

称号及び氏名	博士（獣医学）	中村 隆一
学位授与の日付	平成31年2月28日	
論文名	Identification of novel pathogenic auto-antibodies of myasthenia gravis and pathologic analysis of experimental autoimmune myasthenia gravis (重症筋無力症の病原性自己抗体の同定及び実験的自己免疫性重症筋無力症モデルの病態解析)	
論文審査委員	主査	山手 文至
	副査	渡来 仁
	副査	杉浦 喜久弥

論文要旨

はじめに

重症筋無力症（Myasthenia Gravis: MG）は全身の筋力低下や易疲労性を症状とする自己免疫疾患の1つである。本疾患は、神経筋接合部の筋肉側に存在するニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）に対する病原性自己抗体が生じ、運動神経から筋肉へのアセチルコリンによる神経伝達が障害されて発症するとされる。筋組織中の nAChR は α サブユニットが2つと、 β 、 δ 、そして γ 又は ϵ サブユニットより構成されるヘテロ5量体である。抗 nAChR 抗体価の上昇は MG 診断の根拠の1つであるが、抗 nAChR 抗体価と MG 症状の重篤度の相関は乏しいと言われている。nAChR の α サブユニットの N 末端ドメインには main immunogenic region (MIR) と呼ばれる免疫原性の高い領域が存在しており、MG 患者血清の病原性自己抗体のほとんどが MIR 認識抗体と言われている。

nAChR をげっ歯類に感作することにより、MG に類似する症状を示す実験的自己免疫性重症筋無力症（EAMG）モデルが作製可能であり、本モデルから採取した血清をラットに静脈内投与することによっても EAMG モデルを作製することができる。また、nAChR の MIR を認識する mAb35 抗体は、単独投与で EAMG を誘発することから、MIR を認識する抗 nAChR 抗体が MG の主な病因と考察されている。病原性自己抗体による MG の発症機

序は、nAChR に病原性自己抗体が結合することによる補体カスケードの活性化、nAChR のダウンモジュレーション、又は nAChR に対するアンタゴニスト活性による神経筋接合部の nAChR 量の減少や nAChR の機能低下と考えられている。

近年、補体活性を持たない改変型 MIR 認識抗体が mAb35 等の MIR 認識抗体により誘発される EAMG を抑制することが見出され、抗体改変技術により病原性抗体を保護抗体に改変し、MG 治療への利用が期待されている。一方、複数の病原性自己抗体により発症する MG の病態に対し、単一の保護抗体での治療効果は明らかではない。

そこで、本研究において、第 1 章では MG 治療法開発につながる抗 nAChR 抗体の同定を目的とし、MG 患者の末梢血液中の B 細胞より 1 細胞レベルで産生する自己抗体を同定すると共に、細胞評価系及びげっ歯類を用いた検討により同定抗体の特性を解析した。また、第 2 章では、多数の病原性抗体による MG 病態発症に対する単一の保護抗体の作用を検討するため、複数の病原性自己抗体を有する EAMG 血清で誘発するラット EAMG モデルを用い、単一の MIR 認識保護抗体で本病態を抑制するか否かを検討すると共に、EAMG 血清中の病原性自己抗体について解析した。

第 1 章 単一細胞解析ツールを用いた重症筋無力症患者由来末梢血液中 B 細胞からの病原性自己抗体の同定及び解析

抗 nAChR 抗体価が上昇した MG 患者の末梢血液を入手し、B 細胞の単一細胞の解析を行うと共に病原性自己抗体を同定し、その特性を解析した。

第 1 節 単一細胞解析を用いた重症筋無力症患者由来血液からの自己抗体の同定

MG 患者の末梢血液より、CD19 及び IgG 陽性のメモリー B 細胞、CD19、CD27 及び CD38 陽性の形質芽細胞/形質細胞を 1 細胞ごとに単離した。続いて、単一細胞から磁気ビーズ付のオリゴ dT を用いた cDNA 合成、5'RACE PCR、及び TS-jPCR (Target-Selective joint PCR) を実施し、各細胞の IgH/IgL 遺伝子発現コンストラクトを増幅させ、遺伝子発現ベクターに組み込んだ。上記ベクターを Expi293 細胞に遺伝子導入し、組み換えモノクローナル抗体 (mAb) を培養上清に分泌させた。産生させた抗体は、nAChR を発現する DB40 細胞及び nAChR の発現がない TE671 細胞を用いた nAChR への結合評価系によって評価した。上記評価により 1,015 クローンのメモリー B 細胞を評価した結果、nAChR への結合が見られる 8 つの陽性クローンを同定した。さらに、IgH の CDR 領域の解析では、同定した抗 nAChR 抗体の配列の多様性が示唆された。

第 2 節 新たに同定した抗体(B12L)の特性解析

第 1 節で同定した MG 患者の末梢血液中 B 細胞が産生する抗 nAChR 抗体の特性を解析するため、nAChR への結合評価系で最も強いシグナルが得られた MG ドナーに由来する B12L 抗体について評価を実施した。DB40 細胞に発現する nAChR に対し、B12L 抗体は mAb35、ラット EAMG 由来血清及びヒト MG 血漿と濃度依存的に競合的に結合した。さらに本抗体は nAChR のダウンモジュレーション活性を有していた。B12L 抗体を雌 Lewis ラ

