

Cdk5 (dn-Cdk5) を ca-MEK と同時に SMN に強制発現させると、ca-MEK の神経突起伸長効果は強く抑制された (対照比 :  $0.89 \pm 0.76$ 、図 4A, B)。

上述のように、BDNF による p35 の誘導は MEK 阻害剤 U0126 によって抑制され、PI3K 阻害剤 LY294002 では抑制されなかった。従って、dn-Cdk5 を用いた結果と併せて考えると、BDNF による SMN 軸索伸長には p35/Cdk5 経路は必須であり、その上流の活性化経路として主に MEK-ERK 経路が働いていると考えられた。

### 神経軸索伸張における MAP1b

MEK-ERK 経路の下流にある Gsk3 $\beta$  や Cdk5 は、微小管関連タンパク (microtubule-associated proteins、MAPs) の一つである MAP1b をリン酸化し、微小管のダイナミクスを制御することで、軸索伸張に関与していると考えられている (Paglini et al., 1998 ; Goold and Gordon-Weeks, 2005)。リン酸化 MAP1b は微小管の脱チロシン化を阻害し微小管を dynamic な状態に維持すること、逆に MAP1b 欠損ニューロンでは微小管ダイナミクスが消失し、結果として軸索伸張が抑制されることが知られている (Gonzalez-Billault et al., 2004)。ca-MEK 発現細胞では、BDNF 添加時と同程度に軸索が伸長し、また成長円錐より細胞体に至る軸索全長に渡って SMI31 抗体にて認識されるリン酸化 MAP1b が分布していた (図 5A, B, C)。一方、myr-Akt 発現細胞においては、リン酸化 MAP1b は複数本の短い神経突起に弱く発現しているのみであった (図 5D)。MEK-ERK 経路による成長円錐を含む軸索全長での MAP1b のリン酸化に伴って、軸索が伸長していると考えられた。

## 考察

### SMN 軸索伸張と細胞内シグナル伝達経路

ニューロンの軸索伸長には、細胞体での細胞骨格の合成とその軸索輸送とともに、成長円錐部における *actin filament* と微小管 (*microtubule*) という二つの細胞骨格の働きが重要である (Mitchison and Kirschner, 1988 ; Goldberg, 2003)。成長円錐部は、軸索伸張の際の *motor* と *clutch* に例えられており、軸索に連なる中央部には *microtubule*、末梢先端部には *actin filament* が豊富に存在している。軸索伸張に重要なこの細胞骨格系は、重合・脱重合を繰り返す動的 (*dynamic*) な状態にあり、このような *microtubule* の動態は「動的不安定性 *dynamic instability*」と呼ばれている。軸索伸張の際に *microtubule* のダイナミクスを担うのが MAP1b・*collapsin response mediator protein 2 (CRMP2)*・MAP2・*tau* などの微小管関連タンパク (MAPs) であり、他の微小管結合タンパクとして *adenomatous polyposis coli (APC)* (Zhou et al., 2004) が知られている。

神経栄養因子による MAPs などの制御機構として、大きく二つの経路、PI3K-Akt 経路と MEK-ERK 経路がこれまで報告されている (Markus et al., 2002a ; Goold and Gordon-Weeks, 2004 ; Zou and Snider, 2005)。

DRG の成長円錐先端部では、NGF の下流で PI3K-Akt 経路が *actin* 重合を促進すると同時に、Gsk3 $\beta$  の不活化を介して APC を脱リン酸化 (活性化) することで *microtubule* を安定させ、軸索伸長に関与していることが明らかにされている (Zhou et al., 2004)。また、海馬ニューロンの成長円錐では、NT3 の下流で PI3K-Akt 経路が Gsk3 $\beta$  を不活化し、CRMP-2 を脱リン酸化 (活性化) することで *microtubule* 重合を促進し、軸索形成すなわち細胞極性 (*polarity*) に関与していると報告されている (Jiang et al., 2005 ; Yoshimura et al., 2005)。一方、これら神経成長因子の下流では、MEK-ERK 経

