

Striational Autoantibodies in Myasthenia Gravis Mainly React with Ryanodine Receptor

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9349

重症筋無力症における抗リアノジン受容体抗体について

金沢大学医学部医学科神経内科学講座 (主任: 高守正治教授)

岩 佐 和 夫

40名の重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG), 12名の疾患コントロール, 8名の健康正常人において, 横紋筋構成成分蛋白に対する自己抗体の有無についてELISA, イムノブロット, 間接蛍光免疫染色法を用いて検討した。これまでMGで報告されていた抗横紋筋抗体が陽性であったMG患者は23名おり, その内18名にて抗リアノジン受容体 (ryanodine receptor, RyR) 抗体が認められた。RyR cDNAを組み込みRyRを発現させた細胞 (C1148細胞) を用いて, 抗RyR抗体価を測定したところ, 抗横紋筋抗体価と抗RyR抗体価は有意な相関が認められ ($r=0.65, p<0.005$), 抗横紋筋抗体の主抗原の一つとして新たにRyRが考えられた。18名の抗RyR抗体陽性MG患者のうち15名は胸腺腫を合併しており, 抗RyR抗体と胸腺腫との関連が示唆され, 抗RyR抗体産生の免疫学的機序に胸腺腫が関連していることが考えられた。MGでは興奮収縮連関に異常を来す症例があることが知られており, 興奮収縮連関において重要な役割を担っているRyRに対する抗体がMGにて認められたことは, 抗RyR抗体陽性MGでは抗AChR抗体による神経筋伝達障害だけではなく, 抗RyR抗体による興奮収縮連関障害も病態に関与している可能性が示唆された。

Key words myasthenia gravis, anti-ryanodine receptor antibody, thymoma, striational antibodies, excitation-contraction coupling

重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) は神経筋接合部に存在するニコチンアセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptor, AChR) に対する自己抗体により神経筋伝達が障害され, その結果筋力低下を来す自己免疫性疾患である。胸腺腫を合併するMG患者では抗AChR抗体の他にしばしば横紋筋構成成分蛋白に対する抗横紋筋抗体も検出される^{1) *}。しかし, 胸腺腫合併MGに抗横紋筋抗体が出現する理由, 抗横紋筋抗体産生に至るメカニズム, また抗横紋筋抗体の機能については不明である。また, MGの一部症例では興奮収縮連関に異常を来すことが以前から報告されているが^{9) - 12)}, その原因についても明らかにされていない。興奮収縮連関は神経筋伝達が行われた後の筋細胞膜電位の変化をTチューブに存在するジハイドロピリジン受容体 (dihydropyridine receptor, DHPR) 型カルシウムチャネルが感知し, DHPR型カルシウムチャネルと運動しているフート構造つまりリアノジン受容体 (ryanodine receptor, RyR) にその情報が伝えられ, 筋小胞体内に貯蓄されていたカルシウムイオンがRyRより筋細胞内に放出され筋収縮が起こることをいう^{13) - 16)}。本研究では興奮収縮連関に必要な不可欠であるRyRに注目し, MGにおける抗RyR抗体の有無, 胸腺腫非合併例および合併例を含むMGにおける抗横紋筋抗体と抗RyR抗体との関係, 抗横紋筋抗体の認識抗原について検討した。

材料および方法

I. 対 象

MG患者40例 (男性13例, 女性27例; 平均年齢46.2歳) の患者血清を使用した。胸腺腫合併MGは18例 (男性8例, 女性10例; 平均年齢51.7歳), 胸腺腫非合併MGは22例 (男性5例, 女性17例; 平均年齢41.7歳) であった。MGの診断は, 筋易疲労性, 反復神経刺激による誘発電位の減衰応答, テンシロンテスト陽性, 抗AChR抗体陽性により行った¹⁷⁾。MGの病型, 重症度分類はOssermanの分類 (Osserman's classification) によった¹⁸⁾。つまり, I型は眼筋型, II a型は軽度全身型, II b型は中等全身型, III型は急性劇症型, IV型は晩期重症型を表す。胸腺腫は胸腺摘出術を行った後, 組織病理学的に診断した。コントロール血清として, 正常健康人8例, 他の神経疾患12例 (筋萎縮性側索硬化症7例, 多発性筋炎3例, Lambert-Eaton筋無力症候群2例) の血清を使用した。

II. AChRの注出

骨格筋周囲の腫瘍摘出時取り出された正常部ヒト骨格筋を抗原として用いた。以下の操作はすべて4℃以下の温度下で行った。骨格筋を小片に刻んだ後, 3倍量の均質化緩衝液 I (0.01M リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS), pH 7.4, 50mM NaCl, 1mM フッ化フェニルメチルスルホニル

平成9年7月30日受付, 平成9年8月29日受理

Abbreviations: ¹²⁵I- α -Btx, ¹²⁵I- α -bungarotoxin; AChR, acetylcholine receptor; DHPR, dihydropyridine receptor; MG, myasthenia gravis; PB, phosphate-buffer; PBS, phosphate-buffered saline; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; RyR, ryanodine receptor

(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) (Sigma, St Louis, USA), 1カリクレイン阻害単位 (Kallikrein Inhibitor Unit, KIU) / μ l アプロチニン (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 0.1 μ g/ml ペプスタチンA (Sigma) にいれ、ワーリングブレンダー (Waring product, USA) にて均質化した。30,000 \times g, 30分遠沈した後、沈渣を取り出し、再度3倍量の均質化緩衝液Iにいれ、ワーリングブレンダー (Waring product) にて均質化した。30,000 \times g, 30分遠沈した後沈渣を取りだし、1倍量の均質化緩衝液II (0.01M PBS, pH 7.4, 2% トライトンX-100 (Triton X-100) (Sigma), 50mM NaCl, 1mM PMSF, 1KIU/ml アプロチニン, 0.1 μ g/ml ペプスタチンA) の中にいれ一晩攪拌を行い、翌日105,000 \times g, 60分遠沈を行った。上清を取り出しガラスフィルターに通した後、分注し液体窒素にて凍結した^{19) 20)}。注出したAChRは使用するまで-70°C以下に保存した。取り出したAChRは2.8nMであった。

III. 抗AChR抗体測定

精製したAChR 1mlに 1×10^{-7} mol/l, 20-24 μ Ci/lの濃度に調整した¹²⁵I- α -バンガロトキシン (¹²⁵I- α -bungarotoxin, ¹²⁵I- α -BTx) (Amersham, Buckinghamshire, UK) を170 μ l加え、室温で1時間、4°Cで一晩静置した。1検体あたり2本の試験管を用意し、血清5 μ lに対し 4×10^{-14} molに調整した¹²⁵I- α -BTx標識AChRを加え、室温で1時間、4°Cで一晩静置した。測定限界を超えるものについては血清を10倍、100倍、1000倍希釈し測定した。2次抗体としてヤギ抗ヒトIgG (H+L) (Cappel, Durham, USA) を100 μ l (IgG量として1.0mg) を加え、室温にて30分反応させた後、20% ポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG) (和光, 大阪) 20 μ lを加え室温にて15分反応させ、さらに4°C, 60分反応させた。形成された沈殿物を2回洗浄後、ガンマーカウンター (アロカ, 東京) にてcpmを測定した。 4×10^{-14} molに調整した¹²⁵I- α -BTxも同時に測定し得られたcpm値より血清11あたりが沈降しうる¹²⁵I- α -BTx標識AChR量を定量し、抗AChR抗体価とした^{19) 20)}。

IV. 横紋筋構成成分注出

ヒト骨格筋を小片とした後、均質化緩衝液III (0.01Mリン酸緩衝液 (phosphate buffer, PB), 0.01mM PMSF (Sigma)) にいれ、ワーリングブレンダー (Waring product) にて均質化した。30分室温に放置した後4,500 \times g, 15分遠沈し沈渣を取り出した。沈渣に均質化緩衝液IV (0.6M KCl, pH 7.5) を加え均質化し、60分放置した後再度12,000 \times g, 15分遠沈した。上清を取りだし、8,000MWカットオフの透析膜 (SPECTRUM, Los Angeles, USA) の中にいれ、均質化緩衝液IIIの中で一晩透析を行った。透析を行った上清は液体窒素にて凍結し、使用するまで-70°C以下に保存した^{21) 6)}。

V. 抗横紋筋抗体測定

抗原を蛋白濃度0.6mg/mlになるように0.01M PB pH 7.5にて調整し、96穴ELISAプレート (Nunc, Reskilde, Denmark) に100 μ lづつ分注した。4°C一晩静置し、10% 正常ヤギ血清 (Gibco BRL, New York, USA) を含むカルシウム-マグネシウム不含リン酸緩衝液食塩水 [PBS-calcium magnesium free (CMF)] ツイーン20にてブロックした後、洗浄緩衝液 (2% 正常ヤギ血清を含むPBS-CMF ツイーン20) にて洗浄、60倍から7680倍に希釈した血清を分注し、37°C, 120分で静置した後4°C一晩さらに静置した。洗浄後、アルカリホスファターゼ結合抗ヒトIgG (Cappel) を加え37°C, 60分静置し、基質として

p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (Sigma) をいれ反応させたのち波長405nmにて吸光度を測定した。同一プレート上に測定した標準コントロール血清3検体の平均+2.5SD以上を示した倍率をもって抗横紋筋抗体価とした。7680倍を超えたものは血清を更に希釈し最終抗体価を求めた。検体は2回以上測定し、個々の検体の再現性を確認した^{21) 7)}。

VI. RyR (筋小胞体) 成分精製

ウサギ骨格筋を取りだし、小片にした後均質化緩衝液V (5mM イミダゾール塩酸 (imidazole-HCl) (和光), 0.3M 蔗糖 (sucrose) (和光), 0.3mM PMSF (Sigma), 1KIU/ml アプロチニン (Boehringer Mannheim), 0.1mg/ml ペプスタチンA (Sigma), 0.5mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) (Sigma), pH 7.4) にいれ、ワーリングブレンダー (Waring product) にて均質化した。7,700 \times gにて20分遠沈した後沈渣を再度均質化し同様に遠沈した。上清をチーズ漉し布 (cheesecloth) に通した後、110,000 \times gにて120分遠沈した。沈渣を取りだし均質化緩衝液Vに溶かした後、蔗糖にて27%, 32%, 38%, 45%の濃度勾配を作成した遠心管に入れ、70,000 \times gにて16時間遠心した。分画されたフラクションを5mM イミダゾール塩酸緩衝液 (pH 7.4) にて2倍量にし、125,000 \times gにて120分遠沈した。沈渣を均質化緩衝液Vにて溶解した後、液体窒素にて凍結し-70°C以下に保存した^{8) 21) 23)}。

VII. イムノブロット

抗原として横紋筋構成成分、またはRyR (筋小胞体) 成分を使用し、7.5%または4-20% SDS-PAGEにて電気泳動したのち²⁴⁾、ポリ弗化ビニリデン (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜 (アトー, 東京) に転写した²⁵⁾。各レーンを短冊状に切断し、3% ウシアルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Sigma) にてブロッキングを行った。MG患者血清、マウス抗RyRモノクローナル抗体 (東京都精神神経研究所 竹島浩博士より供与)、ラット抗RyRポリクローナル抗体 (東京都精神神経研究所 竹島浩博士より供与)、マウス抗ミオシンモノクローナル抗体 (Sigma)、マウス抗チニンモノクローナル抗体 (Sigma) を4°C一晩反応させた。RyRはこれまでに3タイプの受容体が報告されているが^{26) 27)}、ここで使用したモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体はウサギ骨格筋タイプ (RyR1) に対するものである。それぞれの一次抗体に対する二次抗体ピオチン標識ヤギ抗ヒトIgG (Cappel)、ピオチン標識ヤギ抗マウスIgG (Cappel)、ピオチン標識ヤギ抗ラットIgG (Cappel) を反応させ、アビジン-¹²⁵I-¹²⁵I- α -BTx (BIO-RAD, 東京) を反応させた。最後にジアミノベンジジン (diaminobenzidine, DAB) (Sigma) に過酸化水素を加え5-10分間発色させた⁸⁾。

VIII. 間接免疫蛍光法による抗体価測定

CHO (Chinese hamster ovary) 細胞にRyR cDNAを組み込み、RyRを発現させた細胞C1148細胞 (東京都精神神経研究所 竹島浩博士より供与) を使用し、間接免疫蛍光法にて抗RyR抗体価を測定した。C1148に発現されたRyRは抗原性、分子サイズ、リアノジンとの結合性、カルシウム放出チャンネルとしての機能は骨格筋に発現しているRyRと同様であることは確認されている^{28) 29)}。C1148細胞を5% 牛胎児血清 (Gibco) を含んだ最小基礎培地アルファ培地 (Minimum Essential Medium Alpha Medium, MEM) 培地 (Gibco) を用いて37°C, 5% CO₂ インキュベーター内にて2日間スライドガラス上で培養した後、アセトンにて固定した。MG患者血清、FITC標識ヤギ抗ヒトIgG

(E-Y Laboratories, San Mateo, USA) を反応させた後、蛍光顕微鏡 (オリンパス, 東京) にて検鏡した。抗RyR抗体価は40倍希釈以上の希釈率にて陽性であったもの陽性とし最大陽性希釈率をその抗体価とした。

成 績

I. 抗AChR抗体

二抗体免疫沈降法にて測定された抗AChR抗体は、正常健康人の平均 $+2.5SD$ が $0.17 \mu M$ であった。MG患者では全例陽性であったが、疾患コントロールでは全例陰性であった (表1)。重症度と抗体価との間に相関は認められなかった。

II. 抗横紋筋抗体

正常健康人、疾患コントロール全例で抗横紋筋抗体は陰性であった。MG患者では40例中23例 (57.5%) で陽性であった。胸腺腫を伴ったMG患者では18例中18例 (100%) で陽性と

り、胸腺腫を伴わないMG患者22例中5例 (22.7%) で陽性であった (表1)。横紋筋成分を使用したイムノプロットでは、抗横紋筋抗体陽性MG患者血清は200-400kDの広い範囲の蛋白と反応を示した。これらの蛋白はコントロール血清や抗横紋筋抗体陰性MG患者血清とは反応しなかった (図1)。また、この位置の蛋白は抗ミオシンモノクローナル抗体、抗チニンモノクローナル抗体とは反応せず、抗RyRモノクローナル抗体、抗RyRポリクローナル抗体が反応するバンドと同位置にあった (図2)。

III. 抗RyR抗体

RyR (筋小胞体) 成分を抗原としたイムノプロットによる検出では、MG患者のうち18名 (45%) にて約400kdの蛋白と反応するIgG抗体が確認された (表1) (図3)。この蛋白は抗RyRモノクローナル抗体、抗RyRポリクローナル抗体と反応したが、抗ミオシンモノクローナル抗体、抗チニンモノクローナ

Table 1. Characteristics and antibodies titers of 40 myasthenia gravis (MG) patients

Case no.	Sex	Age (years)	Stage	Thymoma	Anti-AChR Ab <0.17nM	Anti-Str Ab <60	Anti-RyR Ab <40
1	Male	29	I	+	2.90	960	<40
2	Female	32	IV	+	67.58	15360	2560
3	Female	65	IV	+	16.96	15360	640
4	Female	61	II a	+	2.39	1920	40
5	Female	34	II b	+	51.81	15360	320
6	Male	56	II a	+	36.46	30720	40
7	Male	39	I	+	7.58	15360	<40
8	Female	55	II a	+	5.77	1920	40
9	Male	60	I	+	7.63	1920	80
10	Female	48	I	+	0.60	7680	<40
11	Female	53	II b	+	61.00	7680	640
12	Female	65	II a	+	2.66	7680	160
13	Male	55	I	+	2.05	960	80
14	Male	75	II a	+	35.90	61440	5120
15	Male	37	II b	+	26.61	3840	80
16	Male	36	II b	+	104.29	61440	2560
17	Female	74	II a	+	36.50	1920	320
18	Female	57	II a	+	40.70	30720	1280
19	Female	62	II b	-	29.54	61440	320
20	Female	52	II a	-	3.15	7680	80
21	Male	55	II a	-	2.68	30720	320
22	Female	42	II b	-	231.00	1920	<40
23	Male	22	II a	-	498.00	960	<40
24	Female	48	II a	-	46.80	<60	<40
25	Female	47	I	-	31.88	<60	<40
26	Female	22	II b	-	10.39	<60	<40
27	Male	48	II b	-	0.65	<60	<40
28	Female	62	II a	-	549.12	<60	<40
29	Female	29	I	-	0.66	<60	<40
30	Female	12	IV	-	113.57	<60	<40
31	Female	23	II a	-	26.00	<60	<40
32	Female	41	II a	-	135.04	<60	<40
33	Female	48	II a	-	1.73	<60	<40
34	Female	39	II a	-	9.60	<60	<40
35	Female	39	II b	-	789.10	<60	<40
36	Female	65	II a	-	64.30	<60	<40
37	Female	35	II a	-	694.99	<60	<40
38	Male	41	II b	-	3.00	<60	<40
39	Male	46	IV	-	22.34	<60	<40
40	Female	40	II b	-	0.30	<60	<40

Stage, Osserman's classification ; Anti-AChR Ab, Anti-acetylcholine receptor antibodies Anti-StrAb, Anti-striational antibodies ; Anti-RyR Ab, Anti-ryanodine receptor antibody +, positive ; -, negative.

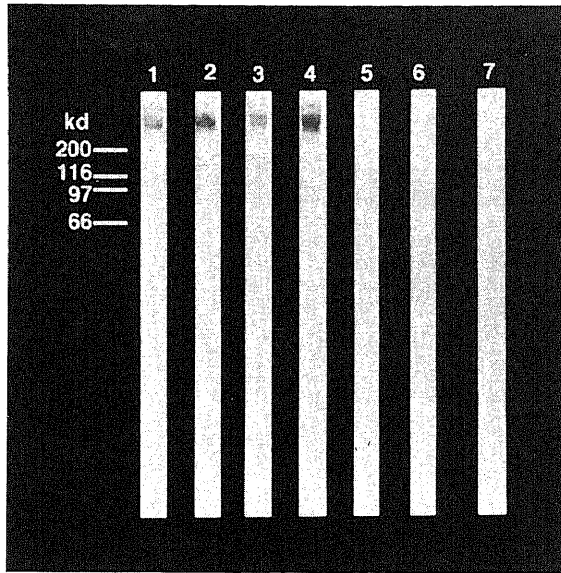


Fig. 1. Immunoblots analysis of myofibrillary proteins with myasthenia gravis (MG) sera. lanes 1-4, sera from MG patients, case no.2, 3, 5, 11, with anti-striational antibodies; lane 5, sera from normal control, lanes 6-7, sera from MG patients, case no. 35, 37, without anti-striational antibodies.

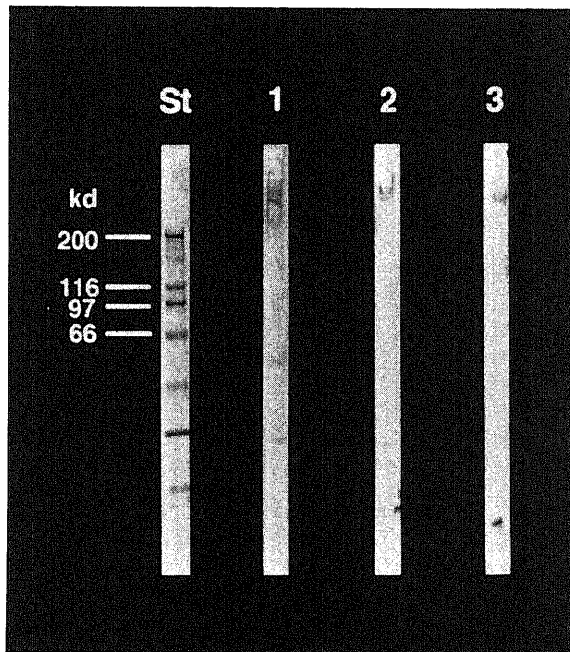


Fig. 2. Immunoblots analysis of myofibrillary proteins with mouse anti-ryanodine receptor (RyR) monoclonal antibody, rat anti-RyR polyclonal antibody and serum from myasthenia gravis (MG) patient with anti-striational antibodies. St, standard; lane 1, mouse anti-RyR monoclonal antibody; lane 2, rat anti-RyR polyclonal antibody; lane 3, serum from MG patient, case no. 2, with anti-striational antibodies.

ル抗体とは反応せず, RyRと同定した. 胸腺腫を伴ったMG患者では18名のうち15名(83.3%)にて抗RyR抗体が陽性であった. 抗横紋筋抗体が陽性であったMG患者では23名中18名(78.2%)にて抗RyR抗体が陽性となった. 17名の抗横紋筋抗体陰性の重症筋無力症患者血清, コントロール血清はこの蛋白と反応はしなかった(表1).

Ⅳ. C1148細胞の間接免疫蛍光法

イムノブロットにてRyRと反応した血清は全例C1148細胞に対するIgG抗体を有していた. この細胞は抗RyRモノクローナル抗体, 抗RyRポリクローナル抗体と反応した. しかし, この細胞はイムノブロットにてRyRと反応しなかった血清やコントロール血清, 抗ミオシンモノクローナル抗体, 抗チチンモノクローナル抗体, 抗AChRモノクローナル抗体とは反応しなかった(図4). この細胞を用いて測定した抗RyR抗体価は表に示した(表1).

Ⅴ. 抗RyR抗体価と抗AChR抗体価, 抗横紋筋抗体価との相関について

抗RyR抗体価と抗横紋筋抗体価は, 両抗体が陽性の18例について検討したところ有意な相関を示した($r=0.65, p<0.005$)(図5). 抗RyR抗体と抗AChR抗体は, 両抗体が陽性の18例にて検討したところ, やはり有意な相関が認められた($r=0.68, p<0.005$)(図6).

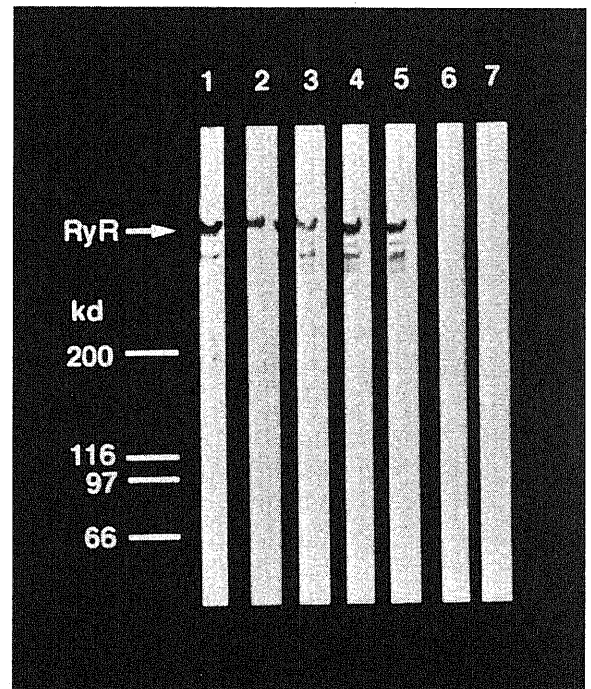


Fig. 3. Immunoblots analysis of ryanodine receptor (RyR) with mouse anti-RyR monoclonal antibody, rat anti-RyR polyclonal antibody and sera from myasthenia gravis (MG) patients. lane 1, anti-RyR polyclonal antibody; lane 2, anti-RyR monoclonal antibody; lanes 3-5, sera from MG patients, case no. 5, 14, 16, with thymoma; lane 6, serum from MG, case no. 35, without thymoma; lane 7, serum from normal control.

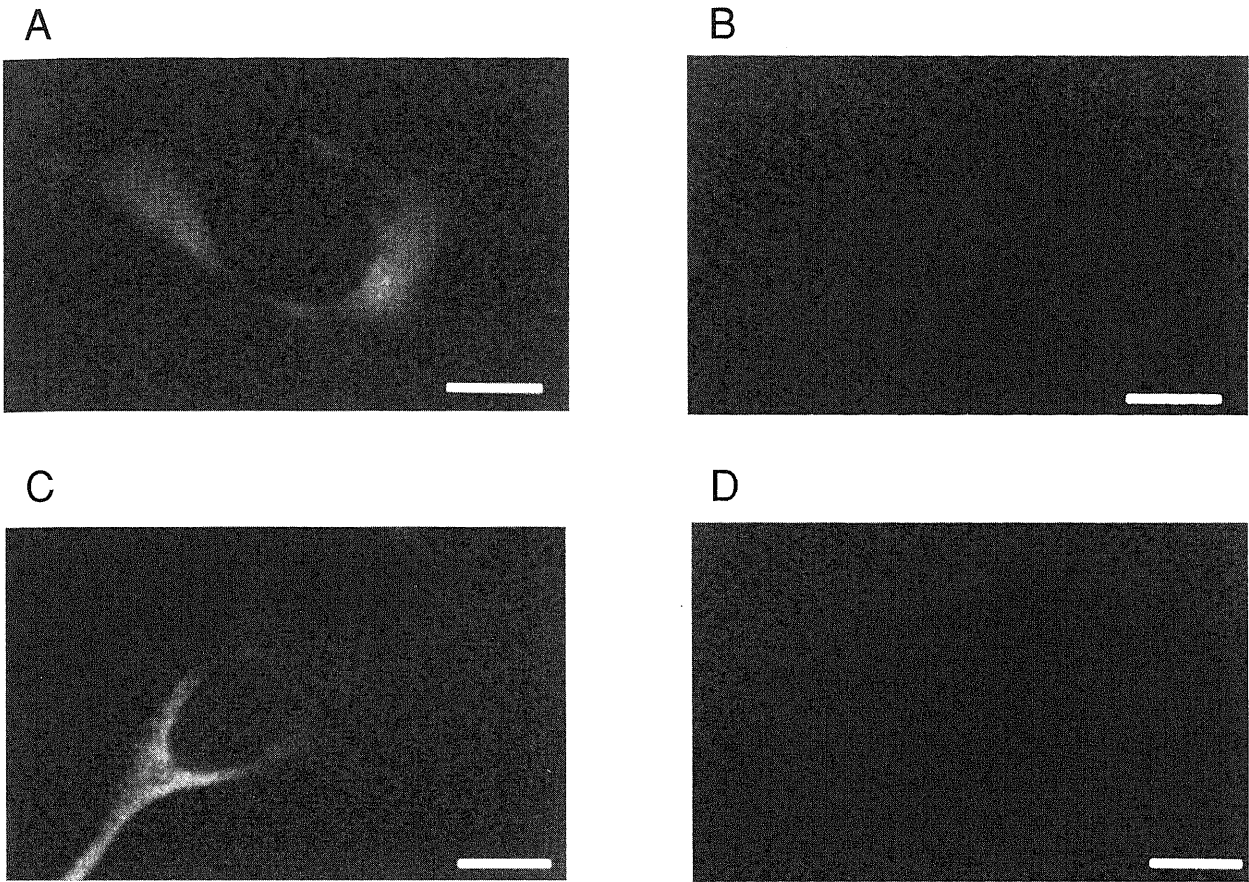


Fig. 4. Indirect immunofluorescence study of the C1148 cells. (A) Serum from myasthenia gravis (MG) patient, case no.2, with anti-ryanodine receptor (RyR) antibody. (B) Serum from control. (C) Monoclonal antibody against the skeletal muscle RyR. (D) Monoclonal antibody against the acetylcholine receptor. Scale bars, 20 μ m.

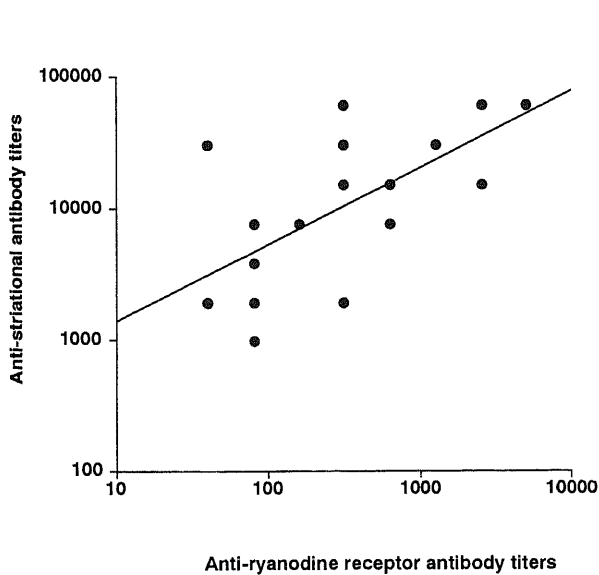


Fig. 5. Correlation of striational antibodies obtained by enzyme immunoassay and anti-ryanodine receptor antibody as determined by indirect immunofluorescence of C1148 cell in 18 myasthenia gravis (MG) patients whose sera showed positive in both assays ($r=0.65$, $p<0.005$).

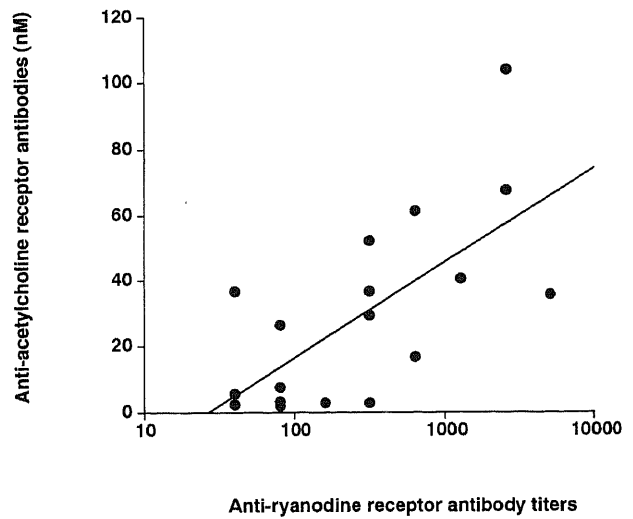


Fig. 6. Correlation of acetylcholine receptor (AChR) binding antibodies obtained by immunoprecipitation of AChR complexed with ^{125}I - α -bungarotoxin and anti-ryanodine receptor antibody as determined by indirect immunofluorescence of C1148 cell in 18 myasthenia gravis (MG) patients whose sera showed positive in both assays ($r=0.68$, $p<0.005$).

考 察

これまでMGで認められる抗横紋筋抗体が認識する抗原としてミオシンやチチンが提唱されてきた^{11) 17)}。しかし、本研究の横紋筋成分を使用して得られたイムノプロットでは、抗横紋筋抗体陽性のMG患者血清はミオシンやチチンと異なる蛋白と反応し、抗RyR抗体にて染色される蛋白と同じ電気泳動位置にあった。この蛋白を同定するために、RyRを豊富に含む筋小胞体分画の蛋白を使用しイムノプロットを行ったところ、抗横紋筋抗体陽性MG患者23名のうち18名にて、約400kdの蛋白と反応する抗体が認められた。この蛋白は抗RyRモノクローナル抗体、抗RyRポリクローナル抗体と反応する蛋白と同様の泳動位置にあり、RyRと同定した。抗ミオシンモノクローナル抗体、抗チチンモノクローナル抗体はこの400kdの蛋白とは全く反応を示さなかった。さらに、抗RyR抗体を有したMG患者血清は全例、RyR cDNAを組み込み本受容体を発現させたC1148細胞と反応し、この間接蛍光免疫染色法から得られた抗RyR抗体価は抗横紋筋抗体価と有意な相関を示した。従って、RyRは抗横紋筋抗体の主抗原の一つであると考えられた。

胸腺腫合併重症筋無力症では、抗チチン抗体の存在が報告されてきた^{11) 17)}。しかし、Marxらはチチンは正常胸腺上には発現しているが、胸腺腫では発現していないことを報告している³⁰⁾。今回の検討では、抗RyR抗体陽性18例のうち15例は胸腺腫を合併しており、胸腺腫と抗RyR抗体との関連性が強く考えられた。このことはMyglandらによっても報告されており^{31) 4) 31)}、さらにRyRの膜貫通部位のペプチドを抗原として作成したモノクローナル抗体による検討で、胸腺腫上皮細胞が染色されたとする報告もある³¹⁾。

本研究は抗RyR抗体価は抗AChR抗体価とも相関することを示したが、抗RyR抗体はAChRの一部を認識している可能性も否定できない。事実、RyRのM2-M3領域(アミノ酸残基4628-4861)はAChRのM2-M3領域(アミノ酸残基231-301)と類似していることが指摘されている²⁹⁾。また抗RyR抗体は胸腺腫との関連性が高いことを示した。胸腺腫が発生した際に腫瘍化した胸腺上皮細胞内においてRyR蛋白が発現され抗原として提示されるとともに、リンパ球を活性化させる免疫学的メカニズムが働き抗RyR抗体産生が誘導された可能性がある一方、同様のメカニズムが抗AChR抗体産生に関する免疫系を刺激している可能性も考えられる。

骨格筋における興奮収縮連関は、神経伝達後の筋細胞膜の興奮が、T管におけるDHPR型カルシウムチャネルを介しRyRに伝わり、筋小胞体に蓄えられたカルシウムイオンが、カルシウム遊離チャネルとも別称されるRyRより放出されることによりその機能が開始する^{13) 16)}。MGの骨格筋の一部ではこの興奮収縮連関が障害されていることが報告されている^{9) 12)}。さらに、抗RyR抗体を持ったMG患者血清は、培養筋細胞の小胞体からのカルシウムイオン放出を抑制することも我々は確認している³²⁾。

