

## 神経変性疾患研究の新局面： 神経軸索輸送を介する新たな細胞内情報伝達系

五 嶋 良 郎

横浜市立大学大学院医学研究科 薬理学

**要 旨：**脳は数千億個のニューロンとその10倍もの数に上るグリア細胞、血管などから構成されており、その機能は神経細胞のネットワークとそこで行われる神経伝達によって支えられている。一方、神経変性疾患をはじめとする様々な神経疾患を対象とする治療薬は、神経伝達に関わる抗うつ薬、抗精神病薬、睡眠薬、抗てんかん薬など、多彩な神経機能からみれば、極めて限られている。私達は、神経伝達に加え、神経回路形成や細胞極性という細胞機能に及ぼす薬物開発の可能性を模索してきた。その1つが軸索輸送である。本総説では、我々が1997年以来、取り組んで来たセマフォリン3Aがひき起す軸索輸送と神経回路形成の役割を軸に、神経変性疾患研究の今後の展望を試みたい。

**Key words:** 軸索輸送 (axonal transport), セマフォリン (semaphorin), 神経回路形成 (neuronal network formation), 神経変性疾患 (neurodegenerative diseases), iPSニューロン (iPS neurons)

### はじめに

神経細胞や上皮細胞は、極めて明確な細胞極性を備えた細胞であり、これらの組織においては正常な極性形成と維持が機能の発揮に必須である<sup>1)</sup>。1つの神経細胞は、情報の受容と伝達を介して、一定の情報を他の細胞へと伝える。神経細胞は樹状突起と軸索と呼ばれる突起を形成するが、この突起状の構造体が、各々情報の受容と伝達の担い手となる。個々の神経細胞は、分化を遂げた後に、あるいはそれと併行してこれらの突起形成を行うが、樹状突起と軸索形成がどのように相互に関連して一定の機能を担う構造体に成長していくかについては殆ど解明されていない。しかし従来から良く知られている神経伝達の過程は、樹状突起と軸索が機能的に密接な連関を持っていることを明示している。すなわち樹状突起に存在するグルタミン酸受容体などの興奮が、細胞体へ伝達され、その効果が一定の閾値に達すると軸索に興奮伝導が起り、それが神経終末に伝達されて一定の神経伝達物質が放出され、化学伝達（シナプス伝達）が起こるという一方向性の過程である。

神経突起の伸長を抑制する生理活性を持つセマフォリン3A (Sema 3A) は、神経回路形成に重要な役割を有する反発性の神経ガイダンス分子である<sup>2-5)</sup>。我々は、今回、Sema 3Aのシグナル伝達が神経末端から細胞体への伝搬する従来の神経伝達の様式とは全く異なる新たな伝達経路を明らかにした<sup>6)</sup>。本総説においては、この発見を契機に浮かび上がってきた軸索輸送の新たな意義と病態との関わりについて考察を試みることにする。

### Sema3Aの様々な生理活性

神経回路形成には、カドヘリンやラミニン、インテグリンなどの細胞接着因子や細胞外マトリックスとそれらの受容体が重要である。加えて、1980~1990年代にかけて、線虫やショウジョウバエなどのモデル生物における神経回路形成異常を示す変異体スクリーニングとタンパク質解析や抗体技術を駆使した解析によって、ネトリン、セマフォリン、エフリンなどの神経軸索や樹状突起の方向性を制御する重要なタンパク質分子が続々と同定された<sup>7)</sup>。

現在では、セマフォリンが、神経系のみならず免疫系、心血管系、骨代謝、がんの転移・浸潤など実に様々な生物現象に関わる様々な分子からなるスーパーファミリーを形成することが明らかとなっている<sup>8, 9)</sup>。中でもセマフォリン3A (Sema 3A) は、セマフォリンスーパーファミリーの中で最も解明が進められて来たプロトタイプと言える<sup>10-16)</sup>。

Sema 3AはLuoらとKolodkinらのグループとによりほぼ同時期に同定された<sup>4, 17)</sup>。Luoらは培養後根神経節 (DRG) 細胞の成長円錐を退縮させ、突起伸長を抑制する活性を持つタンパク質としてcollapsin (退縮させるもの) を同定した。一方、Kolodkinらのグループは、ショウジョウバエを用いて特定の神経束を染めるモノクローナル抗体からファシクリンIV (FasIV) と命名された接着因子を同定したが、これは後にcollapsinと同様の500アミノ酸残基の配列セマ (Sema) ドメインを有する事、またSemaドメインを共通に持つ分子の中にも、collapsin同様の活性を持たない分子が存在することが判明したため、collapsinは、セマフォリンスーパーファミリーに属する分泌型タンパク質Semaphorin 3Aと改めて命名された<sup>18)</sup>。Sema 3Aは、その受容体であるニューロピリン1/プレキシシンA複合体を介して<sup>13, 14)</sup>、後根神経節の退縮応答以外の樹状突起樹状突起<sup>6, 19, 20)</sup>、スパイン形成<sup>19)</sup>、肺分岐形成<sup>8)</sup>、免疫系への作用等<sup>21, 22)</sup>、骨代謝への影響<sup>23)</sup>など、多彩な生理作用を持つことがその後次々に明らかにされた。上記のようなSema 3A作用の発見は、新たな生理活性と病態生理学的意義への理解に結びつくこととなり、現在では最も注目されつつある疾患標的タンパク質の1つである<sup>8, 22, 24)</sup>。

