

# 筋無力症の分子病態の解明と病因分子の探索

東京大学 医科学研究所 腫瘍抑制分野

樋口 理

## 1. はじめに

重症筋無力症(myasthenia gravis, MG)は、その病因が自己抗体であることが唯一実験的に証明されている自己免疫疾患であり、自己抗体が標的とする抗原分子を明らかにすることは、MGの診断や治療戦略の策定、さらには分子病態を解明する上で最重要課題となる。これまで、MGの病因として同定されているのはアセチルコリン受容体(AChR)に対する抗体と、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ(MuSK)に対する抗体である。AChRは神経筋接合部におけるアセチルコリンを介した神経筋伝達に不可欠であり、一方、MuSKは神経筋接合部の形成と維持に必須な分子であることから、これらに対する自己抗体がMGの発症に深く関わっていることを強く示唆する。事実、両者に対する抗体が直接MGを引き起こすことは実験的にも証明されている。現在、全身型MG患者のおよそ8割にAChR抗体が、また、約1割にMuSK抗体が検出されるが、残りの1割程度では病因となる自己抗体の正体が不明とされている。我々は、MGの病因となる新たな自己抗体の抗原分子として、MuSKと同様に神経筋接合部の形成や維持に必須であるLDL受容体関連タンパク質4(LDL receptor-related protein 4, Lrp4)に着目した。Lrp4は筋細胞に発現する膜貫通型タンパク質(推定分子量:215 kDa)で、運動神経の軸索終末端から分泌されるプロテオグリカンであるneural agrinと結合し、その信号をMuSKに伝達することで運動終板上でのAChRの高密度凝集を促進すると考えられている。従って、MuSK抗体と同様に、Lrp4抗体がMGを引き起こす可能性は十分に考えられる。そこで、本研究では、MG患者の血清中にLrp4自己抗体が存在すると仮定し、その探索を計画した。Lrp4抗体の探索に着手するにあたり、血清中に存在する抗体を簡便かつ高感度に検出する新しい技術としてルシフェラーゼ免疫沈降法(luciferase immunoprecipitation method, LUCIP)を開発した。LUCIPでは、抗原ポリペプチドとカイアシ(海洋性動物プランクトンの一種)由来ルシフェラーゼ(Gaussia luciferase, GL)のキメラ分子をリポーターとして利用する。リポーターの抗原ポリペプチド部分に結合した抗体は、プロテインGセファロースを利用することで簡単な遠心操作のみにて回収することが可能となり、最終的には、プロテインGセファロースとともに沈降したIgG複合体中のルシフェラーゼ活性を測定することで目的とする抗体の有無が判定される。LUCIPでは、リポーターの抗原ポリペプチドのアミノ末端に分泌シグナルを配置することで、リポーターを産生する動物細胞の培養上清中にリポーター分子が分泌されるためその精製が容易であるだけでなく、Lrp4のように分泌シグナルを有した膜タンパク質や高分子量のタンパク質を抗原として利用する場合、それらの高次構造や糖鎖修飾の観点からもより理想的な抗原分子の調製が可能である。さらに、抗原の化学修飾や固相化の必要がないため、エピトープを失うリスクも低下する。このように、LUCIPは抗体を検出する方法としては従来のRIA法やELISA法に比べ様々な点において優れている。

## 2. 方法

本研究では、リポーターとして、マウスLrp4の細胞外領域とGLのキメラ分子(Lrp4-GL)を使用した。無血清培地で培養したHEK293細胞にLrp4-GLを発現させ、ニッケルカラムを利用したアフィニティー精製により培養上清からLrp4-GLを精製した。

長崎大学医学部・神経内科の本村政勝博士の協力を得て、本邦のAChR抗体陰性MG患者300名の血清サンプルを探索対象とした。対照群としては、健常人100名およびAChR抗体陽性MG患者100名の血清を利用した。また、MGとは異なるが同じ神経筋伝達異常が原因である自己免疫疾患・Lambert-Eaton myasthenic syndrome (LEMS)の患者100名の血清を対照群として利用した。また、Lrp4抗体の陽性と陰性の判定に関しては、健常人100名に対してLUCIPを実施することで予めcut-off値(mean + 4s.d.)を設定しておき、このcut-off値を超えるサンプルを全てLrp4抗体陽性候補とした。

