

Effect of Immunological and Pharmacologic Agents on Acetylcholine Receptor Clusters of Skeletal Muscle

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/2297/8296

骨格筋アセチルコリンレセプター・クラスターに 対する免疫および薬理学的因子の影響

金沢大学医学部神経内科学講座 (主任: 高守正治教授)

小 島 久 典

(平成4年1月8日受付)

重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) 患者血清および細胞膜下構造を修飾すると考えられている薬剤が, ラット培養筋細胞膜上に現われるアセチルコリンレセプターの凝集体 (acetylcholine receptor cluster, AChR クラスター) にどのような影響を与えるかについて検討した. まず筋細胞のアセチルコリンレセプター (acetylcholine receptor, AChR) を fluorescein isothiocyanate (FITC) を結合させた α -bungarotoxin (FITC- α -BuTx) にて蛍光染色し, レーザーサイトメーターを用いて上記の処理が蛍光強度や蛍光パターンにどのような変化を与えるかで評価した. MG 患者血清は対照血清と有意差をもって筋管細胞における AChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度を低下させる効果が認められた. 血清による処理後, 残存した AChR クラスターの示す局所的蛍光パターン (面積, 平均蛍光量) を MG 患者群と対照群と比較したが, 有意の差は認めなかった. 患者血清が筋管細胞の AChR クラスターの出現頻度を低下させる効果と患者血清中の抗アセチルコリンレセプター抗体価との間には有意の相関が認められた. また, 細胞膜の流動性の変化を調べる目的で, 患者血清で処理した筋管細胞の細胞膜を蛍光染色し, 蛍光回復法 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) にて拡散係数を求めたが, 対照血清処理の場合との間に有意差は認めなかった. 薬剤のなかでは, カルモジュリンを抑制するとされる W-7 および C-キナーゼを活性化するとされる phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) に, AChR クラスターの出現を強く抑制する効果が認められた. なお, コルヒチン, サイトカラシン B や細胞内のサイクリック AMP を修飾する薬剤である dibutyryl cyclic AMP, AChR 合成促進作用のあるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (Calcitonin gene-related peptide, CGRP) には, 対照との間に差は認められなかった. これらの結果から AChR クラスターは, 安定化にカルモジュリンを必要とし C-キナーゼには阻害されるような細胞膜下の構造と関係しており, MG 患者血清には AChR とこの構造との関係に影響を与え, AChR クラスターの破壊をもたらす因子を含むものと推定された.

Key words myasthenia gravis, acetylcholine receptor, cluster, calmodulin, cytoskeletal system

重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) は主として全身の筋力低下を主徴とする疾患単位である. その成立には神経筋接合部の後シナプス側に存在するアセチルコリンレセプター (acetylcholine receptor, AChR) に対して自己抗体が産生され, 神経筋接合部においてアセチルコリンとの薬理学的競合, 筋膜上の受容体崩壊促進, 補体介在性細胞膜障害の3機序を介していると考えられている¹⁾. しかし, 従来の測定法による本抗体の活性は必ずしも臨床像と相関するものではなかった.

本研究では, 本病患者の液性因子が筋細胞膜上の AChR に与える影響について調べるために, 神経筋接合部の実験モデルとして培養ラット初代筋管細胞上に形成される AChR の凝集体 (AChR クラスターと呼ばれる) を利用し, (1)患者血清を培養筋管細胞系に添加した後, AChR クラスターにどのような変化が生じるか, (2)もし変化があるとすれば, 血清中どのような因子によるものか, (3)AChR を細胞膜に固定していると考えられている細胞膜下の構造はどのような薬剤の影響を受けるか, に

ついて検討を行い, AChR の細胞膜上での凝集機構と患者血清のこれに対する修飾作用機構の解析を試みた. なお, AChR クラスターの変化の評価は蛍光色素 (fluorescein isothiocyanate- α -バンガロトキシン, FITC- α -バンガロトキシン) を利用し, レーザーサイトメーター (ACAS 570) を使用して行った.

材料および方法

1. 患者および対照血清

金沢大学神経内科入院歴を持つ17例の重症筋無力症患者と対照として非重症筋無力症患者11例 (正常人9例および筋萎縮性側索硬化症患者2例) の血清を使用した. 重症筋無力症の診断は臨床症状, 薬理学的検査 (エドروفoniumテスト), 臨床電気生理学的解析, 血清中の抗 AChR 抗体価測定などによって行った. 血液はステロイドなど免疫抑制剤の投与は受けていない期間に採取し, 血清を予め56℃, 30分処理し補体を非働化した.

Abbreviations: AChR, acetylcholine receptor; α -BuTx, α -bungarotoxin; CGRP, Calcitonin gene-related peptide; DMEM, Dulbecco modified Eagle's medium; EITC, fluorescein isothiocyanate; FRAP, fluorescence recovery after photobleaching; HEPES, N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]; MG, myasthenia gravis; PMT, photomultiplier tube; TPA, phorbol 12-myristate 13-acetate

II. ラット AChR の抽出²⁾

雄ウイスター系ラットの坐骨神経を切除後10~14日目に下肢の除神経筋を切り出した。細切した後、4倍量の Tris 緩衝液 A (NaCl, 0.1 M; phenylmethyl sulfonyl fluoride, 0.1 mM; NaN₃, 0.02%; ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), 1 mM; ethyleneglycol bis (2-aminoethylether) tetraacetic acid (EGTA), 1 mM; Tris-HCl, 50 mM, pH 7.4) を加えてホモゲナイズした。4℃で 15,000rpm, 30分遠心後、沈渣に同量の 1% Triton X-100 を含む Tris 緩衝液 A を加えた。さらに 4℃にて一晩攪拌し、4℃, 17,000rpm にて 30分遠心後の上清を AChR 分画とした。この標品を抗 AChR 抗体価測定のための抗原とした。

III. 抗ラット AChR 抗体価測定³⁾

抗 AChR 抗体価測定は、結合型抗体法及び阻害型抗体法の 2つの方法によって行った。

1. 二抗体免疫沈降法 (結合型抗体測定)

¹²⁵I- α -バンガロトキシン (α -bungarotoxin, α -BuTx) (アマジヤム・ジャパン, 東京) で標識した AChR 分画 (1 pmol BuTx binding site/ml に調整) 100 μ l に、0.2% Triton X-100 を含む Tris 緩衝液 A にて 100倍希釈した被検血清 100 μ l を加えて、一晩 4℃に放置した。これにリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) にて 2倍希釈した抗ヒト IgG (ヘキストジャパン, 東京) 50 μ l を加えて、4℃にて一晩置いた後、4℃にて 3,500rpm, 20分間遠心した。上清を捨て、沈渣に 0.2% Triton X-100 を含む Tris 緩衝液 A を 2 ml 加え沈渣を洗い、4℃にて 3,500rpm, 20分間遠心、沈渣である ¹²⁵I- α -BuTx 標識 AChR, 抗 AChR 抗体および抗ヒト IgG 抗体の免疫複合体の放射活性を測定した。抗体価は沈降した複合体の放射活性を、使用した ¹²⁵I- α -BuTx の放射活性に換算し、さらに 1 ml の血清あたりの活性に補正して、pmole BuTx-binding site/ml 血清として表した。すべての測定には血清 1 検体につき 3 サンプルを作り、ブランクを引いたあとの平均値を用いた。

2. コンカナバリン A 法 (阻害型抗体価測定)

被検血清 50 μ l に 0.2 pmol BuTx-binding site/ml に調整した AChR 100 μ l を加え一晩 4℃にて放置後、¹²⁵I- α -BuTx を 0.2 pmol 加えて、一晩 4℃にて放置、これをコンカナバリン A-セファローズカラム 0.5 ml (Pharmacia, Uppsala, Sweden) に通して AChR を吸着させた。0.2% Triton X-100 を含む Tris 緩衝液 A を使用して AChR に結合していない ¹²⁵I- α -BuTx を洗い流した後、カラムに残存する放射活性を測定した (RA_{MC})。血清の代わりに Tris 緩衝液 A 50 μ l を用いたものについて同様に放射活性を測定した (RA_{control})。阻害活性価は、 $100 \times (RA_{MC} - RA_{control}) / RA_{control}$ (%) から求めた。