### Sema3Aの軸索輸送亢進作用

Sema 3Aの情報伝達を担うタンパク質として同定されたcollapsin response mediator protein (CRMP) は、線虫UNC-33のホモログである<sup>10)</sup>。CRMPファミリー分子は、CRMP 1~5の5つのタイプとそのスプライシングバリエーションからなり、チューブリン二量体、キネシン1など様々なタンパク質と相互作用する。CRMPsはそのC末端領域に配列するセリン/スレオニンやチロシン残基の修飾等によって、これらのタンパク質との相互作用が制御されている<sup>25, 26)</sup>。CRMP関連分子であるUNC33の線虫遺伝子*unc-33*変異体においては、微小管の形態が異常であり、広範な軸索ガイドの異常が認められる<sup>27)</sup>。この事実から、微小管をレールとする速い軸索輸送とSema 3Aとの関わりに着目した。微分干渉顕微鏡を用いて軸索輸送をモニターする系において<sup>28)</sup>、Sema 3Aが培養ニワトリDRG細胞の軸索輸送を順向性および逆行性に促進することを見出した<sup>29, 30)</sup>。この順行・逆行性の両方向性の輸送の亢進

は、Sema 3Aを含む溶液を軸索末端に形成される成長円錐に投与する場合のみに観察され、細胞体や軸索に局所投与しても認められなかった。その後、一連の実験により、Sema 3Aは軸索成長円錐に局在する受容体ニューロピリン1を介してチロシンキナーゼFynおよびセリン・スレオニンキナーゼであるサイクリン依存性キナーゼCdk 5を介して輸送を亢進することが分かってきた<sup>12, 31)</sup>。Sema 3Aによる軸索輸送の亢進が、その受容体を介する特異的な応答であることは明らかであったが、この時点で、1) Sema 3Aがどのような情報伝達メカニズムを介して輸送を亢進するのか? 2) Sema 3Aシグナルによって亢進する輸送のcargo (荷物) 分子は何か? 3) Sema 3Aによる輸送のcargoはどこに運ばれ、その輸送には一体どのような生理学的な意義が存在するのか? という3つの大きな疑問が残っていた。

### Sema3Aはグルタミン酸受容体GluA2 (GluR2)を樹状突起の遠位端へと輸送する

我々は、Sema 3Aによって亢進される輸送のcargo候補の1つとしてグルタミン酸受容体に着目した。なぜなら、*sema 3A* 遺伝子欠損マウスの大脳皮質錐体細胞の観察<sup>12)</sup>と培養細胞における観察<sup>19, 20)</sup>から、Sema 3Aがグルタミン酸受容体の集積が起こるスパインの形成に重要な役割を果たすのではないかと考えられたからである。Sema 3Aによる軸索輸送の生理学的意義を追究するため、解析する対象を樹状突起においてグルタミン酸受容体を豊富に発現する海馬神経細胞へ変更した。培養海馬神経は、培養3日目では、軸索伸長が起こり、それに続いて樹状突起の伸長が開始されるという細胞形成のパターンを示す<sup>32)</sup>。この時期には軸索と樹状突起を容易に識別できるため、Sema 3Aの作用部位がどこであるかを局所投与によって確かめることができる。検討の結果、海馬においても、Sema 3A作用部位は、軸索成長円錐であることが判明した (図1)。この時期の海馬神経細胞において、Sema 3A処置により、樹状突起のグルタミン酸受容体の発現レベルがどうなるかを免疫細胞化学により調べたところ、Sema 3Aは樹状突起のGluA2のレベルを選択的に上昇させることが判明した。この知見は2つの点で重要な意味をもっている。1つは、Sema 3Aの情報が軸索先端の成長円錐から入り、それが何らかの機構によって逆行性に細胞体・樹状突起へと伝搬していることを示す点、もう1つは、Sema 3Aが他のグルタミン酸受容体GluA1, NR2Bなどの発現に無作用であることから<sup>6)</sup>、GluA2の選択的な輸送に関わることを示唆している点である。我々は次にこのメカニズムを追究した。軸索を逆行性に伝搬し、樹状突起に伝わる機構には、2つのメカニズムが考えられた。1つは逆行性輸送に関わるモーター分子ダイニ

