

主論文の要旨

Zonisamide upregulates neuregulin-1 expression and enhances acetylcholine receptor clustering at the *in vitro* neuromuscular junction

（ ゾニサミドは *in vitro* における神経筋接合部において
ニューレグリン-1 の発現を介し、
アセチルコリンレセプタークラスターを増加させる ）

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：今釜 史郎 教授)

井上 太郎

【緒言】

重症筋無力症、先天性筋無力症候群、またいくつかの神経疾患においてアセチルコリンレセプター (AChR) のクラスターリングの低下による神経筋接合部 (NMJ) における障害が認められる。しかし、現在 AChR クラスターリングを促進させる治療法はない。

抗てんかん薬であるゾニサミド (Zonisamide, ZNS) はパーキンソン病 (PD) の治療薬としても用いられている。以前我々は坐骨神経切断モデルマウスの切断側の支配筋において *Chrne*、*Colq* などの AChR 関連遺伝子の発現量を増加させたと報告した。これより ZNS が AChR クラスターに何らかの影響を与える可能性が考えられた。我々は ZNS の AChR クラスターに対する作用を確認するために、骨格筋、運動神経細胞としてマウスの細胞株を用いた共培養システムのプロトコールを作成、この共培養 (*in vitro*) にて NMJ を再現し ZNS の AChR クラスターリングに対する作用とその機序について評価、検討した。

【対象および方法】

共培養には骨格筋細胞として C2C12 (mouse myoblast cell line)、運動神経細胞として NSC34 (mouse neuroblastoma-spinal motor neuron hybrid cell line) を選択した。これらを図 1A に示すようなプロトコールを作成し共培養を行い、神経筋接合部を再現した。C2C12 を 100 cells/mm² の濃度にて増殖培地 (DMEM、10% fetal bovine serum、1% Pen-Strep) に播種、翌日分化培地 (DMEM、2% horse serum、1% Pen-Strep) に変更、播種後 3 日に NSC34 を 50 cells/mm² の濃度にて播種した。共培養後の培地は DMEM/F12 に 0.5% horse serum、1% non-essential amino acid、1% Pen-Strep を添加し作成した。ZNS は 0、1、10、20 μ M の濃度にて共培養時より投与された。共培養後 6 日に α -bungarotoxin (α -BTX) にて AChR クラスターを染色し、その Area、Intensity、Length について MetaMorph を用いて計測した。また、qRT-PCR を用いて AChR 関連遺伝子の発現量を調査した。

【結果】

C2C12 と NSC34 の共培養による *in vitro* NMJ の再現

Drug screening を簡便かつ再現性のある *in vitro* NMJ にて行うため、骨格筋細胞 C2C12 と運動神経細胞 NSC34 を用いて図 1A に示すような共培養プロトコールを作成した。C2C12 播種後 9 日、共培養後 6 日において共に十分に分化していることを確認した (図 1B)。また NSC34 を Peripherin にて緑色に染色、AChR を α -BTX にて赤色に染色し、NSC34 の neurites の先に C2C12 の myotube における AChR クラスターがあることを確認した。

ZNS は AChR クラスター、収縮する myotube 数、そして AChR 関連遺伝子の発現を濃度依存的に増加させるが、C212 単培養下にはこれらの変化は認めない

共培養と同時に ZNS を添加し共培養後 6 日に AChR クラスターを評価した (図 2A)。結果、AChR クラスターは ZNS 濃度依存性に増加していることが示された (図 2B、C)。

また共培養下において骨格筋細胞の一部は自発的に収縮が見られる。この収縮する骨格筋細胞も濃度依存的に増加していることが分かった(図 2F)。続いて、AChR 関連遺伝子の発現について調査した。すると、*Chrne*、*Colq* が以前の報告と同様に濃度依存的に増加していることが分かった。また *Myod1*、*Nrg1* も同様に増加していた(図 2D、E)。しかし、これらのいずれの変化も C2C12 単独培養下では認められず(図 S1C、D、E)、NSC34 単独培養下でも *Nrg1* の増加は認められなかった(図 S1F)。この結果より、ZNS が作用するには *in vitro* NMJ が必要であること、その作用にはニューレグリン-1(*Nrg1*)が関与している可能性が考えられた。続いて、共培養した培地に含まれる分泌因子が ZNS による AChR クラスターに関与しているか検討するために、共培養された培地を分化した C2C12 に 2 日間、1 日間、6 時間投与した。しかし、いずれにおいても共培養された培地は C2C12 における AChR クラスターリングに影響を与えなかった(図 3)。この結果から AChR クラスターリングに対する ZNS の効果は核細胞より培地に分泌された物質を介したものではないことが示唆された。