IV. 骨格筋細胞培養⁵⁾

生後 1~2 日目の新生ウイスター系ラット 10 匹を 70% エタノールにて消毒後、後肢を切り出しハンクス液に浸した。この後肢から実体顕微鏡下にて皮膚、骨、血管などをはぎ筋肉片のみを取り出した。この筋肉片をさらに鉋にて細断し、0.3% トリプシン液 (1:250) (Difco Lab., Detroit, U.S.A.) にて 37℃, 30分間消化し細胞浮遊液を得た。1,500rpm にて 10分間遠心し上清を取り除いた後、沈渣の細胞に Dulbecco 改変 Eagle 培地 (Dulbecco modified Eagle's medium, DMEM) (Gibco, Grand Island, U.S.A.) を加え、さらに 1,000rpm にて 5分間遠

心した。上清を捨て、残った細胞沈渣に 10% の牛胎児血清 (Gibco, Grand Island, U.S.A.) と 10% の非働化した馬血清 (Gibco, Grand Island, U.S.A.) を含む DMEM 20 ml を加え、よくピペティングして細胞を均一にした後、コラーゲンコートしていない 60 mm 径プラスチックペトリ皿 (岩城硝子, 東京) に 5 ml ずつ分注した。線維芽細胞を選択的に除くため 30 分間培養した後、筋芽細胞に富んだ上清のみ採取し、10% の牛胎児血清 (Gibco, Grand Island, U.S.A.) および 10% の非働化した馬血清 (Gibco, Grand Island, U.S.A.) を含む DMEM を 1 ml につき $3 \sim 4 \times 10^5$ 個の細胞となるように加えた。そしてその細胞浮遊液をコラーゲンコート済みの 35 mm 径プラスチックペトリ皿 (岩城硝子, 東京) に 2 ml ずつ分注し、60 分間培養した。

顕微鏡下、筋管細胞が出来かけている時期を選び、培養液を線維芽細胞を取り除く目的で 100 μ M ウリジン (Sigma, St. Louis, U.S.A.), 10 μ M フルオロウリジン (Sigma, St. Louis, U.S.A.) および 10% の非働化した馬血清を含む DMEM に交換し、48 時間培養した。

新たに 10% の非働化した馬血清を含む DMEM に培養液を交換後、さらに 12 時間培養した。ここで 5% 被検血清および 10% の非働化した馬血清を含む DMEM に培養液を交換して、さらに同条件にて 36 時間培養を続けた後、AChR の蛍光染色を行った。なお、上記の操作はすべて無菌的に行い、培養はすべて 37℃, 5% CO₂, 95% 空気下で行った。

V. 薬剤の影響の測定

AChR クラスタに対する薬剤の影響をみる場合は、血清の影響の検討で用いたのと同一の培養系を以下の薬剤、濃度、時間で処理し、AChR 蛍光染色を行った。薬剤処理の条件は dibutyryl cyclic AMP (ヤマサ, 銚子), 1 mM, 24 時間; ヒト CGRP (Calcitonin gene-related peptide) (ペプチド研究所, 大阪), 200 nM, 24 時間; ニフェジピン (nifedipine) (Sigma, St. Louis, U.S.A.), 20 μ M, 12 時間; phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) (Sigma, St. Louis, U.S.A.), 100 nM, 12 時間; trifluoperazine dihydrochloride (Sigma, St. Louis, U.S.A.), 10 μ M, 6 時間; W-7 (生化学工業, 東京), 10 μ M, 6 時間; W-5 (生化学工業, 東京), 10 μ M, 6 時間; コルヒチン (colchicine) (Sigma, St. Louis, U.S.A.), 10 μ M, 6 時間; サイトカリン B (cytochalasin B) (Sigma, St. Louis, U.S.A.), 2 μ g/ml, 6 時間、でそれぞれ行った。

VI. AChR 蛍光染色⁷⁾

被検体 (プラスチックペトリ皿) をハンクス液で数回洗い、10 mM N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES) (pH 7.4) および 5% 牛胎児血清を含む DMEM (A 液) にかえて 20 分間、37℃, 5% CO₂, 95% 空気下で培養を続けた。次に fluorescein isothiocyanate (FITC) を結合させた α -バンガロトキシン (FITC- α -BuTx) (Sigma, St. Louis, U.S.A.), 500 nM を含む A 液に培養液を交換し、さらに 30 分間、同条件で培養を行った。

筋管細胞に結合していない FITC- α -BuTx を取り除くため、ハンクス液にて数回洗い、-20℃ エタノールに一晩浸し固定を行った。マウントは 0.1 M の sodium carbonate を含む 95% グリセロールで行い、蛍光量の測定を行った。

なお、毎回 5 μ M の α -BuTx (Sigma, St. Louis, U.S.A.) にて 2 時間処理した後、上記と同様に染色を行い、陰対照を作成した。また、作業はすべて暗所にて行った。

Ⅶ. 細胞膜蛍光染色^{9)~10)}

細胞膜を特異的に蛍光染色するため、細胞膜に溶け込む性質を持ったリン脂質の FITC 蛍光誘導体である N-(5-fluorescein-thiocarbonyl) dipalmitoyl-L- α -phosphatidylethanolamine (FL-PE) (Molecular Probes, Inc., Eugene, U.S.A.) を予め 10mg/ml となるようにクロロホルムに溶解した。これを 10mM HEPES (pH 7.4) を含む DMEM にて 1000 倍希釈し、よく混和した。

この液と被検体の培養液を交換後、30 分間、37℃、5% CO₂、95% 空気下に保って細胞膜を染色した後、ハンクス液にて数回洗った。筋管細胞の攣縮を防ぐための 0.75 μ M のテトロドトキシン (Sigma, St. Louis, U.S.A.) を含むハンクス液 2 ml を分注し細胞膜の流動性の解析を行った。

Ⅷ. AChR クラスターの評価

AChR クラスターの評価には ACAS 570 ワークステーション (Meridian Instruments Inc., Okemos, U.S.A.) を利用した¹¹⁾。ACAS 570 はコンピューターによって制御された蛍光測定装置であり、レーザー光学系、蛍光検出部分、コンピューターからなる。

レーザー光学系は、試料からの蛍光を励起するために必要とされる光を供給する部分で 5 W アルゴンレーザー (INNOVA-90) (Coherent, Palo Alto, U.S.A.) からなる。蛍光検出部分は倒立顕微鏡 (オリンパス, 東京), ステップモーターによる可動ステージ, 光電増倍管 (photomultiplier tube, PMT) (浜松ホトニクス, 浜松) からなり、レーザー光学系からの光を対物レンズ (40 \times) を通して径 1 μ m の部分に集め、また試料からの蛍光を PMT にて定量する。得られた蛍光量はコンピューターに内蔵されている種々のプログラムにより解析される。

実際の測定は、レーザー光の波長を 488nm にし、濃度フィルター (neutral-density filter) として 10% を使用した上、較正用プログラムにより毎回レーザー光の光量が一定になるようにレーザー 0 次光を約 150mW に設定した。その後、蛍光測定用メニュー (Scan Image) を選択した。パラメーターは、PMT の感度 (PMT sensitivity) を 50%, レーザー 1 次光の強さ (scan strength) を 30%, 測定点の間隔 (step size) を 1 μ m と設定し、1 回の測定で 180 μ m \times 180 μ m の領域の蛍光 (520nm) を測定できるようにした。

1 被検体につき、無作為に 20 個の筋管細胞を選択し、筋管細胞に属するすべての領域の蛍光量を測定し、別に線維細胞層の蛍光量を測定しバックグラウンドとして筋管細胞の蛍光量より差し引き、以下の条件を満たす領域を AChR クラスターとしてデータを保存し、AChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度 (%) として表した。

AChR クラスターは、(1) 多核細胞である筋管細胞上に存在すること、(2) その筋管細胞は培養皿からはがれた状態になっていないこと、(3) 筋管細胞の他の領域と比較して 2 倍以上の蛍光量があること、(4) 線状や点状の領域でなく、はっきりした境界を持つ領域であること、(5) アーチファクトを除外するため直径 5 μ m 以上あること、を満たす領域とした。

Ⅸ. 細胞膜流動性の評価 (蛍光退色回復法)¹²⁾

患者血清が細胞膜の流動性に影響を与えているかどうかについては蛍光退色回復法 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) によって測定した。原理は、蛍光染色された細胞膜の一部分に短時間強いレーザー光をあててその部分を退色

(ブリーチ) させた後、その部分に非常に弱いレーザーを一定間隔で当てていると、退色された細胞膜周囲のまだ蛍光を保持している膜脂質の流入により蛍光が回復してくる。この回復の速さにて細胞膜の流動性を測定するものである。この測定にも ACAS 570 ワークステーションを利用した。

この測定には AChR の蛍光染色に用いた筋管培養細胞と同時期のものを利用し、培養液を 5% の被検血清と 10% の非働化した馬血清を含む DMEM に交換し、37℃、5% CO₂、95% 空気下に 12 時間培養した。その後、細胞膜の蛍光染色を行い、すぐに ACAS 570 の FRAP 用プログラムにて測定した。

