

業が医薬品開発を行う、このようなシステムを構築できれば停滞している我が国の創薬研究を活性化できると考えている。また各大学研究者が有する医薬品スクリーニング系は自身の基礎研究と直結しているので、その系に作用する医薬品を発見することは、大学研究者の基礎研究の発展にも貢献する。このように大学・企業のネットワークを用いてDR研究を行うことは様々な面で有用である。

- 1) Aburaya, M., Tanaka, K., Hoshino, T., Tsutsumi, S., Suzuki, K., Makise, M., Akagi, R., & Mizushima, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 33422–33432.
- 2) Tanaka, K., Tomisato, W., Hoshino, T., Ishihara, T., Namba, T., Aburaya, M., Katsu, T., Suzuki, K., Tsutsumi, S., & Mizushima, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 31059–31067.
- 3) Tsutsumi, S., Gotoh, T., Tomisato, W., Mima, S., Hoshino, T., Hwang, H.J., Takenaka, H., Tsuchiya, T., Mori, M., & Mizushima, T. (2004) *Cell Death Differ.*, **11**, 1009–1016.
- 4) Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Hwang, H.J., Mio, M., Tsuchiya, T., & Mizushima, T. (2004) *Biochem. Pharmacol.*, **67**, 575–585.
- 5) Yamakawa, N., Suemasu, S., Kimoto, A., Arai, Y., Ishihara, T., Yokomizo, K., Okamoto, Y., Otsuka, M., Tanaka, K., & Mizushima, T. (2010) *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 398–403.
- 6) Yamakawa, N., Suemasu, S., Matoyama, M., Kimoto, A., Takeda, M., Tanaka, K., Ishihara, T., Katsu, T., Okamoto, Y., Otsuka, M., & Mizushima, T. (2010) *J. Med. Chem.*, **53**, 7879–7882.
- 7) Yamakawa, N., Suemasu, S., Matoyama, M., Tanaka, K.-i., Katsu, T., Miyata, K., Okamoto, Y., Otsuka, M., & Mizushima, T. (2011) *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 3299–3311.
- 8) Mima, S., Tsutsumi, S., Ushijima, H., Takeda, M., Fukuda, I., Yokomizo, K., Suzuki, K., Sano, K., Nakanishi, T., Tomisato, W., Tsuchiya, T., & Mizushima, T. (2005) *Cancer Res.*, **65**, 1868–1876.
- 9) Hoshino, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hwang, H.J., Tsuchiya, T., & Mizushima, T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 12752–12758.
- 10) Namba, T., Homan, T., Nishimura, T., Mima, S., Hoshino, T., & Mizushima, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 4158–4167.
- 11) Mima, S., Takehara, M., Takada, H., Nishimura, T., Hoshino, T., & Mizushima, T. (2008) *Carcinogenesis*, **29**, 1994–2000.
- 12) Hoshino, T., Nakaya, T., Araki, W., Suzuki, K., Suzuki, T., & Mizushima, T. (2007) *Biochem. J.*, **402**, 581–589.
- 13) Hoshino, T., Nakaya, T., Homan, T., Tanaka, K., Sugimoto, Y., Araki, W., Narita, M., Narumiya, S., Suzuki, T., & Mizushima, T. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 32676–32688.
- 14) Hoshino, T., Namba, T., Takehara, M., Nakaya, T., Sugimoto, Y., Araki, W., Narumiya, S., Suzuki, T., & Mizushima, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 18493–18502.
- 15) Hoshino, T., Namba, T., Takehara, M., Murao, N., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Matsushima, T., Suzuki, T., & Mizushima, T. (2012) *J. Neurochem.*, **120**, 795–805.
- 16) Takehara, M., Hoshino, T., Namba, T., Yamakawa, N., & Mizushima, T. (2011) *Biochem. Pharmacol.*, **81**, 1124–1135.

