

令和元年5月16日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06752

研究課題名(和文) 神経軸索再生における受容体型チロシンキナーゼALKの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of ALK, a receptor-type protein tyrosine kinase in axonal regeneration

研究代表者

町野 正明 (Machino, Masaaki)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70807510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)は受容体チロシンキナーゼ(RTK)の1つであるが、詳しい機能はいまだ不明である。本研究はALKの神経軸索に対する役割を解明することを目的とした。ASP3026投与にて濃度依存性にリン酸化ALKの発現は低下し神経軸索伸長とsproutingは抑制された。mAb16-39投与にてALKの発現は上昇し神経軸索伸長とsproutingは亢進した。ALKは神経系の発達・維持に寄与している可能性がある。またALKの活性化は神経軸索伸長と神経sproutingを促進し、ALK不活化は軸索伸長とsproutingを抑制する作用を示していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)は受容体チロシンキナーゼ(RTK)の1つであり、特定の神経細胞集団に対して増殖、生存維持などの作用を持つ受容体として機能するとされるが、詳しい機能はいまだ不明である。本研究から得られて研究結果はALKの活性を調節している機構を解明し、ALKを標的とする神経再生治療法の開発に寄与する可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Anaplastic lymphoma kinase (ALK) is a receptor type tyrosine kinase (RTK) that is expressed in neurons of the central and peripheral nervous systems. We investigated whether the ASP3026 as inhibitor of ALK and knocking down of ALK by siRNA suppress the outgrowth of adult mouse dorsal root ganglion (DRG) neurons, whether monoclonal antibody (mAb) 16-39 as an agonist of kinase activity of ALK promote axon outgrowth. In cultured DRG neuron, ALK was activated in elongating growth cones and sprouting axonal branches. Inhibition of ALK by ASP3026, reduced axonal elongation and branching in adult neurons. Inactivation of ALK by siRNA, reduced axonal elongation and branching in adult neurons. In contrast, mAb16-39 induced tyrosine phosphorylation of ALK, activation of ALK by mAb16-39, and promoted axonal elongation and sprouting. ALK significantly enhanced axonal elongation and branching. Taken together, our data indicate pivotal roles of RTK pathway in neural development or its repair.

研究分野：神経科学

キーワード：受容体型チロシンキナーゼ 未分化リンパ腫キナーゼ 神経軸索

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

神経系において特異的に発現の見られる受容体型チロシンキナーゼ (RTK) は、神経系の発生、分化、生存維持など多彩な生物学的機能を有している。未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) は RTK の一つであり、特定の神経細胞集団に対して増殖、生存維持などの作用を持つ受容体として機能していることが期待されるが、ALK に対する詳しい機能はいまだ不明である。本研究は RTK の関わる神経系の発達・維持等の研究において重要な知見が得られるものと考えられる。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的は神経軸索伸長における ALK の役割を解析することである。

#### 3. 研究の方法

ALK の中枢神経における発生学的な発現を確認するために C57BL/6J マウス全脳における mRNA 発現を胎児期から出生後まで測定する。

またマウス後根神経節 DRG (dorsal root ganglion) から抽出した初代培養ニューロンを用いて神経軸索におけるリン酸化 ALK の発現を免疫染色にて観察する。

ALK 阻害剤である ASP3026 を HEK293T 細胞株に投与しリン酸化 ALK の発現を免疫染色と Western blotting 法にて確認する。

DRG ニューロンに ASP3026 を投与し神経軸索長を定量的に評価する。

アゴニストであるモノクローナル抗体 (mAb16-39) を HEK293T 細胞株に投与しリン酸化 ALK の発現を免疫染色と Western blotting 法にて確認する。

DRG ニューロンに mAb16-39 を投与し神経軸索長を定量的に評価する。

N2a 細胞株に shRNA を用いた ALK の knock down を行い、qRT-PCR にて ALK の mRNA を確認する。ALK の Knock down 有無による DRG ニューロンの神経軸索長を比較検討する。

#### 4. 研究成果

ALK の発生学的な mRNA の発現は qRT-PCR にて出生直後がピークであった (図 1)。神経軸索成長円錐先端でリン酸化 ALK の発現が亢進していることを免疫染色法にて確認した (図 2)。

