基礎老化研究　30(4):25－30,2006

【研究報告】

抗MuSK抗体陽性重症筋無力症の病因と病態

1.　重本　和宏, 2.久保　幸穂、2.丸山　直記
1.愛媛大学大学院医学系研究科　予防医学　2.東京都老人総合研究所　老化制御

はじめに

重症筋無力症の新しい自己抗原、MuSK(muscle-specific kinase)に対する自己抗体により重症筋無力症が発症することを、我々は最近動物モデルを使って証明した。また、MuSKとその複合体の機能異常により遺伝性筋無力症が発症することが次々と最近明らかにされている。一方でMuSKのリガンド、活性化機構、機能は未解明である。今後もMuSKを中心とした研究から、神経筋疾患の原因が明らかにされるであろう。サルコペニアについても、神経筋シナプスの可塑性のメカニズムとの関連が注目される。

重症筋無力症の新しい病因

重症筋無力症が、神経筋シナプスの筋側部に集まる神経伝達分子レセプター（アセチルコリンレセプター）に対する自己抗体により発症することは、すでに30年前に証明されており、あまりにも有名である[1]。この場合、運動神経からアセチルコリンによるシナプスを介した筋への神経伝達を阻害する結果、運動麻痺の症状を発症する。その発症のメカニズムは多くの研究者により明らかにされてきた。一方で重症筋無力症の患者の約20％では、抗アセチルコリンレセプター抗体(抗AChR抗体)は検出されないことから、抗AChR抗体陽性の患者群（seropositive 重症筋無力症)、抗AChR抗体の陰性の患者群（seronegative 重症筋無力症）と分類し、その発症原因としてAChR抗原以外の自己抗体の存在が予想されていた。

2001年、Hochらはseropositive 重症筋無力症の患者の2/3の血清中に抗MuSK (Muscle specific kinase) 抗体を検出した[2]。さらに、我々は重症筋無力症患者の抗MuSK抗体の定量アッセイシステムを神戸薬科大学太田教授と共同で開発して国内の患者を調べたところ、seronegative 重症筋無力症の約30％で抗 MuSK抗体が高値で検出されることを報告した[3,4]。しかしながら、抗MuSK自己抗体が患者血清中に存在することは、必ずしも重症筋無力症の発症原因であるとはいえないことや、原因不明の筋無力症候群の症状を示すが、抗MuSK自己抗体が発症原因とは考えられない、という症例が報告され抗MuSK抗体が重症筋無力症の真の発症原因となりうるのかどうか激しい議論が起きた[5,6]。つまり、抗MuSK自己抗体と重症筋無力症発症の因果関係を明らかにするには、動物モデルで抗MuSK自己抗体によって症状を誘導できるかどうかが重要な問題であった。我々は、精製したMuSK蛋白をウサギに免疫することにより、抗MuSK自己抗体により重症筋無力症様の症状を発症することを世界で初めて示した（図1)[7]。発症したウサギの神経筋シナプスでは、AChRの凝集が減少しており筋電図も重症筋無力症と同じパターンを示すことから、抗MuSK自己抗体がMuSKの機能を阻止して神経筋シナプスの維持を障害することを明らかにした。言い換えればMuSKが、神経筋シナプスを維持するのに必須であることが明らかとなった。

図１　リコンビナントMuSK蛋白の免疫により発症した筋無力症ウサギモデル。

MuSK機能と重症筋無力症の発症メカニズム

Torpedo RTKはリセプター型タイロシンカイネースで、1992年にシビレエイの発電器官から発見された[8]。ほ乳類のTorpedo RTKに相当する遺伝子としてMuSKが、1995年に筆者の所属していた英国のLudwig Instituteからマウス Nsk2 (=MuSK), そして米国リ

連絡先：
1. 791-0295
愛媛県東温市志津川
Tel: 089-960-5278
Fax:089-960-5279
E-mail: shigemot@m.ehime-u.ac.jp
2.　173-0015
東京都板橋区栄町35-2
Tel:03-3964-3241
Fax:03-3579-4776