使用したパラメーターは、レーザー光の波長を 488nm、レーザー 0 次光を約 150mW、PMT の感度 (PMT sensitivity) を 60%、レーザー 1 次光の強さ (scan strength) を 2%、ブリーチ時のレーザー光の強さ (blast strength) を 50%、ブリーチ照射時間 (blast time) を 50msec、測定点の間隔 (step size) を 0.25 μ m、測定間隔を 5 秒間隔 20 回に引き続いて 10 秒間隔 6 回の測定、と設定した。測定は 0.75 μ M のテトロドトキシン (Sigma, St. Louis, U.S.A.) の存在下、30℃ のハンクス液中ですべて行った。測定は細胞膜のインターナショナルリゼーションを考慮して染色後 45 分以内に終わるようにした。

得られた結果は Koppel の理論に基づいて ACAS の FRAP 解析用プログラムに導入して、拡散係数を求めた^{13)~15)}。このとき拡散定数の絶対値は、すでに拡散係数の分かっている分子量 148,900 の FITC-デキストラン (Sigma, St. Louis, U.S.A.) を 40% または 25% のグリセロール溶液に溶かして拡散係数を測定し、その値より補正して求めた。

X. 統計処理

得られたデータは平均値士標準偏差で表した。血清または薬剤処理後の AChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度の比較および細胞膜流動性の比較については、Mann-Whitney ノンパラメトリックテストを使用して統計的解析を行った。抗 AChR 抗体価と AChR の破壊活性との相関の有意性の検定は、Pearson の相関係数を求め行った。重症筋無力症患者および対照群の 2 群間の AChR クラスターの蛍光パターンの比較は、Fisher の等分散の検定を行った上で、対応のない標本の t 検定を用いた。すべてについて 5% 未満の危険率をもって有意と判定した。

成 績

1. AChR クラスターに対する重症筋無力症患者血清の影響

1. 非処理筋管細胞上の AChR クラスター

血清や薬剤による処理を行わなかった場合、筋管細胞 (図 1) の他の部分と比較して、蛍光量の急峻な立ち上がりを持つ際だって蛍光量が高い部分が存在した (図 2)。図 3 はこのような領域の 1 次元断面データである。このような筋管細胞上の蛍光の強い領域は陰対照では全く認められないことから、AChR クラスターと考えた。領域内で蛍光量は中心部が高いという傾向は認められたが、必ずしも一様でなく、しばしば AChR クラスターの領域内にほとんど蛍光が存在しない領域が点在することがあった。また、この AChR クラスターは、ACAS 570 の三次元描出用プログラムによって、広さ (面積) と高さ (蛍光量) をもつ山として描出された (図 4)。

2. 患者血清の AChR クラスターの出現頻度に与える影響
対照群 (50 \pm 12%) と比較して、患者血清による処理群 (25 \pm

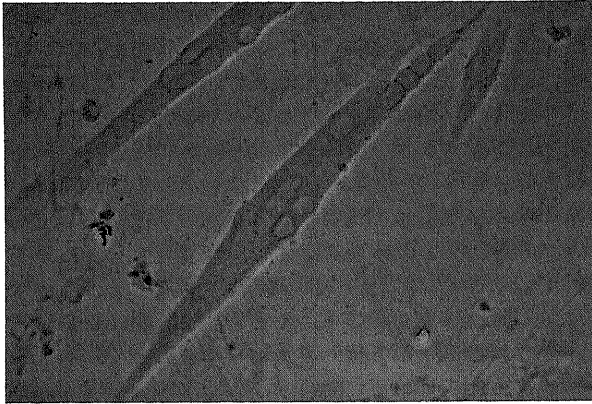


Fig. 1. Phase contrast microscopy of rat cultured multinucleated myotubes on the day 7 after staining with FITC- α -bungarotoxin and fixation in cold ethanol. $\times 400$.

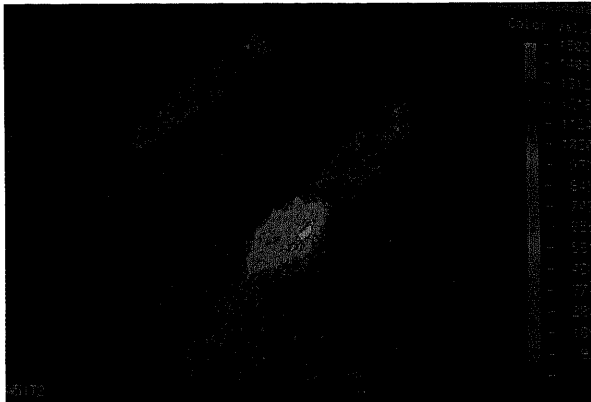


Fig. 2. Fluorescence image of the same area as shown in Fig. 1. The ACAS 570 provided a graded pseudocolor image on the computer display. An AChR cluster is a bright area (white~red area) at the center of the image. $180\ \mu\text{m} \times 180\ \mu\text{m}$.

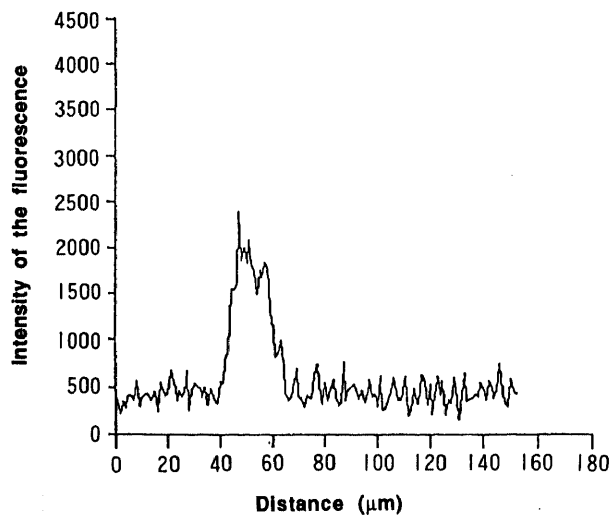


Fig. 3. Linear section of the AChR cluster already presented in the Fig. 2. Numbers on vertical axis indicate the intensity of the fluorescence (arbitrary unit) and horizontal axis shows the distance (μm) from a point which has the background fluorescence intensity. The AChR cluster was observed as a higher intensity area than other portion of the myotube.

13%)ではAChRクラスターを有する筋管細胞の出現頻度の有意な ($p < 0.01$) 低下を認めた (図5)。

3. 血清処理の AChR クラスターの性状に対する影響

血清処理後消失せず残存した AChR クラスターの蛍光パターンに対照群と患者血清処理群との間に差があるかどうかについて検討を試みた。両群の各々の AChR クラスターについて面積と平均蛍光量 (総蛍光量/面積) を ACAS 570 の解析用プログラムにて計算した (図6)。

その結果、両指標とも等分散と判定されたため、対応のない標本の t 検定を行い、両群の平均値の間に差があるかを調べ

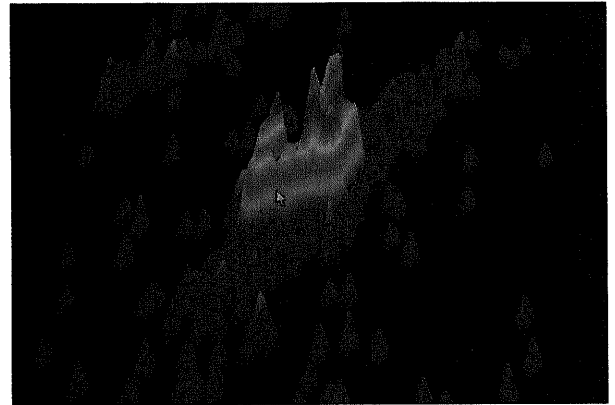


Fig. 4. Three-dimensional presentation of the fluorescence of an AChR cluster. The image was constructed on ACAS 570. The arrow (\Leftarrow) indicates the AChR cluster.