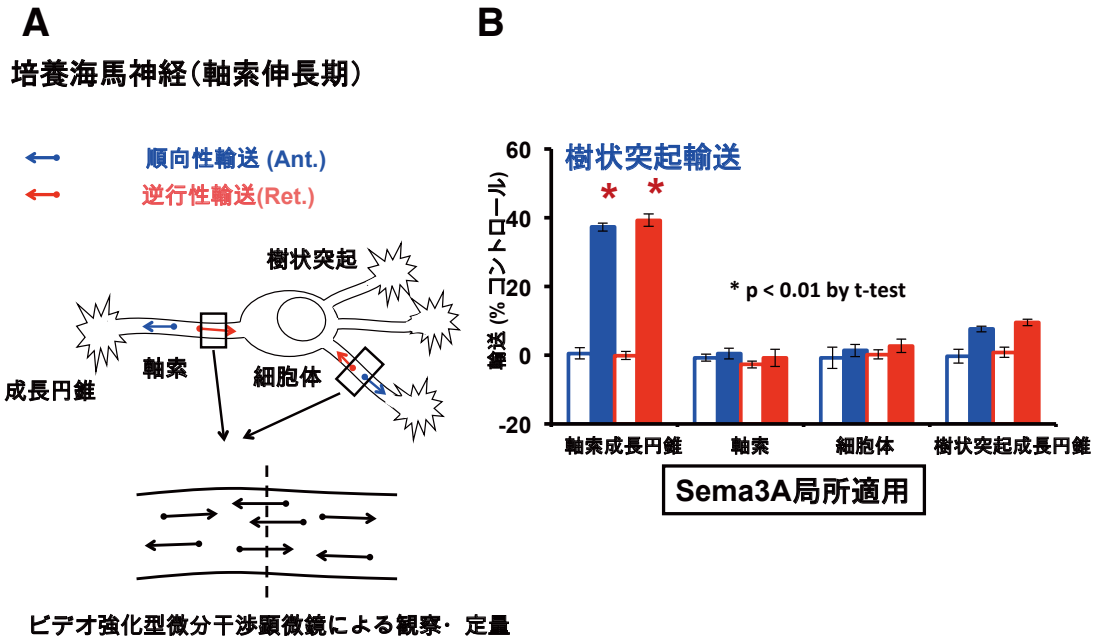


図1 培養海馬神経細胞における Sema 3 A 刺激による軸索と樹状突起輸送の亢進。

(A) ビデオ強化微分干渉顕微鏡による観察法の模式図。(B) Sema 3 A 局所適用が、軸索および樹状突起輸送に及ぼす影響。軸索成長円錐に局所適用した場合のみ、軸索および樹状突起輸送の亢進が引き起こされる。軸索、細胞体、樹状突起成長円錐への投与では全く作用が見られない(文献<sup>6)</sup>より改変)。

ンの関与である。もう1つは活動電位の担い手である電位依存性ナトリウムチャネルの関与である。生理学的には軸索における神経伝導は細胞体から神経終末へと一方向性に伝搬するが、物理化学的には、本来神経伝導能は両方向性である。チャネル阻害剤やカルシウムイメージングの結果から、驚くべき事に、Sema 3 A の逆行性輸送には電位依存性L-型 $C^{2+}$ チャネルと $Na^{+}$ チャネルの双方が関与することが明らかになった<sup>6,33)</sup>。

一方、Sema 3 A の逆行性輸送の生理学的意義の解明は、上述のように、そのcargo分子に少なくともGluA 2が含まれる可能性が示唆された時点から、急速な展開を見せた。まず、Sema 3 A を可視化するため、Venusと呼ばれる蛍光タンパク質を融合したVenus-Sema 3 A を用いて、Sema 3 A が成長円錐に作用したのち、どのような運命を辿るかを追跡した。その結果、Sema 3 A は投与後、確かに軸索成長円錐部から経時的に細胞体へ向かって経時的に輸送されることが分かった。同時にその受容体であるPlexA 4もほぼ同じ時間経過で逆行性に輸送されるとともに、軸索部にSema 3 A とPlexA 4の二重陽性シグナルが増加すること確認された。この知見は、Sema 3 A 刺激に続いて、Sema 3 A/PlexA 4複合体が、逆行性に輸送されることを示唆している。また、この逆行性輸送は、ダイニンのRNAiノックダウンによって抑制されることから、ダイニンモーター分子による輸送であることが分

かった。では、軸索を逆行性に運ばれたPlexA 4が、樹状突起におけるGluA 2輸送とどのように連結されるのであろうか?我々は長い細胞内ドメインを持つPlexA 4がGluA 2と直接的に相互作用するか否かを検討した。山下らは、免疫沈降法と、細胞、組織において分子間相互作用を検出するin situ proximity ligation assay (PLA)により、GluA 2が、PlexA 4の細胞内ではなく、細胞外に存在するimmunoglobulin-like Plexin-transcription-factor (IPT)ドメインにおいて相互作用することを明らかにした<sup>6)</sup>。PLA法による染色像は、PlexA 4とGluA 2とが相互作用する部位(ピンク色の斑点)が、Sema 3 Aを投与した後、10, 20, 30分と経過するに従って、軸索から細胞体、さらには樹状突起へと移動する様子を示している(図2)<sup>6)</sup>。上記のように、微小管のマイナス端方向への逆行性輸送はダイニンによって担われる一方、プラス端方向に輸送される順向性輸送は主に複数のキネシンによる。樹状突起においては、微小管のプラス・マイナス端の配向は混在しており、ダイニン、キネシン分子群の双方が関与すると考えられている。RNAiノックダウンやドミナントネガティブ体の導入により、Sema 3 A刺激によって惹起される樹状突起遠位端へのGluA 2の輸送は、glutamate receptor-interacting protein 1 (GRIP 1)との相互作用を介して、キネシンモーター分子群の1つであるKIF 5によって行われることが明らかとなった<sup>6)</sup>。このように、軸索