ジェネロン社がrat MuSK遺伝子を単離し報告した[9,10]。 MuSKはリセプタータイロシン型カイネースに分類され、MuSKの細胞外領域に未知の分子が結合することにより、細胞内のタイロシンカイネース酵素の部位が活性化される。ほ乳類の神経筋シナプスの筋側で、アセチルコリンレセプターと一緒にMuSK蛋白が発現している。ちなみに、シビレエイの発電器官は神経筋シナプス接合部がたくさん積み重なったもので、進化の過程で筋肉が退化し、その代り発電器官として進化したものである。シビレエイは、これを使って電位差を発生させ、小魚などを気絶させて捕食に利用する（図2)。 MuSKはリセプター蛋白の構造をしており、自己抗体は細胞の外側に突き出ている部位に結合することがわかっている（図３)。

図２　日本の太平洋沿岸で捕獲したシビレエイ。

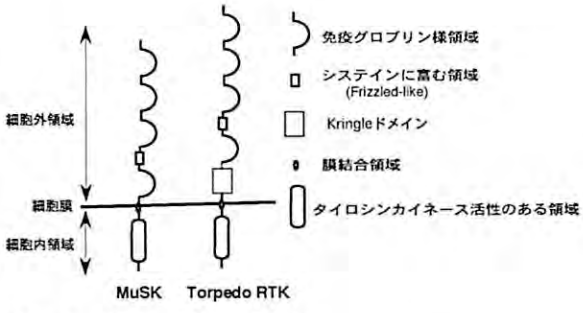

図３　MuSK蛋白のドメイン構造
MuSKはリセプター型タイロシンカイネース(RTK)蛋白に分類される。細胞外に突き出た領域は、それぞれの蛋白の高次構造のドメイン構造で表した。４個の免疫グロブリン様ドメイン、Frizzled-likeドメインから構成されている。 シビレエイのTorpedo RTKには、Kringle-likeドメインが一つ余分にある。

MuSK遺伝子を発生工学の手法により遺伝的に欠失させた、いわゆるノックアウトマウスでは神経筋シナプスが形成されないことから、MuSKがシナプス形成に必須の遺伝子であることが明らかにされている[11]。 加えてシナプスの運動神経終末から分泌される、agrin（ヘパリン硫酸プロテオグリカン）のノックアウトマウスの表現型が、MuSKノックアウトマウスときわめて類似していることから、agrinとMuSKの機能が密接に関連していることが明らかになった[12]。 AgrinはMcMahanのagrin仮説として有名である[13]。 これは神経筋シナプスで運動神経終末から分泌される未知の分子により、シナプス筋側でAChR凝集を誘導する分子が存在するという仮説であった。 そして実際にAChR凝集活性を示すagrin遺伝子が同定された[14,15]。 実験的にagrinを培養筋細胞に添加すると、筋細胞表面のAChR凝集を誘導することができるが、そのためにはMuSKのタイロシンカイネースの活性化が必須であることが示されている。しかし、agrinはMuSKに直接結合しないことから、MuSKに結合して活性化を誘導するリガンドはいまだに不明であり、AChR凝集のメカニズムもほとんど解明されていない。未知リガンド（あるいはco-receptorかもしれないが）とagrinの両方がMuSKのタイロシンカイネースの活性化に必要であると予想される（図４）[16]。興味深いことに、胎児期において運動神経終末が筋支配する以前から、agrin非存在下でもMuSKの働きにより、筋組織の中心領域でAChRの緩やかな集合が誘導されることが示されている[17,18]。これは、シナプス神経終末からagrinによりシナプス後部筋側へ伝えるシグナルの仲介役のリセプターとして、MuSKがAChRを凝集するだけでないことを示している。 さらに、AChR凝集にはMuSKからのシグナル伝達だけでは不十分で、細胞外ドメインが必要である。 これらの結果から、MuSKはAChRや未知の分子と複合体を形成する足場蛋白としても機能している可能性が考えられる。このようにMuSKは神経終末がシナプスを介して筋を支配する前から、将来運動神経支配される予定領域の決定に必要な分子として作用する。