ットに単回静脈内投与すると、用量依存的に EAMG モデルに特徴的な筋力低下、及び体重低下を示した。また、B12L 抗体投与 8 時間後の長趾伸筋の免疫染色では、神経筋接合部に補体 (C3) シグナルが観察され、投与 48 時間後では神経筋接合部に nAChR シグナルがほとんど認められなかった。以上の結果より、B12L 抗体は EAMG 誘発能を有する病原性抗体であることが示唆された。

第 2 章 EAMG 血清誘発ラット EAMG モデルの病態解析及び病態発症機序の検討

EAMG 血清誘発ラット EAMG モデルを用い、MIR 認識抗体の 1 つである mAb35 の Fab フラグメント (Fab35) が本モデルの病態を抑制するか否かを検討すると共に、EAMG 血清を分画し、IgG 又は IgM クラスの自己抗体の EAMG 病態への関与を検討した。

第 1 節 保護抗体による *in vitro* での EAMG 血清に対する作用検討及び EAMG 血清誘発 EAMG モデルを用いた検討

シビレエイの nAChR を雌 Lewis ラットに感作することにより、EAMG モデルを作製した。感作 1-2 ヶ月後に各個体より血清を採取し、解析を実施した。生前のクリニカルスコアに基づいて EAMG 血清の nAChR への結合を評価したところ、いずれの EAMG 血清においても血清中の抗 nAChR 抗体が増加していた。一方、各 EAMG 血清を正常ラットに移入すると、血清採取前のクリニカルスコアに依存した EAMG の発症がみられ、クリニカルスコアが高い EAMG 血清の方が病原性抗体の量が多かった。

上述の病態発症能を有する血清を用い、Fab35 の nAChR 保護作用について検討した。Fab35 は EAMG 血清に対し、濃度依存的な nAChR への結合の阻害、ダウンモジュレーション活性及び complement dependent cytotoxicity (CDC) 活性の抑制作用を示したが、いずれの評価系においても部分的な抑制作用にとどまった。

Lewis ラットを用い、Fab35 を 4 回腹腔内投与することにより EAMG 血清誘発ラット EAMG モデルでの Fab35 の病態発症抑制効果を検討した。しかしながら、Fab35 投与の有無にかかわらず、EAMG 血清移入により、クリニカルスコアが上昇すると共に体重減少がみられ、長趾伸筋の免疫染色では、投与 8 時間後に神経筋接合部に補体 (C3) のシグナルが観察され、投与 48 時間後に神経筋接合部の nAChR のシグナルがみられなくなった。以上より、EAMG 血清移入によるラット EAMG 病態は Fab35 投与では抑制されないことが明らかとなった。

第 2 節 EAMG 血清の IgG 含有画分又は IgM 含有画分用いた病原性抗体の解析

ラットにおける補体の活性化は IgG2b 又は IgM により誘導される。EAMG 血清中の IgG サブクラス又は IgM の nAChR への結合を評価したところ、いずれの IgG サブクラス及び IgM においても nAChR に結合する抗体が増加していた。また、Fab35 は EAMG 血清中の IgM の nAChR への結合阻害作用を示さなかった。しかしながら、EAMG 血清の IgG 画分は EAMG 血清と同様に EAMG 病態を誘発したのに対し、EAMG 血清の IgM を含む画分は EAMG 病態を発症させなかった。以上の結果より、EAMG 血清誘発ラット EAMG モデル

の病態において、IgG クラスの自己抗体が病態発症に寄与することが示唆された。

総括

本研究では、自己免疫疾患の1つであるMGを研究対象として、以下の結論を得た。

第1章

1. MG患者の末梢血液中より1細胞単離技術を用いて抗体産生細胞を単離し、nAChRに対する自己抗体を複数同定した。
2. 同定した抗体の1つであるB12L抗体の*in vitro/in vivo*評価を実施し、MGの病原性抗体であることを確認した。
3. 単一細胞解析手法はMGを含めた免疫疾患に応用ができ、各疾患に特徴的な自己抗体の同定が可能であることを示した。

第2章

4. EAMG血清に対するFab35の効果を検証し、単一のnAChR保護抗体ではEAMG血清誘発のEAMG病態を抑制できないことを示した。
5. EAMG血清中のIgGクラス自己抗体がEAMG病態に寄与し、IgMクラス自己抗体はEAMG病態に関与しないことを示した。
6. ラットEAMGモデルを用いて、MGの病態解明の一端となるIgGクラスの病原性抗体の多様性を示唆する研究結果を得た。

以上、この研究は、MGの病態の発症機序の一端を明らかにするとともに、MGの治療薬開発に向けた有用な基礎情報を提示し、加えて、MG以外の自己免疫疾患にも応用できるユニークな実験的アプローチを教示している。

審査結果の要旨

重症筋無力症（Myasthenia Gravis: MG）は、全身の筋力低下や易疲労性を症状とする自己免疫疾患のひとつである。この疾患は、神経筋接合部に存在するニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）に対する自己抗体が生じることで、運動神経から筋肉へのアセチルコリンによる神経伝達が阻害される病態である。nAChRの α サブユニットのN末端ドメインにはmain immunogenic region（MIR）と呼ばれる免疫原性の高い領域が存在しており、MG患者血清の病原性自己抗体のほとんどがMIR認識抗体とされる。近年、補体活性を持たない改変型MIR認識抗体が、mAb35等のMIR認識抗体により誘発される実験的自己免疫性重症筋無力症（EAMG）モデルの病態を改善することが見出された。これは、病原性抗体を保護抗体に改変することでMG治療が可能になることを示唆している。しかし、

複数の病原性自己抗体により発症するとされるMGの病態に対し、単一の保護抗体による治療効果がどの程度あるのかについては未だ十分に検討されていない。

本研究では、ヒトMG患者から得られた抗nAChR抗体を同定し、その特性解析を行うと共に、EAMG血清で誘発したラットEAMGモデルを用いて、単一のMIR認識保護抗体でMGの病態がどの程度改善できるのかについて詳細に検討している。

第1章では、第1節において、ヒトMG患者の末梢血液よりCD19及びIgG陽性のメモリーB細胞を一細胞ごとに単離し、各細胞のIgH/IgL遺伝子発現コンストラクトを増幅させ、遺伝子発現ベクターに組み込み、Expi293細胞に遺伝子を導入した組み換え型モノクローナル抗体(mAb)を確立している。確立した抗体を用いて、nAChRを発現するDB40細胞及びnAChRの発現がないTE671細胞を用い、nAChRへの結合を評価している。その結果、1,015クローンのメモリーB細胞からnAChRへの結合が見られる8つの陽性クローンを同定している。第2節では、第1節のnAChRへの結合評価系で同定した8つのクローンのうち、最も強い結合シグナルが得られたB12L抗体の特性を詳細に解析している。その結果、DB40細胞に発現するnAChRに対し、B12L抗体は、mAb35、ラットEAMG由来血清及びヒトMG血漿と濃度依存性に競合的に結合すること、また、nAChRに対するダウンモジュレーション活性を有していることが分かった。さらに、B12L抗体をLewisラットに単回静脈内投与すると、用量依存的にEAMGモデルに特徴的な筋力低下や体重低下が生じ、B12L抗体投与8時間後の長趾伸筋の免疫染色では、神経筋接合部に補体(C3)シグナルが観察され、投与48時間後では神経筋接合部にnAChRシグナルがほとんど認められなくなった。以上の成果は、B12L抗体はEAMG誘発能を有する病原性抗体であることを明らかにしている。

第2章では、第1節において、シビレエイのnAChRをLewisラットに感作することによりEAMGモデルを作製し、感作1-2カ月後にEAMG血清を採取し、MIR認識抗体のひとつであるmAb35のFabフラグメント(Fab35)のnAChR保護作用について検討している。その結果、Fab35は、EAMG血清の濃度依存的なnAChRへの結合を阻害し、かつダウンモジュレーション活性やcomplement dependent cytotoxicity (CDC)活性の作用を抑制したが、しかし、その効果は限定的であることが分かった。さらに、Lewisラットを用い、Fab35を4回腹腔内投与することによりEAMG血清誘発ラットEAMGモデルでのFab35の病態発症抑制効果を検討している。その結果、Fab35投与の有無に拘わらず、EAMG血清移入により、クリニカルスコアが上昇すると共に体重減少がみられ、長趾伸筋の免疫染色では、投与8時間後に神経筋接合部に補体(C3)のシグナルが観察され、投与48時間後に神経筋接合部のnAChRのシグナルがみられなくなった。これらの成果は、単一の保護抗体であるFab35投与によるEAMG血清移入ラットに生じるEAMG病態への影響は限られたものであり、完全には抑制されないことを示している。第2節では、EAMG血清中のIgGサブクラス又はIgMのnAChRへの結合を評価している。その結果、いずれのIgGサブクラス及びIgMにおいてもnAChRに結合する抗体が増加しているが、Fab35はEAMG血清中のIgMのnAChRへの結合阻害作用がないことを示している。しかし、EAMG血清のIgG画分はEAMG血清と同様にEAMG病態を誘発したのに対し、EAMG

血清の IgM を含む画分は EAMG 病態を発症させなかった。この成果は、EAMG 血清誘発ラット EAMG モデルにおいて、IgG クラスの自己抗体が病態発症に最も重要であることを明らかにしている。

本研究では、難治性疾患である MG の病理発生機序の一端を明らかにするとともに、MG の治療薬開発に向けた有用な基礎情報を提示している。加えて、MG 以外の自己免疫疾患にも応用できるユニークな実験的アプローチを教示している。この研究成果は、獣医学・医学、特に免疫病理学・実験動物学の研究分野の新たな展開に資するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。