路も同時に機能しており、下流ではさらに 活性化型 Gsk3 $\beta$  (Goold and Gordon-Weeks, 2005) や p35/Cdk5 (Paglini et al., 1998 ; Harada et al., 2001) が、交感神経節細胞や小脳ニューロンの伸長軸索と成長円錐において、MAP1b をリン酸化することで microtubule のダイナミクスを制御し、軸索伸張に関与していると報告されている。

このように、Gsk3 $\beta$  は MEK-ERK 経路と PI3K-Akt 経路の両者の下流で働くことが報告されているが、その標的分子と作用機構としては異なる報告がなされている (Goold and Gordon-Weeks, 2004 ; Zou and Snider, 2005)。このことを説明しうる可能性として、興味深いことに、最近になって Kim et al. (2006) は、Gsk3 $\alpha,\beta$  (Gsk3s) の活性化の程度がニューロンの形態変化において重要な役割を果たしており、Gsk3s 活性の部分的抑制では APC や CRMP-2 のみが脱リン酸化され軸索分岐を促進し、さらに Gsk3s 活性の全抑制では MAP1b までが脱リン酸化され軸索伸長を阻害すると報告している。この Gsk3 $\beta$  の異なる作用を説明する機構として、ニューロン内での Gsk3 $\beta$  の局在の違い (成長円錐先端部あるいは伸長軸索から成長円錐中央部)、Gsk3 $\beta$  がリン酸化を受ける部位の違い、Cdk5 など他のリン酸化酵素による Gsk3 $\beta$  の標的基質の「priming」の有無などが提唱されている (Goold and Gordon-Weeks, 2004 ; Zou and Snider, 2005)。

したがって、少なくとも成長円錐先端部で局所的に Gsk3 $\beta$  を不活化する PI3K-Akt 経路は神経突起伸張に必要と考えられ、本研究で用いた SMN では、PI3K 阻害剤 LY294002 は成長円錐部を含めたニューロン全体の PI3K-Akt 経路を遮断し、Gsk3 $\beta$  阻害剤 LiCl、GSKinhIX はニューロン全体の Gsk3 $\beta$  活性を全抑制することで、神経突起伸長を阻害したと考えられる。逆に、SMN 全体での PI3K-Akt 経路の活性化 (Gsk3 $\beta$  の不活化) では複数の神経突起が形成され、これは Markus et al. (2002a) の報告と一致している。また本研究では、ニューロン細胞体での PI3K-Akt 経路は細胞死抑制作用を持ち、ニューロンの生存維持に関与することが確認された。

一方、BDNF 存在下の SMN では主に MEK-ERK 経路によって p35 発現が増強すること、p35 により活性化される Cdk5 の阻害剤である roscovitin の添加や ca-MEK に対する dn-Cdk5 の共発現によって SMN 神経突起伸長が阻害されることから、MEK-ERK 経路の下流で p35/Cdk5 は SMN 軸索伸長に必要と考えられる。MEK-ERK 経路の下流で活性化される Gsk3 $\beta$  のリン酸化部位は、PI3K-Akt 経路下流における 9 番目のセリンとは異なると考えられており、未だ明らかになっていない (Goold and Gordon-Weeks, 2005)。ただし、ca-MEK を発現させた SMN では、BDNF 添加と同様に、成長円錐部を含めた軸索全長での MAP1b のリン酸化が観察され、軸索伸長が有意に促進された。以上の結果から、BDNF による SMN 軸索伸張促進においては、MEK-ERK 経路から Gsk3 $\beta$  あるいは p35/Cdk5 を介した MAP1b のリン酸化という経路が重要な役割を担っていると考えられる。

#### 成体末梢神経損傷との比較

本研究から胎生期 SMN においても、Markus et al. (2002b) による胎生期 DRG の軸索伸張シグナルと同一であることが明らかとなったが、果たして成体末梢神経軸索損傷時の再生過程においても同一であろうか。