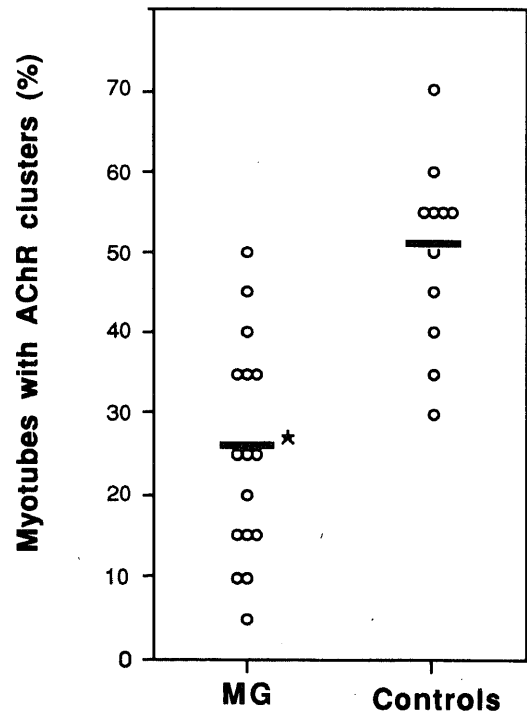


Fig. 5. Myotubes with AChR clusters (%) after the treatment with the serum samples of 17 MG patients and 11 controls. The average values of the two groups are plotted as mean \pm S.D. The serum samples of MG patients disrupted AChR clusters significantly in comparison with those of the controls. \star , $p < 0.01$ (Mann-Whitney test).

た。

まず、面積については対照群、 $570 \pm 311 \mu m^2$ ($n=110$) および患者群、 $540 \pm 338 \mu m^2$ ($n=81$) と両群間に有意差は認められなかった。また、平均蛍光量については対照群、 1192 ± 356 (任意単位) (arbitrary unit) および患者群、 1169 ± 382 (任意単位) と両群間で有意差は認められなかった。

従って、残存した AChR クラスターには両群間に面積および平均蛍光量ともに差は認められなかった。

II. 患者血清の AChR クラスター破壊活性の評価

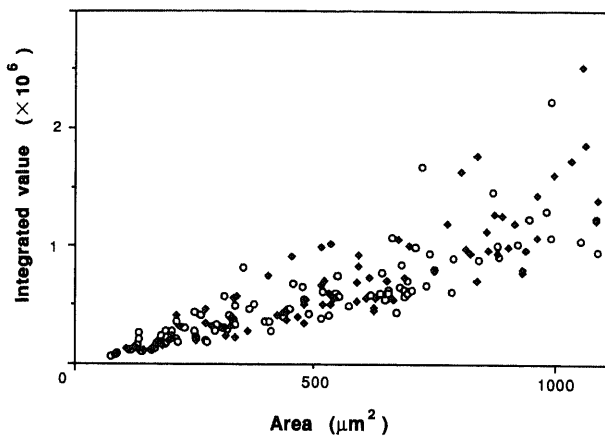


Fig. 6. Characteristics of the fluorescence intensity of the each AChR cluster remaining after the treatment with the serum samples. The horizontal axis indicate the area (μm^2) occupied by AChR clusters. The integrated fluorescence value on the area is indicated on the vertical axis. \circ , control serum samples; \blacklozenge , MG serum samples.

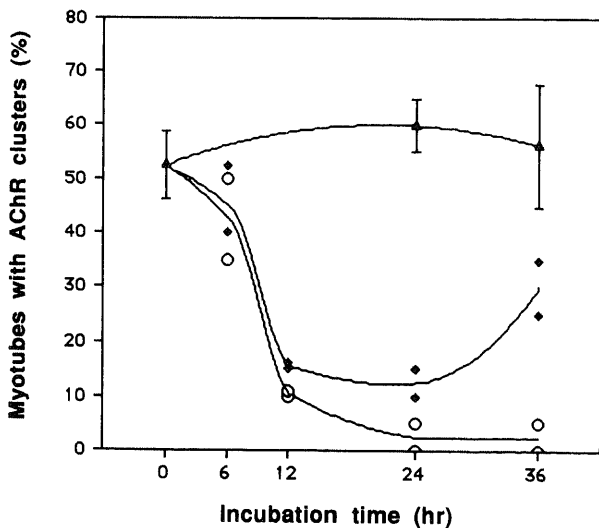


Fig. 7. Time course of disappearance and reformation of AChR clusters after exposure of the two MG patients' serum samples to the rat myotubes. The myotubes with AChR clusters (%) observed at 6, 12, 24 and 36hr were plotted (mean \pm S.D.). During incubation for 6 to 12 hr, AChR clusters were rapidly disappeared. At 36 hour, remarkable recovery of AChR clusters was observed in the patient B serum having low titer of anti-AChR antibody, however, no apparent recovery was seen in the patient A serum having high titer of anti-AChR antibody. \circ , patient A; \blacklozenge , patient B; \blacktriangle , control cultures.

AChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度に対する重症筋無力症患者血清の減少効果が、血清中のどのような因子によるのかを知る目的で、その出現頻度減少効果がどのような時間経過で出現するのかについて検討した。加えて、AChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度と抗 AChR 抗体価との関連についても検討した。

1. 時間経過

どのような時間経過にて AChR クラスターの破壊がすすむ

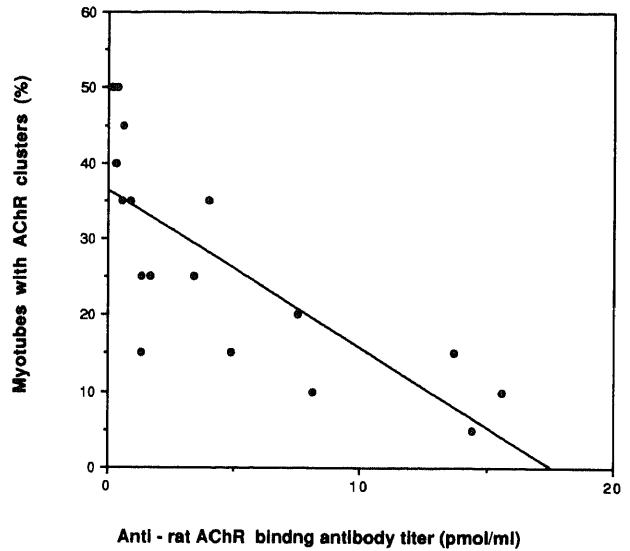


Fig. 8. Correlation between the anti-AChR binding antibody titer (pmol/ml) of the MG patients and the myotubes with AChR clusters (%) after treatment with the serum samples. AChR cluster dispersal activity was significantly correlated with the binding antibody titer ($r=-0.764$, $p<0.01$).

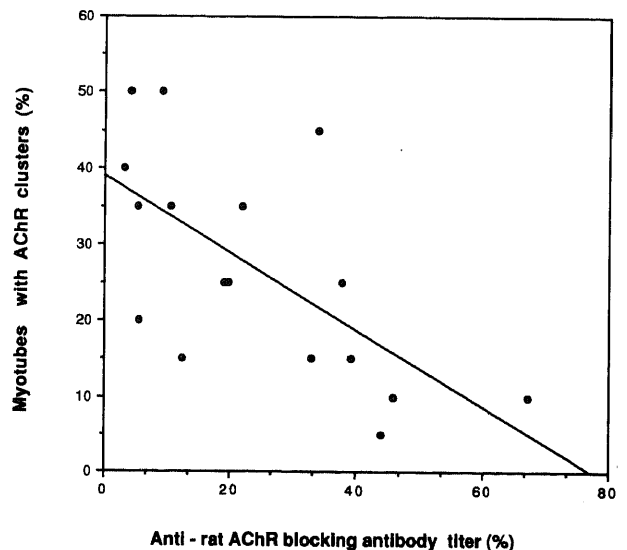


Fig. 9. Correlation between the anti-AChR blocking antibody titer (%) of the MG patients and the myotubes with AChR clusters (%) after treatment with the serum samples. Significant correlation between blocking antibody titer and the AChR cluster dispersal activity was observed ($r=-0.647$, $p<0.05$).

のか調べる目的で、AChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度の低下が確認された2例の患者血清(患者AおよびB)について、血清添加後6時間、12時間、24時間、36時間にそれぞれAChRを蛍光染色し、AChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度を調べた。

患者血清処理を行わない培養系では約半数の筋管細胞にAChR クラスターが認められるが、患者血清処理(A, B)を行うと血清添加6~12時間においてAChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度の低下が著明に認められるようになり、24時間後に最低となった。患者Bの血清処理では36時間後、すでに出現頻度の回復が認められた(図7)。なお、抗ラットAChR抗体価は、患者Aについては結合型抗体14.1pmol/ml、阻害型抗体44%で、患者Bについては結合型抗体1.3pmol/ml、阻害型抗体20%であった。

2. 抗AChR抗体価との関連性

結合型抗体価および阻害型抗体価の両者ともにAChR クラスター保有筋管細胞出現頻度低下とよい相関(結合型, $p < 0.01$; 阻害型, $p < 0.05$)が認められた(図8, 9)。両測定とも抗体価が上昇につれてAChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度が低下した。

III. 患者血清の筋管細胞細胞膜流動性への影響

患者血清の細胞膜流動性への影響を調べるため、II-1で使用した2例の患者血清(患者AおよびB)および2例正常対照血清(CおよびD)をそれぞれ筋管細胞に加え12時間処理した後、細胞膜を蛍光染色し変化をみた。

その評価は短時間(50msec)の強いレーザー光により退色された領域の蛍光量の状況を、X軸に時間、Y軸に $\ln \mu$ (μ は

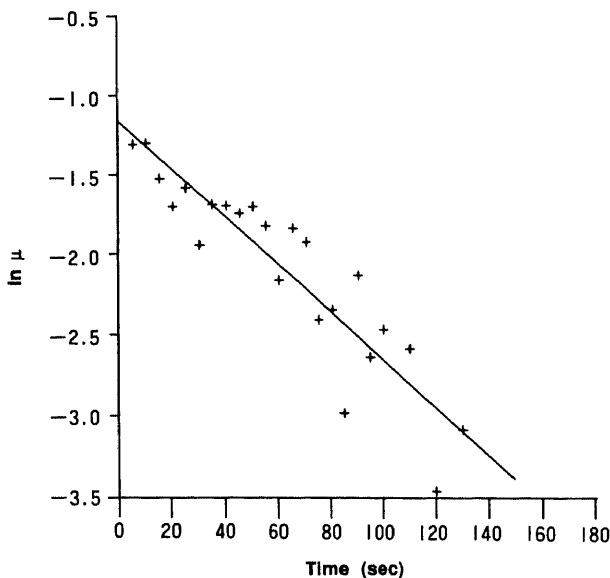


Fig.10. An example of FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) analysis of myotube plasma membrane fluidity on the presence of patient's serum. The fluorescence of a fixed area on the myotube plasma membrane was measured at various time (sec). The μ value was calculated by the method of Koppel¹³⁻¹⁵, and collected $\ln \mu$ (+) were analyzed based on the "flat cell analysis" program of ACAS 570 software. The gradual decrease in $\ln \mu$ value shows recovery of the fluorescence of the plasma membrane and means the fluidity of it.

測定開始時の蛍光量とある時間経過後の蛍光量の差を測定開始時の蛍光量で割ったもの)をとり、細胞膜はこの測定点の回帰直線の傾き(拡散定数)が急峻なほど流動性に富むものとして定量を行った(図10)。

その結果、患者A血清では 2.63 ± 0.41 ($n=5$)、患者B血清では 2.01 ± 0.72 ($n=4$)であり、一方対照血清Cでは 1.99 ± 0.78 ($n=6$)、対照血清Dでは 2.87 ± 0.98 ($n=9$) ($\times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{sec}$)と重症筋無力症患者と正常対照との間に有意差は認められなかった。従って、患者血清は筋管細胞の細胞膜流動性には影響を与えないことが分かった。

IV. AChR クラスターへの薬剤の影響

主として細胞(膜)内蛋白質のリン酸化状態に影響を与える薬剤および細胞骨格の重合状態に影響を与える可能性のある薬剤を用いて筋管細胞のAChR クラスターへの影響を調べた(図11)。

各種薬剤のなかでカルモジュリンに結合し Ca^{2+} /カルモジュリン依存性酵素活性を阻害するW-7¹⁶とC-キナーゼを活性化させるTPA¹⁷に筋管細胞膜上のAChR クラスターを破壊する著しい効果が認められた($p < 0.05$)。W-5¹⁸、trifluoperazine¹⁹、ニフェジピン²⁰には本測定条件では効果は認められなかった。

細胞内のサイクリックAMPを介して生理作用を引き起こすと考えられているdibutyryl cyclic AMPやCGRP²¹により処理では対照と比較して有意差は認めなかった。

細胞骨格系に直接働いて主に脱重合を引き起こすと考えられているコルヒチン²²やサイトカラニンB²³を筋管細胞培養系に加えたところ、顕微鏡下では筋管細胞に形態学的な変化を認めたものの、AChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度には対照と比較してはっきりした差は認められなかった。形態学的にはコルヒチンを加えた場合、筋管細胞は線維細胞のように平坦化し培養皿との接触領域が増加するのが観察され、サイトカラニンBを加えた場合は細胞の輪郭が波様に変形した。

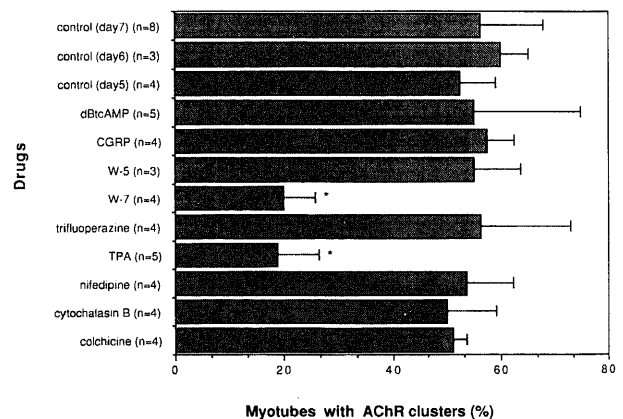


Fig.11. The effect of drugs on the maintenance of AChR clusters of rat cultured myotubes. Cultured myotubes were treated with the drugs listed in the figure. W-7, an inhibitor of calmodulin, disrupted AChR clusters significantly, whereas neither W-5, a weaker inhibitor of calmodulin, nor trifluoperazine, an other type of calmodulin inhibitor, did. TPA, an activator of C-kinase, also inhibited the maintenance of AChR clusters. *, $p < 0.05$ (Mann-Whitney test).

考 察

骨格筋細胞膜上のニコチン性アセチルコリンレセプター (acetylcholine receptor, AChR) は発生途上に於いて神経筋接合部に限局するようになり, 成熟動物では接合部と接合部以外との AChR の密度の比は1000倍以上にもものぼるといふ²⁰. AChR に特異的に結合するリガンドである α -バンガロトキシン (BuTx) の放射性ヨードや蛍光色素 (FITC, rhodamine) を用いた観察では, ラットでは胎生16日頃になって AChR クラスターが見られるようになるが, 既にこの時期には筋細胞に対する機能的神経支配も見られ自発性微小終板電位も観察できる^{21,22}. また, 培養条件下でもその凝集体 (AChR クラスター) を観察することができる⁷. 胎生期や培養条件下に見られる AChR クラスターは成熟ラットのものと比較して疎な構造を呈していることや AChR の膜上の半減期が短いなどの違いはあるものの²⁰, 成熟動物の神経筋接合部の代用として利用できる. 培養条件下において AChR クラスターを観察する場合, 初代脊髄神経培養細胞^{22,23} や神経芽細胞腫由来の細胞との共同培養⁹, 細胞中枢神経や末梢神経の抽出物²⁹⁻³⁰, アグリン (agrin) と名付けられているシビレエイの電気器官の抽出物^{31,32}, 陽電荷を持つ微粒子 (例えばポリリジンやポリオルニチンでコートしたラテックスビーズ)³³, 外部電場³⁴などで AChR クラスターを誘発する方法が知られる. その他, 初代筋管細胞培養において培養を開始後5~10日に細胞膜上にあらわれている AChR が細胞膜の一部分に不均一に分布することを利用する方法などが知られている⁹. 本研究では培養方法が比較的容易な上, 観察される AChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度が, 他の培養条件, 例えば神経細胞の生着, 分化, 神経突起の形成の有無などの因子を考慮にいれなくてよいという点で初代筋管細胞単独培養を利用した. ここで採用した培養系において, 観察時 (培養開始後第7日) には約半数の筋管細胞に AChR クラスターが認められた.

本研究ではこのようにして作製した筋管細胞の AChR クラスターに重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) 患者血清を接触させた場合, 一体どのような変化が生じるかについて調べた. その結果, (1)MG 患者血清を加えた場合, AChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度が低下した. (2)各々の AChR クラスターの蛍光量の局所の特徴を比較した場合, 対照血清と MG 患者血清との間には有意差を認めなかった. (3)MG 患者血清処理後の AChR クラスターの消失および再出現の時間経過の観察から, MG 患者血清中に含まれる AChR クラスターの維持阻害活性を持つ因子は, 長時間インキュベーションすると消費または変性する性質を持つことが示唆された. (4)患者血清の AChR クラスターを有する筋管細胞出現頻度の低下をもたらす活性と抗 AChR 抗体価との間に相関が見られた. 以上の結果および過去の報告³⁵⁻³⁷ から, MG 患者血清に含まれる AChR クラスターの維持阻害活性の本体は抗 AChR 抗体自体またはこれと相関して変化する因子と推定された.