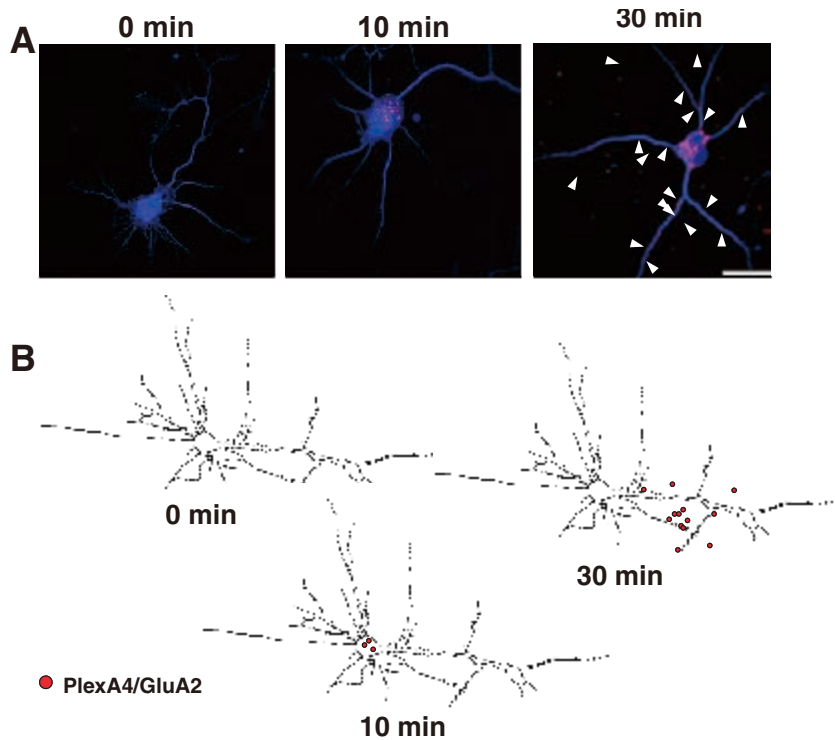


図2 培養海馬神経における Sema 3 A 刺激後の PlexA 4 /GluA 2 複合体形成

(A) Sema 3 A 刺激後、0、10、30分後に細胞を固定し、in situ proximity ligation assay (PLA) 法を用いて近接する PlexA 4 と GluA 2 を検出した (マゼンダ色)。Scale bar, 20  $\mu$ m. (B) (A) における PlexA 4 /GluA 2 複合体シグナルの局在変化の模式的図。シグナルは赤丸で示す。神経細胞において、Sema 3 A 刺激後、経時的にシグナルの位置が変化する。最初にシグナルが細胞体に増加し (10 min)、それらがやがて細胞周辺の樹状突起起始部、さらには樹状突起へと輸送される様子が窺える (30 min) (文献<sup>6)</sup>より改変)。

先端局所から発した細胞外シグナルが、イオンチャンネルとモーター分子を介して、遠隔にある細胞体・樹状突起へと素早く伝達される全く新たなシグナル伝達の仕組みが解明されたことになる<sup>6, 33, 34</sup>。

### 軸索輸送とグルタミン酸受容体の局在制御—精神神経疾患との関連性

現在までの多くの知見が、精神神経疾患、特にアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、ハンチントン病などの神経変性疾患において、軸索輸送の障害が存在することを示唆している<sup>35-37</sup>。アルツハイマー病については、病理学的、生化学的、遺伝学的解析を通じてその成因の可能性が指摘されているアミロイド前駆体、タウ、プレセニン1、アミロイド $\beta$ 等の変異が、事実、軸索輸送を障害することが報告されている。また、輸送の障害は、アミロイド $\beta$ の産生の促進を伴うことも報告されており、その因果関係の解明が今後の課題である。注目すべきことは、アルツハイマー病のモデルにおいては、軸索輸送の障害が、細胞死が見られない比較的早期に見られる事実である<sup>38</sup>。しかし、いずれも動物モデルでの検証であり、ヒトの病態へどのように関わるか、この障

害が、神経変性が起こる過程の中でどのような意義を持つかについては今後の検討課題である<sup>35-39</sup>。

軸索輸送には、速い輸送 (fast axonal transport) と遅い輸送 (slow axonal transport) がある。速い輸送には、さらに順向性輸送と逆行性輸送があり、両者はともに微小管をレールとして分子、オルガネラの輸送が行われている。一方、アクチンをレールとして、モータータンパク質としてミオシンファミリーを使う輸送系も存在する。これらのモーター分子は、運ぶべき cargo (荷物) と直接相互作用する場合と、アダプタータンパク質を介して結合する場合とがある。従って、cargoが特定の場所でのモーター分子に結合し、一定の距離を運ばれ、所定の場所でおろされるということがなければ、物質の流れは滞り、細胞の恒常性は乱されることになる。モーター分子群が次々に明らかにされていった状況の中で、意外なことに、こうしたプロセスを調節するメカニズムは殆ど未解明であるといっても過言ではない<sup>39</sup>。

もし神経ガイダンス分子 Sema 3 A が1つの軸索輸送制御因子であるとするなら、軸索輸送の障害やグルタミン酸神経伝達異常が推定される神経変性疾患の1つの背景として、神経ガイダンス分子やそのシグナル伝達の異常が存在する可能性がある。実際、アルツハイマー病、ALS

を始め、パーキンソン病、ハンチントン病、統合失調症、自閉症、てんかん等の様々な疾患において、樹状突起スパインの形態・機能の異常やガイダンス分子の関与が報告されている<sup>40-42</sup>。また、ALSモデルマウスであるSOD<sup>G93A</sup>では、アストロサイトにおけるグルタミン酸とランスポーター (EAAT2, excitatory amino acid transport protein 2) の発現が低下する。またALSで障害される脊髄前角細胞は、AMPA型グルタミン酸受容体刺激によって容易に細胞死を起こすことが知られており、グルタミン酸の取り込み機構の異常のみならず、グルタミン酸受容体の感受性の亢進が存在することが示唆されている<sup>41</sup>。例えば、ヒトALSにおいては脊髄前角細胞に特異的にGluA 2のQ/RサイトにおけるRNAエディティング (転写後編集) の有意な減少がみとめられるという。GluA 2は、このQ/R部位の編集を受けるとCa<sup>2+</sup>透過性を失なうが、未編集体ではこの性質は残存することになる。従って、ALS患者前角細胞ではグルタミン酸刺激によってCa<sup>2+</sup>流入が起きやすくなり、これが神経細胞死につながる可能性がある。ALS患者の脊髄前角細胞においてはGluA 2のレベルは相対的に低下し<sup>43</sup>、またSOD<sup>G93A</sup>マウスでは、症状の発現に先立ってGluA 2の脊髄前角細胞における量的発現が低下しているという<sup>44</sup>。Sema 3 Aは樹状突起のGluA 2のレベルを上げるとすれば、ALSの病態にはSema 3 Aシグナルの低下が存在するのかもしれない。実際、強力な筋再生促進作用を持つhepatocyte growth factorは、筋衛星細胞においてSema 3 Aの発現は上昇させることから、Sema 3 Aが再生促進活性を併せ持つ事が示唆されている<sup>45</sup>。一方、逆に、SOD<sup>G93A</sup>マウスでは、Sema 3 Aシグナルの過剰が病態に関与することを示唆する知見がある。特異的抗ニューロピリン 1抗体を40日齢から開始すると、運動機能および生存率を改善するという<sup>46</sup>。このように、ALSの病態においてSema 3 Aシグナルの過剰・欠損のどちらが存在するかについては、一致した見解が得られていない。この背景には、Sema 3 Aの成長円錐に対する効果が細胞内環状ヌクレオチド濃度の高低<sup>47</sup>や軸索・樹状突起によって<sup>48</sup>反発・誘引の全く正反対の作用として発現することが要因として存在するのかもしれない。

