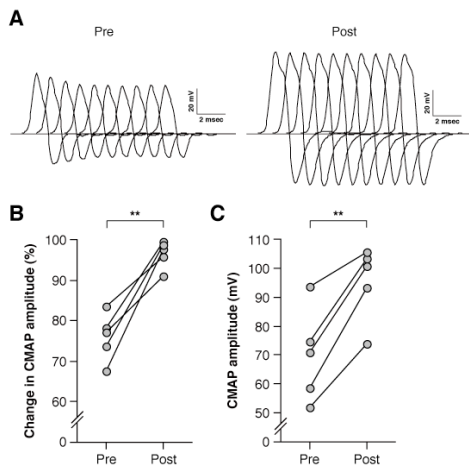


図2 神経筋伝達能に対する3,4-ジアミノピリジンの効果

(3) MuSK-MGの発症に関与する分子機序の解明

MuSK-MG患者の血中に存在する自己抗体の大部分はIgG4サブクラスで占められている。IgG4は補体活性化能を有していないという特徴に加え、生体内で他のIgG4と抗原結合部位であるFab armを交換して、機能的に一価の抗体となることが報告されている。それ故、一価と二価の両方の抗体がMuSKの機能を抑制する作用を有しているか検討した。抗MuSK IgG抗体(10 µg/ml)と抗MuSK Fab抗体(10 µg/ml)はagrinによるAChRの凝集誘導を抑制した(図3A)。しかし、Fab抗体がagrinによるMuSKの活性化(チロシン残基のリン酸化)を抑制するのに対し、IgG抗体はagrinの存在に関係なくMuSKの活性化を誘導していた(図3B)。それ故、IgG抗体は直接的にMuSKの機能を抑制するわけではなく、MuSKの下流にあるシグナル経路を変化させていると考えられた。以上の結果から、一価と二価の抗MuSK抗体は異なる作用機序を介してagrinによるAChRの凝集誘導を抑制すると考えられた。

欧米の研究グループでは、IgG4のFab arm exchangeを利用して自己抗体の病原性を抑えるという新たな治療戦略がAChR-MGで試み

られている。これは二価の抗AChR抗体による抗原(AChR)の架橋がポストシナプス膜上のAChRの減少を引き起こすため、AChR-MGの発症に関与しているという根拠が与えられているからである。現在までのところ、抗MuSK IgG4抗体にどの程度の割合で一価の抗体が存在するのかわからないが、本研究の結果を考慮すると、MuSK-MGに対しては別の治療戦略を取ることが必要になってくると考えられる。

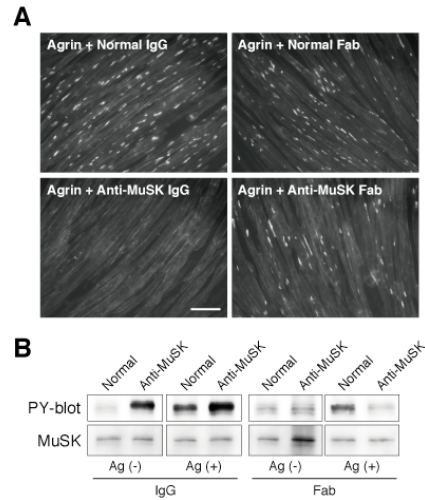


図3 抗MuSK抗体の機能解析

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13件)

- (1) Mori S, Shigemoto K. Mechanisms associated with the pathogenicity of antibodies against muscle-specific kinase in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*, in press, 2013, 査読有
DOI: 10.1016/j.autrev.2013.03.005
- (2) 森 秀一, 重本 和宏. 神経筋接合部の異常と筋萎縮. *医学のあゆみ*, 244, 696-703, 2013, 査読無
- (3) Miyazaki T, Iwasawa M, Nakashima T, Mori S, Shigemoto K, Nakamura H, Katagiri H, Takayanagi S, Tanaka S. Intracellular and extracellular ATP coordinately regulate the inverse correlation between osteoclast survival and bone resorption. *J Biol Chem*, 287, 37808-23, 2012, 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M112.385369
- (4) 森 秀一, 山田 茂, 秋好 沢論, 福永 大地, 重本 和宏. *健康医科学*, 27, 148-56, 2012, 査読無
- (5) Mori S, Kishi M, Kubo S, Akiyoshi T,

- Yamada S, Miyazaki T, Konishi T, Maruyama N, Shigemoto K. 3,4-diaminopyridine improves neuromuscular transmission in a MuSK antibody-induced mouse model of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*, 245, 75-8, 2012, 査読有
DOI: 10.1016/j.jneuroim.2012.02.010
- (6) Mori S, Yamada S, Kubo S, Chen J, Matsuda S, Shudou M, Maruyama N, Shigemoto K. Divalent and monovalent autoantibodies cause dysfunction of MuSK by distinct mechanism in a rabbit model of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 244, 1-7, 2012, 査読有
DOI: 10.1016/j.jneuroim.2011.12.005
- (7) Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Hotta H, Desaki J, Kishi M, Konishi T, Nishino Y, Miyazawa A, Maruyama N, Shigemoto K. Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis. *Am J Pathol*, 180, 798-810, 2012, 査読有
DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.10.031
- (8) Muraoka T, Aoki K, Iwasaki T, Shinoda K, Nakamura A, Aburatani H, Mori S, Tokuyama K, Kubota N, Kadowaki T, Terauchi Y. Ezetimide decreases SREBP-1c expression in liver and reverses hepatic insulin resistance in mice fed a high-fat diet. *Metabolism*, 60, 617-28, 2011, 査読有
DOI: 10.1016/j.metabol.2010.06.008

[学会発表] (計6件)

- (1) Mori S. 3,4-diaminopyridine to treatment of a MuSK antibody-induced mouse model of myasthenia gravis. 日本神経科学学会, 2012年9月21日, 名古屋
- (2) 森 秀一. 神経筋シナプスの維持メカニズムの解明とサルコペニア研究への展開. 日本体力医学会, 2012年9月15日, 岐阜
- (3) 森 秀一. 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. 日本神経学会, 2012年5月25日, 東京
- (4) Mori S. Distinct mechanism between divalent and monovalent MuSK antibodies are involved with dysfunction of MuSK leading to myasthenia gravis. Society of Neuroscience, 2011年11月15日, Washington, D.C. (USA)

- (5) 森 秀一. 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. 日本体力医学会, 2011年9月17日, 下関
- (6) Mori S. Distinct mechanism between divalent and monovalent MuSK antibodies are involved with dysfunction of MuSK leading to myasthenia gravis. 日本神経科学学会, 2011年9月15日, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 秀一 (MORI SHUICHI)

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・研究員

研究者番号 : 30508677

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :