

<シンポジウム (3)—9—2>重症筋無力症の新たな病態と疾患概念

抗 MuSK 抗体はコラーゲン Q と MuSK の結合を阻害する

大野 欽司

(臨床神経 2012;52:1306-1308)

Key words : 重症筋無力症, アセチルコリンエステラーゼ, コラーゲンQ, MuSK, 抗MuSK抗体

神経終末から放出される agrin は LRP4 に結合し, LRP4 ダイマーは MuSK ダイマーとヘテロテトラマーを形成する¹⁾. agrin/LRP4/MuSK 複合体は Dok-7 とともに MuSK のリン酸化を惹起し, 筋終板におけるアセチルコリン受容体 (AChR) のクラスター形成を促進する. また, 神経終末から放出をされるアセチルコリン (ACh) を急速に分解する酵素アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 12 分子はコラーゲン Q (ColQ) 3 分子と結合し, 巨大な AChE/ColQ 複合体を形成する²⁾. ColQ はシナプス基底膜の perlecan³⁾ と筋終板の MuSK⁴⁾ に結合することにより AChE/ColQ 複合体をシナプス基底膜に係留をする. つまり, MuSK は LRP4 と ColQ の 2 種類の分子に結合をする (Fig. 1).

重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) の 5~15% は MuSK に対する IgG 抗体を有する⁵⁾. MuSK-IgG はサブクラス 4 に属し補体を活性化しないブロッキング抗体である. MuSK-IgG がブロックをする分子はいままで知られていなかった. MuSK-MG 患者では終板 AChR 欠損が軽度であること, また, MuSK-MG 患者に対してはコリンエステラーゼ阻害

剤が無効もしくは症状を憎悪させることから⁶⁾, MuSK-IgG は MuSK と ColQ の結合を阻害するという仮説を立てて検証をおこなった.

MuSK-MG 患者 1~4 は, それぞれ, 48 歳女性, 30 歳女性, 5 歳男性, 45 歳女性である. 抗 MuSK 抗体価は患者 1~3 で, それぞれ, 22.0nM, 11.2nM, 0.12nM (正常<0.01nM) であった. 患者 4 は抗 MuSK 抗体陽性であったが抗体価は測定されていない. 患者 1, 3, 4 は 10ml 末梢血をもちい, 患者 2 は血漿交換より血清をえた. コントロール 1 は肢帯型筋ジストロフィーの患者で, コントロール 2 は期限切れの新鮮凍結血漿を愛知県赤十字血液センターより施設承認後に供与を受けた. この研究は名古屋大学医学系研究科ならびに米国メイヨークリニックの IRB 承認を受けておこなった.

はじめに, 血清より IgG を精製し, Coomassie 染色により純度を確認した. Colq ノックアウトマウスの筋切片に MuSK-IgG ならびに control-IgG をオーバーレイしたところ, MuSK-IgG のみが神経筋接合部に結合し, ヒト MuSK-IgG はマウス神経筋接合部を認識することが確認された.

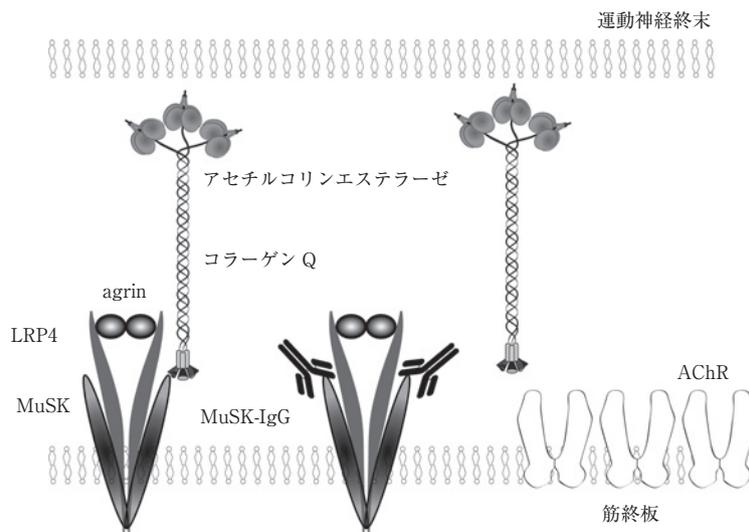


Fig. 1 アセチルコリン受容体 (AChR) 集積をトリガーする agrin は LRP4 に結合し MuSK のリン酸化を促進する. また, アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 12 分子はコラーゲン Q (ColQ) 3 分子と結合し, 巨大な AChE/ColQ 複合体を形成し, ColQ が MuSK に結合することにより AChE を神経筋接合部のシナプス基底膜に係留をする. MuSK-IgG は ColQ と MuSK の結合を阻害する.

われわれは、精製をしたヒト組み替え AChE./ColQ 複合体とアフリカツメガエル筋切片の *in vitro* インキュベーションにより、AChE./ColQ 複合体が神経筋接合部に特異的に結合をすることを報告した⁷⁾。今回、同様に、AChE./ColQ 複合体が *Colq* ノックアウトマウスの神経筋接合部に特異的に結合をすることを確認した。このアッセイ系に対して 600 μ g のコントロール 2 名、MuSK-MG 患者 4 名の IgG を加えたところ、MuSK-IgG はいずれも AChE./ColQ 複合体の神経筋接合部への係留を阻害したが、control-IgG は阻害をしなかった。

次に、ヒト *MUSK* cDNA コドン 1~393 の細胞外ドメインを pAPatag-5 に挿入し、MuSK 細胞外ドメインの C 末端に myc タグをつけた hMuSKect-myc を作成した。プレート上に精製をした hMuSKect-myc を吸着させておき、精製ヒト組み替え AChE./ColQ 複合体を加えてインキュベーションをすることにより AChE./ColQ 複合体が hMuSKect-myc に結合をすることを確認した。このアッセイ系に対して上述と同様にコントロール 2 名、MuSK-MG 患者 4 名の様々な濃度の IgG を加えたところ、MuSK-IgG は濃度依存性に ColQ と MuSK の結合を阻害した。一方、control-IgG は高濃度においても ColQ と MuSK の結合を阻害しなかった。

さらに、1 名のコントロール IgG と 1 名の MuSK-MG 患者 IgG を正常マウスに 15 日間腹腔内投与をおこなった。MuSK-IgG の受容免疫を受けたマウスの筋切片の定量解析にて ColQ は control-IgG の 10% に低下をした。一方、AChR と MuSK の低下は軽度であった。

3 種類のアッセイ系において MuSK-IgG は ColQ と MuSK の結合を阻害することを実証した⁸⁾。 *Colq* ノックアウトマウスをもちいた研究で、ColQ の欠損により細胞表面の MuSK が減少し、MuSK リン酸化ならびに AChR クラスター形成が阻害されることが報告をされている⁹⁾。MuSK-MG における AChR 欠損は ColQ の MuSK への結合阻害が原因である可能性がある。

一方、3 名の MuSK-MG 患者の筋生検では、2 名において微小終板電流 (MEPC) の減衰時間の軽度延長をみとめ AChE 欠損が示唆されるが、AChE の免疫染色では AChE 欠損を示唆する所見はない¹⁰⁾。また筋生検では AChR 欠損も軽度である。能動免疫ならび受動免疫の研究ならびに培養細胞をもちいた研究のいずれも、MuSK-IgG が ColQ と MuSK の結合を

阻害するという所見に一致しており、本研究をふくめた *in vitro* 研究、*in vivo* 研究と患者筋生検の所見の乖離に関して今後さらなる研究が必要である。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

文 献

- 1) Zhang B, Luo S, Wang Q, et al. LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* 2008;60:285-297.
- 2) Krejci E, Thomine S, Boschetti N, et al. The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J Biol Chem* 1997;272:22840-22847.
- 3) Peng HB, Xie H, Rossi SG, et al. Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan. *J Cell Biol* 1999;145:911-921.
- 4) Cartaud A, Strohlic L, Guerra M, et al. MuSK is required for anchoring acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 2004;165:505-515.
- 5) Farrugia ME, Vincent A. Autoimmune mediated neuromuscular junction defects. *Curr Opin Neurol* 2010; 23:489-495.
- 6) Evoli A, Tonali PA, Padua L, et al. Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. *Brain* 2003;126:2304-2311.
- 7) Kimbell LM, Ohno K, Engel AG, et al. C-terminal and heparin-binding domains of collagenic tail subunit are both essential for anchoring acetylcholinesterase at the synapse. *J Biol Chem* 2004;279:10997-11005.
- 8) Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, et al. Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology* 2011;77:1819-1826.
- 9) Sigoillot SM, Bourgeois F, Lambergeon M, et al. ColQ controls postsynaptic differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 2010;30:13-23.
- 10) Selcen D, Fukuda T, Shen X-M, et al. Are MuSK antibodies the primary cause of myasthenic symptoms? *Neurology* 2004;62:1945-1950.

Abstract**Anti-MuSK antibodies in myasthenia gravis block binding of collagen Q to MuSK**

Kinji Ohno, M.D.

Division of Neurogenetics, Center for Neurological Diseases and Cancer, Nagoya University Graduate School of Medicine

In myasthenia gravis (MG), 5-15% of patients are positive for MuSK antibodies. MuSK binds to LRP4 and transmits an agrin-mediated signal for clustering of acetylcholine receptor (AChR). MuSK also anchors the collagenic tail subunit (ColQ) of acetylcholinesterase (AChE). MuSK-IgG is a blocking antibody, but its molecular targets remained elusive. As acetylcholine receptor (AChR) deficiency is typically mild and as cholinesterase inhibitors are generally ineffective in MuSK-MG patients, we asked if MuSK-IgG interferes with binding of ColQ to MuSK. The *in vitro* overlay assay showed that MuSK-IgG blocked binding of ColQ to the neuromuscular junction of *Colq*^{-/-} mice. The *in vitro* plate-binding assay showed that MuSK-IgG blocked binding of ColQ to MuSK in a dose-dependent manner. Passive transfer of MuSK-IgG to wild-type mice reduced the size and density of ColQ to ~10% of controls and had a lesser effect on the size and density of AChR and MuSK. These data point to a notion that MuSK-IgG blocks binding of ColQ to MuSK. As lack of ColQ compromises agrin-mediated AChR clustering in *Colq*^{-/-} mice, a similar mechanism may lead to AChR deficiency in MuSK-MG patients.

(Clin Neurol 2012;52:1306-1308)

Key words: myasthenia gravis, acetylcholinesterase, collagen Q, MuSK, anti-MuSK antibody