血清処理後残存した AChR クラスターの面積や平均蛍光量には対照と比べて差異は見いだせなかった一方で, MG 患者で AChR クラスターを破壊する活性が強いほど筋管細胞上の AChR クラスターの数は減少した. この理由として, 36時間という比較的長い血清処理時間を採用した場合は, その間に阻害活性を有する液性因子が消費または変性し, すでに一部の

AChR クラスターで回復期に入っているため局所的に差異を見いだせなかった可能性も考えられる (図7).

AChR クラスターの消失は, AChR に抗 AChR 抗体が結合することで開始されるとも考えられるが, MG 患者血清中には抗 AChR 抗体の他にも抗フィラミン抗体, 抗ヴィンキュリン抗体といった細胞骨格系蛋白に対する抗体が含まれるとの報告もあり³⁸. これらが AChR クラスターの局在を規定している各因子へ影響を与えているとも考えられる. そこで本研究では AChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度の低下を来たすことが確認された一部の血清について, 筋管細胞膜流動性に影響を与えていないかどうか検討した. しかし, 蛍光退色回復法を用い Koppel の理論より算出した拡散係数には重症無力症患者血清 (2例) と対照血清の間に相違は認められなかった. 用いた血清はすべて非働化してあり, 培養液中に補体などの膜障害性因子はほとんど含まれていないものと考えられ, AChR 破壊活性を持つ液性因子のみでは膜流動性に影響を与えないものと考えられた.

AChR クラスター維持を障害する免疫学的液性因子の作用機序を明かにするために, 細胞膜下で AChR も含めて AChR の局在にかかわる構造に対する作用が予想される薬剤が, 培養筋管細胞の AChR クラスターにどのような影響を及ぼすかを観察した. 薬剤は主として細胞内情報伝達系を修飾するもの及び直接細胞骨格系の脱重合を促進させるものを選んで用いた. カルモジュリンの阻害活性を有する W-7¹⁶ の培養液中への添加は, AChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度の著明な低下 (化学構造的には W-7 と類似するが, カルモジュリンの阻害活性は W-7 に比較して低い W-5¹⁸ では影響を認めない) をもたらした. AChR クラスターを筋膜上に維持するにはカルモジュリンが重要であることが示唆された. さらに C-キナーゼを活性化する TPA¹⁷ にも同様に AChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度を低下させる効果が見られた. 一方, 細胞内サイクリック AMP 修飾剤である dibutyryl cyclic AMP や CGRP¹⁹ には AChR クラスターを有する筋管細胞の出現頻度に対する増加, 低下いずれの作用も見られなかった.

これら薬剤が影響を与えるのは筋膜下の構造, すなわち細胞骨格系蛋白や膜蛋白の裏打ち蛋白ではないかと考えられている³⁹. これらの蛋白による AChR クラスター内での AChR 流動性の低下については, 蛍光色素で標識した AChR クラスターの蛍光退色回復法での解析⁴⁰ や, イオントフォレーシスによる電気生理学的解析⁴¹ によると, 拡散係数にして 10^{-11} ~ 10^{-12} cm²/sec と通常の膜蛋白に比較して流動性が $1/10$ ~ $1/100$ になっているという. 例えば, 神経筋接合部のシナプス後膜には免疫蛍光法を中心とする方法で調べると10種類を超える細胞骨格系蛋白の局在が知られている³⁹. ほとんどがなんらかの形式でのアクチン関連の蛋白質である. これらの蛋白は分類すると(1)マイクロフィラメントの架橋蛋白 (α -アクチニン, フィラミン)⁴², (2)マイクロフィラメントの膜への固定蛋白と思われるもの (ヴィンキュリン^{42,43}, ターリン⁴⁴), (3)スペクトリン様蛋白やその関連蛋白 (β スペクトリン^{45,46} やアンキリン⁴⁷), (4)AChR と直接結合し, スペクトリン様蛋白やマイクロフィラメントと AChR との橋渡しとして機能すると考えられているもの (43K 蛋白)⁴⁸⁻⁵², (5)ジストロフィン (機能は未解決)⁵³⁻⁵⁵ などに分けられる. その他, クレアチニンキナーゼや分子量で呼ばれる蛋白が数種類報告されている. これらの蛋白の局在についてはシナ

プス襲の頂の部分に 43K 蛋白が、溝の部分に Na チャンネルとともにアンキリンやヴィンキュリンが局在しているとの報告^{43,47} や、培養筋管細胞での AChR クラスタにおいて AChR とスペクトリン様蛋白の局在が一致するとの報告がある^{45,49}。Pumplin らの AChR クラスタを分離して電顕にて解析した報告によれば筋単独の培養系で観察されるクラスタは (1) 接着斑 (adhesion plaque) 様の部分, (2) AChR が凝集し, 細胞膜下で細いフィラメントがネットワークを形成している部分, (3) 被覆小胞部分 (coated vesicle) の三つの部分に区分けされるという^{56,57}。

カルモジュリンおよび C-キナーゼが、このような細胞骨格群や膜の裏打ち蛋白のなかで具体的にどのように機能しているかについては不明である。カルモジュリンに限るなら、上記の蛋白群でカルモジュリン結合能を有するのはスペクトリン様蛋白やその関連蛋白⁵⁸ であるが、カルモジュリン自体はアクチン、スペクトリンなどの重合やポリマーの間の架橋には抑制的に働くと考え⁵⁹, AChR クラスタの破壊が局所的な流動性の増加によると考えると、W-7 のカルモジュリン阻害活性は、本報で AChR クラスタに観察されたのとは逆に安定化の方向へ働いてもよいように考えられる。この仮説を説明するには、AChR クラスタの形成には局所的に、筋管細胞の他の部分とは異なる細胞膜下の構造をとる必要があり、そのためには局所的に AChR またはクラスタ構成要素は既存の細胞膜下の構造より離脱しなければならず、このためにカルモジュリンが機能している可能性が挙げられる。この考えに立てば、アクチンの重合阻害剤のサイトカラニン B やチューブリンの重合阻害剤のコレヒチンがほとんど AChR クラスタの破壊活性を持たなかったことも説明できる。一方、C-キナーゼの働きについてはカルモジュリン系と相乗的に作用する場合と拮抗的に作用する場合が知られるが⁶⁰, 筋管細胞での AChR クラスタの維持に関しては拮抗的に作用していると考えられた。

他の蛋白リン酸化機構に関しては、チロシンキナーゼ系について (1) 癌遺伝子サーク (src) を持つラウス (Rous) 肉腫ウイルスによって筋細胞がトランスフォームされるとクラスタリングが阻害されるとの報告⁶¹, (2) AChR クラスタの誘導作用を持つシビレエイの電気器官の抽出物であるアグリンを用いた系で、アグリン添加後 AChR の β サブユニットのチロシン残基がリン酸化を受け、アグリンの作用を阻害する処置でそのリン酸化も阻害されるとの報告がされている⁶²。前者の src については標的蛋白質は不明である。

では MG 患者血清中の抗 AChR 抗体が細胞膜の外から AChR に結合したとき、一体どのような変化でレセプターの凝集現象の阻害に結びつくのであろうか。抗体によるレセプターのクロスリンクが最も重要視されているが³⁹⁻⁵⁷, その時細胞膜下の構造自体はどのように変化しているのか、AChR と細胞膜下の構造との関係はどのように変化しているのかについては不明である。患者血清を筋管細胞培養系に加えて時間経過を見た場合、AChR クラスタの消失は血清添加後しばらくのタイムギャップの存在のあと急速に観察されるようになることから³⁹, いくつかのステップを含んでいる可能性が考えられる。アグリンは AChR の他に細胞外基質の再分布を誘導することが知られている⁶³ が、クロスリンクタイプの抗体をこの系に添加すると、細胞外基質の再分布は、抗体の含まれない系と変わりなく誘導されるにもかかわらず AChR クラスタの形

成は阻害されることが示されている⁶³。抗体の結合は AChR にクラスタを形成するための細胞膜下の構造との関連を消失させてしまうように見える。抗体の結合により筋管細胞膜にとどまる能力を消失した AChR はクラスタ誘導用の機構に乗ることができず短期間で筋管細胞膜上から姿を消すことになるのかも知れない。

結 論

重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) 患者血清、および主として細胞膜下の構造を修飾すると考えられる薬剤が初代筋管培養細胞の AChR クラスタに与える影響についてレーザーサイトメーターにて検討し、以下の結果を得た。