### 軸索輸送の新しいモニター<sup>38</sup>系とinduced pluripotent stem cells (iPS) ニューロンにおける薬物スクリーニングの可能性

ヒト疾患の遺伝学的解析は、軸索輸送を担う分子の変異と神経変性疾患との関係を明らかにした。例えば、運動ニューロン疾患1つをとってみても、KIF 5 A<sup>49</sup>やDynactin1<sup>50</sup>のような軸索輸送そのものの機構に関わる分子、軸索を構成するアクチン<sup>51</sup>や微小管関連タンパク質の制御に関わる分子<sup>52, 53</sup>、ミトコンドリアの輸送<sup>54, 55</sup>やエ

ンドサイトーシス<sup>56</sup>、タンパク分解といった変性タンパク質の蓄積に伴うゴルジ体ゴルジ体—小胞体ストレス応答に関わる分子<sup>57, 58</sup>、RNA輸送に関わる分子群の異常など、様々な因子が関与することが報告されている<sup>59</sup>。このように、遺伝子の変異とタンパク質の機能喪失 (loss-of-function) と機能獲得 (gain-of-function) が軸索輸送の異常、神経変性・脱落と関連する疾患の場合、これらの疾患の罹患患者検体から調整された疾患iPSニューロンにおいて同様な異常が検出されることは容易に想像できる。実際、つい最近になり、RNA結合タンパク質TDP-43の異常変異をもつALS患者から作製されたiPSニューロンにおいてTDP-43を含むmRNA顆粒の輸送が障害されていることが報告された<sup>60</sup>。一方、このように直接的に輸送関連分子の変異が関与しないアミロイド前駆体タンパク質トランスジェニックマウス (アルツハイマー病態モデル動物) においても、比較的早期に軸索輸送の低下が見られることが報告されている<sup>38</sup>。生体内では、神経細胞、グリア細胞、血管などの様々な細胞から構成され、様々な細胞間相互作用が存在する。最近では異常タウタンパク質のシナプス間伝搬が病態に関与する事を示唆する知見が報告されている。また細胞間相互作用に加え、生体における中枢神経組織は、末梢臓器からの影響も受けるため、神経変性疾患を疾患iPSニューロンの中だけで再現することは不可能であろう。しかしながら、様々な想定されているどのようなメカニズムであれ、神経変性疾患の1つの最終共通経路として、細胞死が起こらない比較的早期に発生し得ると考えられる軸索輸送の障害の機序とその回復の可能性を検証する系として、疾患iPSニューロンを用いた軸索輸送のモニターは有用と考えられる。

最近になり、我々は、iPSニューロンにおける軸索輸送の評価を行うことに成功した<sup>61, 62</sup>。軸索輸送の評価は、従来は目視で行われることが多く、その客観性や時間的制約などの課題があった。これを解決するため、まずニワトリDRG細胞において脂溶性蛍光色素chloromethylbenzamide dialkylcarbocyanine (CM-DiI) を負荷して輸送小胞がラベルされる条件を検討した。CM-DiIによってラベルされる輸送粒子には、ゴルジ体、リソソーム、小胞体、ミトコンドリアなど様々なオルガネラ、分子が含まれると考えられる。ミトコンドリアと小胞体を標識すると考えられる蛍光色素を用いて標識した細胞や、GFPと融合させたリソソームのマーカーであるlysosomal associated membrane protein 1 (EGFP-LAMP 1) を導入した細胞において、CM-DiIと重染色を試みたところ、CM-DiIによって標識される粒子が、少なくとも一部に小胞体とミトコンドリアを含むこと、またその殆どがEGFP-LAMP 1と重染色したことから、CM-DiIによって主にリソソームが標識されていることが明らかになった<sup>61</sup>。デ

