論　文　内　容　要　旨

Electrical stimulation accelerates neuromuscular junction formation through ADAM19/neuregulin/ErbB signaling in vitro

（電気刺激は ADAM19/neuregulin/ErbB シグナル伝達系を介し神経筋接合部形成を促進する）

Neuroscience Letters,545:29-34, 2013

保健学専攻生体環境適応科学

（主指導教員：弓削　　類　教授）

保健学専攻成人健康学

（副指導教員：片岡　　健　教授）

保健学専攻健康開発科学

（副指導教員：小林　敏夫　教授）

深澤　賢宏

【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。活性型 ADAM19（A Disintegrin And Metalloproteinase 19）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，切断された可溶型 neuregulin が ErbB を活性化する。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 ヒポキサンチンナトリウム 5mM，アミノプテリン 20μM 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-α-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 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。AchRα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】蛍光免疫染色の観察で全ての群において 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 AchRα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 の発現に差は認められなかった。

【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 α 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，リン酸化型 ErbB3 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。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る。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。しかしながら，*in vivo* と *in vitro* では異なる点があり，今回の実験結果が *in vivo* でも反映するかを今後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。