水島 徹

(慶應義塾大学薬学部)

Novel pharmacological effects of NSAIDs and their molecular mechanism

Tohru Mizushima (Faculty of Pharmacy, Keio University, 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan)

神経軸索の再生における Dock3 の機能

1. はじめに

細胞骨格制御とそれによって引き起こされる細胞の運動は、基本的な生命現象の一つとして様々な細胞の機能に関わっている。たとえば免疫細胞の遊走、神経細胞の形態形成、さらにはがん細胞の浸潤・転移などにおいても、多くの役割をはたすことが明らかとなっている。なかでも細胞骨格のひとつであるアクチン骨格は、細胞の動的な形態変化を引き起こす中心的な役割を担っている。運動している細胞の先端では急速なアクチンの重合が起こり、運動の駆動力を生み出す細胞の突起が形成される。このようなアクチン骨格の再編成は、主に Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 (Rac1, Cdc42, RhoA など) によって制御されている。たとえば Rac1 が細胞の先端部で活性化すると平板な葉状仮足 (ラメリポディア) が形成されて駆動力が生まれ、Cdc42 が活性化すると糸状仮足 (フィロポディア) が形成されて細胞の進行方向を探る。こうした機能は神経細胞でも重要であり、外界からの刺激に応じて形態を変化させることにより、細胞極性や軸索伸長にも関与すると考えられている。

一方、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の活性を制御する分子としてグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) が知られている。つまり細胞は GEF の活性を調節することによってアクチン骨格の動態を制御することになる。GEF はこれまでに約 80 種類が知られているが、近年新しいタイプの GEF として Dock ファミリー分子が発見された (図 1)¹⁾。現在では Dock ファミリー分子の解析が進み、様々な疾患への関与も指摘されつつある。興味深いことに Dock ファミリー分子の中で中枢神経に特異的に発現するのは Dock3 のみであることから、著者らのグループを含め、いくつかの研究

Dock family	分子構造	活性化する Gタンパク質	Dock1との 相同性	主な機能と 関連する疾患
Dock-A	Dock1	Rac1	100 %	赤痢菌感染、がん、喘息
	Dock2	Rac1	59%	リンパ球の走化性
Dock-B	Dock3	Rac1	35%	アルツハイマー病、注意欠陥・多動性障害
	Dock4	Rac1	36%	アッシャー症候群、がん
	Dock5	Rac1	64%	骨形成
Dock-C	Dock6	Rac1/Cdc42	13%	アダムズ・オリバー症候群
	Dock7	Rac1/Cdc42	11%	神経細胞の極性、オリゴデンドロサイトの走化性
	Dock8	Rac1/Cdc42	12%	複合免疫不全、精神発達遅延
Dock-D	Dock9	Cdc42	11%	神経細胞の樹状突起形成
	Dock10	Cdc42	12%	がん
	Dock11	Cdc42	11%	不明

図1 Dockファミリー分子の構造と疾患との関係

Dockファミリー分子には四つのサブタイプがあるが、相同性は高くはない。現在は機能解析も進み、様々な疾患との関与が報告されている。

SH3, Src homology 3 domain; DHR, Dock homology region; PxxP, SH3 binding motif; PH, pleckstrin homology domain.

グループによってその機能解析が進められている。そこで本稿では Dock3 による神経軸索伸長の分子メカニズムを中心に、最近の知見を紹介したい。

2. Dockファミリー分子

GEF分子は以前から良く知られている Double-homology domain (DHドメイン)を持つグループと、Dock homology region (DHR)と呼ばれる独自の活性化領域を持つグループに大別される。このうち後者は Dockファミリーとよばれる分子量 180-240 kDa の分子ファミリーで、これまでにヒトでは 11 種類 (Dock1~11) が同定されており、サブファミリーとして Dock-A, B, C, D に分類されている (図1)¹⁾。全ての Dockファミリーメンバーは、DHR-1 および DHR-2 の 2 種類の DHR 領域を持つ。このうち DHR-2 のみが GEF 活性を担っており、Dock1~5 は Rac1 を、Dock9~11 は Cdc42 を活性化することができる。一方 Dock6~8 は、これまで Rac1 と Cdc42 の両者を活性化すると考えられていたが、最近ではそのいずれにも結合しない可能性が報告され、今後の詳細な解析が待たれる状況にある。Dockファミリー分子は様々な臓器や細胞に発現しており、*in vivo* における生体機能が徐々に明らかとなりつつある。たとえば Dock1 (Dock180) はアポトーシス細

胞の貪食や筋芽細胞の融合などに重要な役割を持ち、そのシグナルネットワークに関して国内外の研究者によって多くの研究がなされている²⁾。また Dock2 はリンパ球の走化性に、Dock4 は様々ながんの発生や転移に関与することが報告されている³⁾。中枢神経系においても Dockファミリー分子が軸索ガイダンス、神経細胞の極性決定、オリゴデンドロサイトの走化性などに影響を与えることが報告されている^{4,5)}。最近のトピックスとして、2009 年にはヒト Dock8 の欠損が複合免疫不全を引き起こすことが判明した⁶⁾。さらに Dockファミリー分子は赤痢菌感染、がん、喘息、アルツハイマー病、注意欠陥・多動性障害、アダムズ・オリバー症候群など多様な疾患に関与することが推定されており、Dockファミリー分子の制御機構の理解が疾患治療へ発展する可能性が示唆される。このように生体における Dockファミリー分子の生理活性は多岐に渡っており、更なる解析によりその重要性が益々明らかになると思われる。

3. 神経組織における Dockファミリー分子の機能

このような Dock family のうち Dock3 は Modifier of cell adhesion protein (MOCA) または presenilin binding protein (PBP) の別名を持ち、アルツハイマー病の原因遺伝子産

物であるプレセニリンに結合する新規タンパク質として発見された。また Dock3 は amyloid precursor protein (APP) の分解を促進することやアルツハイマー病患者の脳で減少することが報告されたが、その後の解析は進んでおらず、病態との関係にはまだ不明な点が多い⁷⁾。我々は Dock3 が中枢神経系のみならず分布する唯一の Dock ファミリー分子であり、Rac1 を特異的に活性化する GEF であることを報告した⁸⁾。さらに Dock3 をマウス海馬の初代培養細胞に過剰発現させ、Dock3 が軸索伸長効果を有することを見出した。Dock3 による軸索伸長には、強力な神経栄養因子である brain-derived neurotrophic factor (BDNF) との相乗効果が確認された⁹⁾。BDNF は脳の発生や学習・記憶といった高次機能にも関与することから、Dock3 欠損マウスにおいては神経軸索の形成不全など、重篤な phenotype があるものと予想された。その後の検討により、確かに Dock3 欠損マウスでは運動学習能力の低下が確認されたが、意外なことに病理学的な軸索変性は軽微なものしか検出されなかった¹⁰⁾。この原因としては DHR-2 領域内に存在する活性中心が Dock1~4 でほぼ共通していることが考えられる⁹⁾。これに関係して PC12 細胞においては、Dock1 がアダプタータンパクである Elmo や RhoG と複合体を形成することにより、突起伸長を促進すると報告されている²⁾。また活性中心のアミノ酸配列を変異させた Dock1~4 では Rac1 活性が大幅に低下し、軸索伸長効果も著しく減少していた⁹⁾。それでは神経系における Dock3 の軸索伸長のメカニズムとはどのようなものであろうか？

4. Dock3 による軸索伸長のメカニズム

一般的に GEF によって活性化された Rac1 はアダプタータンパクである IRSp53 を介して WASP family verprolin-homologous protein (WAVE) と呼ばれるタンパクと複合体を形成し、WAVE を活性化状態にする。さらに活性化 WAVE は Arp2/3 複合体と結合することによりアクチン重合を促進し、葉状仮足を形成することが知られている¹¹⁾。著者らは研究の過程で Dock3 が細胞膜上の Rac1 を活性化するだけでなく、細胞質中の WAVE を Rac1 近傍へ輸送する可能性を見出した。Dock3 は BDNF の刺激によって成長円錐の細胞膜に輸送されるが (図 2A)、この時点では WAVE と複合体を形成している。しかし細胞膜上で Rac1 を活性化すると同時に、自身がリン酸化修飾を受けることにより WAVE を解離することがわかった。つまり Dock3 は自ら Rac1 活性を高めるだけでなく、細胞膜近傍に WAVE を供給するという二つの機構で効率良くアクチン

骨格の重合と軸索伸長を促進している可能性がある (図 2B, 左側の経路)⁹⁾。また Dock3 と WAVE の結合には DHR-1 領域が必要であることも明らかとなった (図 3B)。DHR-1 はフォスファチジルイノシトール 3-リン酸と結合することにより Dock ファミリー分子を細胞膜へ局在化することも報告されており、DHR-1 には複数の機能があることが推測される¹²⁾。

軸索の伸長に深く関わる細胞骨格としては、アクチン骨格の他にチューブリン分子によって構成される微小管が知られている。アクチン骨格は成長円錐の細胞膜近傍で機能するが、微小管は神経軸索内部で束化した状態で存在しており、その重合状態が軸索の伸長に影響を与える。微小管の重合・脱重合のバランスはチューブリンに結合するタンパク質 [タウタンパクや collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) など] によって調節されている。一方セリン/スレオニンキナーゼであるグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3β (glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β) は CRMP-2 のリン酸化を介して神経極性を制御することから、軸索伸長メカニズムへの関与が推定される¹³⁾。最近になって GSK-3β は Dock3 と細胞膜上で複合体を形成し、同じセリン/スレオニンキナーゼである Akt によって Ser9 部位がリン酸化され、不活性化されることがわかった¹⁴⁾。この Dock3 を介した GSK-3β の不活性化は CRMP-2 に加えて adenomatous polyposis coli (APC) の活性化を誘導しており、微小管の重合促進による軸索伸長効果を示した (図 2B, 右側の経路)¹⁴⁾。Dock3 によるアクチン細胞骨格の重合には GEF 活性が必要であったが、GSK-3β を介した微小管重合においては GEF 活性が関与しないことも判明した。以上から Dock3 は GEF 活性非依存的な経路によっても細胞骨格の制御が可能であることが示された。

5. Dock3 による軸索再生研究

神経軸索の変性は多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病などの神経変性疾患において広く認められ、病態との関連が活発に研究されている。このような軸索変性を主要な病態とする疾患の中に、我が国における最大の失明原因である緑内障が存在する。緑内障においては視神経変性とそれに伴う視野障害 (見える範囲が狭まる) が問題となっている。一方、緑内障の進行は極めて緩徐であり、視神経変性が始まっても一定期間は網膜神経節細胞の細胞体は正常であると考えられている。したがって細胞体が消失する前に軸索伸長を誘導できれば、新たな治療法につながる可能性がある。そこで

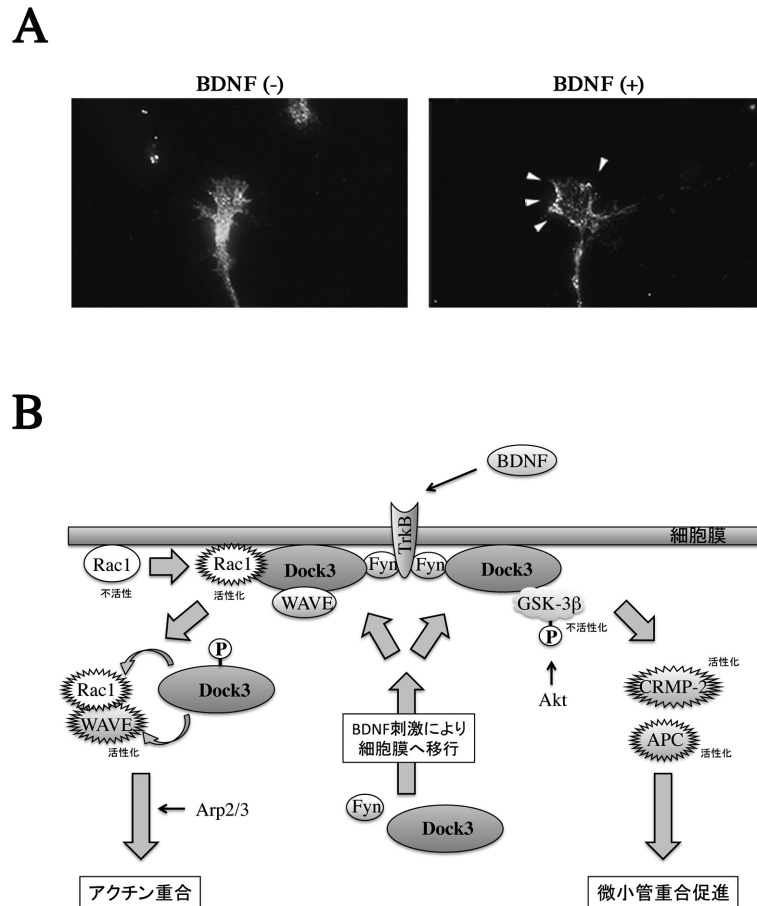


図2 BDNFによるDock3を介したアクチンおよび微小管の重合促進
 (A) 初代培養した海馬神経細胞にBDNFを投与すると、Dock3は細胞膜に集積する。
 (B) BDNFはその高親和性受容体であるTrkBとFynの結合を促進し、Fynを活性化することで、細胞質中に存在するDock3を細胞膜へ移動させる。Dock3はRac1の活性化を引き起こすだけでなく、細胞膜付近でWAVEを解離することで、Arp2/3の活性化を促進する。さらにGSK-3βと結合することにより、Rac1活性を介さない微小管の重合が可能である。