MGでは筋力が急激に低下し、呼吸困難、嚥下困難、などを呈するクリーゼと言われる臨床症状が起こることがあるが、抗RyR抗体を持っているMG患者ではこのクリーゼに傾く傾向がある^{4) 33)}。我々は以前、胸腺腫を伴い抗横紋筋抗体が陽性の3例にクリーゼを認め、この抗横紋筋抗体価は抗AChR抗体価とともにクリーゼ時に更に上昇し、また臨床症状と関連してい

たことを報告した³⁴⁾。このことはクリーゼの際には両抗体価を上昇させる免疫学的な異常が背景にあることを伺わせる。本研究で抗横紋筋抗体の主抗体が抗RyR抗体であることを示したことより、クリーゼ時には抗AChR抗体による神経筋伝達障害に抗RyR抗体による興奮収縮連関障害が加重し、臨床的悪化をもたらしている可能性が示唆される^{4) 8) 9) 10) 33)}。

RyRは細胞内に存在する蛋白であり、細胞外の抗体がいかにしてRyRと反応するのかが疑問として残る。しかし、細胞外のIgGが運動神経細胞内に取り込まれ、細胞内蛋白と反応することを示した報告があり^{35) 36)}、抗RyR抗体も同様のメカニズムが働いている可能性は否定できない。

結 論

MG患者40例について、二抗体免疫沈降法にて抗AChR抗体測定、ELISA法にて抗横紋筋抗体測定、イムノプロット法およびRyR cDNAを組み込みRyR蛋白を発現させた細胞を用いる間接蛍光免疫染色法にて抗RyR抗体測定を行い、以下の結論を得た。

1. MG患者では胸腺腫を伴った患者の100%で抗横紋筋抗体が認められその83.3%で抗RyR抗体が陽性であった。抗RyR抗体と胸腺腫との関連性が高く、胸腺腫内で抗RyR抗体産生の免疫学的メカニズムが働いていることが示唆された。
2. 抗横紋筋抗体価と抗RyR抗体価は有意な相関を示し、抗横紋筋抗体の主抗原はRyRであることが示唆された。
3. 抗AChR抗体価と抗RyR抗体価は両抗体陽性の症例で有意な相関を示し、両抗体産生において同様な免疫学的メカニズムが働いていることが示唆された。
4. MGにおける抗RyR抗体が興奮収縮連関を障害することにより、本来神経筋伝達障害の疾患であるMGの病態を複雑化している可能性が考えられた。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始御指導、御校閲を賜りました恩師高守正治教授に深甚なる謝辞を捧げます。また直接御指導、御助言をして頂きました当科佐野正登博士に深く感謝致します。さらに貴重な抗体、細胞を供与して頂き、御助言を賜りました東京都精神神経研究所竹高浩博士に深謝致します。最後に御協力頂きました金沢大学神経内科学講座の浅賀知也先生をはじめ諸先生方に厚くお礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は第34回神経学会総会(1993, 千葉)および第35回神経学会総会(1994, 福岡), the 8th International Congress on Neuromuscular Diseases, (July, 1994, Kyoto), the 4th International Congress on Neuroimmunology, (October, 1994, Amsterdam)において発表した。

本研究の一部は文部省科学研究費基礎研究(課題番号07457154)および厚生省免疫性神経疾患調査研究助成金によったことを付記します。

文 献

- 1) Aarli JA, Stefansson K, Marton LSG, Wollmann RL. Patients with myasthenia gravis and thymoma have in their sera IgG autoantibodies against titin. *Clin Exp Immunol* 82: 284-288, 1990
- 2) Cikes N, Momoi MY, Williams C, Howard FM, Hoagland HC, Whittingham S, Lennon VA: Striational autoantibodies: Quantitative detection by enzyme immunoassay in myasthenia gravis, thymoma, and recipients of d-penicillamine or allogenic bone marrow. *Mayo Clin Proc* 63: 474-481, 1988
- 3) Mygland Å, Tysnes OB, Matre R, Volpe P, Aarli JA, Gilhus NE: Ryanodine receptor autoantibodies in myasthenia gravis

patients with a thymoma. *Ann Neurol* 32: 589-591, 1992

4) Mygland Å, Aarli JA, Matre R, Gilhus NE: Ryanodine receptor antibodies related to severity of thymoma associated myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57: 843-846, 1994

5) Ohta M, Ohta K, Itoh N, Kurobe M, Hayashi K, Nishitani H: Anti-skeletal muscle antibodies in the sera from myasthenic patients with thymoma: identification of anti-myosin, actomyosin, actin, and α -actinin antibodies by a solid-phase radioimmunoassay and a Western blotting analysis. *Clin Chem Acta* 187: 255-264, 1990

6) Williams CL, Lennon VA: Thymic B lymphocyte clones from patients with myasthenia gravis secrete monoclonal striational autoantibodies reacting with myosin, α -actinin, or actin. *J Exp Med* 164: 1043-1059, 1986

7) Williams CL, Hay JE, Huiatt TW, Lennon VA: Paraneoplastic IgG striational autoantibodies produced by clonal thymic B cells and in serum of patients with myasthenia gravis and thymoma react with titin. *Lab Invest* 66: 331-336, 1992

8) Iwasa K: Striational autoantibodies in myasthenia gravis mainly react with ryanodine receptor. *Muscle Nerve* 20: 753-756, 1997

9) Pagala MKD, Nandakumar NV, Venkatachari SAT, Ravindran K, Namba T, Grob D: Responses of intercostal muscle biopsies from normal subjects and patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 13: 1012-1022, 1990

10) Pagala MKD, Nandakumar NV, Venkatachari SAT, Ravindran K, Amaladevi B, Namba T, Grob D: Mechanisms of fatigue in normal intercostal muscle and muscle from patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 16: 911-921, 1993

11) Krarup C: Electrical and mechanical responses in the platysma and in the adductor pollicis muscle: in patients with myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 40: 241-249, 1977

12) Nielsen VK, Paulson OB, Rosenkvist J, Holsøe E, Lefvert AK: Rapid improvement of myasthenia gravis after plasma exchange. *Ann Neurol* 11: 160-169, 1982

13) Endo M: Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev* 57: 71-108, 1977

14) Martonosi AN: Mechanisms of Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Physiol Rev* 64: 1240-1320, 1984

15) Rios E, Pizarró G, Brum G: Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol* 54: 109-133, 1992

16) Fleischer S, Inui M: Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu Rev Biophys Chem* 18: 333-364, 1989

17) Drachman DB: Myasthenia gravis. *New Engl J Med* 330: 1797-1810, 1994

18) Osserman KE, Genkins G: Studies in myasthenia gravis: short-term massive corticotrophin therapy. *JAMA* 198: 699-702, 1966

19) Lindstrom J: An assay for antibodies to human

acetylcholine receptor in serum from patients with myasthenia gravis. *Clin Immunol Immunopathol* 7: 36-43, 1977

20) Lindstrom JM, Lennon VA, Seybold ME, Whittingham S: Experimental autoimmune myasthenia gravis: biochemical and immunochemical aspects. *Ann NY Acad Sci* 274: 254-274, 1976

21) Imagawa T, Smith JS, Coronado R, Campbell KP: Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca^{2+} -permeable pore of the calcium release channel. *J Biol Chem* 262: 16636-16643, 1987

22) Inui M, Saito A, Fleischer S: Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum fast skeletal muscle. *J Biological Chemistry* 262: 1740-1747, 1987

23) Saito A, Seiler S, Chu A, Fleischer S: Preparation and morphology of sarcoplasmic reticulum terminal cisternae from rabbit skeletal muscle. *J Cell Biol* 99: 875-885, 1984

24) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970

25) Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979

26) Murayama T, Ogawa Y: Properties of Ryr3 ryanodine receptor isoform in mammalian brain. *J Biol Chem* 271: 5079-5084, 1996

27) Sorrentino V, Volpe P: Ryanodine receptors: how many, where and why? *TIPS* 14: 98-103, 1993

28) Penner R, Neher E, Takeshima H, Nishimura S, Numa S: Functional expression of the calcium release channel from skeletal muscle ryanodine receptor cDNA. *FEBS Lett* 259: 217-221, 1989

29) Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Ueda M, Hanaoka M, Hirose T, Numa S: Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339: 439-445, 1989

30) Marx A, Osborn M, Tzartos S, Geuder KI, Schalke B, Nix W, Kirchner T, Muller-Hermelink HK: A striational muscle antigen and myasthenia gravis-associated thymomas share an acetylcholine-receptor epitope. *Dev Immunol* 2: 77-84, 1992

31) Mygland Å, Kuwajima G, Mikoshiba K, Tysnes O, Aarli JA, Gilhus NE: Thymomas express epitopes shared by the ryanodine receptor. *J Neuroimmunol* 62: 79-83, 1995

32) Asaka T, Ishisaka N, Iwasa K, Takamori M: Striational autoantibodies in myasthenia gravis modulate calcium-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum [abstract]. *Muscle Nerve (suppl)*: 188, 1994

33) Skeie GO, Bartoccioni E, Evoli A, Aarli JA, Gilhus NE: Ryanodine receptor antibodies are associated with severe myasthenia gravis. *Eur J Neurol* 3: 136-140, 1996

34) 岩佐和夫, 佐野正登, 高守正治: 重症筋無力症患者の抗横紋筋抗体—診断的意義および臨床経過との関連について—。厚生省特定疾患免疫性神経疾患調査研究班 平成4年度研究報

告書 : 113-116, 1993

35) Engelhardt J, Appel SH: Motor neuron reactivity of sera from animals with autoimmune motor neuron destruction. *J Neurol Sci* 96: 333-352, 1990

36) Smith RG, Engelhardt JI, Tajti J, Appel SH: Experimental immune-mediated motor neuron disease: Model for human ALS. *Brain Res Bull* 30: 373-380, 1993

Striational Autoantibodies in Myasthenia Gravis Mainly React with Ryanodine Receptor Kazuo Iwasa, Department of Neurology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *J. Juzen Med Soc.*, **106**, 465 — 472 (1997)

Key words myasthenia gravis, anti-ryanodine receptor antibody, thymoma, striational antibodies, excitation-contraction coupling

Abstract

Forty patients with myasthenia gravis (MG), 12 disease controls and 8 healthy controls were studied for antibodies to various myofibrillary proteins by immunoblotting and immunofluorescence analyses. Eighteen of 24 MG patients who had striational antibodies (StrAb) were positive for anti-ryanodine receptor (RyR) antibody and there was a significant correlation between titers of anti-RyR antibody and StrAb, suggesting that the anti-RyR antibody is a major specificity of StrAb. This was also confirmed by staining the RyR-expressed C1148 cell with these patients' sera. Fifteen of 18 anti-RyR antibody-positive patients had thymoma, suggesting a relationship between the immune response to RyR and thymoma. Excitation-contraction coupling (E-C coupling) in skeletal muscle depends on Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum into the myoplasm following the transduction of information from the dihydropyridine receptor in the transverse tubulous membrane to the RyR. A defect of E-C coupling and contractility in myasthenia muscle has been reported, and this may be explained by a defective release of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum induced by anti-RyR antibody.