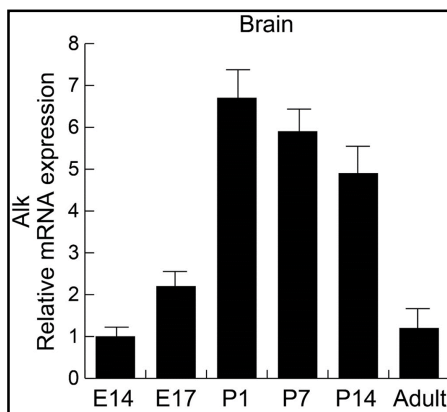


図 1. 胎児期から出生後までの ALK 発現

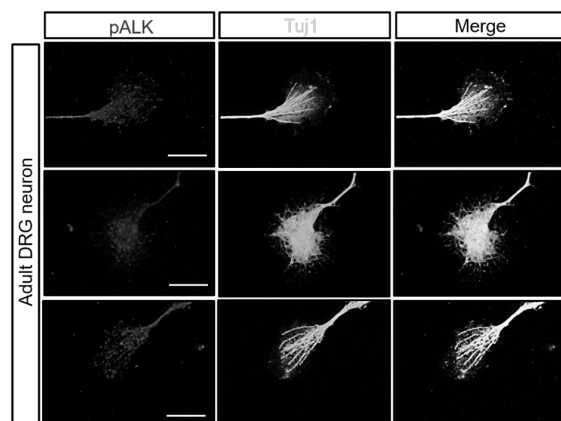


図 2. 神経軸索成長円錐先端のリン酸化 ALK

ASP3026 投与にて濃度依存性にリン酸化 ALK の発現が低下することを Western blotting 法にて確認した (図 3)。

ASP3026 投与にてコントロールと比べ有意に神経軸索伸長は抑制されることを免疫染色法にて確認した (図 4)。

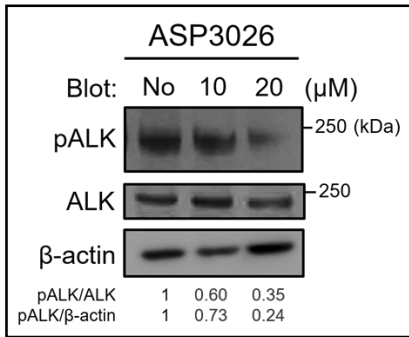


図 3. ASP3026 によるリン酸化 ALK 発現抑制

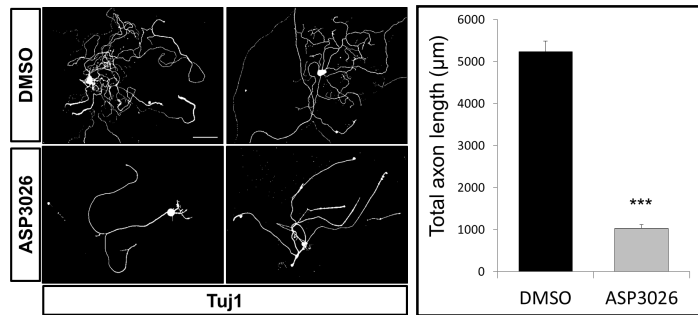


図 4. ASP3026 による軸索伸長抑制

mAb16-39 投与にてリン酸化 ALK の発現が上昇することを Western blotting 法にて確認した (図 5)。mAb16-39 投与にてコントロールと比べ有意に神経軸索伸長は亢進することを免疫染色法にて確認した (図 6)。

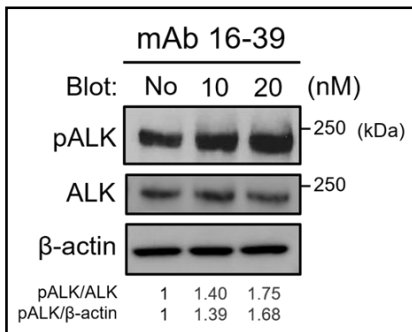


図 5. mAb16-39 によるリン酸化 ALK 発現亢進

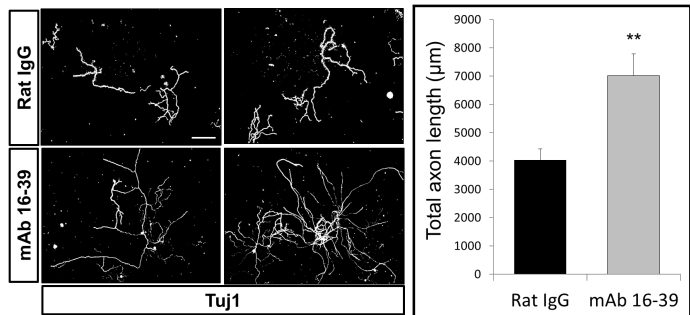


図 6. mAb16-39 による軸索伸長亢進

N2a 細胞株に siRNA を用いた ALK の knock down を行い、qRT-PCR にて ALK の mRNA を確認した。ALK の Knock down 有無による DRG ニューロンの神経軸索長を比較検討する。ALK を Knock down することで神経軸索伸長は有意に抑制された (図 7)。

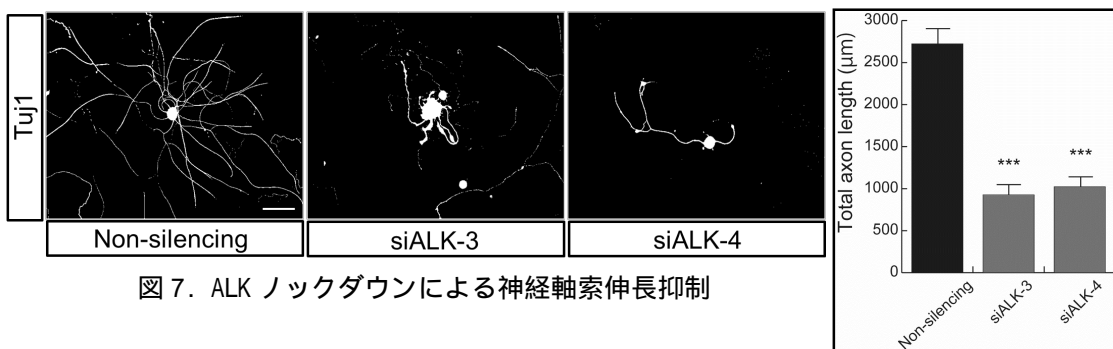


図 7. ALK ノックダウンによる神経軸索伸長抑制

Preliminary な実験結果から、ALK は神経系の発達・維持に寄与していることが明らかとなった。また ALK の活性化は神経軸索伸長を促進し、ALK 不活化は軸索伸長を抑制する作用を示していた。この知見は ALK の活性を調節している機構を解明し、ALK を標的とする脊髄再生治療法を開発するための手法を示唆するものである。

本研究において受容体複合体の解明が行われれば、この受容体のノックアウトマウスなどを用いた研究からその全貌を明らかにすることも可能であろう。本研究は神経軸索再生を主眼 においているが、本研究のもたらす成果は、生理的可塑性の分子基盤の解明など、神経科学 にブレイクスルーをもたらす可能性を秘めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 門松 健治

ローマ字氏名: (KADOMATSU, kenji)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。