成体坐骨神経圧挫モデルでは、中間径 filament の vimentin が軸索損傷時に ERK1/2 を細胞体へ輸送し、軸索再伸長に寄与していると報告されており (Perlson et al., 2005 ; Willis and Twiss, 2006)、成体末梢神経損傷モデルでの p35/Cdk5 の関与も示唆されている (Terada et al., 1998、Desbarats et al., 2003、Namgung et al., 2004)。さらに、Kim et al.(2006) は、Gsk3s のニューロン形態変化への寄与は損傷後成体 DRG でも同様と報告している。また、成体末梢神経では、次で述べるような軸索伸張阻害因子は主に損傷部周辺にのみ分布し、軸索再伸張を支持する“bands of Büngner”と呼ばれる Schwann 細胞管と基底膜には、laminin などの細胞外マトリックスが含まれることが

知られている (Höke, 2006)。本研究の胎生期 SMN と laminin でコートされた培養器を用いて明らかにした MEK-ERK-Gsk3 $\beta$ /Cdk5-MAP1b 経路は、成体における損傷後の軸索再伸長においても重要な役割を担っている可能性が示唆される。

一方、胎生期と成体損傷時の DRG では異なる軸索伸張シグナルがあり、損傷後成体 DRG 軸索再伸長には JAK-STAT 経路が必要と報告されている (Liu and Snider, 2001)。また、損傷時に細胞内で活性化するストレス応答性 MAPK である JNK-cJUN 経路の必要性も報告されている (Lindwall et al., 2004)。成体ニューロンでは、胎生期と異なり、損傷に関連するシグナル経路が必要となる可能性が考えられる。

#### 成体中枢神経損傷との関連

脊髄など中枢神経系軸索損傷では、末梢神経系とは異なり、ミエリン由来の Nogo、MAG、oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) やグリア瘢痕内の CSPG が軸索伸張阻害の主な要因と提唱されている (Yiu and He, 2006)。これら軸索伸張阻害因子の特異的受容体を介した細胞内シグナル伝達経路は、最近明らかになりつつある。現在の処、いずれの因子による効果も低分子量 G タンパク RhoA-ROCK の活性化に集束され、活性化されたリン酸化酵素 ROCK は actin 脱重合因子 cofilin を阻害することで成長円錐部の actin filament を安定化させ、growth cone collapse を誘導し、結果として軸索伸張を阻害すると考えられている。

神経栄養因子などによって活性化する cAMP-PKA 経路と下流の cAMP response element binding protein (CREB) は、この伸張阻害作用を解除できるが (Gao et al., 2003 ; Gao et al., 2004)、cAMP 自体が軸索伸長を促進 (伸長速度を増加) するわけではないと報告されている (Snider et al., 2002 ; Han et al., 2004 ; Liu and Brady, 2004)。また、RhoA-ROCK は CRMP-2 をリン酸化 (不活化) することで軸索伸張を阻害しているとの報告や (Mimura et al., 2006)、別の伸張阻害因子である Sema3A は脊髄損傷

時の癒痕組織に発現しており、Cdk5 と CRMP-2 のリン酸化を介して軸索伸張を阻害しているという報告もある (Sasaki et al., 2002 ; Uchida et al., 2005 ; Kaneko et al., 2007)。Kim et al.(2006) は、中枢神経系である海馬ニューロンの形態変化への Gsk3s の寄与も、末梢神経系と同様と報告している。神経栄養因子下流の PI3K-Akt 経路は、中枢神経系ニューロンにおいても成長円錐先端部で活性化し、Gsk3s 不活化を介して CRMP-2 活性を維持することで、抑制的な細胞外マトリックスの軸索伸張阻害作用を解除していると推測される。

MEK-ERK 経路に関して、我々はラット脊髄切断モデルにおいて、ca-MEK の強制発現によって阻害因子を克服し、赤核脊髄路の再伸長と部分的運動機能再獲得が可能であることを示している (Miura et al., 2000)。末梢神経ニューロンと同様に、MEK-ERK 経路が赤核ニューロン軸索伸長能を増強することで、あるいは一部には cAMP を介して RhoA-ROCK 経路の抑制効果を部分的に解除することで (Gao et al., 2003)、中枢神経系でも損傷軸索を再伸長したと推測される。

