

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07742

研究課題名（和文）軸索輸送を介した逆行性シグナル伝達とそのアルツハイマー病発症への関与

研究課題名（英文）Regulation of retrograde signaling through axonal transport and its role in the onset of Alzheimer's disease

研究代表者

山下 直也（Naoya, YAMASHITA）

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・准教授

研究者番号：40508793

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー型認知症（AD）は人類が克服すべき疾患の一つである。AD発症には、アミロイド（A $\beta$ ）の蓄積が関与するが、A $\beta$ が脳内に過剰蓄積する機構は不明である。本研究では、軸索輸送による新規神経細胞内シグナル伝達制御がA $\beta$ 産生を制御することを見出した。さらに、この機構の破綻がAD発症と関係する可能性を見出した。以上から本研究は、AD発症の予測や予防につながる基盤となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人類がADを克服するためには、その発症の引き金となりうるA $\beta$ の蓄積を引き起こす要因を明らかにする必要がある。本研究では、軸索輸送と呼ばれる神経細胞の生存に関わる機構の新たな役割を見出した。さらに、発見した機構の破綻がA $\beta$ 蓄積を引き起こしてAD発症に関わる可能性を突き止めた。従って、本研究には、神経細胞の発達や機能の制御における基本原理の解明にとどまらず、AD発症に関わる新しい機構の発見につながる可能性がある。ここに、得られた成果の学術的意義と社会的意義が存在する。

研究成果の概要（英文）：Alzheimer's disease (AD) is one of the neurodegenerative diseases that we must find a way to cure. Toxic aggregation of amyloid (A $\beta$ ) in neurons is implicated in AD pathology. However, the mechanisms that induce accumulation of A $\beta$  in the brain remain unclear. In this study, we newly identified an axonal transport dependent neuronal signaling that controls A $\beta$  production. Moreover, we found that disruption of this signaling may be related to the onset of AD. Our study therefore provides a basis for predicting and preventing the onset of AD.

研究分野：神経生物学、神経病態学

キーワード：軸索輸送 逆行性シグナル トランスサイトosis アルツハイマー病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経発生過程において、神経成長因子(NGF)は軸索先端の成長円錐に局在する受容体(TrkA)により受容され、神経栄養作用を発揮する。この時、NGF/TrkA複合体は成長円錐内へ取り込まれ、形成されたエンドソームの逆行性軸索輸送により、情報を細胞体へ逆行性に伝達する(Yamashita and Kuruvilla, *Curr Opin Neurobiol.*, 2016)。研究代表者は、細胞体へ軸索輸送された成長円錐 TrkA が、細胞体で合成され、細胞体膜上に局在していた細胞体膜 TrkA に作用し、その成長円錐への順行性軸索輸送(トランスサイトーシス)を促進するポジティブフィードバック機構を明らかにした(Yamashita et al., *Dev Cell*, 2017)。しかしながら、細胞膜 TrkA とともに、軸索の伸長や成熟、ならびに、その機能制御に関わる膜タンパク質が同期して輸送されるかについては明らかにされていなかった。

神経細胞において、細胞体から軸索へトランスサイトーシスされる分子は数分子しか報告されていない。その中の一つであるアミロイド前駆タンパク質(APP)は、TrkAと相互作用することが示されている。APPはアルツハイマー型認知症(AD)の原因分子として考えられているアミロイド(A $\beta$ )の前駆体であるが、APP自体は、軸索に対して栄養作用があることが示唆されている(van der Kant and Goldstein, *Dev Cell*, 2015)。これはNGFの生理機能と一致するが、NGF-APPの機能連関や、APPの生理的意義を明らかにした報告は存在しなかった。興味深いことに、TrkA-APPの相互作用は、AD患者において減弱し、TrkAと相互作用できないAPPを発現する変異マウスはAD様の表現型を示す(Canu et al., *Int J Mol Sci*, 2017)。従って、TrkA-APP複合体がNGF依存的にトランスサイトーシスされるのであれば、この複合体は、NGFによる神経細胞への栄養作用に寄与するばかりでなく、APPの異常切断を回避してAD発症を抑制する可能性が考えられる。しかしながら、このような仮説を支持する事象は明らかにされていなかった。

### 2. 研究の目的

(1) NGF依存的に細胞体から軸索へトランスサイトーシスされるTrkAが、タンパク質間相互作用を介してAPPもトランスサイトーシスし、軸索の伸長や成熟を制御することを明らかにすること。

(2) APPがAD発症に関わるA $\beta$ の前駆体であることに着目し、TrkA-APPトランスサイトーシスがAD発症を制御する可能性を明らかにすること。

TrkA-APPトランスサイトーシスとAD発症との関係を明らかにするにあたり、NGFとは相反する役割を持つセマフォリン3A(Sema3A)にも着目した。Sema3AはAD発症を増悪する分子である可能性が示唆されているが、その詳細は不明である。Sema3Aは、NGFと同様に受容体の軸索輸送を介した逆行性シグナルを制御する(Yamashita et al., *Nat Commun*, 2014)。興味深いことに、Sema3A逆行性シグナルは、Sema3A受容体(PlexA4)のみならず、その相互作用分子であるTrkAも軸索輸送する(Yamashita et al., *J Cell Sci*, 2016)。一方、NGFはTrkAのみを軸索輸送するため、Sema3Aシグナルが過剰となると、PlexA4が細胞体へ過剰蓄積すると考えられる。そこで、NGF・Sema3Aシグナルのバランス異常がPlexA4を介してTrkA-APPトランスサイトーシスを破綻させ、AD発症を引き起こすという仮説の立案とその実証を試みることも目指した。

(3) 本研究の成果がAD発症の早期診断法の確立につながる基盤となる可能性を明らかにすること。

以上の目的が達成された場合、本研究はAD発症を引き起こす新しい経路の解明に繋がる発展性が考えられる。そこで、本研究とAD発症とをつなげる鍵分子としてSema3Aに着目した。Sema3Aは以前からAD発症時に発現が上昇することが報告されていたが(Good et al., *J Neurochem*, 2004)その後の検証は進んでいない。研究が進展しない原因として、脳内Sema3A量を正確に測定できる実験系がないことが挙げられたため、この実験系を構築することも目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) TrkA-APP複合体が軸索へのNGF刺激依存的に細胞体から軸索へトランスサイトーシスされることを明らかにするため、細胞体と軸索を異なる環境にて培養できる特殊なチャンパーを用いた神経細胞の初代培養(Yamashita et al., *Dev Cell*, 2017)を行った。この培養系を用いて細胞体膜由来のTrkAとAPPのみを抗体にて標識し、その軸索への移行を蛍光顕微鏡にて観察した。さらに、TrkA-APPトランスサイトーシスがNGFによる神経栄養作用に関わることを明らかにするための検討も行った。まず、TrkA-APPの相互作用に関わる機能ドメインをそれぞれ同定した。さらに、同定した機能ドメインの情報を活用し、細胞体膜上におけるTrkA-APP複合体形成を特異的に抑制できる実験系を構築し、この実験系において、NGFによる軸索伸長促進作用

が抑制されるかを検討した。

(2) TrkA-APP トランスサイトosisとAD発症との関係を明らかにするため、TrkA-APP トランスサイトosisによる抗AD発症作用を抑制する可能性が考えられるSema3Aシグナルにも着目し、NGF・Sema3AシグナルのバランスとAD発症との関係を調べた。まず、免疫沈降法を用い、Sema3A受容体の構成因子であるPlexA4がAPPと相互作用するかを調べた。同様の実験系を用いて、PlexA4が、TrkA-APP相互作用を抑制するかを検討した。さらに、神経細胞の初代培養を用い、培養神経細胞へのSema3Aの過量投与が、NGFによる抗AD発症作用(APPからAへの切断を抑制する作用)を抑制するかを検討した。

(3) 脳内Sema3Aを定量できる実験系を確立するため、研究代表者らが以前に樹立した抗Sema3A抗体(Yamashita et al., Int Immunol. 2015)を利用したELISAシステムを構築した。まず、リコンビナントSema3Aを用い、確立したELISAシステムの感度を調べた。さらに、成体ならびに胎児由来のマウス脳サンプルを用い、生体脳サンプルにおいてもSema3A量を測定できるかを調べた。

#### 4. 研究成果

まず、「研究の方法」に記した(1)~(3)の研究から得られた主な成果について記載する。

(1) 特殊チャンバーを用いた神経細胞の初代培養を用い、軸索へのNGF刺激によりTrkA-APP複合体が細胞体から軸索へトランスサイトosisされることが分かった。そこで、TrkA-APP複合体に関わる機能ドメインの同定を試みた結果、TrkA側、ならびに、APP側ともに、相互作用に関わる機能ドメインを50アミノ酸以下まで絞り込むことに成功した。そこで、TrkA側の相互作用ドメインをGST(グルタチオンS-トランスフェラーゼ)と融合させたリコンビナントタンパク質として発現・精製し、これを特殊チャンバーの細胞体領域にのみ添加したところ、軸索へのNGF刺激により認められる軸索伸長の促進が抑制されることが分かった。以上から、軸索へのNGF刺激は、細胞体膜由来のTrkAとAPPを相互作用させ、これらを軸索へトランスサイトosisすることで、軸索を伸長させる機構があることが分かった。

(2) APPがPlexA4と相互作用することが分かった。そこで、PlexA4とTrkA-APP相互作用との関係を調べた結果、PlexA4がTrkA-APP相互作用を抑制することが分かった。以上から、Sema3Aシグナルが過剰になると、TrkA-APP相互作用が抑制されることが示唆されたため、Sema3Aの過量投与がNGFシグナルを抑制するかを調べた。その結果、神経細胞の初代培養にNGFとともにSema3Aを投与すると、NGFによる抗AD発症作用が解除されることが分かった。さらに、PlexA4-APP相互作用に関わる機能ドメインも同定できたことから、今後は、この情報を活用した実験系の構築を進める予定である。

(3) リコンビナントSema3Aを用いた検証から、確立したSema3A ELISAシステムは、10 - 100 pMの範囲においてSema3Aを定量できることが分かった。さらに本ELISAシステムは、リコンビナントSema3Aだけでなく、Sema3A発現が高い、マウス胎児脳においてもシグナルが検出できることが分かるとともに、検出されるシグナルは、Sema3A遺伝子欠損マウスでは認められないことが明らかとなり、本システムにより生体Sema3Aを特異的に検出できることが分かった。そこで、AD発症との関連を検討する上で、胎児脳に比べて発現量が低下していると考えられている成体においてもシグナルが検出できるかを検討したところ、成体マウス脳由来のサンプルにおいてシグナルの検出に成功した。

以上の研究成果から、TrkA-APP複合体がトランスサイトosisされる機構の存在が見出されるとともに、その生理機能の一端が明らかになった。神経発生過程において、種々の因子が軸索の伸長を促進する。しかしながら、これらの因子により軸索伸長が促進される時、どのようにして軸索伸長に必要な材料が軸索の先端まで供給されるかは不明である。神経細胞におけるタンパク質合成は、主に細胞体で行われる。そして、合成された膜タンパク質の多くは細胞体膜上に局在すると考えられている。本研究から、細胞体膜上に局在していた膜タンパク質のうち、軸索の伸長や機能制御に必要な分子のみが選択的にトランスサイトosisされる可能性が示唆された。今後、さらなるトランスサイトosis分子が同定されることで、軸索伸長に必要な分子が作用点まで供給される基本原理の解明が期待される。

本研究の成果は、生命が有する基本原理の解明にとどまらず、未だ不明な点が多いAD発症を引き起こす要因の一端を解明する可能性を秘めている。なかでも、本研究で着目したSema3Aシグナルは、いくつかの神経疾患との関連が示唆されているものの、その詳細は不明である。本研究では、研究の進展を阻害する要因の一つとして考えられてきた、Sema3Aの発現量を高精度に定量できる手法が存在しない問題を解消するため、新たなELISAシステムを構築し、生体試料での高精度測定にも成功した。今後は、種々の検体を用いた測定を進め、Sema3Aを疾患発症予測

のバイオマーカーとして位置付けられる可能性についての検証を進めることが期待できる。なかでも AD 発症との関係においては、Sema3A 受容体の PlexA4 が APP の相互作用分子であることを突き止めた。すでに相互作用に関わる機能ドメインの同定も進めており、PlexA4-APP を作用点とした、AD 発症の予防を目指した手法の確立が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Blaine Connor, Guillermo Moya-Alvarado, Naoya Yamashita, Rejji Kuruville	4. 巻 120(6)
2. 論文標題 Transcytosis-mediated anterograde transport of TrkA receptors is necessary for sympathetic neuron development and function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2205426120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nomoto M, Konopaske GT, Yamashita N, Aoki R, Jitsuki-Takahashi A, Nakamura H, Makihara H, Saito M, Saigusa Y, Nakamura F, Watanabe K, Baba T, Benes FM, Tobe BT, Pernia CD, Coylye JT, Sidman RL, Hirayasu Y, Snyder EY, Goshima Y.	4. 巻 118
2. 論文標題 Clinical evidence that a dysregulated master neural network modulator may aid in diagnosing schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2100032118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamashita N	4. 巻 1331
2. 論文標題 NGF Signaling in Endosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 19-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-030-74046-7_3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki Yuki, Nagai Jun, Akinaga Satoshi, Koga Yumeno, Hasegawa Masaya, Takahashi Miyuki, Yamashita Naoya, Kolattukudy Papachan, Goshima Yoshio, Ohshima Toshio	4. 巻 1736
2. 論文標題 Phosphorylation of CRMP2 is required for migration and positioning of Purkinje cells: Redundant roles of CRMP1 and CRMP4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 146762-146762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2020.146762	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Jitsuki Takahashi Aoi, Jitsuki Susumu, Yamashita Naoya, Kawamura Meiko, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Sano Akane, Nakamura Fumio, Goshima Yoshio, Takahashi Takuya	4. 巻 0
2. 論文標題 Activity induced secretion of semaphorin 3A mediates learning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.15210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 古川 涼音, 小林 瑞季, 林 克儀, 中村 史雄, 櫻井 隆, 五嶋 良郎, 山下 直也
2. 発表標題 成体脳におけるセマフォリン3A発現を定量するELISAシステムの確立.
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関口 拓己, 櫻井 隆, 山下 直也
2. 発表標題 Semaphorin3A-PlxinAシグナルがアミロイド 前駆タンパク質の機能や代謝に与える影響.
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下直也、櫻井隆
2. 発表標題 Axonal targeting of TrkA-APP complex via transcytosis
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下 直也、水谷 由衣、實木-高橋 葵、林 克儀、中村 史雄、櫻井 隆、五嶋 良郎
2. 発表標題 成体脳におけるセマフォリン3A発現を定量するELISAシステムの確立
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamashita Naoya、Sakurai Takashi
2. 発表標題 Axonal targeting of TrkA signaling complex via transcytosis
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamashita Naoya、Sakurai Takashi
2. 発表標題 Axonal targeting of TrkA-APP complex via transcytosis
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------