

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591253

研究課題名(和文) 神経型アセチルコリン受容体を標的とした自己免疫性神経疾患

研究課題名(英文) Autoimmune neurological diseases targeting neuronal acetylcholine receptor

## 研究代表者

吉川 弘明 (Yoshikawa, Hiroaki)

金沢大学・保健管理センター・教授

研究者番号：10272981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：自律神経機能障害を持つ患者の中には、神経型アセチルコリン受容体(nAChR 3サブユニット)に対して自己抗体を持つ患者が存在する。我々はnAChR 3および4サブユニットの過剰発現細胞を用い、患者血清とモノクローナル抗体の影響を調べた。患者血清を培養液に添加すると、細胞表面上のnAChR(3 4)が細胞質内に取り込まれた。また、抗3抗体は3 4過剰発現細胞の3サブユニット発現量を減少させ、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を抑えることがわかった。4で処理すると、細胞表面上3サブユニットの減少はおこらなかったことより、エンドサイトーシスによる変化であることが示された。

研究成果の概要(英文)：There are patients with autoantibodies for neuronal acetylcholine receptor (nAChR alpha 3 subunit) with autonomic nervous system dysfunction. We used excessive expression cells of nAChR (alpha-3 and beta-4), and investigated the effects of patient's serum and monoclonal anti-alpha-3 antibodies. Patient serum containing medium induced internalization of nAChR (alpha-3 and beta-4) into the cytoplasm. Monoclonal anti-alpha-3 antibodies decreased the expression of alpha-3 subunit and reduced the concentration of Ca<sup>2+</sup> in cytoplasm. Processing at 4 °C revealed no decrease of alpha-3 subunit on the surface, that indicated endocytosis had a role in the process of decrease of alpha-3 subunits on the cell surface.

研究分野：神経内科学

キーワード：自己免疫疾患 自律神経機能障害 アセチルコリン受容体 細胞内カルシウム濃度 エンドサイトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

精神状態で発症し、卵巣奇形種を合併する若年女性の中に、N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)に対する自己抗体を持つ患者が存在することが Dalmau らにより示され、その詳細な臨床像が明らかになってきた (Finke C et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011)。一方、他の神経型受容体に対する自己抗体として、神経型アセチルコリン受容体の $\alpha 3$ サブユニットに対する自己抗体が見つかり、その臨床像として高度な自律神経症状が特徴であることが明らかになった (Vernino S et al. *J Neuroimmunol* 2008)。しかし、これまでの研究では神経型アセチルコリン受容体 $\alpha 3$ サブユニット抗体の測定は、epibatidine 結合部位として測定系が組み立てられており、方法論的問題が存在する。また、そのほかの神経型アセチルコリン受容体に対する自己抗体の検索に関する知見は乏しい。

ところで、自己免疫疾患である重症筋無力症 (Myasthenia gravis) の多くは、神経筋接合部の筋型アセチルコリン受容体 ( $\alpha 1$ ) を標的としている。本疾患は骨格筋の筋力低下・易疲労性のほか、胸腺腫、骨格筋障害、心筋障害などの多彩な臨床症状を呈することが分かってきた。臨床症状の多様性を説明する知見として、筋型アセチルコリン受容体 ( $\alpha 1$ ) 抗体を持つ患者は、しばしば、他の受容体やサイトカインに対する自己抗体を持つことが知られるようになった。その例として、リアノジン受容体抗体、ジヒドロピリジン受容体抗体 (dihydropyridine receptor, DHPR) (Maruta and Yoshikawa H et al. *J Neuroimmunol*. 2009)、Kv1.4 抗体 (Suzuki S et al. *J Neuroimmunol*. 2005)、Interleukin(IL)-12 p40 抗体 (Yoshikawa H et al. *J Neuroimmunol*. 2006)などがあげられ、自己抗体と臨床像との関連も明らかになりつつある (Suzuki S et al. *Autoimmune diseases*, 2011)。一方、重症筋無力症における中枢神経系症状はこれまでたびたび議論されてきたところであり、軽度の認知機能低下、てんかん、パーキンソン症状、うつ症状の報告があった。しかし、重症筋無力症の病因である筋型アセチルコリン受容体 ( $\alpha 1$ ) 抗体との関連は指摘できなかった。最近になって重症筋無力症における中枢神経症状が、新たな視点から報告されるようになってきた。すなわち、視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica) 様の中枢神経症状と重症筋無力症を合併する症例が比較的高い頻度で見いだされることがわかってきた (Furukawa Y and Yoshikawa H et al. *J Neuroimmunol* 2006, Vaknin-Dembinsky A. et al. *Arch Neurol* 2011)。これらの事実は、重症筋無力症における中枢神経症状が、新たな自己抗体測定方法の進歩とともに少しずつ認識される可能性を示している。また、原因不明の神経疾患の中に、中枢神経系のアセチルコリン受容体

