

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 8 日現在

機関番号：87302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461284

研究課題名(和文)重症筋無力症のアセチルコリン受容体主要免疫原性領域に対する抗体：多施設共同研究

研究課題名(英文)Antibodies against the main immunogenic region of the acetylcholine receptor correlate with disease severity in myasthenia gravis; Multicenter Study

研究代表者

成田 智子(Narita, Tomoko)

独立行政法人国立病院機構長崎川棚医療センター(臨床研究部)・その他部局等・研究員

研究者番号：20549373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：重症筋無力症(MG)は、神経筋接合部に免疫反応が生じることによって、シナプスの伝達障害が生じる疾患である。その80%以上にアセチルコリン受容体(AChR)に結合する抗体(AChR抗体)が検出され、診断的価値は高い。しかし、個体間で抗体価を比較しても、各々の臨床症状や重症度を反映しない。そこで我々は、主に免疫反応を引き起こすと考えられるエピトープにたいするモノクローナル抗体と患者血清を競合阻害させることで、患者血清中に含まれる主要免疫原性領域(MIR)に対する抗体(MIR抗体)の測定に成功した。

研究成果の概要(英文)：MG is a disease caused by autoimmune reaction at neuromuscular junction mediated antibodies. Antibody that binds to the acetylcholine receptor (AChR Ab) is useful diagnostically because it detected in more than 80% of MG patients. On the other hand, there is less correlation between AChR Ab titer and clinical symptoms and severity. In this study, we have succeeded in the measurement of antibody against main immunogenic regions (MIR antibody) to competitive inhibition of the monoclonal antibody and the patient serum against epitopes that are cause mainly immune response.

研究分野：神経病態免疫学

キーワード：重症筋無力症 主要免疫原性領域 MIR アセチルコリン受容体

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症 (myasthenia gravis: MG) は、神経筋接合部に生じる自己免疫反応のために、筋力低下や繰り返し運動による易疲労性が生じる疾患である。一般的に、接合部で免疫反応の標的となる分子はアセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor: AChR) であり、MG 全体の 80~85% で陽性となる。その他の標的分子としては、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ (muscle-specific receptor tyrosine kinase: MuSK) や LDL 受容体関連蛋白質 4 (LDL receptor-related protein 4: Lrp4) が知られている。ここでは高頻度に見られる AChR に対する免疫反応について検討する。現在行われている AChR 抗体測定は、放射性同位体を用いた免疫沈降法 (RIA) であり、¹²⁵I- BuTx でラベルした AChR を用いる。この方法で測定された AChR 抗体価は MG 患者において、高い疾患特異性をもち、診断に有用である。また、個々の患者における抗体価の推移は、病勢や治療効果と連動して変動することが知られており、治療の指標となり得る。しかし、患者個体間においては、従来の抗体価は臨床症状の特徴や重症度を直接表しておらず、高値ゆえに重症になるなどの推測ができない。重症筋無力症の特徴として、その多くは軽症である眼症状で発症するにもかかわらず、眼筋型として経過するのは 20% であり、80% は全身型に移行する。よって、早期にその後の経過を予測できることは、治療方針を決定するために重要となるが、従来の抗体価ではその予測ができない。

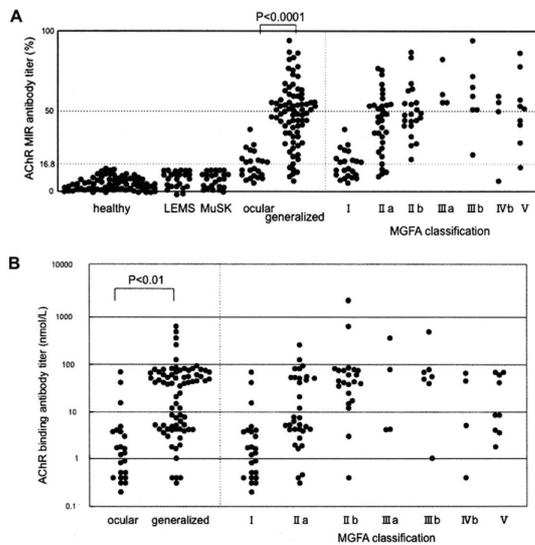
そこで、より病因と強く関連した抗体やエピトープを探るべく、AChR を抗原として種々のモノクローナル抗体 (mAb) が作成され、MG 患者血清と AChR の結合を最も阻害する抗体とそのエピトープ検索がなされた。そして、患者血清の結合を最も阻害するモノクローナル抗体のエピトープを主要免疫原性領域