本研究は、東京大学医科学研究所および長崎大学医学部の双方の倫理審査委員会の承認を受けた後に実施した。

## 3. 結果

### Lrp4抗体の同定

我々はLUCIPによるLrp4抗体探索を実施した結果、9名のLrp4抗体陽性全身型MG患者を発見した。高い抗体価を示す症例が4つ、低い抗体価を示す症例が5であった。一方、健常人群(100名)とAChR抗体陽性MG群(100名)のいずれにもLrp4抗体陽性は認めなかった。なお、9名のLrp4抗体陽性MG患者のいずれにも胸腺腫は認められなかった。次に、Lrp4抗体陽性と判定された9名のMG患者由来の血清が実際に細胞膜上にて発現するLrp4を認識できるかどうかを調べた。ヒト株細胞HEK293に全長マウスLrp4を発現させた後、細胞の固定処理や膜透過処理を施さない状態で各種ヒト血清を用いた免疫蛍光染色を実施した。その結果、高い抗体価を示す上位3サンプルのうち2サンプル(残り1サンプルは死亡例にて本実験に使用できなかった)がHEK293細胞膜上に存在するLrp4を認識した。他の6サンプルについてはLrp4抗体濃度が低いために染色ができなかったと判断している。細胞免疫染色とは別に、HEK293細胞に発現した全長マウスLrp4の免疫沈降実験も実施したが、高い抗体価を示す上位4サンプルのいずれもが全長マウスLrp4を認識した。異常の結果から、我々がLrp4抗体陽性と判断したMG患者の血清中には生理的な状態であるLrp4を認識できる抗体が存在することが明らかとなった。

### Lrp4抗体のIgGサブクラス決定

AChR抗体陽性全身型MGの場合、AChR抗体の大部分がIgG1サブクラスに属している。IgG1サブクラスは補体凝集活性が高く、事実、AChR抗体陽性全身型MG患者の神経筋接合部では補体凝集が認められる。その結果、補体を介した神経筋接合部の破壊が進行し、MGを引き起こす。このように、MGにおける自己抗体のIgGサブクラスの決定は病態解明への手がかりとなる。そこで、今回同定した9人のLrp4抗体陽性患者の血清サンプルのうち、抗体価が高い上位4サンプルについて、IgGサブクラスの決定を行った結果、いずれのサンプルにおいてもIgG1サブクラスが主要であることがわかった。1サンプルだけ

だが、IgG1とIgG4の双方が目立つ例もあった。今回はわずか4例のみの解析であったが、Lrp4抗体の主要なIgGサブクラスがIgG1であるとするならば、補体を介した神経筋接合部の破壊をLrp4抗体陽性MGの分子病態の有力な候補として考慮する必要があるだろう。

#### Lrp4抗体によるLrp4-agrin結合阻害効果の解析

上述したように、Lrp4はneural agrinと結合し、その信号をMuSKに伝達する役割を担っている。従って、このneural agrinとLrp4の結合が、Lrp4抗体により阻害された場合もまた、神経筋接合部の形成不全や神経筋伝達不全を招く可能性がある。そこで、我々は、Lrp4抗体陽性MG患者由来の血清のneural agrinとLrp4の相互作用に対する影響を調べた。まず、アミノ末端にFLAGタグで標識したneural agrinとLrp4-GLを溶液中で混合し、次に、抗FLAG抗体アガロースを用いてneural agrinを免疫沈降した後に、沈降物中に含まれるGL活性を測定する。このLUCIPを利用した方法により、neural agrinとLrp4間の結合様式を解析できると考えた。事実、neural agrin-Lrp4間の親和性については、他の研究グループが先に報告したものと同等の値を確認した。そこで、Lrp4抗体の抗体価が高い3サンプルについて、agrin結合阻害効果を調べた。その結果、3サンプルのいずれもがneural agrinとLrp4-GLの相互作用に対して阻害的に作用することがわかった。

#### 4. 考察

今回、我々は、世界に先駆けてLrp4自己抗体が陽性である全身型MG患者を発見した。しかしながら、現時点では、Lrp4抗体がMGの病因であるかどうかは不明である。今後は、1) Lrp4自己抗体を産生する動物モデルを作出し、実際にMGを引き起こすかどうかを調べ、さらに、2) Lrp4抗体陽性MG患者の血清から部分精製したIgG画分を導入した実験動物が実際にMGの症状を示すかどうかを調べる必要がある。また、Lrp4抗体陽性MGの分子病態の解明の一環として、Lrp4抗体陽性患者に対して筋生検および電子顕微鏡を利用した観察などの検査を実施し、神経筋接合部の異常の有無を詳細に調べる必要があるだろう。

#### 5. 発表論文

Higuchi O, Hamuro J, Motomura M, Yamanashi Y. Autoantibodies for LDL receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Annals of Neurology*; **accepted manuscript online** (28 Oct, 2010)

#### 6. 謝辞

本研究における本村政勝博士(長崎大学医学部)のご貢献に謝意を表すとともに、財団法人病態代謝研究会からのご支援に深謝いたします。