

【緒言】神経筋接合部 (neuromuscular junction 以下 NMJ) は、運動神経と骨格筋との間に作られるシナプスである。NMJ の異常は、重症筋無力症やサルコペニアなどの病態に関係している。これまでの報告では、NMJ 形成を誘導するために電気刺激が試みられてきているが、適当なモデルが確立されていないため、適切な条件や NMJ 形成に作用する機序は不明である。また、NMJ 形成の制御は、neuregulin/ErbB シグナル伝達系、agrin/MuSK シグナル伝達系、Wnt シグナル伝達系などが知られている。ADAM19 (A Disintegrin And Metalloproteinase 19) は、心血管系の形成や神経筋の発達に重要な役割があることが報告されている。ADAM19 は、neuregulin/ErbB シグナル伝達系の上流で neuregulin を切断する活性を持ち、切断された可溶性 neuregulin が ErbB を活性化する。また、ADAM19 は EphA4 と相互作用し NMJ 形成に寄与するとの報告がある。近年、電気刺激やトレッドミルランニングなどによって neuregulin/ErbB シグナル伝達系が活性化されるという報告がある。しかしながら、ADAM19, NMJ 形成に対する電気刺激の作用機序は未だ不明である。神経系細胞である NG108-15 は、筋芽細胞と共培養するとシナプスを形成することが知られており、NMJ の形成を観察するのに一般的に用いられる。本研究では、神経筋共培養モデルを用いて、電気刺激の NMJ 形成に対する効果と ADAM19/neuregulin/ErbB シグナル伝達系を検討した。

【方法】ラット筋芽細胞を 100mm ディッシュに播種し、増殖培地 (DMEM-H 10%FBS) で 4 日間増殖培養した。分化培地 (DMEM-H 2%FBS) に交換し、5 日間分化培養して筋管を形成させた。また、運動神経に似た性質を持つコリン作動性神経系細胞であるラットグリオーマ、マウスニューロブラストーマの雑種細胞 NG108-15 は、増殖培地 (DMEM-H 10%FBS ヒポキサントチンナトリウム 5mM, アミノプテリン 20 $\mu$ M およびチミジン 0.8mM) で増殖培養した後、分化させた筋管細胞の培養皿へ移し共培養した。共培養 2, 3 日後に電気刺激を行い、共培養 4 日後に解析用の観察試料を作製した。電気刺激装置 (SEN-2201: 日本光電) を用いて、培養液に接した白金電極を通して、パルス幅 2.0ms, 刺激頻度 0.5Hz, 刺激強度 50V, 矩形波という条件で電気刺激を行った。実験群は、電気刺激を行わない C 群, 電気刺激を 5 分間行う ES5 群, 30 分間行う ES30 群, 60 分間行う ES60 群の 4 群とした。解析は、アセチルコリン受容体 (AchR) に特異的に結合する TMR- $\alpha$ -bungarotoxin (TMR-BTX), Neurofilament-H (NF-H), Neurofilament-L (NF-L), ADAM19, リン酸化型 ErbB3 の発現を蛍光免疫染色で観察した。また、共培養 4 日後の蛍光免疫染色像の AchR 集積数, 神経突起の長さを計測した。シナプシン 1 (SYN1), ADAM19, リン酸化型 ErbB3, ERK1/2 の発現をウェスタンブロットにより解析した。AchR  $\alpha$  サブユニットの発現をリアルタイム PCR 法により検討した。

【結果】蛍光免疫染色では、全ての群において TMR-BTX, NF-H の発現が観察された。ES30 群 ( $P<0.01$ ), ES60 群 ( $P<0.01$ ) において神経伸長が有意に抑制されていた。AchR の集積数は、ES30 群 ( $P<0.01$ ), ES60 群 ( $P<0.01$ ) で有意に増加していた。SYN1 も同様に ES30 群 ( $P<0.01$ ), ES60 群 ( $P<0.01$ ) で有意に発現が増加していた。一方、リアルタ

イムPCR法ではAchR $\alpha$ サブユニットの発現がES5群( $P<0.05$ ), ES30群( $P<0.01$ ), ES60群( $P<0.01$ )で有意に低下していた。ADAM19/neuregulin/ErbBシグナル伝達系の局在を蛍光免疫染色で検討とした結果、共培養4日後のサンプルでADAM19, NF-LはNG108-15に共局在していた。また、NF-H, リン酸化型ErbB3もNG108-15に共局在していた。ウェスタンブロットによる観察では、前駆型, 活性型ADAM19の発現がそれぞれES30群( $P<0.05$ ), ES60群( $P<0.01$ )で有意に増加していた。リン酸化型ErbB3の発現はES30群( $P<0.05$ ), ES60群( $P<0.01$ )において有意に増加していた。また、ERK1はES30群( $P<0.05$ ), ES60群( $P<0.05$ )で有意に活性化していた。一方、ERK2の発現に差は認めなかった。

【考察】NMJ成熟に関連するSYN1の発現やAchR集積数がES30群, ES60群で増加した。また、シナプス形成により骨格筋が神経支配されるとAchR $\alpha$ サブユニットのmRNA発現は低下するという報告があるが、今回の実験ではES30群, ES60群で低下していた。以上のことから、共培養モデルにおいて電気刺激はNMJ形成を促進したと考えられた。電気刺激により発現が増加した前駆型ADAM19はEphA4と相互作用し、シナプス形成に関与したことが考えられた。また、電気刺激はfurinの活性に影響し、ADAM19のプロドメイン切断を促し、前駆型から活性型への変換を促した可能性が考えられた。

ADAM19がNG108-15に局在していたことから、電気刺激はNG108-15に作用したと考えられた。シグナル伝達系の下流にあるErbBは、シュワン細胞, 運動終板, T管に局在していると報告があり、パラクリンまたはオートクリンによるシグナル伝達の可能性があった。そこで蛍光免疫染色によりリン酸化型ErbB3の発現を観察したところ、リン酸化型ErbB3は共培養下でNG108-15に局在していた。また、電気刺激は神経突起伸長を抑制していた。過去の研究でNMJの成熟には神経伸長よりも神経終末の分化が必要であることが示唆されていた。以上より、電気刺激はADAM19/neuregulin/ErbBシグナル伝達系を介し神経終末分化を誘導し、NMJ形成を促進したと考えられた。

本研究で用いた共培養モデルにおいても、*in vivo*での過去の研究と同様に電気刺激がNMJ形成を促進した。共培養モデルは、動物実験よりも簡単に電気刺激条件の設定が可能であるので、*in vivo*の実験に進む前に条件検討をするのに有用である可能性がある。しかしながら、*in vivo*と*in vitro*では異なる点があり、今後、共培養モデルでの結果が*in vivo*でも反映するかを検証する必要がある。

【結語】*In vitro*において、電気刺激によるNMJ形成の促進は、ADAM19/neuregulin/ErbBシグナル伝達系により制御されている可能性が示唆された。