#### ヒト末梢神経損傷治療への応用

ヒト末梢神経損傷においては、比較的良好な軸索再伸長が期待できるにもかかわらず、伸長すべき距離が長い四肢近位部での損傷などでは、長期の脱神経によって Schwann 細胞や骨格筋が変性に陥り、修復後の運動機能は必ずしも良好ではない (Höke, 2006)。良好な機能回復を目指す一つの方法として、末梢神経ニューロン内での MEK-ERK 経路の活性化誘導は有望であり、その下流の Gsk3 $\beta$ /Cdk5-MAP1b 経路を介して迅速な軸索伸張を促すと期待される。

## 参考文献

- Boyd, J.G., Gordon, T., 2001. The neurotrophin receptors, trkB and p75, differentially regulate motor axonal regeneration. *J. Neurobiol.* 49, 314-325.
- Brunet, A., Datta, S.R., Greenberg, M.E., 2001. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 297-305.
- Camu, W., Henderson, C.E., 1992. Purification of embryonic rat motoneurons by panning on a monoclonal antibody to the low-affinity NGF receptor. *J. Neurosci. Meth.* 44, 59-70.
- Desbarats, J., Birge, R.B., Mimouni-Rongy, M., Weinstein, D.E., Palerme, J.S., Newell, M.K., 2003. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat. Cell Biol.* 5, 118-125.
- Gao, Y., Deng, K., Hou, J., Bryson, J.B., Barco, A., Nikulina, E., Spencer, T., Mellado, W., Kandel, E.R., Filbin, M.T., 2004. Activated CREB is sufficient to overcome inhibitors in myelin and promote spinal axon regeneration in vivo. *Neuron.* 44, 609-621.
- Gao, Y., Nikulina, E., Mellado, W., Filbin, M.T., 2003. Neurotrophins elevate cAMP to reach a threshold required to overcome inhibition by MAG through extracellular signal-regulated kinase-dependent inhibition of phosphodiesterase. *J. Neurosci.* 23,

11770-11777.

Goldberg, J.L., 2003. How does an axon grow? *Genes Dev.* 17, 941-958.

Gonzalez-Billault, C., Jimenez-Mateos, E.M., Caceres, A., Diaz-Nido, J., Wandosell, F., Avila, J., 2004. Microtubule-associated protein 1B function during normal development, regeneration, and pathological conditions in the nervous system. *J. Neurobiol.* 58, 48-59.

Goold, R.G., Gordon-Weeks, P.R., 2004. Glycogen synthase kinase 3beta and the regulation of axon growth. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 809-811.

Goold, R.G., Gordon-Weeks, P.R., 2005. The MAP kinase pathway is upstream of the activation of GSK3beta that enables it to phosphorylate MAP1B and contributes to the stimulation of axon growth. *Mol. Cell. Neurosci.* 28, 524-534.

Han, P.J., Shukla, S., Subramanian, P.S., Hoffman, P.N., 2004. Cyclic AMP elevates tubulin expression without increasing intrinsic axon growth capacity. *Exp. Neurol.* 189, 293-302.

Hanson, M.G. Jr., Shen, S., Wiemelt, A.P., McMorris, F.A., Barres, B.A., 1998. Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neurons in vitro. *J. Neurosci.* 18, 7361-7371.



Harada, T., Morooka, T., Ogawa, S., Nishida, E., 2001. ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1. *Nat. Cell Biol.* 3, 453-459.

Höke, A., 2006. Mechanisms of disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 448-454.

Jiang, H., Guo, W., Liang, X., Rao, Y., 2005. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators. *Cell* 120, 123-135.

Kaneko, S., Iwanami, A., Nakamura, M., Kishino, A., Kikuchi, K., Shibata, S., Okano, H.J., Ikegami, T., Moriya, A., Konishi, O., Nakayama, C., Kumagai, K., Kimura, T., Sato, Y., Goshima, Y., Taniguchi, M., Ito, M., He, Z., Toyama, Y., Okano, H., 2006. A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat. Med.* 12, 1380-1389.

Kim, W.Y., Zhou, F.Q., Zhou, J., Yokota, Y., Wang, Y.M., Yoshimura, T., Kaibuchi, K., Woodgett, J.R., Anton, E.S., Snider, W.D., 2006. Essential roles for GSK-3s and GSK-3-primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth. *Neuron* 52, 981-996.