アグリンは *in vitro* NMJ において AChR クラスターリングに必要であるが、ZNS の効果を媒介しない

ZNS の AChR クラスターリングに対する効果にアグリンが関与しているかを確認するために、抗アグリン抗体を共培養下に 48 時間投与した。結果、抗アグリン抗体が AChR クラスターリングを ZNS 存在下、非存在下いずれにおいても抑制することが示された(図 4E)。一方 *Chrne* の発現量には影響を与えなかった(図 4F)。よって、ZNS は Agrin 依存的に AChR クラスターリングを増強させているが、Agrin 非依存的に *Chrne* の発現量を増加させていることが示唆された。

ZNS は *in vitro* NMJ においてニューレグリン-1(*Nrg1*)の発現を誘導し、AChR クラスターリングを誘導するために *Nrg1*/ErbB signaling を必要とする

ZNS の AChR クラスターリングに対する作用における *Nrg1* の関与を検討した。まず共培養下に ZNS を 6 日間投与と、*Nrg1* を 2 日間投与したところ AChR クラスターリング、*Chrne* 発現量が共に増加した。また ZNS 投与と *Nrg1* 投与間に差を認めなかった(図 5A、B、C)。このことから ZNS が *Nrg1* と同様の効果を示すことが示唆される。次に、ZNS の効果に *Nrg1* とその受容体である ErbB が必要であるかを、ErbB の inhibitor を使用して検討した。結果、ZNS による AChR クラスターリング、*Chrne* 遺伝子発現量の増強は ErbB inhibitor を投与することにより共に抑制された(図 5D、E、F)。図 2E と図 S1F の結果より ZNS が *in vitro* NMJ において *Nrg1* の発現を誘導することがわかっているため、図 5 より ZNS の AChR クラスターリングの誘導は *Nrg1*/ErbB signaling を介していることが示唆された(図 5G)。

【考察】

共培養下に、ZNS は AChR クラスターリング、筋収縮、そして *Nrg1*、*Chrne* を含む NMJ

関連遺伝子の発現を促進させた(図 2 C、D、E、F)。加えて、C2C12、NSC34 単培養下にはこれらの変化は認められなかった(図 S1C、D、E、F)。つまり ZNS は運動神経細胞と骨格筋細胞が NMJ を形成している状態においてのみ作用していることが分かった。さらに AChR クラスターリングと *Chrne* の発現に対する ZNS の効果は Nrg1/ErbB signaling に依存していた(図 5D、E、F)。

ZNS は抗てんかん薬であり、PD に対する治療薬としても使用されている。PD モデルマウスにおいてチロシン水酸化酵素を増加させることによりドパミン作動性神経細胞におけるドパミンの産生を増加させることが報告されている。一方 Nrg1 と ErbB4 は PD モデルマウスにおいてドパミン作動性神経細胞の保護作用や中脳におけるドパミン濃度の上昇、チロシン水酸化酵素の発現および活性の増加が報告されている。これらから、PD モデルマウスにおいて ZNS と Nrg1 がドパミン作動性神経細胞に同様の作用を及ぼすことが示唆される。また、筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデルマウス、Charcot-Marie-Tooth 病モデルラットにおいても Nrg1 の関与が指摘されている。つまり、ZNS はこれらの疾患に対しても有効である可能性がある。今後、さらなる研究、試験により NMJ に対する ZNS の効果が明らかになるかもしれない。

【結語】

我々は、C2C12、NSC34 を使用し簡便な共培養システムを作成した。これを用いて ZNS が AChR クラスターリングを増強させ、関連遺伝子の発現を増加させることを示した。そして ZNS の NMJ に対する作用は Nrg1/ErbB signaling を介していることが示唆された。