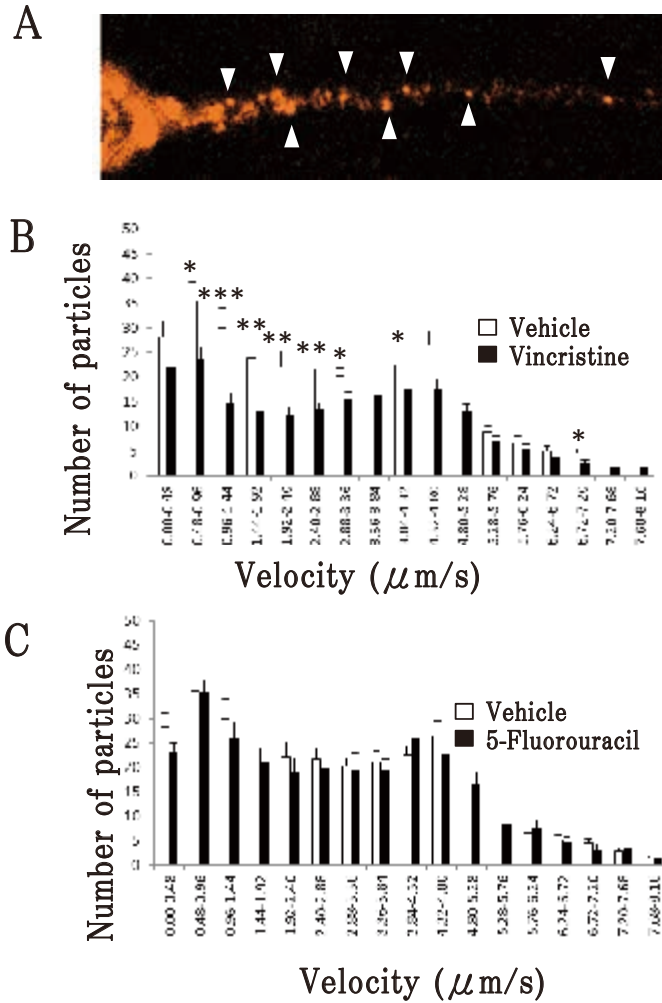


図3 iPSニューロンにおける軸索輸送の可視化と抗腫瘍薬の軸索輸送に対する効果

(A) CM-Dilによって染色された輸送粒子の静止画像(上)と微分干渉顕微鏡像(下)。(B)ビンクリスチン(0.1 nM)の順向性(Anterograde)および逆行性(Retrograde)輸送に対する抑制効果。図は各々の移動速度を持つ粒子の分画を表す。ビンクリスチンは、0.48–4.32 μm/secの幅広い平均移動速度を示す粒子の移動を抑制する。(C)5-フルオウラシル(5-FU)(100 μM)の順向性・逆行性輸送に対する効果。5-FUは輸送に対して無作用であることが分かる。5-FUはビンクリスチンに比し、末梢神経障害をひき起こしにくいという臨床的知見<sup>64)</sup>と一致する(文献<sup>61)</sup>より改変)。

デジタル画像として取り込んだ輸送粒子のライブイメージングを、横浜国立大学、後藤敏行研究グループとの共同で、独自に開発した自動解析ソフトを使用し、輸送粒子の数、速度、その分布を解析した<sup>61,62)</sup>。その結果、この輸送は微小管をレールとして能動的に輸送される軸索輸送であることが確認された。さらに、この実験系を基礎に、Cellular Dynamics International社においてヒト前脳から調整・樹立されたiPSニューロン(iCell Neuron)において、再現性よく軸索輸送の定量と薬物効果の評価を行うことが可能であった(図3)<sup>62)</sup>。この結果は、我々が確立した系が、神経変性疾患を有する患者由来の細胞、すなわち疾患iPSニューロンにおける1つの病態をモニターする系となり得ること、同実験系を用いた軸索輸送評価が新しい創薬スクリーニング系の可能性を示唆している。

### 今後の展望, 課題

本稿では細胞内輸送とりわけ軸索輸送を中心に、我々の得て来た知見を中心に紹介した。軸索や樹状突起といった極めて明確な機能をもつ細胞の部位には、選択的輸送は必須であろう。しかし一方では、かなりの分子が同時に同一のモーター分子によって運ばれていると考えられている。そのようなcargoの複合体は何か?またどこでどのようにcargoを載せ、おろされて配置され、また分解されるのか?こうした問題は、細胞内シグナル伝達の時間的・空間的制御がどのように行われているか?という生化学、細胞生物学の根本課題とも繋がる問題でもある。

細胞レベルでの分子機構を解明することと同時に、肝臓などの実質臓器で試みられているように、疾患iPS細胞由来の疾患神経組織モデルの構築<sup>63)</sup>も今後検討されて

いく可能性がある。輸送神経変性疾患の克服の道のは決して平坦とは言えない。我々は基礎生物学と臨床における課題や現象を結びつけ、難治の神経変性疾患の克服に向け、このハードルを乗り越えるべく努力しなければならない。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、この研究の開始に際して、強化型微分干渉顕微鏡顕微鏡による軸索輸送の観察にご協力頂いた故竹中敏文 名誉教授、現北里大学生理学教室 川上倫教授、宝塚医療大学 堀英明教授に感謝する。軸索輸送の研究を行った庄司雅之、後藤泰一郎、山本寛、山本藍子、朝倉太郎、蔵岡聡、肥田友伸、山根昌之、中村治子、大学院学生諸氏、指導に当たった佐々木幸生准教授（生命医科学）、竹居光太郎教授（生命医科学）、中村史雄准教授（薬理学）、小倉頭一助教（薬理学）、臼井洋博士 研究員諸氏、そして、軸索と樹状突起輸送の関連を追究し、ガイダンス分子による輸送の意義を明らかにした山下直也（前助教助教、現ジョンスホプキンス大学博士研究員）氏に感謝する。様々な実験上の支援を頂いた青木令奈、Sandy Chen、岡田貴子、小河原美幸、関根由子、榎原弘子諸氏に感謝する。また、軸索輸送の自動解析ソフトの開発を一から立ち上げ、その確立にご尽力頂いた横浜国立大学環境情報研究院 社会環境と情報研究部門、後藤敏行教授、大学院生の塩沢孝仁、金丸悠理諸氏に感謝する。この草稿についてご助言を頂いた本学神経内科教授、田中章景先生に感謝する。これらの研究の一部は、戦略的創造研究推進事業（CREST）（脳の神経回路形成と可塑性の分子機構、細胞内パターンニングによる組織構築（No. 07051076）、特定領域研究（セマフォリン・ネトリン伝達系とトラフィック機構の解析）（No. 16044238）、特定領域研究（神経ガイダンス制御分子CRMPによる細胞内・外位置情報と組織構築）（No. 17082006）、ターゲットタンパク研究プログラム（No. 0761890004）、先端融合領域イノベーションプログラム（No. 42890001）、若手研究B（No. 21700411）、基盤研究C（No. 24500444）による支援により行った。