等に対する自己免疫疾患が存在する可能性もあるが、これまで抗体アッセイ系の手段が開発されておらず、立証することができなかった。重症筋無力症に関しては、近年、カルシニューリン阻害薬の多施設間二重盲検群間比較試験の結果が発表されるなど (Yoshikawa H et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2011)、治療方法の改善が著しい。原因不明の神経疾患の中に治療可能な自己免疫性疾患が存在することがわかれば、治療に結びつく可能性があり、研究の推進を進める価値が高い。

## 2. 研究の目的

(1) 近年、原因不明の神経症状を呈する患者の中に、中枢神経系のニューロトランスマッター受容体に対する自己抗体を持つ患者が存在することが明らかになり、新たな神経系に対する自己抗体の存在と免疫性神経疾患の発症の関連に対して関心が高まっている。本研究の目的は、神経型アセチルコリン受容体に対する自己抗体のスクリーニング方法を確立して、神経疾患患者血清をスクリーニングすることにより、神経型アセチルコリン受容体を持つ患者の特性を明らかにするとともに、その病因に関わる基礎的研究の端緒を開くことにある。

(2) これまでの背景と研究成果をもとに、本研究では神経型アセチルコリン受容体に対する自己抗体測定系を開発し、重症筋無力症や多発性硬化症等の免疫性神経疾患患者の血清を対象にスクリーニングを行うことを第一の目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 神経型アセチルコリン受容体抗体測定系の作成

新規のアッセイ系として、神経型アセチルコリン受容体抗体測定系の開発を進める

a. 神経型アセチルコリン受容体のクローニング

ヒト脳組織より抽出した RNA から cDNA ライブラリーを作製し、PCR 法を用いて神経型アセチルコリン受容体 ( $\alpha : 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10$   $\beta : 1, 2, 3, 4$ ) をクローニングする。その cDNA 断片を用いて哺乳類細胞におけるタンパク発現用プラスミドを構築する。

b. 神経型アセチルコリン受容体発現培養細胞の作製

a で作成した各プラスミドを COS-7 細胞 (サル線維芽細胞) に導入して、一過性過剰発現細胞系を確立する。また、HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞) にプラスミドを導入して安定過剰発現細胞株を樹立する。

c. 免疫蛍光抗体法 -間接法- による神経型アセチルコリン受容体測定系の作成

b で作成した遺伝子導入 COS-7 もしくは HEK293 細胞を用いて、希釈患者血清を一次抗体とした免疫蛍光抗体法による神経型アセチルコリン受容体測定系を作成する