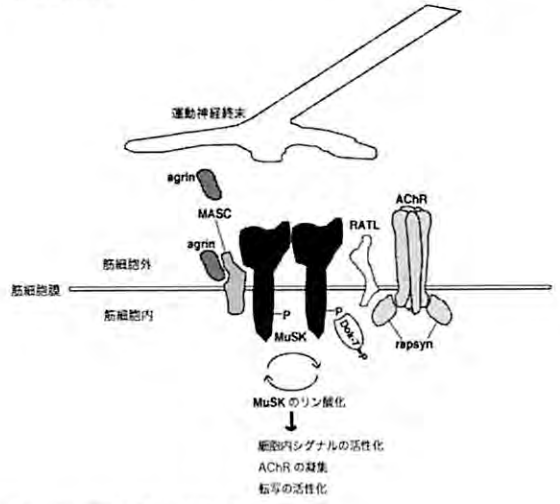

図４　MuSKの複合体形成
MuSKは神経筋シナプスの形成、維持、再生に必須の分子であるが、複数の分子と複合体を形成してその機能を果たしている。運動神経終末から分泌されるagrin（ヘパラン硫酸プロテオグリカン）と未知の分子MASC (myotube-associated specificity component) により、 MuSKが２量体を形成して細胞内領域にあるカイネースが活性化する。そして、MuSKの細胞内領域のリン酸化が引き金となり、Dok-7などのシグナル分子が結合し、細胞外から細胞内へシグナル伝達されAChRの凝集や核へ転写活性化シグナルを伝える。 agrinは，直接MuSKと結合することができない。 遺伝子が同定されている分子：agrin, MuSK, AChR, Dok-7 機能解析から存在が想定されるが未同定の分子：MASC (myotube-associated specificity component)、RATL (rapsynとMuSKをつなぐ分子:rapsyn-associated transmembrane linking molecule)。

運動神経支配の有無に関係なく、神経筋シナプス接合部でのAChR凝集は、MuSKによって誘導されるが、この作用は単に胎児期だけでなく、成体の成熟した神経筋シナプスの維持や、再生においても重要な役割を果たしている。神経筋シナプス接合部は、いったん形成されると不動のものと考えがちだが、成熟した神経筋シナプスにおいても短時間でAChRなどの分子が次々入れ替わり、動的にはいつも再構築されている[18]。 従って、MuSKによる神経筋シナプス接合部の形成機構は、それぞれのシナプスが形成された後も、終生にわたって維持や再生の機構に必要であると考えられた。

抗MuSK自己抗体と重症筋無力症発症の因果関係を明らかにするには、動物モデルで抗MuSK自己抗体によって症状を誘導できるかどうかが重要な問題であった。我々は、精製したMuSK蛋白をウサギに免疫することにより、抗MuSK自己抗体により重症筋無力症様の症状を発症することを世界で初めて示した[7]。発症したウサギの神経筋シナプスでは、AChRの凝集が減少しており、抗MuSK自己抗体が、MuSKの機能を阻止して神経筋シナプスの維持を障害することを明らかにした。言い換えれば、我々はMuSK蛋白が神経筋シナプスの維持に必須であることをはじめて示すことができた。

ところで重症筋無力症患者の経過は長く、その過程で何らかの治療を施されているため、神経筋シナプスもそれに応じて、抗MuSK抗体以外の因子の影響を受けている可能性がある。また、神経筋シナプスは短時間で再構築され、動的に定常状態にあるので、その形態変化と病態を直接関連づけて解析するのは困難であるかもしれない。そして、神経筋シナプスであっても、体の部位、年齢や性別によってその動的再構築の速度や、障害による再生能力が異なることは十分に考えられる。さらに、抗MuSK抗体がシナプスのAChR凝集阻害だけでなく、未知のMuSK機能阻害活性を誘発している可能性もあり、病態や経過が症例によって異なり複雑であることも考えられる。以上の観点から、抗MuSK抗体による重症筋無力症発症の動物モデルの解析は、臨床研究とならんで重症筋無力症の病態を理解する上で重要である。