Lindwall, C., Dahlin, L., Lundborg, G., Kanje, M., 2004. Inhibition of c-Jun phosphorylation reduces axonal outgrowth of adult rat nodose ganglia and dorsal

root ganglia sensory neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 267-279.

Liu, H.H., Brady, S.T., 2004. cAMP, tubulin, axonal transport, and regeneration. *Exp. Neurol.* 189, 199-203.

Liu, R.Y., Snider, W.D., 2001. Different signaling pathways mediate regenerative versus developmental sensory axon growth. *J. Neurosci.* 21, RC164.

Mansour, S.J., Matten, W.T., Hermann, A.S., Candia, J.M., Rong, S., Fukasawa, K., Vande Woude, G.F., Ahn, N.G., 1994. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science.* 265, 966-970.

Markus, A., Patel, T.D., Snider, W.D., 2002a. Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 523-531.

Markus, A., Zhong, J., Snider, W.D., 2002b. Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron* 35, 65-76.

Mimura, F., Yamagishi, S., Arimura, N., Fujitani, M., Kubo, T., Kaibuchi, K., Yamashita, T., 2006. Myelin-associated glycoprotein inhibits microtubule assembly by a Rho-kinase-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 281, 15970-15979.

Mitchison, T., Kirschner, M., 1988. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron.* 1, 761-772.

Miura, T., Tanaka, S., Seichi, A., Arai, M., Goto, T., Katagiri, H., Asano, T., Oda, H., Nakamura, K.. 2000. Partial functional recovery of paraplegic rat by adenovirus-mediated gene delivery of constitutively active MEK1. *Exp. Neurol.* 166, 115-126.

Morooka, T., Nishida, E., 1998. Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 273, 24285-24288.

Namgung, U., Choi, B.H., Park, S., Lee, J.U., Seo, H.S., Suh, B.C., Kim, K.T., 2004. Activation of cyclin-dependent kinase 5 is involved in axonal regeneration. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 422-432.

Neumann, S., Bradke, F., Tessier-Lavigne, M., Basbaum, A.I., 2002. Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron.* 34, 885-893.

Nikolic, M., Dudek, H., Kwon, Y.T., Ramos, Y.F., Tsai, L.H., 1996. The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev.* 10, 816-825.

Ogata, T., Iijima, S., Hoshikawa, S., Miura, T., Yamamoto, S., Oda, H., Nakamura, K., Tanaka, S., 2004. Opposing extracellular signal-regulated kinase and Akt pathways control schwann cell myelination. *J. Neurosci.* 24, 6724-6732.

Ogata, T., Yamamoto, S., Nakamura, K., Tanaka, S., 2006. Signaling axis in schwann cell proliferation and differentiation. *Mol Neurobiol.* 33, 51-62.

Paglioni, G., Pigino, G., Kunda, P., Morfini, G., Maccioni, R., Quiroga, S., Ferreira, A., Caceres, A., 1998. Evidence for the participation of the neuron-specific CDK5 activator P35 during laminin-enhanced axonal growth. *J. Neurosci.* 18, 9858-9869.

Perlson, E., Hanz, S., Ben-Yaakov, K., Segal-Ruder, Y., Seger, R., Fainzilber, M., 2005 Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron.* 45, 715-726.

Resh, M.D., 1994. Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell.* 76, 411-413.

Sasaki, Y., Cheng, C., Uchida, Y., Nakajima, O., Ohshima, T., Yagi, T., Taniguchi, M., Nakayama, T., Kishida, R., Kudo, Y., Ohno, S., Nakamura, F., Goshima, Y., 2002. Fyn and Cdk5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex. *Neuron.* 35, 907-920.

Snider, W.D., Zhou, F.Q., Zhong, J., Markus, A., 2002. Signaling the pathway to regeneration. *Neuron.* 35, 13-16.

Terada, M., Yasuda, H., Kogawa, S., Maeda, K., Haneda, M., Hidaka, H., Kashiwagi,

A, Kikkawa, R., 1998. Expression and activity of cyclin-dependent kinase 5/p35 in adult rat peripheral nervous system. *J. Neurochem.* 71, 2600-2606.

Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yanai, S., Yamashita, N., Nakamura, F., Takei, K., Ihara, Y., Mikoshiba, K., Kolattukudy, P., Honnorat, J., Goshima, Y., 2005. Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes, Cells.* 10, 165-179.

Willis, D.E., Twiss, J.L., 2006. The evolving roles of axonally synthesized proteins in regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 111-118.

Yamamoto, S., Nagao, M., Sugimori, M., Kosako, H., Nakatomi, H., Yamamoto, N., Takebayashi, H., Nabeshima, Y., Kitamura, T., Weinmaster, G., Nakamura, K., Nakafuku, M., 2001a. Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 21, 9814-9823.

Yamamoto, S., Yamamoto, N., Kitamura, T., Nakamura, K., Nakafuku, M., 2001b. Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 172, 115-127.

Yiu, G., He, Z., 2006. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 617-627.

Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., Kaibuchi, K., 2005. GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell*. 120, 137-149.

Zhou, F.Q., Snider, W.D., 2005. Cell biology: GSK-3beta and microtubule assembly in axons. *Science*. 308, 211-214.

Zhou, F.Q., Zhou, J., Dedhar, S., Wu, Y.H., Snider, W.D., 2004. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron* 42, 897-912.

## 図 1. SMN の単離と BDNF 細胞内シグナルの活性化

(A) 胎生 14.5 日ラット脊髄腹側組織からの SMN の単離。同一視野の免疫染色蛍光像。回収した生細胞 (DAPI、青) 中に、TuJ1 陽性のニューロン (赤) さらには Islet1 陽性 SMN (緑) が含まれる (矢頭)。スケール：200 $\mu$ m。

(B、C) SMN における BDNF 細胞内シグナルの活性化。BDNF (50ng/ml) 存在下の培養 3 時間で、リン酸化された活性化型 ERK (B 上段、pERK、赤) と Akt (C 上段、pAkt、赤) が、SMN (B、C 下段、Islet1、緑) に発現している (矢頭)。さらに、MEK 阻害剤 U0126 (20 $\mu$ M)・PI3K 阻害剤 LY294002 (20 $\mu$ M) を添加すると、pERK・pAkt 発現は減弱した。DAPI (青) で生細胞の核を染色している。スケール：B、C (C に示す)、200 $\mu$ m。

図 2. BDNF による神経突起伸長に対する細胞内シグナル阻害剤の効果

(A) BDNF 存在下の SMN 神経突起とシグナル阻害剤の効果。BDNF 存在下あるいは MEK、PI3K、Gsk3 $\beta$ 、Cdk5 に対する各阻害剤 (U0126、LY294002、LiCl ; 2mM、roscovitin ; 10 $\mu$ M) を同時に添加した培養 24 時間での、Islet1 陽性 SMN (緑) の神経突起 (TuJ1、赤) を示している (矢頭)。DAPI (青) で生細胞の核を染色している。スケール : 200 $\mu$ m。

(B) BDNF 依存性神経突起伸長に対するシグナル阻害剤添加の効果。各条件下の全神経突起長を、NIH イメージソフトウェアを用いて計測し、比較している。5 回の独立した実験で各 20 細胞計測し、対照との比率を平均 $\pm$ 標準偏差で示している。\* : 対照比  $p < 0.01$ 。\*\* : BDNF 比  $p < 0.01$ 。



図 3. PI3K-Akt 経路の生存維持効果と突起伸長

(A) 核の fragmentation と Cleaved Caspase3 の発現。培養 72 時間での核 (DAPI、青) の fragmentation と Cleaved Caspase3 (赤) の発現 (矢頭)。スケール: 200 $\mu$ m。

(B) 細胞死に対する BDNF とシグナル阻害剤添加の効果。培養 72 時間で核の fragmentation を生じた細胞の割合を、BDNF 単独あるいは U0126・LY294002・Caspase 阻害剤 Z-VAD (40 $\mu$ M) を組み合わせて添加した条件間で比較している。3 回の独立した実験で各 100 細胞以上観察して、平均 $\pm$ 標準偏差で示している。\* : 対照比  $p < 0.01$ 。  
\*\* : BDNF 比  $p < 0.01$ 。