#### 4. 研究成果

(1) 神経型アセチルコリン受容体抗体 (nAChR) 測定系の開発を進めた。ヒト脳組織より抽出した RNA から cDNA ライブラリーを作成し、PCR 法を用いて nAChR ( $\alpha$ : 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10,  $\beta$ : 1, 2, 3, 4) をクローニングした。その cDNA 断片を用いて哺乳類細胞におけるタンパク発現プラスミドを構築した。次にこれらのプラスミドを COS-7 細胞に導入して、一過性過剰発現細胞系を確立した。また、HEK293 細胞にプラスミドを導入して安定過剰発現細胞株を樹立した。これらを用いて、免疫蛍光抗体法による nAChR 測定系の開発に取り組んだ。その結果、遺伝子導入 COS-7 細胞、HEK293 細胞を用いて、患者血清の抗 nAChR 抗体の半定量測定系を確立することが出来た。nAChR の中でも  $\alpha 3$  に注目し、これに対して自己抗体をもつ自己免疫性自律神経性ガングリオノパチー (autoimmune autonomic ganglionopathy: AAG) 患者血清をサンプルとして、免疫蛍光抗体法による抗体測定とその特異性を COS-7 細胞、HEK293 細胞から抽出したタンパクを用いて Western blot 法で確認することが出来た (図 1)。

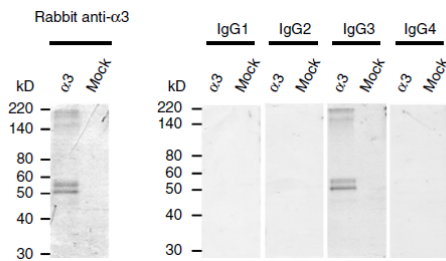


図 1 COS-7 細胞抗原の抗  $\alpha 3$  抗体、患者血清を使った Western blot 法での確認 (論文①より引用)

また、 $\alpha 3$  と  $\beta 4$  サブユニットを共発現させた HEK293 細胞において希釈患者血清中の IgG が、 $\alpha 3 \beta 4$  受容体に結合することを明らかにした (図 2)。

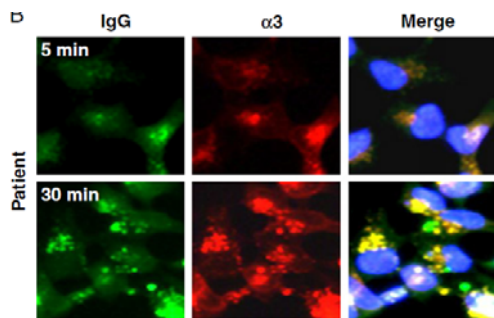


図 2 患者 IgG の  $\alpha 3 \beta 4$  受容体複合体への結合 (論文①より引用)

さらに、希釈患者血清を 37°C で反応させると、ヒト IgG と  $\alpha 3$  がともに細胞表面から細胞質内に移行することを明らかにした (図 3)。

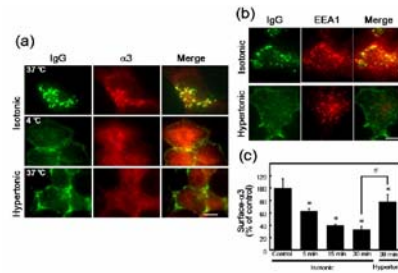


図 3  $\alpha 3$  抗体による、 $\alpha 3$  サブユニットのエンドサイトーシス (論文②より引用)

これは、AAG 血清中の IgG が、培養細胞表面上の nAChR ( $\alpha 3 \beta 4$ ) に結合した後、細胞質内に取り込まれることを証明したもので、自己免疫性神経疾患の自己抗体による細胞障害機序を示し、神経症状が出現する過程を説明するものとして意義あるものである。

(2)  $\alpha 3$  サブユニット抗体を使い、その作用を検討したところ、この抗体はニコチンにより誘発される細胞内カルシウム流入を阻害することがわかった (図 4)。

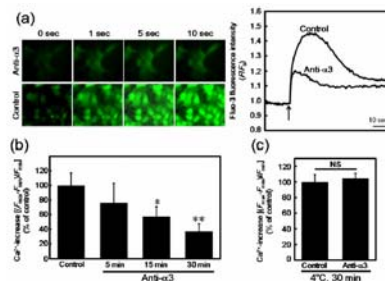


図 4 抗  $\alpha 3$  抗体添加による、細胞内カルシウム濃度上昇の阻止 (論文②より引用)

この作用は細胞培養環境の温度を下げることで、働かないことが示された。そのため、神経型アセチルコリン受容体  $\alpha 3$  サブユニットの抗体による減少現象はエンドサイトーシスを介しているものと推測された。

(3) 認知症の中で自律神経機能障害を伴う dementia with Lewy bodies (DLB) と伴わない Alzheimer 病 (AD) を自律神経機能評価により分離できないか検討した。その際、sympathetic skin response (SSR) と heart rate variability (HRV) の二つの方法を評価手段とした。その結果、SSR だけでなく HRV によっても、DLB と AD を良好に分離できることを示すことが出来た。SSR の感度は 85%、HRV の感度は 90% と日常診療で応用が期待で

きるレベルであることがわかった (図 5)

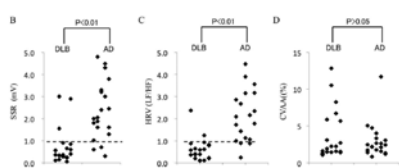


図 5 アルツハイマー病とレビー小体型認知症における SSR, HRV, CVAA の比較 (文献④より引用)

## 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 7 件)

- ① Kobayashi S, Yokoyama S, Maruta T, Negami M, Muroyama A, Mitsumoto Y, Iwasa K, Yamada M, Yoshikawa H. Autoantibody-induced internalization of nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 3$  subunit exogenously expressed in human embryonic kidney cells. *J Neuroimmunol.* 査読有、2013; 257(1-2):102-6. doi: 10.1016/j.jneuroim.2012.12.010.
- ② Kobayashi S, Yokoyama S, Maruta T, Muroyama A, Yoshikawa H, Mitsumoto Y. Attenuation of nicotine-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  influx by antibody to the nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 3$  subunits in human embryonic kidney cells. *Advances in Bioscience and Biotechnology.* 査読有、2013; 04(06):9-14.
- ③ Iwasa K, Yoshikawa H, Samuraki M, Shinohara M, Hamaguchi T, Ono K, Nakamura H, Yamada M. Myasthenia gravis: predictive factors associated with the synchronized elevation of anti-acetylcholine receptor antibody titer in Kanazawa, Japan. *J Neuroimmunol.* 査読有、2013; 267(1-2): 97-101. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.12.011
- ④ Negami M, Maruta T, Takeda C, Adachi Y, Yoshikawa H. Sympathetic skin response and heart rate variability as diagnostic tools for the differential diagnosis of Lewy body dementia and Alzheimer's disease: a diagnostic test study. *BMJ Open.* 査読有、2013; 3(3). pii: e001796. doi: 10.1136/bmjopen-2012-001796.
- ⑤ Iwasa K, Nambu Y, Motozaki Y, Furukawa Y, Yoshikawa H, Yamada, M.

Increased skeletal muscle expression of the endoplasmic reticulum chaperone GRP78 in patients with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 査読有、2014; 273(1-2): 72-6.

doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.05.006

- ⑥ 吉川弘明. 抗アセチルコリン受容体抗体検査値を読む. *内科*、査読無、2013; 111: 1388-1389.
- ⑦ 吉川弘明. 重症筋無力症と妊娠・出産. *神経内科*、査読無、2013; 78: 514-519.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 小林星太, 横山 茂, 丸田高広, 室山明子, 光本泰秀, 岩佐和夫, 山田正仁, 吉川弘明: ニコチン性アセチルコリン受容体  $\alpha 3$  サブユニットに対する自己抗体による受容体機能障害機序の検討. 第 24 回日本神経免疫学会学術集会、2012. 9. 20-21、軽井沢
- ② 岩佐和夫, 吉川弘明, 小野賢二郎, 浜口毅, 篠原もえ子, 佐村木美晴, 中村裕之, 山田正仁. 重症筋無力症通院患者における 2012 年上半期の抗アセチルコリン受容体抗体価の上昇現象. 第 54 回日本神経学会学術大会. 2013 年 5 月 29 日、東京.
- ③ 岩佐和夫, 吉川弘明, 小野賢二郎, 浜口毅, 篠原もえ子, 佐村木美晴, 中村裕之, 山田正仁. 重症筋無力症患者における抗アセチルコリン受容体抗体価の 5 年間にわたる時系列推移. 第 28 回日本神経免疫学会学術大会. 2013 年 11 月 27 日、下関.
- ④ Yoshikawa H. The current concept of therapy for myasthenia gravis in Japan. 2013 Annual Meeting of Korea Society of Neuromuscular Disorder (Keynote Lecture). 2013 November 22, Seoul, Korea.
- ⑤ 岩佐和夫, 吉川弘明, 小野賢二郎, 浜口毅, 篠原もえ子, 佐村木美晴, 中村裕之, 山田正仁. 抗 AChR 抗体価の上昇に関わる因子は、潜在性重症筋無力症の症状発言にも影響を与える. 第 55 回日本神経学会学術大会、2014 年 5 月 21 日~24 日、福岡.
- ⑥ 岩佐和夫, 吉川弘明, 古川 裕, 山田正仁. 重症筋無力症骨格筋における caveolin-3 の発現について. 第 19 回日本神経感染症学会学術集会・第 26 回神経免疫学会学術集会合同集会. 2014 年 9 月 4 日~6 日、金沢.
- ⑦ 吉川弘明. プログラフ製造販売後調査最終結果報告. 第 55 回日本神経学会学術集会、第 13 回重症筋無力症治療フォーラム. 2014 年 5 月 21 日~24 日、福岡
- ⑧ Yoshikawa H, Takada S, Adachi Y, Furukawa Y, Sakai K, Iwasa K, Yamada M. Analysis of Clinical Profile of MG Patients from the National Database of Japan. 第 56 回日本神経学会学術大会、

2015年5月20日～23日、新潟。

〔図書〕(計 3件)

- ① 吉川弘明 他. 重症筋無力症(成人) 今日の神経疾患治療指針 第2版、2013 医学書院
- ② 吉川弘明 他. 甲状腺異常性眼症 今日の神経疾患治療指針 第2版、2013 医学書院
- ③ 根上昌子、丸田高広、吉川弘明. 心拍変動を利用した認知症判定システムの研究 パーソナルヘルスケア、ユビキタス、ウェアラブル医療実現に向けたエレクトロニクス研究最前線 2013 株式会社 エヌ・ティイー・エス

〔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 3件)

名称：レピー小体型認知症の判定方法、判定装置並びにプログラム  
発明者：丸田高広、吉川弘明、角弘諭  
権利者：金沢大学  
種類：特許  
番号：5252345  
取得年月日：2013年4月26日  
国内外の別：国内

名称：心筋障害の検査方法  
発明者：吉川弘明、横山茂、丸田高広、角弘諭、根上昌子  
権利者：金沢大学  
種類：特許  
番号：5370969  
取得年月日：2013年9月27日  
国内外の別：国内

名称：診断支援システム、方法及びコンピュータプログラム  
発明者：角弘諭、丸田高広、吉川弘明、相馬務  
権利者：金沢大学  
種類：特許  
番号：5429517  
取得年月日：2013年12月13日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉川 弘明 (YOSHIKAWA, Hiroaki)  
金沢大学・保健管理センター・教授  
研究者番号：10272981

(2)研究分担者

横山 茂 (YOKOYAMA, Shigeru)  
金沢大学・子どものこころの発達研究センター・教授  
研究者番号：00210633

(3)連携研究者

足立 由美 (ADACHI, Yumi)  
金沢大学・保健管理センター・准教授  
研究者番号：30447677