抗MuSK抗体陽性重症筋無力症患者の病態像

著者らを含め，これまでに報告されている抗MuSK抗体陽性例における臨床像の特徴は，以下のようにまとめることができる。

1 これまで、英国、イギリス、台湾、本邦、米国から抗MuSK抗体陽性重症筋無力症に関する文献報告がある。 Seronegative重症筋無力症におけるMuSK抗体陽性率は，欧米では約40％陽性，日本人では約30％となっている[3,4]。当初この陽性率には欧米と日本で大きな差（70％と40％）があった[2]。

2 抗AChR抗体と抗MuSK抗体を同時に保有する重症筋無力症患者が存在するかどうについて議論がわかれている。我々の最新のアッセイ系およびイギリスのベンチャー会社が供給するものを使った結果からは、両方が陽性の患者は見つかっていない。しかし、スウェーデンのグループからは両方が検出される患者も存在するという報告もある。しかし彼らが抗MuSK抗体値に使用しているMuSK蛋白は発現細胞から免疫沈降で得たものを使用しており、別の蛋白に反応する抗体価も測定している可能性が否定できない。

3 同じ重症筋無力症患者で、抗MuSK抗体値の増減と症状の変化には相関関係がある[20]。治療抵抗性の患者では、抗体値の変化は少ない。同じ程度の症状の患者間では抗MuSK抗体値にはばらつきがありそうである。つまり、抗MuSK抗体はもちろんポリクローナルであるが、MuSK蛋白のどの部位に抗体が結合するかによって病態が決まる可能性が高い。

4 最近、症状が軽症の眼筋型重症筋無力症例や小児重症筋無力症例では抗MuSK抗体が検出される例も報告されており、抗MuSK抗体陽性の重症筋無力症の病態は、当初報告されていたものより多彩である。抗MuSK抗体陽性の眼筋型重症筋無力症例の場合、重症の全身型への移行を十分警戒する必要がる。

5 発症年齢は，20歳から60歳までが多くみられ，圧倒的に女性が多い（自験例では16：3）。特定のHLA型との連鎖が報告されている[21]。

6 主症状としては，眼瞼下垂，複視，構音障害，鼻声，嚥下困難，球麻痺，頚部筋力低下，呼吸筋麻痺がある。また舌萎縮による運動障害を伴うことや，クリーゼに陥りやすい特徴がある[22,23]。一方，抗AChR抗体陽性重症筋無力症の主症状である四肢の筋力低下や易疲労性の症状が比較的少ない症例がある。MuSK抗体陽性患者では AChR抗体陽性と比較して有意に筋萎縮が認められることがVincentらによって報告されている。いわゆる速筋（白筋）が選択的に萎縮している傾向があり、その選択的萎縮の機序は大変興味がもたれる[24]。胸腺腫合併例のほとんどは抗AChR抗体陽性であることから，抗MuSK抗体陽性症例においては，胸腺腫の合併例はない（自験例で胸腺過形成を疑われた症例が１例存在)。抗AChR抗体陽性重症筋無力症と異なり，胸腺(腫)摘出の効果はこれまでの報告では無効のようである。

7 抗コリンエステラーゼ剤やステロイド療法に対して難治性である症例が多い。血漿交換療法は症状の改善に有効だが、筋萎縮の強い症例に関してその有効性は現在のところ不明である。加えて前述したように，ステロイド治療後も球症状が残存する症例も見られる。一般に用いられている免疫抑制剤の効果は不定で，予後不良の症例もある。抗コリンエステラーゼ薬の効果は不定で，改善しない例や副作用の出る例がある。一部にステロイド薬や免疫抑制薬に反応せず，筋萎縮を来す予後不良の症例もある。

8 抗MuSK抗体は，MuSKの細胞外IgG様ドメインに結合し，圧倒的にIgGサブクラス4であり（一部IgGサブクラス2にも検出される)，このクラス4には補体介在性作用はない。抗AChR抗体はこれまでの研