(C) 神経突起伸長に対する Caspase 阻害剤 Z-VAD の効果。培養 24 時間の SMN 全神経突起長を、Z-VAD 存在下で BDNF 単独あるいは LY294002 と組み合わせて添加した条件間で比較している。3 回の独立した実験で各 20 細胞計測して、対照との比率を平均 $\pm$ 標準偏差で示している。\* : 対照比  $p < 0.05$ 。\*\* : BDNF 比  $p < 0.05$ 。

#### 図4. 遺伝子導入による神経突起伸長

(A) 遺伝子導入された SMN の神経突起。恒常的活性化型 MEK・Akt (ca-MEK・myr-Akt) あるいは ca-MEK と恒常不活性化型 Cdk5 (dn-Cdk5) の組み合わせで、electroporation 法を用いて DsRED と共に培養細胞に遺伝子導入した。培養 48 時間の、DsRED (赤) を発現した Islet 陽性 SMN (緑) の神経突起 (TuJ1、青) を示している (矢頭)。スケール：200 $\mu$ m。

(B) 遺伝子導入による神経突起の伸長効果。各条件下の全神経突起長を計測し、各条件間で比較している。3 回の独立した実験で各 20 細胞計測して、対照との比率を平均 $\pm$ 標準偏差で示している。\* : 対照比  $p < 0.05$ 。\*\* : ca-MEK 比  $p < 0.01$ 。

(C) 遺伝子導入による神経突起数。培養 48 時間の神経突起数を、各条件間で比較している。3 回の独立した実験で各 20 細胞計測して、平均 $\pm$ 標準偏差で示している。

(D) 遺伝子導入による軸索の伸長効果。培養 48 時間の最長の神経突起、すなわち軸索の長さを計測し、各条件間で比較している。3 回の独立した実験で各 20 細胞計測して、対照との比率を平均 $\pm$ 標準偏差で示している。\* : 対照比  $p < 0.01$ 。

## 図 5. 神経軸索伸長におけるリン酸化 MAP1b の発現

(A、B) 培養 24 時間での神経突起とリン酸化 MAP1b の発現。BDNF 非添加群 (A) に比べ、BDNF 添加群 (B) のニューロン (TuJ1、赤) では、成長円錐 (矢頭) を含む伸長軸索にリン酸化 MAP1b (pMAP1b、緑) が発現している。DAPI (青) で生細胞の核を染色している。

(C、D) 遺伝子導入ニューロンにおけるリン酸化 MAP1b の発現。ca-MEK (C) あるいは myr-Akt (D) を、DsRED (赤) と共にニューロン (TuJ1、青) へ遺伝子導入し、48 時間培養した。ca-MEK 導入ニューロンでは、成長円錐 (矢頭) を含む伸長軸索に pMAP1b (緑) が発現している (C)。