(MIR) と概念づけた。現在、MIR に結合するモノクローナル抗体は mAb35 として市販されている。mAb35 は、MIR を認識する mAb と考えられ、ラット由来の抗体であり、ラットに受動免疫することで EAMG を引き起こし、その神経筋接合部病理検査では補体沈着と破壊を認めることが確認されている。電子顕微鏡では、mAb が AChR の 2 つのサブユニットの外側単に結合する様子が確認されている。

そこで我々は、患者 AChR 抗体のうち、MIR に結合する抗体の割合を測定し、臨床症状と比較検討を行った。

MG 患者 102 例について、¹²⁵I- BuTx-AChR を抗原として、mAb35 と患者血清を競合阻害させることで、mAb35 のエピトープ、すなわち MIR に結合する抗体成分 (以下 MIR 抗体) の抗体価を測定した。得られた結果を、性、年齢、Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA) 分類、Quantitative MG score (QMG スコア)、胸腺腫の合併の有無など種々の臨床的特徴との関連性に関して、通常の AChR 抗体価と比較し、二変量解析を用いて検討した。その結果、全身型 MG における MIR 抗体価は眼筋型に比べて有意に高値であった (図 1)。二変量解析では、従来の結合抗体と比較して MIR 抗体は MGFA 分類、QMG スコア、球症状の有無と有意な相関がみられ、一方で眼筋型かどうかという点では負の相関がみられた。

(図 1)



2. 研究の目的

以上の結果を受けて、MIR 抗体の特徴をより詳細に検討し、MG 患者の病勢を反映する抗体として臨床応用可能かどうかを確認することが必要である。特に、重症度との相関、発症時点での予後予測、治療経過との関連などについて検討し、MIR 抗体の実用化を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 検体

総合花巻病院 槍沢公明、長根百合子、慶応義塾大学 鈴木重明らを中心とする研究グループである Japam MG Registry study における MG 患者データベースに登録された MG 患者 676 名(2013 年時点)のうち、血清が得られた症例 175 例について検討した。登録情報には、MGFA 分類、QMG スコア、治療歴、クリーゼの有無などの臨床情報が含まれており、測定した抗体価と各臨床情報との比較検討を行った。

(2) 抗体測定

MIR 抗体の測定方法は、1982 年に Tzar tos らによって発表された方法を基にして、当方で二次抗体などの調整工夫を行った。

アッセイ方法は、まず ^{125}I - BuTx-AChR を

抗原として用い、前述の mAb35 と患者血清とともに反応させた。その後 mAb35 を認識する抗ラット IgG 抗体を二次抗体として用い、免疫沈降させて、測定した。得られた測定値は、高原と mAb35 のみを反応させた場合の測定値を 100% として患者血清が結合を阻害した割合を算出することで、MIR に抗体価とした。

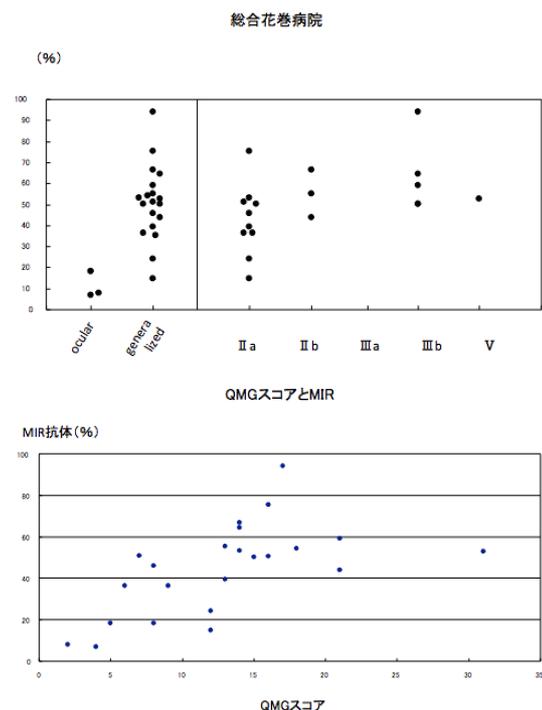
(3) データ解析

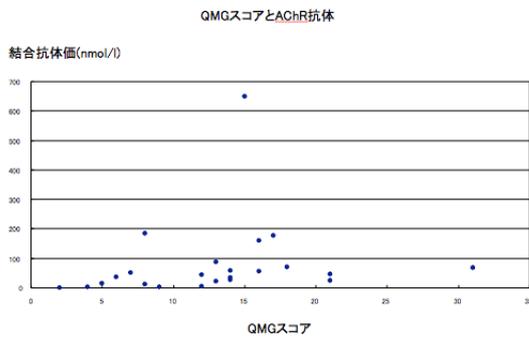
従来の AChR 抗体は疾患特異性が高く、診断に際し非常に有用である。本抗体測定では、従来の方法と比較し、予想される利便性が実際に認められるかどうかの主眼を置き、データ解析を行った。