究から，補体介在性のIgG1やIgG3が主要であることから，抗MuSK抗体による病態機序には，補体介在性後シナプス膜破壊の関与はないと考えられる。

9 症状、筋電図や抗コリンエステラーゼによる診断、および治療に対する反応、臨床経過に関する特徴に関していくつかのタイプに分かれる。一つは、眼・球症状や呼吸筋障害などが目立つ重症例で、クリーゼにもなりやすく免疫抑制剤に難治性であるケース。もう一つは眼の症状はむしろ目立たず、頸部、肩や呼吸筋のweaknessが主体であるケース。そして、残りは抗AChR抗体陽性重症筋無力症と症状の上では区別がつかないケースである。本邦やイタリアの報告では、最初のケースの眼・球症状が目立つ重症例が多いと報告されており注目される。抗MuSK抗体陽性重症筋無力症では、筋電図所見で重症筋無力症の典型的な重症筋無力症の所見を示さず、抗コリンエステラーゼ剤により症状が改善しないという症例も多いという報告もあり、抗AChR抗体が陰性で重症筋無力症が疑われる場合は、抗MuSK抗体の有無を調べることは重要である。

MuSKと複合体分子の遺伝子変異による疾患

リセプタータイロシンカイネースは通常、リガンドとの結合によりシグナルを細胞内に伝達するが、MuSKは複合体を形成してその他にもさまざまな機能を果たしている。そしてMuSKや複合体分子（rapsyn、Dok-7）の遺伝子変異が遺伝性筋無力症の原因となることが次々と明らかにされている[25-27]。 原因不明の重症筋無力症の自己抗原も、MuSKやAChRと複合体を形成して機能していることが予想される。また、MuSKは神経筋シナプス以外に、脳などで発現機能しているという報告も最近ではじめている[28-29]。 今後も、MuSKに関連する研究からこれまで不明であった神経や筋疾患の原因が明らかにされることが期待される。我々はサルコペニアと神経筋シナプスの可塑性のメカニズムとの関連について注目して研究を進めている。

文献

1. Patrick J and Lindstrom, J. (1973). Autoimmune response to acetylcholine receptor. Science 180, 871-872.
2. Hoch W, McConville J, al. (2001). Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. Nat Med, 365-368.
3. Ohta K, Shigemoto, S. Kubo, et al. (2004). MuSK antibodies in AChR Ab-seropositive MG vs AChR Ab-seronegative MG. Neurology 62, 2012-2133.
4. Ohta K, Shigemoto K, Kubo S, et al. (2005). Neurology 65, 1988.
5. Lindstrom J. (2004). Is "seronegative" MG explained by autoantibodies to MuSK? Neurology 62, 1920-1921.
6. Selcen D, Fukuda T, Shen XM, et al. (2004). Are MuSK antibodies the primary cause of myasthenic symptoms? Neurology 62, 1945-1950.
7. Shigemoto K, Kubo S, Maruyama N, et al. (2006). Induction of myasthenia by immunization against muscle-specific kinase. J Clin Invest 116, 1016-24.
8. Charles GB, Jennings SM, Dyer et al. (1993). Muscle-specific trk-related receptor with a kringle domain defines a distinct class of receptor tyrosine kinases. Proc Natl Acad Sci USA 90, 2895-2899.
9. Ganju P., Walls E., Brennan J, et al. (1995). Cloning and developmental expression of Nsk2, a novel receptor tyrosine kinase implicated in skeletal myogenesis. Oncogene 11, 281-90.
10. Valenzuela DM, Stitt TN, DiStefano PS, et al. (1995). Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. Neuron 15, 573-84.
11. DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, et al. (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. Cell 85, 501-12.
12. Gautam M, Noakes PG, Moscoso L, et al. (19969. Defective Neuromuscular Synaptogenesis in Agrin-Deficient Mutant Mice. Cell 85, 525-35.
13. McMahan UJ. The agrin hypothesis. (1990). Cold Spring Harb Symp Quant Biol 55, 407-18.
14. Ruegg MA, Tsim KW, Horton SE, et al. (1992). The agrin gene codes for a family of basal lamina proteins that differ in function and distribution. Neuron 8, 691-99.
15. Glass DJ, Bowen DC, Stitt TN, et al. (1996). Agrin acts via a MuSK receptor complex. Cell 85, 513-523.
16. Glass DJ, Bowen DC, Stitt TN, et al. (1996). Agrin acts via a MuSK receptor complex. Cell 85, 513-523.
17. Lin W, Burgess RW, Dominguez B, Pfaff SL, et al. (2001). Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. Nature 410, 1057-64.
18. Yang X, Arber S, William C, et al. (2001). Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. Neuron 30, 399-410.
19. Akaaboune M, Culican M, Tumey G, et al.