スケール： A-D (D に示す)、200 $\mu$ m。

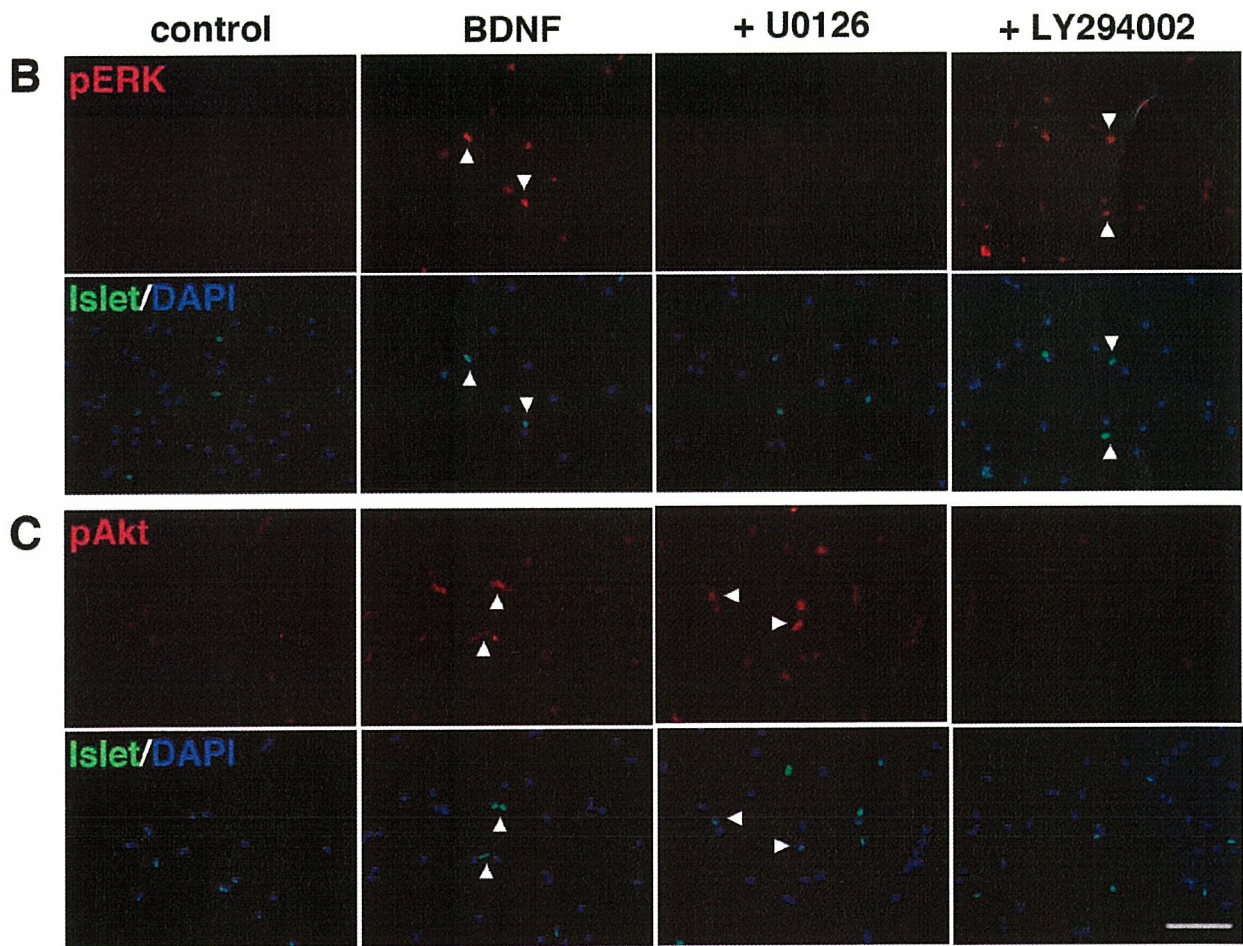
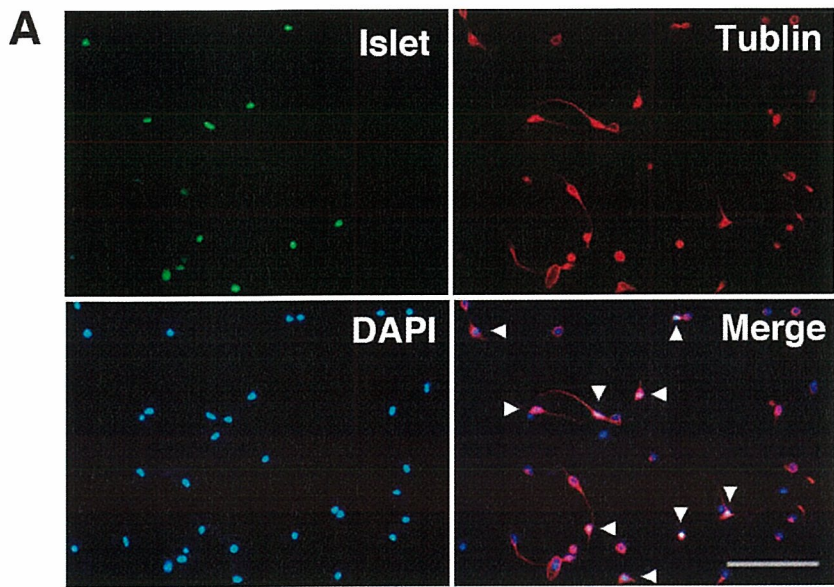


图 1