1. 初代ラット筋細胞培養開始後、5~7日にて約半数の筋管細胞膜上に FITC- α -BuTx に強く染色される AChR クラスタが観察された。
2. MG 患者血清を培養系に添加したところ、AChR クラスタを有する筋管細胞の出現頻度の低下が観察され、この効果は患者血清中の抗 AChR レセプター抗体価と相関があった。
3. 血清添加後、残存した AChR クラスタの示す蛍光量の局所的な特徴には患者血清群と対照血清群との間に差異は認められなかった。
4. 一部の患者血清について筋管細胞膜自体の膜流動性に変化を与えうるかどうかを蛍光退色回復法による拡散係数で比較したが、対照と差は認められなかった。
5. 主として細胞骨格系など AChR クラスタの維持に重要と考えられる細胞膜下の構造を修飾すると考えられる薬剤を同培養系に添加した場合、安定化にはカルモジュリンが機能し、C-キナーゼはこれに拮抗的に作用していることを示唆する結果を得た。

以上から筋膜上の AChR はカルモジュリンと C-キナーゼが拮抗的に働くような細胞膜下の構造に支えられており、MG 患者血清に含まれる抗 AChR 抗体はこの系と AChR との関連に阻害作用をもたらしていると推定した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました神経内科学教室高守正治教授に深甚の謝意を表します。また、本研究に対し御指導頂きました同教室奥村誠一博士、本学神経情報研究施設神経性研究部門東田陽博教授、北陸大学創薬研究所光本泰秀博士、毛利哲郎教授に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Lindstrom, J.: Immunobiology of myasthenia gravis, experimental autoimmune myasthenia gravis, and Lambert-Eaton syndrome. *Annu. Rev. Immunol.*, **3**, 109-131 (1985).
- 2) Almon, R. R., Andrew, C. G. & Appel, S. H.: Serum globulin in myasthenia gravis; inhibition of α -bungarotoxin binding to acetylcholine receptors. *Science*, **186**, 55-57 (1974).
- 3) Lindstrom, J. M., Seybold, M. E., Lennon, V. A., Whittingham, S. & Duane, D. D.: Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. *Neurology*, **26**, 1054-1059 (1976).
- 4) Besinger, U. A., Toyka, K. V., Homberg, M., Heininger, K., Hohlfeld, R. & Fateh-Moghadam, A.:

- Myasthenia gravis: long-term correlation of binding and bungarotoxin blocking antibodies against acetylcholine receptors with changes in disease severity. *Neurology*, **33**, 1316-1321 (1983).
- 5) Busis, N. A., Daniels, M. P., Bauer, H. C., Pudimat, P. A., Sonderegger, P., Schaffner, A. E. & Nirenberg, M.: Three cholinergic neuroblastoma hybrid cell lines that form few synapses on myotubes are deficient in acetylcholine receptor aggregation molecules and large dense core vesicles. *Brain Res.*, **324**, 201-210 (1984).
- 6) Bloch, R. J.: Dispersal and reformation of acetylcholine receptor clusters of cultured rat myotubes treated with inhibitors of energy metabolism. *J. Cell Biol.*, **82**, 626-643 (1979).
- 7) Anderson, M. J. & Cohen, M. W.: Fluorescent staining of acetylcholine receptors in vertebrate skeletal muscle. *J. Physiol.*, **237**, 385-400 (1974).
- 8) Foley, M., MacGregor, N., Kusel, J. R., Garland, P. B., Downie, T. & Moore, I.: The lateral diffusion of lipid probes in the surface membrane of *Schistosoma mansoni*. *J. Cell Biol.*, **103**, 807-818 (1986).
- 9) Golan, D. E., Furlong, S. T., Brown, C. S. & Caufield, J. P.: Monopalmitoylphosphatidylcholine incorporation into human erythrocyte ghost membranes causes protein and lipid immobilization and cholesterol depletion. *Biochemistry*, **27**, 2661-2667 (1988).
- 10) Stolpen, A. H., Golan, D. E. & Pober, J. S.: Tumor necrosis factor and immune interferon act in concert to slow the lateral diffusion of proteins and lipids in human endothelial cell membranes. *J. Cell Biol.*, **107**, 781-789 (1988).
- 11) Falk, L. A., Wahl, L. M. & Vogel, S. N.: Analysis of Ia antigen expression in macrophages derived from bone marrow cells cultured in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.*, **140**, 2652-2660 (1988).
- 12) Balint, E., Aszalos, A. & Grimley, P. M.: Alpha interferon accelerates lateral diffusion of surface differentiation antigens: measurement by fluorescence redistribution after photobleaching. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 808-815 (1988).
- 13) Koppel, D. E., Axelrod, D., Schlessinger, J., Elson, E. L. & Webb, W. W.: Dynamics of fluorescence marker concentration as probe of mobility. *Biophys. J.*, **16**, 1315-1329 (1976).
- 14) Koppel, D. E.: Fluorescence redistribution after photobleaching. *Biophys. J.*, **28**, 281-292 (1979).
- 15) Koppel, D. E. & Sheetz, M. P.: Lateral diffusion in biological membranes. *Biophys. J.*, **30**, 187-192 (1980).
- 16) Kanamori, M., Naka, M., Asano, M. & Hidaka, H.: Effect of N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide and other calmodulin antagonists (calmodulin interacting agents) on calcium-induced contraction of rabbit aortic strips. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **217**, 494-499 (1981).
- 17) Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. & Nishizuka, Y.: Direct activation of calcium activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, **257**, 7847-7851 (1982).
- 18) Tanaka, T., Ohmura, T. & Hidaka, H.: Hydrophobic interaction the Ca²⁺-calmodulin complex with calmodulin antagonists. *Mol. Pharmacol.*, **22**, 403-407 (1982).
- 19) Weiss, B., Fertel, R., Figlin, R. & Uzunov, P.: Selective alteration of the activity of the multiple forms of adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase of rat cerebrum. *Mol. Pharmacol.*, **10**, 615-625 (1974).
- 20) Rios, E. & Brum, G.: Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature*, **325**, 717-720 (1987).
- 21) Takamori, M. & Yoshikawa, H.: Effect of Calcitonin gene-related peptide on skeletal muscle via specific binding site & G protein. *J. Neurol. Sci.*, **90**, 99-109 (1989).
- 22) Andreu, J. M. & Timasheff, S. N.: Tubulin bound colchicine forms polymers different from microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 6753-6756 (1982).
- 23) Carter, S. B.: Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature*, **213**, 261-264 (1967).
- 24) Bloch, R. J. & Pumplin, D. W.: Molecular events in synaptogenesis: nerve-muscle adhesion and postsynaptic differentiation. *Am. J. Physiol.*, **254**, C345-C364 (1988).
- 25) 杉山博之, 熱海佐保子: アセチルコリン受容体の発生と分化. 筋発生の細胞生物学 (小沢金英次郎, 嶋田裕, 真崎知生編), 第1版, 109-131頁, 学会出版センター, 東京, 1983.
- 26) Hirano, Y. & Kidokoro, Y.: Heparin and heparan sulfate partially inhibit induction of acetylcholine receptor accumulation by nerve in *Xenopus* culture. *J. Neurosci.*, **9**, 1555-1561 (1989).
- 27) Kidokoro, Y., Brass, B. & Kuromi, H.: Concanavalin A prevents acetylcholine receptor redistribution in *Xenopus* nerve-muscle cultures. *J. Neurosci.*, **6**, 1941-1951 (1986).
- 28) Podleski, T. R., Axelrod, D., Ravdin, P., Greenberg, I., Johnson, M. M. & Salpeter, M. M.: Nerve extract induces increase and redistribution of acetylcholine receptors on cloned muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 2035-2039 (1978).
- 29) Olek, A. J., Pudimat, P. A. & Daniels, M. P.: Direct observation of the rapid aggregation of acetylcholine receptors on identified cultured myotubes after exposure to embryonic brain extract. *Cell*, **34**, 255-264 (1983).
- 30) Krikorian, J. G. & Daniels, M. P.: Reorganization and stabilization of acetylcholine receptor aggregates on rat myotubes. *Dev. Biol.*, **131**, 524-538 (1989).
- 31) Nitkins, R. M., Smith, M. A., Magill, C., Fallon, J. R., Yao, Y.-M. M., Wallace, B. G. & McMahan, U. J.: Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ. *J. Cell Biol.*, **105**, 2471-2478 (1987).
- 32) Magill, C., Reist, N. E., Fallon, J. R., Nitkins, R. M., Wallace, B. G. & McMahan, U. J.: Agrin. *Prog. Brain Res.*, **71**, 391-396 (1987).