(1999). Rapid and reversible effects of activity on acetylcholine receptor density at the neuromuscular junction in vivo. Science 286, 503-507.
20. Bartoccioni E, Scuderi F, Minicuci M, et al. (2006). Anti-MuSK antibodies: Correlation with myasthenia gravis severity. Neurology 67, 505-507.
21. Niks E, Kuks J, PoepB, et al. (2006). Strong association of MuSK antibody-positive myasthenia gravis and HLA-DR14-DQ5. Neurology 66, 1772-1774.
22. Evoli A, Tonali A, Pauda L, et al. (2003). Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. Brain 126, 2304-2311.
23. Sanders DB, El-Salem K, Massey J, et al. (2003). Clinical aspects of MuSK antibody positive seronegative MG. Neurology 60, 1978-1980.
24. Farrugia M, Robson M, Clover L, et al. (2006). MRI and clinical studies of facial and bulbar muscle involvement in MuSK antibody-associated myasthenia gravis. Brain 129, 1981-1992.
25. Ohno K, Engel AG, Shen XM, et al. (2002). Rapsyn mutations in humans cause endplate acetylcholine-receptor deficiency and myasthenic syndrome. Am J HuM Genet 70, 875-885.
26. Chevessier F, Faraut B, Ravel-Chapuis A, et al. (2004). MUSK, a new target for mutations causing congenital myasthenic syndrome. Hum Mol Genet 2004 13, 3229-3240.
27. Beeson D, Higuchi O, Palace J, et al. (2006). Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy. Science 313, 1975-1978.
28. Garcia-Osta A, Tsokas P, Pollonini G, et al. (2006). MuSK expressed in the Brain Mediates Cholinergic Responses, Synaptic Plasticity, and Memory Formation. J Neurosci 26, 7971-7932.
29. Cheusova T, Khan M, Enz R, et al. (2006). Identification of developmentally regulated expression of MuSK in astrocyte of the rodent retina. J Neurochem 99, 450-457.

Clinical features and molecular pathogenesis of myasthenia gravis caused by anti-MuSK antibodies.

1.Kazuhiro Shigemoto, 2.Sachiho Kubo, 2.Naoki Maruyama

1.Department of Preventive Medicine
Ehime University, School of Medicine
Shitsukawa, Toon, Ehime, Japan 791-0295

2.Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology
35-2 Sakaecho, Itabashi-ku, Tokyo, JAPAN 173-0015

Abstract:
We describe a recent progress in understanding of the pathogenesis of myasthenis gravis (MG). Antibodies to muscle acetylcholine receptors (AChR) are a major cause of the human autoimmune disease, MG. Additionally, autoantibodies against the ectodomain of muscle specific kinase (MuSK) have been found in generalized MG patients. MuSK is critical for the clustering of AChR and plays multiple roles at neuromuscular junctions (NMJ). Recently we demonstrated that rabbits immunized with MuSK ectodomain protein manifested MG-like muscle weakness. That is, the MuSK autoantibodies rigorously inhibited AChR clustering mediated by multiple pathways, an outcome that broadens general comprehension of myasthenic diseases including MG, congenital myasthenic syndrome and sarcopenia.

Key words: MuSK, myasthenia gravis, neuromuscular synapse