Dock3の遺伝子過剰発現マウスを作製して視神経損傷実験を行ったところ、野生型マウスよりも視神経の再生が有意に亢進することがわかった(図3A)⁹⁾。さらに再生中の視神経軸索においてはリン酸化GSK-3βの発現が増大していた。以上からDock3はGEF活性依存および非依存な複数の経路を介して、アクチンと微小管それぞれの細胞骨格を制御することによって視神経軸索の伸長を促進することが示された(図3B)。当研究室では日本人の緑内障の7割を占める「正常眼圧緑内障」に関して、世界初の疾患モデル動物を確立している¹⁵⁾。現在はこの緑内障モデルに加えアルツハイマー病の疾患モデルを用いてDock3遺伝子

治療の有用性を検討しており、今後も様々な神経変性疾患への治療応用を目標に研究を進展させたい。

6. おわりに

これまでDockファミリー分子の機能解析は培養細胞など*in vitro*での検討が中心に行われてきた。最近ではDock1やDock2を中心に遺伝子改変マウスを用いた*in vivo*解析の成果が報告されているが、多くのDockファミリー分子においては、本格的な機能解析はまだこれからという段階にある。今後はDockファミリー分子の機能解明が進み、各種疾患における新たな病態メカニズムの理解や新規治療法

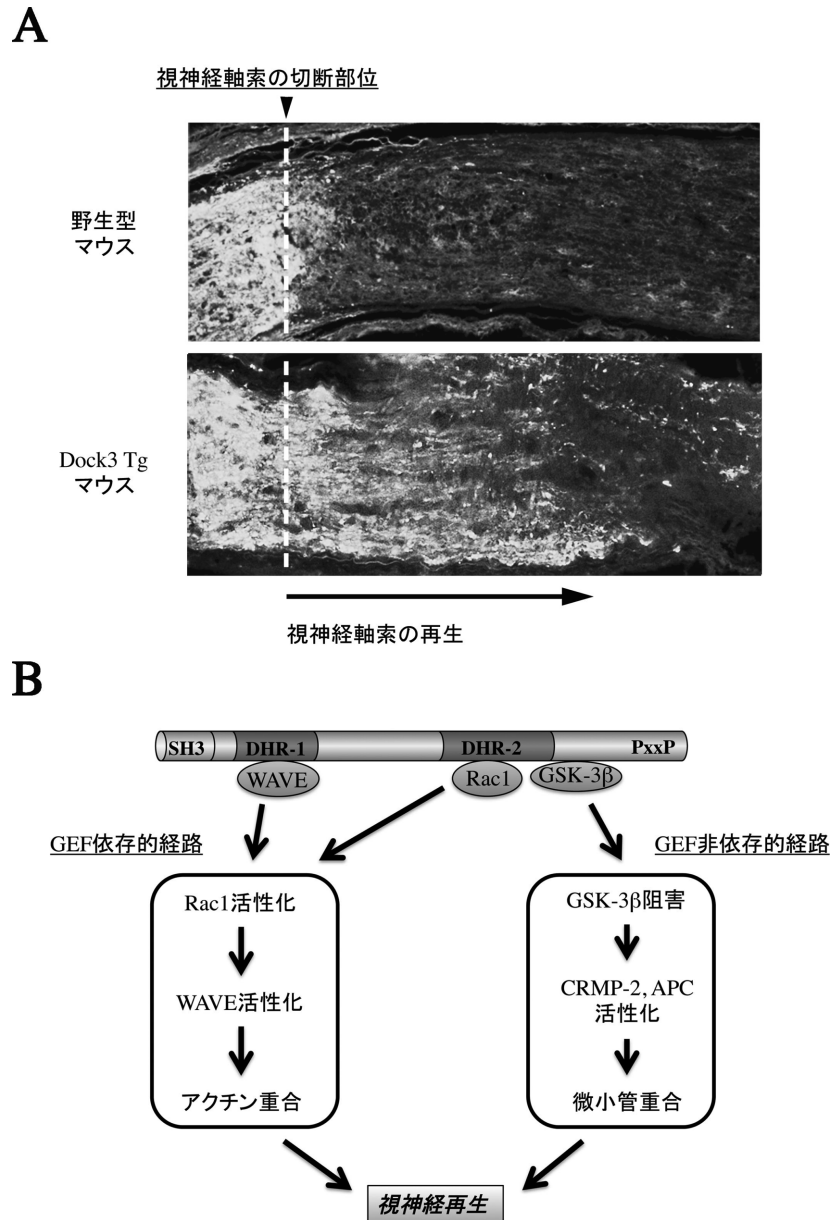


図3 Dock3による軸索再生のメカニズム

(A) Dock3 過剰発現マウスにおける視神経外傷後の軸索再生の亢進。

(B) Dock3 結合分子と軸索再生への関与。Dock3 は異なる部位に結合するタンパク質を使い分けて GEF 活性依存のおよび非依存的経路を駆使することにより、効率良く軸索伸長を促進すると考えられる。

の開発に結びつくことが期待される。iPS 細胞等による神経再生療法が現実味を帯びてきた現在、細胞体生着後の軸索再生が大きな課題となることは自明であることから、我々もこの点についてさらに検討を進めていきたいと考えている。

- 1) Côté, J.F. & Vuori, K. (2007) *Trends Cell Biol.*, 17, 383–393.
- 2) Katoh, H. & Negishi, M. (2003) *Nature*, 424, 461–464.
- 3) Nishikimi, A., Fukuhara, H., Su, W., Hongu, T., Takasuga, S., Mihara, H., Cao, Q., Sanematsu, F., Kanai, M., Hasegawa, H., Tanaka, Y., Shibasaki, M., Kanaho, Y., Sasaki, T., Frohman, M.A., & Fukui, Y. (2009) *Science*, 324, 384–387.

- 4) Li, X., Gao, X., Liu, G., Xiong, W., Wu, J., & Rao, Y. (2008) *Nat. Neurosci.*, **11**, 28–35.
- 5) Watabe-Uchida, M., John, K.A., Janas, J.A., Newey, S.E., & Van Aelst, L. (2006) *Neuron*, **51**, 727–739.
- 6) Zhang, Q., Davis, J.C., Lamborn, I.T., Freeman, A.F., Jing, H., Favreau, A.J., Matthews, H.F., Davis, J., Turner, M.L., Uzel, G., Holland, S.M., & Su, H.C. (2009) *N. Engl. J. Med.*, **361**, 2046–2055.