- 33) Peng, H. B., Cheng, P.-C. & Luther, P. W.: Formation of ACh receptor clusters induced by positively charged latex beads. *Nature*, **292**, 831-834 (1981).
- 34) Stollberg, J. & Fraser, S. E.: Acetylcholine receptors and conacavalin A-binding sites on cultured *Xenopus* muscle cells: electrophoresis, diffusion, and aggregation. *J. Cell Biol.*, **106**, 1723-1734 (1988).
- 35) Bursztajn, S., McManaman, J. L., Elias, S. B. & Appel, S. H.: Myasthenic globulin enhances the loss of acetylcholine receptor clusters. *Science*, **219**, 195-197 (1983).
- 36) Pumplín, D. W. & Drachman, D. B.: Myasthenic patients' IgG causes redistribution of acetylcholine receptors: freeze-fracture studies. *J. Neurosci.*, **3**, 576-584 (1983).
- 37) Eymard, B., De la Porte, S., Berrih-Aknin, S., Morel, E., Fardeau, S., Bach, J. F. & Koenig, J.: Effect of myasthenic patient sera on the number and distribution of acetylcholine receptors in muscle and nerve-muscle cultures from rat. *J. Neurol. Sci.*, **86**, 41-59 (1988).
- 38) Yamamoto, T., Sato, T. & Sugita, H.: Antifilamin, antivinculin and antitropomyosin antibodies in myasthenia gravis. *Neurology*, **37**, 1329-1333 (1987).
- 39) Froehner, S. C.: The role of the postsynaptic cytoskeleton in AChR organization. *Trends Neurosci.*, **9**, 37-41 (1986).
- 40) Axelrod, D., Ravdin, P., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Webb, W. W., Elson, E. E. & Podleski, T. R.: Lateral motion of fluorescently labeled acetylcholine receptors in membranes of developing muscle fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 4594-4598 (1976).
- 41) Poo, M.-M.: Rapid lateral diffusion of functional AChR receptors in embryonic muscle cell membrane. *Nature*, **295**, 332-334 (1982).
- 42) Bloch, R. J. & Hall, Z. W.: Cytoskeletal components of the vertebrate neuromuscular junction: vinculin, α -actinin and filamin. *J. Cell Biol.*, **97**, 217-223 (1983).
- 43) Yorifuji, H. & Hirokawa, N.: Cytoskeletal architecture of neuromuscular junction: localization of vinculin. *J. Electron Microsc. Tech.*, **12**, 160-171 (1989).
- 44) Rochlin, M. W. & Peng, H. B.: Localization of intracellular proteins at acetylcholine receptor clusters induced by electric fields in *Xenopus* muscle cells. *J. Cell Sci.*, **94**, 73-83 (1989).
- 45) Bloch, R. J. & Morrow, J. S.: An unusual beta-spectrin with clustered acetylcholine receptors. *J. Cell Biol.*, **108**, 481-493 (1989).
- 46) Daniels, M. P.: Localization of actin, beta-spectrin, 43K and 58K proteins to receptor-enriched domains of newly formed acetylcholine receptor aggregates in isolated myotube membranes. *J. Cell Sci.*, **97**, 615-627 (1990).
- 47) Flucher, B. E. & Daniels, M. P.: Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and 43kd protein. *Neuron*, **3**, 163-175 (1989).
- 48) Frail, D. E., Mudd, J., Shah, V., Carr, C., Cohen, J. B. & Merlie, J.: cDNA for the postsynaptic 43-kDa protein of Torpedo electric organ encode two proteins with different carboxyl termini. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 3602-3606 (1987).
- 49) LaRochelle, W. J. & Froehner, S. C.: Comparison of the postsynaptic 43-kDa protein from muscle cells that differ in acetylcholine receptor clustering activity. *J. Biol. Chem.*, **262**, 8190-8195 (1987).
- 50) Frail, D. E., Musil, L. S., Buonanno, A. & Merlie, J. P.: Expression of RAPsyn (43K protein) and nicotinic acetylcholine receptor genes is not coordinately regulated in mouse muscle. *Neuron*, **2**, 1077-1086 (1989).
- 51) Musil, L. S., Frail, D. E. & Merlie, J. P.: The mammalian 43-kD acetylcholine receptor-associated protein (RAPsyn) is expressed in some nonmuscle cells. *J. Cell Biol.*, **108**, 1833-1840 (1989).
- 52) Froehner, S. C., Luetje, C. W., Scotland, P. B. & Patrick, J.: The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron*, **5**, 403-410 (1990).
- 53) Jasmin, B. J., Cartaud, A., Ludosky, M. A., Changeux, J. P. & Cartaud, J.: Asymmetric distribution of dystrophin in developing and adult Torpedo marmorata electrocyte: Evidence for its association with the acetylcholine receptor-rich membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 3938-3941 (1990).
- 54) Miyatake, M., Miike, T., Zhao, J.-E., Yoshioka, K., Uchino, M. & Usuku, G.: Dystrophin: localization and presumed function. *Muscle & Nerve*, **14**, 113-119 (1991).
- 55) Sealock, R., Butler, M. H., Kramarcy, N. R., Gao, K. X., Murnane, A. A., Douville, K. & Froehner, S. C.: Localization of dystrophin relative to acetylcholine receptor domains in electric tissue and adult and cultured skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, **113**, 1133-1144 (1991).
- 56) Pumplín, D. W.: Acetylcholine receptor of clusters of rat myotubes have at least three domains with distinctive cytoskeletal and membranous components. *J. Cell Biol.*, **109**, 739-753 (1989).
- 57) Pumplín, D. W. & Bloch, R. J.: Clathrin-Coated membrane: a distinct membrane domain in acetylcholine receptor clusters of rat myotubes. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **15**, 121-134 (1990).
- 58) 大和田幸嗣: カルモジュリン結合蛋白質とトランスフォーメーション. 細胞工学別冊3カルシウムシグナリングの分子制御 (日高弘義編), 第1版, 140-153頁, 秀潤社, 東京, 1987.
- 59) Stromquist, M., Bergland, A., Shanbhag, V. P. & Backman, L. J.: Influence of calmodulin on the human red cell membrane skeleton. *Biochemistry*, **27**, 1104-1110 (1988).
- 60) 田中利男, 日高弘義: 細胞内カルシウムシグナリングとその制御. 蛋白質核酸酵素, **33**, 2207-2216 (1988).
- 61) Anthony, D. T., Schuetze, S. M. & Rubin, L. L.: Transformation by Rous sarcoma virus prevents acetylcholine receptor clustering on cultured chicken muscle fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 2265-2269 (1984).

- 62) Wallace, B. G., Qu, Z. & Haganir, R. L.: Agrin induces phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron*, **6**, 869-878 (1991).
- 63) Nitkins, R. M. & Rothschild, T. C.: Agrin-induced

reorganization of extracellular matrix components on cultured myotubes: relationships of AChR aggregation. *J. Cell Biol.*, **111**, 1161-1170 (1990).

Effect of Immunological and Pharmacologic Agents on Acetylcholine Receptor Clusters of Skeletal Muscle
Hisanori Kojima, Department of Neurology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **101**, 57—67 (1992)

Key words myasthenia gravis, acetylcholine receptor, cluster, calmodulin, cytoskeletal system

Abstract

To gain insight into how the acetylcholine receptor (AChR) is dispersed by antigen-specific humoral factor in myasthenia gravis, the effects of myasthenic patient serum or pharmacologic agents on AChR clusters were investigated. At first, the cultured rat myotubes were stained with fluorescein isothiocyanate conjugated α -bungarotoxin (FITC- α -BuTx) and changes caused by the serum or drugs were determined by the use of laser cytometer (ACAS 570). Serum samples from 17 myasthenia gravis (MG) patients caused a dispersal of AChR clusters in quantitative correlation with anti-AChR antibody titers. The fluorescent patterns (area or average of fluorescence intensity) of AChR clusters remaining after the treatment with the serum samples showed no significant difference between the patient group and the control group. FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) analysis also showed no effect of myasthenic sera on the myotube membrane fluidity. Calmodulin antagonist (W-7) and C-kinase activator (TPA) induced a significant loss of AChR clusters. On the other hand, colchicine, cytochalasin B, and drugs effective on intracellular cAMP concentration (dibutyl cyclic AMP, CGRP) did not disrupt or induce the formation of AChR clusters. These results, obtained by the use of clinical and pharmacologic samples, lead to the possibility that the myasthenic antibody may influence the interaction between AChR and the submembranous system, and the submembranous system is stabilized by calmodulin and interfered with by C-kinase.