

## 第6号様式

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 保健学 )	氏名	深澤 賢宏
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
Electrical stimulation accelerates neuromuscular junction formation through ADAM19/neuregulin/ErbB signaling <i>in vitro</i> (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)			
論文審査担当者			
主 査	教授	小林 敏生	印
審査委員	教授	片岡 健	印
審査委員	教授	川真田 聖一	印
審査委員	教授	松川 寛二	印
審査委員	教授	弓削 類	印
論文審査の要旨			
<p>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。これまでに電気刺激による NMJ 形成促進効果が報告されているが作用機序は不明である。近年、電気刺激や運動負荷などによって neuregulin/ErbB シグナル伝達系が活性化されるという報告がある。また、その上流にある ADAM19 (A Disintegrin And Metalloproteinase 19) の NMJ 形成への関与が示唆されている。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。</p> <p>ラット筋芽細胞を4日間増殖培養した。分化培地に交換し、5日間分化培養して筋管を形成させた。また、神経系細胞である NG108-15 は、増殖培地で培養した後、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、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</p>			

群の 4 群とした。解析は、アセチルコリン受容体に特異的に結合する TMR- $\alpha$ -ブンガロトキシシン (TMR-BTX)、ニューロフィラメント-H, ニューロフィラメント-L, ADAM19, リン酸化型 ErbB 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アセチルコリン受容体集積数, 神経突起長を計測した。シナプシン 1, ADAM19, リン酸化型 ErbB, ERK1/2 の発現をウェスタンブロットにより解析した。アセチルコリン受容体  $\alpha$  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。

蛍光免疫染色で全ての群において TMR-BTX, ニューロフィラメント-H の発現が観察された。また, 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。先行研究で神経終末分化の際には神経伸長が抑制されるという報告がある事から電気刺激により神経終末分化が誘導された可能性が示唆された。アセチルコリン受容体集積数は ES30 群 ( $P<0.01$ ), ES60 群 ( $P<0.01$ ) で有意に増加していた。成熟したシナプスで発現するシナプシン 1 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。また, 骨格筋が神経支配されるとアセチルコリン受容体の mRNA 発現が低下するとの報告があるが, 本研究においてもアセチルコリン受容体  $\alpha$  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。以上の事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。

ADAM19/neuregulin/ErbB シグナル伝達系の局在を蛍光免疫染色で検討した結果, 共培養 4 日後のサンプルで ADAM19, リン酸化型 ErbB は NG108-15 に局在していた。この事から電気刺激は NG108-15 に作用したと考えられた。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 ErbB 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。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。

以上, 本論文は電気刺激による NMJ 形成促進効果の作用機序解明の一助になったもので, リハビリテーション科学に有益な示唆を与え, 保健学に資するところが大きい。よって, 審査委員会委員全員は, 本論文が著者に博士 (保健学) の学位を授与するのに十分な価値のあるものと認めた。