## 文 献

- 1) Ohno S. Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol*, **13**: 641–648, 2001.
- 2) Huber A.B., Kolodkin A.L., Ginty D.D. & Cloutier J.F. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci*, **26**: 509–563, 2003.
- 3) Kruger R.P., Aurandt J. & Guan K.L.: Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**: 789–800, 2005.
- 4) Raper J.A.: Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol*, **10**: 88–94, 2000.
- 5) Zhou Y., Gunput R.A. & Pasterkamp R.J.: Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci*, **33**: 161–170, 2008.
- 6) Yamashita N., et al.: Plexin-A 4-dependent retrograde semaphorin 3A signalling regulates the dendritic localization of GluA 2-containing AMPA receptors. *Nat Commun*, **5**: 3424, 2014.
- 7) Tessier-Lavigne M. & Goodman C.S.: The molecular biology of axon guidance. *Science*, **274**: 1123–1133, 1996.
- 8) Goshima Y., Ito T., Sasaki Y. & Nakamura F.: Semaphorins as signals for cell repulsion and invasion. *J Clin Invest*, **109**: 993–998, 2002.
- 9) Kumanogoh A. & Kikutani H.: Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins. *Nat Rev Immunol*, **13**: 802–814, 2013.
- 10) Goshima Y., Nakamura F., Strittmatter P. & Strittmatter S.M.: Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature*, **376**: 509–514, 1995.
- 11) Nakamura F., Kalb R.G. & Strittmatter S.M.: Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol*, **44**: 219–229, 2000.
- 12) Sasaki Y., et al.: Fyn and Cdk 5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex. *Neuron*, **35**: 907–920, 2002.
- 13) Takahashi T., et al.: Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell*, **99**: 59–69, 1999.
- 14) Tamagnone L., et al.: Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell*, **99**: 71–80, 1999.
- 15) Uchida Y., et al.: Semaphorin 3A signalling is mediated via sequential Cdk 5 and GSK 3 beta phosphorylation of CRMP 2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes Cells*, **10**: 165–179, 2005.
- 16) Negishi M., Oinuma I. & Katoh H.: R-ras as a key player for signaling pathway of plexins. *Mol Neurobiol*, **32**: 217–222, 2005.
- 17) Kolodkin A.L., Matthes D.J. & Goodman C.S.: The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell*, **75**: 1389

- 1399, 1993.
- 18) Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. *Cell*, **97**: 551 – 552, 1999.
  - 19) Morita A., et al.: Regulation of dendritic branching and spine maturation by semaphorin 3 A-Fyn signaling. *J Neurosci*, **26**: 2971 – 2980, 2006.
  - 20) Yamashita N., et al.: Regulation of spine development by semaphorin 3 A through cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of collapsin response mediator protein 1. *J Neurosci*, **27**: 12546 – 12554, 2007.
  - 21) Yamashita N., et al.: Anti-Semaphorin 3 A neutralization monoclonal antibody prevents sepsis development in lipopolysaccharide-treated mice. *Int Immunol*, **27**: 459 – 466, 2015.
  - 22) Goshima Y., Sasaki Y., Yamashita N. & Nakamura F.: Class 3 semaphorins as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*, **16**: 933 – 944, 2012.
  - 23) Hayashi M., et al.: Osteoprotection by semaphorin 3 A. *Nature*, **485**: 69 – 74, 2012.
  - 24) Nogi T., et al.: Structural basis for semaphorin signalling through the plexin receptor. *Nature*, **467**: 1123 – 1127, 2010.
  - 25) Yamashita N. & Goshima Y.: Collapsin response mediator proteins regulate neuronal development and plasticity by switching their phosphorylation status. *Mol Neurobiol*, **45**: 234 – 246, 2012.
  - 26) 山下直也: 神経回路網の発達・可塑性・維持における Collapsin Response Mediator Protein の役割. *横浜医*, **62**: 545 – 553, 2011.
  - 27) Li W., Herman R.K. & Shaw J.E.: Analysis of the *Caenorhabditis elegans* axonal guidance and outgrowth gene *unc-33*. *Genetics*, **132**: 675 – 689, 1992.
  - 28) Takenaka T., Kawakami T., Hikawa N. & Gotoh H.: Axoplasmic transport of mitochondria in cultured dorsal root ganglion cells. *Brain Res*, **528**: 285 – 290, 1990.
  - 29) Goshima Y., et al.: Growth cone neuropilin-1 mediates collapsin-1/Sema III facilitation of antero- and retrograde axoplasmic transport. *J Neurobiol*, **39**: 579 – 589, 1999.
  - 30) Goshima Y., et al.: A novel action of collapsin: collapsin-1 increases antero- and retrograde axoplasmic transport independently of growth cone collapse. *J Neurobiol*, **33**: 316 – 328, 1997.
  - 31) Li C., et al.: Correlation between semaphorin 3 A-induced facilitation of axonal transport and local activation of a translation initiation factor eukaryotic translation initiation factor 4E. *J Neurosci*, **24**: 6161 – 6170, 2004.
  - 32) Dotti C.G. & Banker G.A.: Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature*, **330**: 254 – 256, 1987.
  - 33) Yamane M., et al.: Semaphorin 3 A facilitates axonal transport through a local calcium signaling and tetrodotoxin-sensitive voltage-gated sodium channels. *Biochem Biophys Res Commun*, **422**: 333 – 338, 2012.
  - 34) Yamashita N., et al.: Voltage-gated calcium and sodium channels mediate Sema 3 A retrograde signaling that regulates dendritic development. *Brain Res*, **1631**: 127 – 136, 2015.
  - 35) Encalada S.E. & Goldstein L.S.: Biophysical challenges to axonal transport: motor-cargo deficiencies and neurodegeneration. *Annu Rev Biophys*, **43**: 141 – 169, 2014.
  - 36) Hirokawa N., Niwa S. & Tanaka Y.: Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*, **68**: 610 – 638, 2010.
  - 37) Millecamps S. & Julien J.P.: Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, **14**: 161 – 176, 2013.
  - 38) Stokin G.B., et al.: Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science*, **307**: 1282 – 1288, 2005.
  - 39) Gibbs K.L., Greensmith L. & Schiavo G.: Regulation of Axonal Transport by Protein Kinases. *Trends Biochem Sci*, **40**: 597 – 610, 2015.
  - 40) Maiti P., Manna J., Ilavazhagan G., Rossignol J. & Dunbar G.L.: Molecular regulation of dendritic spine dynamics and their potential impact on synaptic plasticity and neurological diseases. *Neurosci Biobehav Rev*, **59**: 208 – 237, 2015.
  - 41) Rattray M. & Bendotti C.: Does excitotoxic cell death of motor neurons in ALS arise from glutamate transporter and glutamate receptor abnormalities? *Exp Neurol*, **201**: 15 – 23, 2006.
  - 42) Moloney E.B., de Winter F. & Verhaagen J.: ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. *Front Neurosci*, **8**: 252, 2014.
  - 43) Kawahara Y., et al.: Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature*, **427**: 801, 2004.
  - 44) Tortarolo M., et al.: Glutamate AMPA receptors change in motor neurons of SOD1 G93A transgenic mice and their inhibition by a noncompetitive antagonist ameliorates the progression of amyotrophic lateral sclerosis-like disease. *J Neurosci Res*, **83**: 134 – 146, 2006.
  - 45) Tatsumi R., et al.: Possible implication of satellite cells in



- regenerative motoneuritogenesis: HGF upregulates neural chemorepellent Sema 3 A during myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol*, **297**: C238 – C252, 2009.
- 46) Venkova K., et al.: Semaphorin 3 A signaling through neuropilin-1 is an early trigger for distal axonopathy in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, **73**: 702 – 713, 2014.
- 47) Song H., et al.: Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science*, **281**: 1515 – 1518, 1998.
- 48) Polleux F., Morrow T. & Ghosh A.: Semaphorin 3 A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature*, **404**: 567 – 573, 2000.
- 49) Zhao C., et al.: Charcot-Marie-Tooth disease type 2 A caused by mutation in a microtubule motor KIF1 Bbeta. *Cell*, **105**: 587 – 597, 2001.
- 50) Puls I., et al.: Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet*, **33**: 455 – 456, 2003.
- 51) Tarrade A., et al.: A mutation of spastin is responsible for swellings and impairment of transport in a region of axon characterized by changes in microtubule composition. *Hum Mol Genet*, **15**: 3544 – 3558, 2006.
- 52) Evgrafov O.V., et al.: Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat Genet*, **36**: 602 – 606, 2004.
- 53) Duplan L., et al.: Collapsin response mediator protein 4 a (CRMP 4 a) is upregulated in motoneurons of mutant SOD1 mice and can trigger motoneuron axonal degeneration and cell death. *J Neurosci*, **30**: 785 – 796, 2010.
- 54) Banfi S., et al.: Identification and characterization of AFG3L2, a novel paraplegin-related gene. *Genomics*, **59**: 51 – 58, 1999.
- 55) Miller K.E. & Sheetz M.P.: Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J Cell Sci*, **117**: 2791 – 2804, 2004.
- 56) Verhoeven K., et al.: Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2 B neuropathy. *Am J Hum Genet*, **72**: 722 – 727, 2003.
- 57) Fasana E., et al.: A VAPB mutant linked to amyotrophic lateral sclerosis generates a novel form of organized smooth endoplasmic reticulum. *FASEB J*, **24**: 1419 – 1430, 2010.
- 58) Suzuki H., et al.: ALS-linked P56S-VAPB, an aggregated loss-of-function mutant of VAPB, predisposes motor neurons to ER stress-related death by inducing aggregation of co-expressed wild-type VAPB. *J Neurochem*, **108**: 973 – 985, 2009.
- 59) Sau D., et al.: Dysregulation of axonal transport and motor neuron diseases. *Biol Cell*, **103**: 87 – 107, 2011.
- 60) Alami N.H., et al.: Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron*, **81**: 536 – 543, 2014.
- 61) Goshima Y., et al.: Computational analysis of the effects of antineoplastic agents on axonal transport. *J Pharmacol Sci*, **114**: 168 – 179, 2010.
- 62) Nakamura H., et al.: Quantitative analysis of intraneuronal transport in human iPSC neurons. *J Pharmacol Sci*, **128**: 170 – 178, 2015.
- 63) Takebe T., et al.: Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, **499**: 481 – 484, 2013.
- 64) Miltenburg N.C. & Boogerd W.: Chemotherapy-induced neuropathy: A comprehensive survey. *Cancer treatment reviews*, **40**: 872 – 882, 2014.

**Abstract**

A NOVEL SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM THROUGH AXONAL TRANSPORT AND  
NEURODEGENERATIVE DISORDERS

Yoshio GOSHIMA

*Department of Molecular Pharmacology & Neurobiology, Yokohama City University Graduate School of Medicine*

Axonal transport is fundamental for neuronal network formation, synaptic transmission and the maintenance of neuronal cell polarity. A vast body of evidence suggests that the impairment of axonal transport plays a pivotal role in several kinds of neurodegenerative disorders. However, how axonal transport is regulated and how its disturbance leads to neurodegeneration are far from understood. We found a novel mechanism of axonal transport by which a repulsive axon guidance molecule semaphorin3A exerted regulation of the dendritic AMPA-type glutamate receptor, GluA2 through retrograde axonal transport, suggesting diverse physiological roles for axonal transport. Monitoring of axonal transport in disease-specific iPS neurons may aid in the discovery of therapeutic agents for neurodegenerative disorders in the future.