4. 研究成果

まず、総合花巻病院の検体を測定したところ、図 2 のように、MIR 抗体では眼筋型と全身型の間で著明な抗体価の差が見られた。また、QMG スコアと抗体価の間には相関関係が示唆された。

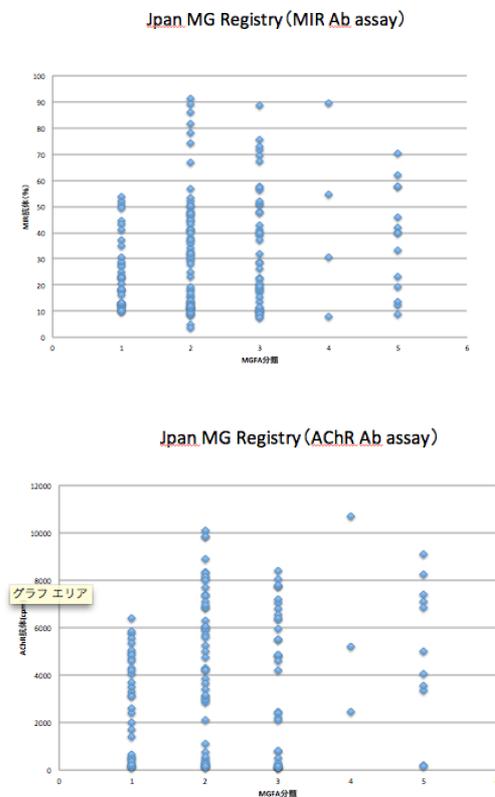
(図 2)





そこで、Japan MG Registry Study の検体測定に着手した。図3に測定結果を示す。

(図3)



上記のように、ここでは眼筋型と全身型を比較して、MIR 抗体価の有意な差はみられなかった

今回の結果の要因としては、複数の施設から得たサンプルで、後ろ向き研究であるため、個々の MG 患者の経過の中で検体を採取されたタイミングが一定していない、特に治療介入がなされた後の検体が含まれており結果に影響したと考えられる。実際、これまで当方の症例において治療経過を追った抗体測定では、治療に伴い抗体価が減少することが判明している。

また、一連の抗体測定が、RI を用いた方法であり、測定可能な施設に限られる点も、研究施設を限定する要因となっている。

今後は、非 RI を用いた同様の抗体測定が可能となれば、さらに多くの施設で研究可能となり、当研究部でも測定可能となるため、研究の機会が広がる。また、前向き研究を行い、初発時、増悪時、治療後など臨床病期において抗体価を測定することで、その役割について検討していくことが必要と考える。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1) 新しい抗体測定法と治療戦略 成田智子
第 54 回日本神経学会総会ランチョンセミナー
— 2013 年 5 月 30 日 東京

〔図書〕(計 5 件)

1) 重症筋無力症の自己抗体, 本村政勝, 成田智子 医学書院 Brain and Nerve, 2013, 65 巻 4 号, 433-439

2) ランバート・イートン筋無力症候群, 成田智子, 本村政勝 医学書院 今日の神経疾患 治療方針 第 2 版, 2013, 835-839

3) 重症筋無力症 成田智子, 松尾秀徳 南江堂 内科疾患最新の治療 増大号 明日への指針 2014,

4) 免疫性神経疾患の分子標的治療 成田智子, 松尾秀徳 医歯薬出版株式会社 免疫性神経疾患-病態解明と治療の最前線 2015, 569-573

5) 重症筋無力症 福嶋かほり, 成田智子, 本村政勝 Medical View EBM に基づく脳神経疾患の基本治療指針 2016 666-671

6) Lambert-Eaton 筋無力症候群 成田智子, 本村政勝 Medical View EBM に基づく脳神経疾患の基本治療指針 2016 672-675

〔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

名称：長崎川棚医療センター

URL：<http://www.nkmc.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田 智子 (Narita Tomoko)
独立行政法人国立病院機構長崎川棚医療
センター(臨床研究部)・統括医療診療部・
医師
研究者番号：20549373

(2) 研究分担者

本村 政勝 (Motomura Masakatsu)
長崎総合科学大学・工学(系)研究科(研究
院)・教授
研究者番号：70244093

中根 俊成 (Nakane Shunya)
熊本大学・医学部附属病院・寄付講座教員
研究者番号：70398022

(3) 連携研究者

松尾 秀徳 (Matsuo Hidenori)
独立行政法人国立病院機構長崎川棚医療
センター(臨床研究部)・医学系・教授
研究者番号：20380975

鈴木 重明 (Suzuki Shigeaki)
慶応義塾大学・大学病院・講師
研究者番号：50276242

村井 弘之 (Murai Hiroyuki)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：80325464