- 7) Kashiwa, A., Yoshida, H., Lee, S., Paladino, T., Liu, Y., Chen, Q., Dargusch, R., Schubert, D., & Kimura, H. (2000) *J. Neurochem.*, **75**, 109–116.
- 8) Namekata, K., Enokido, Y., Iwasawa, K., & Kimura, H. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 14331–14337.
- 9) Namekata, K., Harada, C., Taya, C., Guo, X., Kimura, H., Parada, L.F., & Harada, T. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **107**, 7586–7591.
- 10) Chen, Q., Peto, C.A., Shelton, G.D., Mizisin, A., Sawchenko, P.E., & Schubert, D. (2009) *J. Neurosci.*, **29**, 118–130.
- 11) Takenawa, T. & Suetsugu, S. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 37–48.
- 12) Côté, J.F., Motoyama, A.B., Bush, J.A., & Vuori, K. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 797–807.
- 13) Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., & Kaibuchi, K. (2005) *Cell*, **120**, 137–149.
- 14) Namekata, K., Harada, C., Guo, X., Kimura, A., Kittaka, D., Watanabe, H., & Harada, T. (2012) *J. Neurosci.*, **32**, 264–274.
- 15) Harada, T., Harada, C., Nakamura, K., Quah, H.M., Okumura, A., Namekata, K., Saeki, T., Aihara, M., Yoshida, H., Mitani, A., & Tanaka, K. (2007) *J. Clin. Invest.*, **117**, 1763–1770.

行方 和彦, 原田 高幸

(東京都医学総合研究所 視覚病態プロジェクト)

The role of Dock3 in axonal regeneration
Kazuhiko Namekata and Takayuki Harada (Visual Research
Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-
1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan)