東海大学紀要工学部
Vol.56,No1,2016,pp.67-73

マイクロ流体デバイスを用いたALS疾患モデルの開発

荒木　良介[*1]　大友　麻子[*2]　和田　純希[*3]　石田　智行[*3]　横山　奨[*4]
秦野　伸二[*5]　木村　啓志[*6]

Development of a Novel ALS Model *in vitro* by Using a Microfluidic Device-Based Cell Culture System

by

Ryosuke ARAKI[*1], Asako OTOMO[*2], Junki WADA[*3], Tomoyuki ISHIDA[*3], Sho YOKOYAMA[*4], Shinji HADANO[*5] and Hiroshi KIMURA[*6]

(Received on Mar. 31, 2016 and accepted on May 12, 2016)

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease characterized by loss of upper and lower motor neurons. We have previously reported that autophagosome-like structures with membrane whorls are accumulated in the spinal axons of a $SOD1^{H46R}$ transgenic mouse ALS model as disease progresses. Further, several recent studies on the pathogenesis of familial ALS caused by mutations in *SOD1*, *ALS2*, *SQSTM1*, *TDP-43*, and *OPTN* have revealed deficits in the autophagy-endolysosomal pathway. These findings suggest that defects in autophagy might be implicated in the pathogenesis of ALS. However, the exact causal relation between neuronal deficit and inefficient autophagosome transport in diseased neurons is still unknown. In this study, we used a microfluidic device that allows simultaneous detection of vesicular transport in multiple axons to precisely monitor the axonal transport and dynamics of acidic vesicles including autophagosomes in living neurons. Our results suggest that there is a deficit in acidic vesicle transport in ALS-diseased neurons.

Keywords: Microfluidic device, ALS, Neuron, Axon, Axonal transport, Autophagy

1. 緒言

神経細胞は，細胞核を持つ細胞体と細胞体から枝のように伸びている突起状の樹状突起，細胞体から1本だけ樹状突起より長く伸びる軸索で構成されている[1,2]．樹状突起と軸索では，役割が異なり，軸索は神経細胞と神経細胞を結ぶケーブルのようなもので，情報伝達の役割を有し，樹状突起は他の神経細胞軸索からの情報を受け取り細胞体へと伝える機能を持つ（Fig.1）．

神経細胞のうち，運動機能を司る細胞が変性することにより発症する難病に筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis：ALS）がある．ALSは上位および下位運動ニューロンの選択的変性を伴う進行性の神経変性疾患である[3]．ALSの発症機序の解明を目指した研究がなされているが，その機序は明らかにされていない．しかし，近年の研究により，ALSの発症や進行に神経細胞内のオートファジー（自食作用）を介したタンパク質分解経路の障害や変調が関与すると示唆されている[4-7]．2010年にHadanoらは，ALS疾患（$SOD1^{H46R}$）のマウスモデル[8]の脊髄に存在する神経細胞の軸索内において自食作用によって作られるオートファゴソーム様の多重膜構造物が疾患の進行に伴って蓄積することを見出し報告した（Fig.1（B））[9]．また，ALS患者においても同様な部検像が報告されている[10]．これらの組織学的な変化は，オートファゴソームの軸索内での輸送障害の結果であると示唆されるが，その実態は明らかにされていない．

近年の神経細胞の軸索輸送に関する研究は，培養皿を用いた神経細胞の分散培養によってなされてきた[11]．しかし，培養皿上での分散培養では，神経細胞の樹状突起と軸索を区分けする極性制御が不可能であるため，解析手法は煩雑で限定的であった．そこで，神経細胞の極性制御を可能とする培養器としてマイクロ流体デバイスが注目され[12]，2003年にTaylorらによって神経細胞の細胞体と神経突起を区分けするマイクロ流体デバイスが報告された[13]．マイクロ流体デバイスは半導体微細加工技術により，流路や反応容器をマイクロスケールで作製可能であるため，細胞の培養面積や刺激および細胞極性を制御するのに有用である．2006年にはTaylorらによって神経細胞の極性制御を可能とするマイクロ流体デバイスのデザインが報告され[14]，このデバイスデザインを基に作製されたマイクロ流体デバイスを用いて神経細胞を対象

*1　工学研究科機械工学専攻修士課程
*2　医学部基礎医学系分子生命科学助教授
*3　工学部機械工学科学部生
*4　マイクロ・ナノ研究開発センター特定研究員
*5　医学部基礎医学系分子生命科学教授
*6　工学部機械工学科准教授

とした研究がされてきた[15-17]．しかし，マイクロ流体デバイスを用いた ALS 疾患の発症機序解明に迫る研究に関しては，2015 年の Kunze らおよび Feiler らの報告のみである[18,19]．

マイクロ流体デバイスを用いた ALS 疾患研究の現状が示すように，神経疾患研究へのマイクロ流体デバイスの導入とそれらを用いた評価系の確立はまさに初歩段階にある．実験条件の均一さやハイスループット性が求められる疾患研究や薬剤スクリーニングにおいてマイクロ流体デバイスの利用は，それらのアッセイを発展させる大きな可能性を持つ．現段階では，前述のようにマイクロ流体デバイスを神経疾患研究へ導入した例は限定されている．そこで，本研究では初代培養神経細胞を用い，マイクロ流体デバイスを用いた細胞極制御および軸索輸送の定量的評価方法の開発を行い，神経軸索内における酸性小胞の輸送動態を ALS マウスモデル（$SOD1^{H46R}$）由来の初代培養神経細胞と野生型由来の初代培養神経細胞の間で比較した．また，その結果を解析し，本研究で使用したマイクロ流体デバイスを用いた軸索輸送解析システムが，新しい *in vitro* ALS 疾患モデルとして提唱できるのかを考察した．

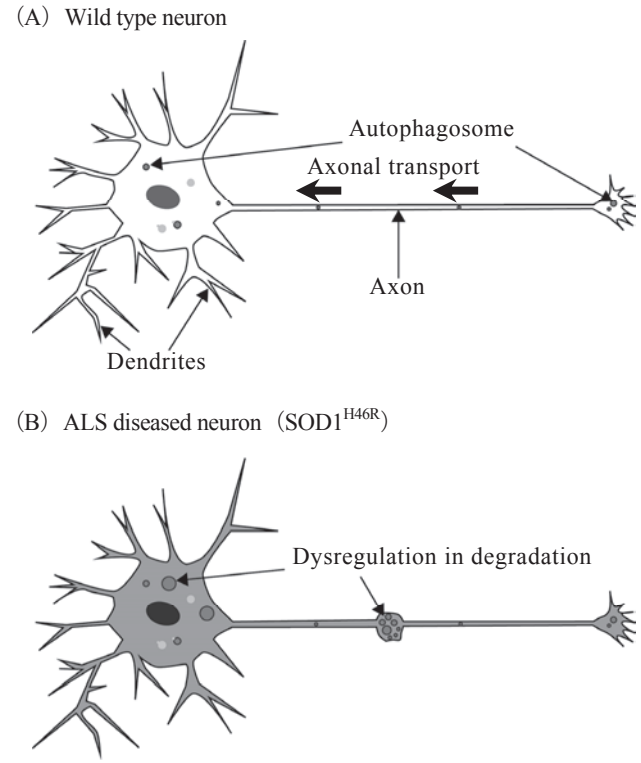


Fig.1 Autophagosome dynamics in WT and ALS diseased neurons.

2．神経極性制御デバイス

培養皿に野生型マウス胎児（胎生 14.5 日目; E14,5）大脳皮質由来初代培養神経細胞を播種し，培養後 7 日後に顕微鏡によってその形態を観察した．Fig.2（A）は培養皿上の神経細胞を位相差で観察した顕微鏡の写真である．また，細胞骨格を構成する重合アクチンに対し，高い結合親和性を示すヘプタペプチドである Phalloidin に赤色蛍光色素を標識した Alexa Fluor Phalloidin 594（Thermofisher Scientific）[20]を添加し，アクチン骨格を標識した後に蛍光顕微鏡で観察した写真を Fig.2（B）に示す．Fig.2 より，神経突起が重なり一細胞の形態観察が困難であること，また，軸索と樹状突起の判別が困難であることが確認された．よって，本研究の目的である軸索輸送観察を達成するためには，神経細胞の樹状突起と軸索を区

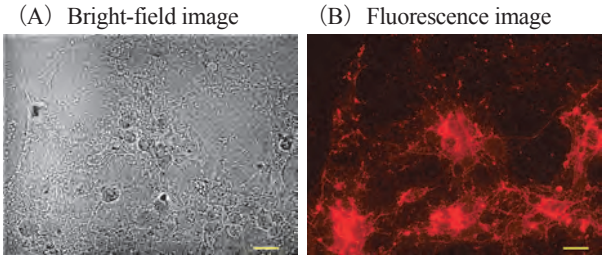


Fig.2 Primary cultured neurons on a dish.（A）：Bright-field image of primary cultured cortical neurons（DIV7）.（B）：Fluorescence image of Fig.2（A）. Red signals show actin（cytoskeleton）. Scale bar = 20 μm.

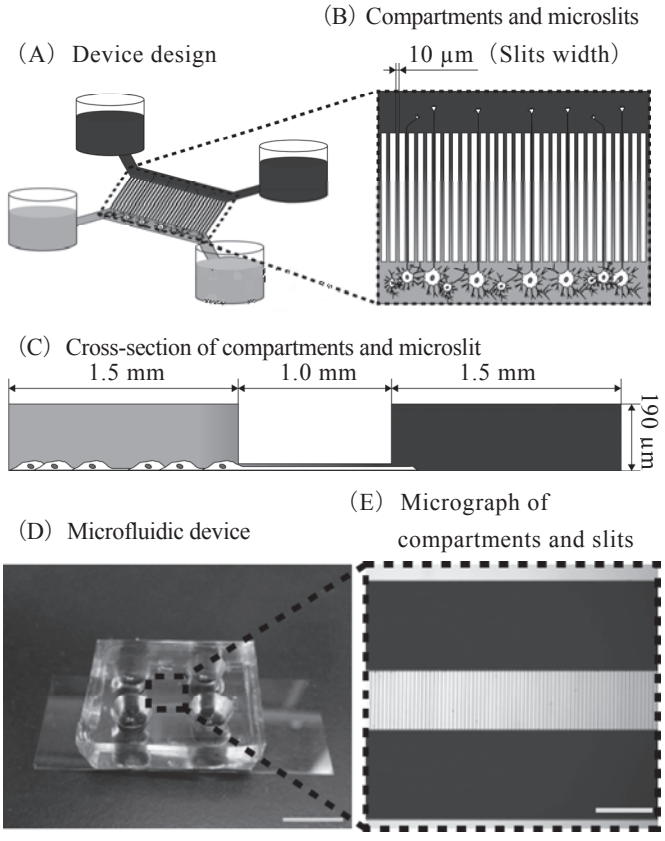


Fig.3 Microfluidic device controlling nerve outgrowth.（A）：Design of microfluidic device nerve outgrowth.（B）：High magnified image of compartments and maicroslits.（C）：Cross-section diagram of Fig.2（B）.（Maicroslits：width = 10 μm, length = 1,000 μm, height = 4.5 μm, Axonal and somal compartment：width = 1.5 mm, length = 7 mm, height = 190 μm）.（D）Image of microfluidic divice. Scale bar = 500 μm.（E）：

High magnified micrograph of compartments and maicroslits. Scale bar = 1.0 mm.

分けする細胞極性の制御が必要であることは明確である．

これらの問題を解決するために Taylor らの作製したマイクロ流体デバイスに注目した[13]．Taylor らによって報告された神経細胞の培養と極性制御を実現するマイクロ流体デバイスのデザインを Fig.3（A）に図示する．それを基に作製した本デバイスは細胞体区画と軸索区画，それら 2 つの区画を繋ぐ微小流路で構成されている（Fig3（B））．神経細胞を細胞体区画に播種し，神経栄養因子（NF ; Neurotrophic factor）を軸索区画に添加する．軸索先端部の成長円錐は NF によって方向づけられることが知られている[21,22]．NF が軸索区画から微小流路を通り，細胞体区画に拡散することで細胞体から伸長した軸索のみが微小流路を通じて軸索区画へと伸長することを想定している（Fig.3（C））．従って，細胞の極性制御と軸索内の膜小胞の動態観察を可能とするデザインとなっている．微小流路内への神経細胞の侵入を防ぐために，流路幅は 10 μm，高さは 4.5 μm で作製した．また，樹状突起は 450 μm 以上の長さにならず[14]，1,000 μm 以上ある神経突起は軸索であると言えるので[23]，微小流路の長さは 1,000 μm とした．このデバイスはポリジメチルシロキサン（PDMS）により流路を形成した PDMS チップとカバーガラスで構成されている．本研究では，デバイス内播種後の神経細胞軸索における小胞の輸送を観察可能とするため，170 μm 以下の厚さを持つカバーガラス（24×60 mm，Thickness No.1，松浪硝子工業株式会社）上にデバイスを接合した．実際に作製したデバイスを Fig.3（D）に示す．

3. 神経極性制御デバイスの機能評価

3.1　微小流路の物質拡散評価

本デバイスの微小流路部の機能評価を行うために，蛍光試薬を用いて NF の拡散を模倣した．蛍光試薬は 595 nm を最大励起波長として赤色蛍光を発する Texas Red を標識した MW70,000 の Dextran（Thermofisher Scientific）を用いた．Dextran Texas Red を軸索区画に終濃度 20 μM となるように添加し，添加後から 4 時間毎に 24 時間撮影した（BZ-9000 ，KEYENCE）．Fig.5（A）に微小流路から各時間に取得した Dextran Texas Red の物質拡散のイメージシリーズを示す．Fig.4（B）は 0 時間の軸索区画の一定面積あたりの蛍光輝度の平均値を 1 とし，細胞体区画のそれを 0 とした．各時間の軸索区画，微小流路および細胞体区画における蛍光輝度の推移を示したグラフである．Fig.4（A）より，軸索区画に添加した Dextran Texas Red は微小流路内を介して細胞体区画に拡散していることが分かる．これは，Fig.4（B）の軸索区画の蛍光輝度が添加直後から 24 時間後で下がっていることからも分かる．しかし，細胞体区画の蛍光輝度の推移が微小であるため細胞体区画への物質拡散には時間を要することが示唆された．従って，NF を軸索区画に添加し物質拡散に依存した NF の濃度差を微小流路内に 24 時間維持することが出来ること，またそれにより軸索先端部の成長円錐を微小流路内に誘引可能であることが示唆された．

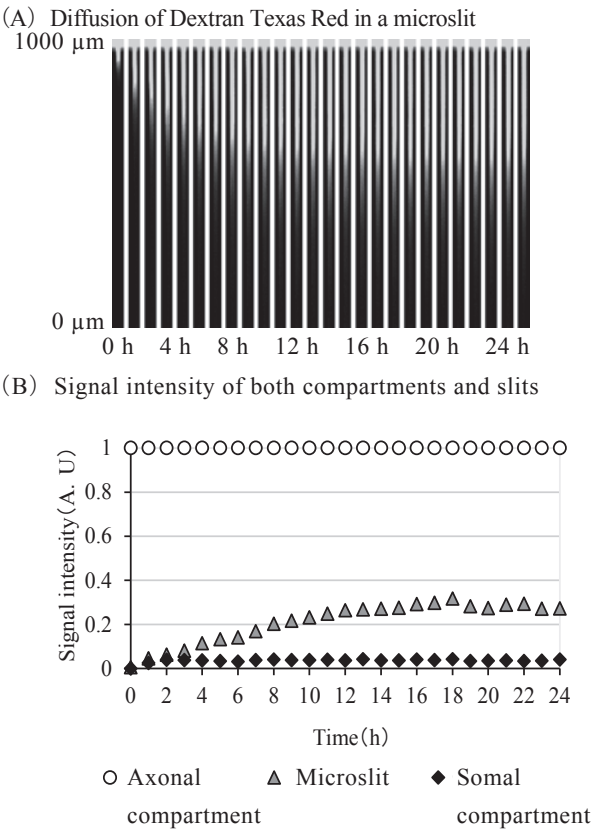


Fig.4 Confirmation of diffusion in microslit.（A）：Image series of diffused Dextran Texas Red in a microslit.（B）：Graph of signal intensity every 1 hour in axonal compartment，somal compartment and microslits.

3.2　神経極性制御の評価

本デバイスが極性制御の機能を有するか評価するために，野生型マウス胎児（E14,5）大脳皮質由来神経細胞を本デバイス内で初代培養し，デバイス内で培養開始後 16 日目に免疫染色を行った．軸索区画には神経栄養因子の 1 つである Brain-derived neurotrophic factor（BDNF）を 1 ng/ml で添加し培養した．

免疫染色は，一次抗体として β-tubulin Ⅲ（神経細胞体および軸索に特異的なタンパク質）と MAP2（樹状突起に特異的なタンパク質）を特異的に認識する抗体を用いてデバイス内での抗原抗体反応を行った．次に 488 nm を最大励起波長として緑色蛍光を発する Alexa Flour 488 を標識した抗体を二次抗体として用い，一次抗体と同様にデバイス内で抗原抗体を行った．同時に 594 nm を最大励起波長として赤色蛍光を発する Alexa Fluor 594 を標識した抗体を二次抗体として用いた．本デバイスの区画および微小流路の神経細胞の動態を共焦点レーザー顕微鏡（LSM700，ZEISS）によって撮影した．その結果を Fig.5 に示す．

Fig.5（B-1）～（B-3）より，β-tubulin Ⅲの緑色のシグナルは軸索区画，微小流路および細胞体区画に確認できた．しかしながら，MAP2 の赤色のシグナルは軸索区画と微小流路に

は確認できず，細胞体区画にのみに確認できた．また，Fig.5（B）より，MAP2 のシグナルが軸索区画より細胞体区画の方

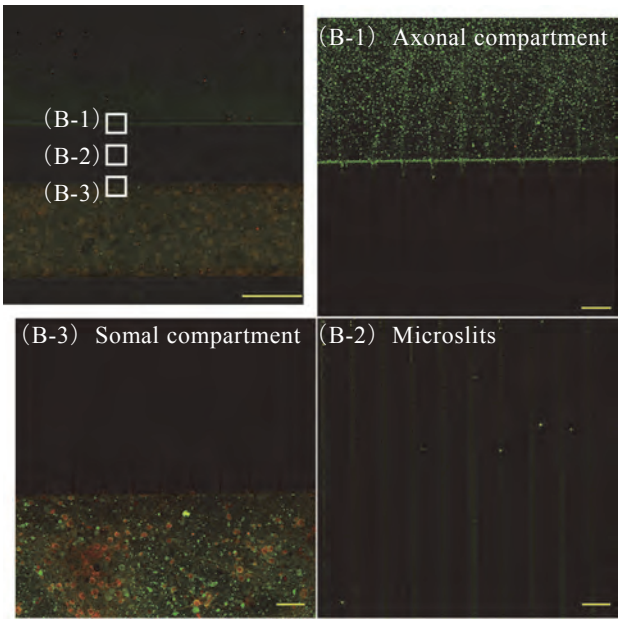


Fig.5 Confirmation of axonal elongation into axonal compartment through microslits.（A）：Observed area of compartments and microslits. Scale bar = 1.0 mm.（B-1）：High magnified fluorescence image of Axonal compartments. Scale bar = 10 μm.（B-2）：High magnified fluorescence image of Somal compartments.（B-3）：High magnified fluorescence image of microslits.

が強いことから，軸索と樹状突起の区分け培養が可能であることが示された．従って，本デバイスは神経細胞の極性制御の機能を有することが確認された．

4．神経極性制御デバイスを用いた酸性小胞の軸索内動態解析

本デバイスを用いて野生型マウス胎児（E14.5）の大脳皮質由来神経細胞を初代培養し，培養 7 日後に蛍光顕微鏡システム（BZ-9000，KEYENCE）を用いて小胞の動態をリアルタイムで観察した．酸性小胞を標識する LysoTracker を用いて標識した[24-26]後に，に軸索区画付近の微小流路 Fig.6（A）および，細胞体区画の中央部 Fig.6（B）を観察した結果を示す．Fig.6（A）は細胞体区画から 900 μm，軸索区画から約 100 μm 付近を観察した．そのため，この微小流路内に見られる小胞は軸索内の酸性小胞である．

Fig.6（B）は，細胞体区画の中央部を示し，細胞体区画では培養皿上と同様に神経突起が重なりあっているため，軸索内酸性小胞の同定は困難であった．本研究では，Fig.6（A）に示した微小流路の軸索区画から約 100 μm 付近に観察部位を限定し，酸性小胞のリアルタイム観察を行った．Fig.7 に観察領域と解析領域，また，それらから作成した Kymograph を示す．Fig.7（A）は BZ-9000（KEYENCE）の油浸の 100 倍レンズで観察できる領域であり，実際に取得できる動画の全域である．Fig.7（B）は Kymograph を作成する際に使用した解析領域（ROI；Region Of Interest，1.6 μm x 89 μm）を示す．Fig.7

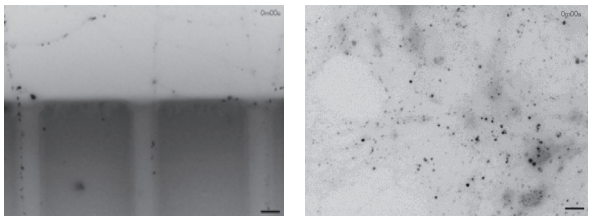


Fig.6 Acidic（LysoTracker positive）vesicles in microfluidic device.（A）：Acidic vesicles in axons in axonal compartment. Scale bar = 10 μm.（B）：Acidic vesicles in axons in neurites in middle of somal compartment similar to culture dishes condition.

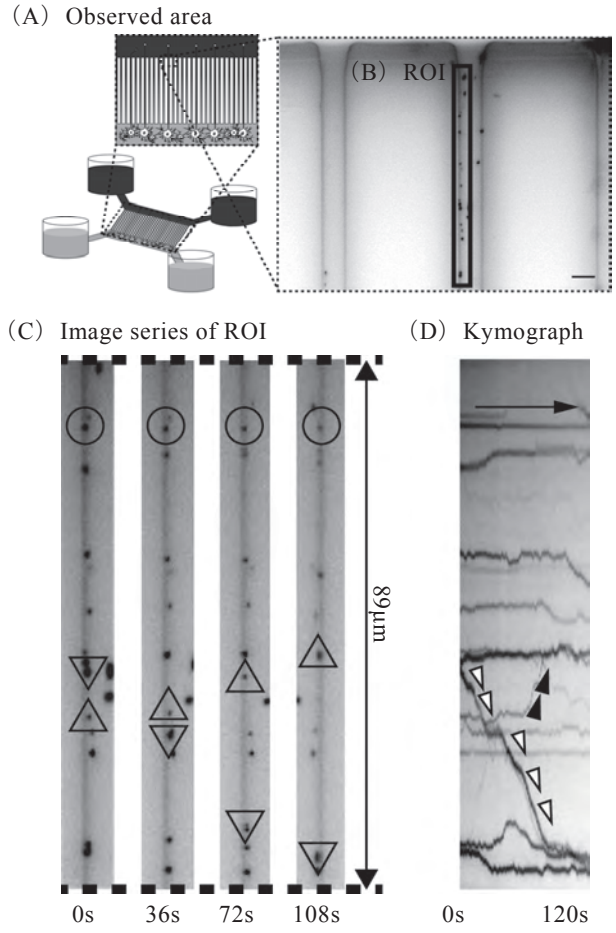
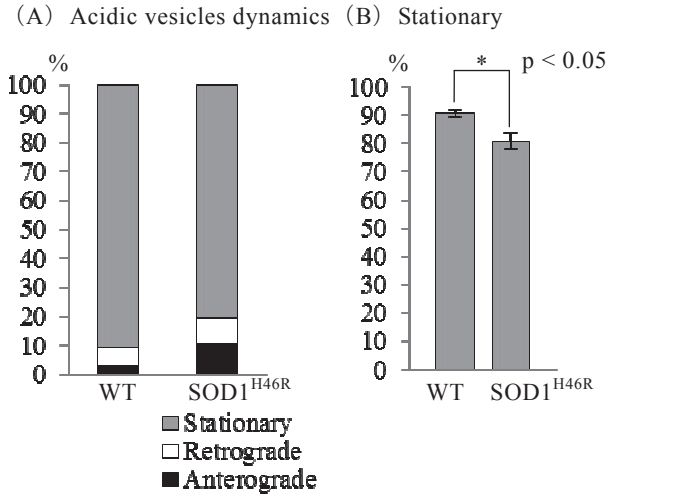


Fig.7 Kymograph generated from image sequence.（A）：Observed area of axonal compartment by BZ-9000（KEYENCE）. Scale bar = 10 μm.（B）：Region of interest .（C）：Image series of ROI. Each acidic vesicles which shrouded with triangle, inverted triangle and circle are identification.（D）：Kymograph generated from image sequence.

（C）は 2 分間小胞動態を撮影したイメージシリーズの一部であり，△と▽と○で囲んだ酸性小胞は同一の酸性小胞を示す．これにより，酸性小胞の一部が経過時間ごとに輸送されているのが分かる．Fig.7（C）のイメージシリーズを基に作成した

Kymograph が Fig.7（D）に示す．△で囲んだ酸性小胞は，黒矢頭のように順行方向（Anterograde）に輸送されたことが分かる．逆に▽で囲んだ酸性小胞は，白矢頭のように逆行



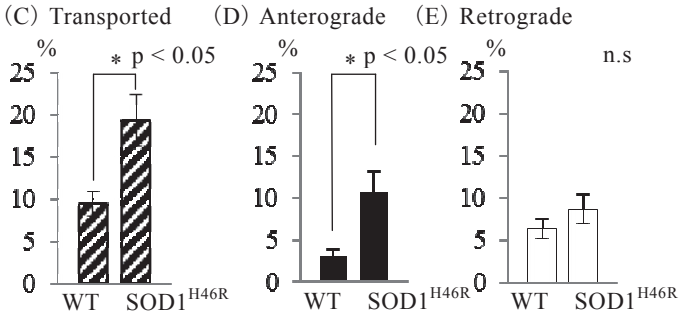


Fig.8 Analysis of axonal transport WT and SOD1^{H46R} neurons

方向（Retrograde）に輸送されたことが分かる．また，○で囲んだ酸性小胞は矢印のように輸送停止していることが分かる．この Kymograph を，正常（WT）および ALS 疾患（SOD1^{H46R}）由来の初代培養神経細胞を 9 日間培養したデバイスより取得したイメージシリーズから作成し，酸性小胞の動態を比較した（ROI ; n = 96（WT），n = 69（SOD1^{H46R}），vesicles ; n = 764（WT），n = 376（SOD1^{H46R}））（Fig.8）．

Fig.8（A）のグラフに各 ROI から得た Kymograph より小胞を輸送停止（Stationary），順行輸送（Anterograde：細胞体から軸索先端部へ）および逆行輸送（Retrograde：軸索先端部から細胞体へ）小胞の 3 種に分類し，それぞれの割合の平均値を示した． Fig.8（B）～（E）のグラフに，それぞれ輸送停止，全輸送小胞，順行輸送，逆行輸送の WT と SOD1H46R の比較を示す．全酸性小胞の中，動きが見られず軸索内に停止していた小胞の割合は WT が 90.6 ± 1.40 %（mean ± SE），SOD1^{H46R} が 80.7 ± 3.03 %であり，SOD1^{H46R} において有意に減少していた（$p < 0.05$，Mann Whitney test）（Fig.8（B））．また，観察時間内に 1.6 μm 以上軸索内を輸送されていた小胞（Transported）の割合を比較した結果，WT が 9.4 ± 1.40 %，SOD1^{H46R} が 19.3 ± 3.03 %であり，SOD1^{H46R} において有意に増加していた（$p < 0.05$，Mann Whitney test）（Fig.8（C））．更に全輸送小胞の中，順行輸送小胞の割合は WT が 3.09 ± 0.75 %，SOD1^{H46R} が 10.6 ± 2.51 %であり，SOD1^{H46R} において有意に増加していた（$p < 0.05$，Mann Whitney test）（Fig.8（D））．一方で，逆行輸送小胞の割合は WT が 6.30 ± 1.20 %で，SOD1^{H46R} が 8.64 ± 1.74 %であり，WT と SOD1^{H46R} の間で，その割合に統計学的有意差は見られなかった（N.S ; not significant，Mann Whitney test）（Fig.8（E））．

5. 考察

Kymograph による定量解析の結果，正常な神経細胞において Fig.8（A）に示した酸性小胞動態の割合は，培養皿上に播種した正常な神経細胞で酸性小胞の動態解析を行った先行研究[24-26]の結果を支持するものであった．従って，本稿で報告したマイクロ流体デバイスを用いた軸索輸送の定量的評価方法は，従来の培養皿同様の結果が得られる方法であることが示された．それに加え，デバイスを用いることにより，一度の解析において評価できる軸索数を飛躍的に増加可能であることが示された．Pandey らが 2011 年に報告しているように従来の分散培養では，11～12 の軸索 100 μm における小胞輸送を評価し，小胞動態の変化について論じている [26]．対して，本研究に用いたデバイスは，一度に 96（WT）および 69（SOD1^{H46R}）の軸索の解析を可能とした．デバイスを用い解析可能な軸索数が増加することにより，精度の高い評価を可能であると考える．

これまで，SOD1^{H46R} の神経細胞における軸索輸送に関する報告はなされていないが，ALS 研究において一般的に使用される SOD1^{G93A} の軸索輸送の速度に関しては，2012 年に Jordi らにより報告されている[27]．Jordi らは順行方向に軸索輸送される細胞小器官において，細胞小器官の輸送数について報告はしていないが，輸送速度が WT よりも SOD1^{G93A} の方が遅くなることを報告している．本研究において酸性小胞の動態を評価した結果，順行輸送小胞の割合は 3.09 ± 0.75 %（WT），10.6 ± 2.51 %（SOD1^{H46R}）であり，SOD1^{H46R} において有意に増加していた．これは，SOD1^{H46R} における順行輸送に何らかの異常がある可能性を示唆する．本研究では，酸性小胞の輸送速度については計測していないが，順行輸送に異常を生じるという点では，SOD1^{G93A} と SOD1^{H46R} に共通する疾患表現型である可能性が示唆される．今後，SOD1^{G93A} についてもデバイスを用いた評価を行う必要があると考える．

6. 結言

本研究では，マイクロ流体デバイスを用いた神経極制御および軸索輸送の定量的評価方法の開発を目的として，神経軸索内における酸性小胞の輸送動態を ALS マウスモデル（SOD1^{H46R}）の初代培養神経細胞と正常（WT）な初代神経培養細胞の間で比較した．その結果，本デバイスが神経細胞の極性制御が可能であることを確認するとともに，軸索輸送の定量解析が容易に可能であることが示された．

本実験では各遺伝子由来のマウス 1 個体から採取した初代培養神経細胞から取得した結果であるため，現在，サンプル

数を増やし，遺伝子型に依存した軸索輸送の変化についての再現性について検討している．また，本実験で用いたLysoTrackerはオートファゴソームを含む酸性小胞を標識しておりオートファゴソームの特定は不可能である．従って，オートファゴソームに特異的なマーカーを用いて，オートファゴソーム動態の解析を行う必要がある．今後，ウイルス発現ベクターを用いて，オートファゴソーム膜に存在するLC3タンパク質[4]を標識した実験系により更なる解析を行う計画である．

参考文献

1) N. Spruston: Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration., Nat. Rev. Neurosci. 9, 3, pp.206–221(2008).
2) C. Conde and A. Cáceres: Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites., Nat. Rev. Neurosci. 10, 5, pp.319–332(2009).
3) P. Pasinelli and R. H. Brown: Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics, Nat. Rev. Neurosci. 7, 9, pp.710–723(2006).
4) N. Mizushima. T. Yoshimori. and Y. Ohsumi: The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 27, 1, pp.107–132(2011).
5) Q. J. Wang. Y. Ding. D. S. Kohtz. N. Mizushima. I. M. Cristea. M. P. Rout. B. T. Chait. Y. Zhong. N. Heintz. and Z. Yue: Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration, J Neurosci 26, 31, pp.8057–8068(2006).
6) A. Otomo. L. Pan. and S. Hadano: Dysregulation of the autophagy-endolysosomal system in amyotrophic lateral sclerosis and related motor neuron diseases., Neurol. Res. Int. 2012p.498428(2012).
7) F. Navone. P. Genevini. and N. Borgese: Autophagy and Neurodegeneration: Insights from a Cultured Cell Model of ALS, Cells 4, 3, pp.354–386(2015).
8) S. Sasaki. M. Nagai. M. Aoki. T. Komori. Y. Itoyama. and M. Iwata: Motor neuron disease in transgenic mice with an H46R mutant SOD1 gene., J. Neuropathol. Exp. Neurol. 66, 6, pp.517–24(2007).
9) S. Hadano. A. Otomo. R. Kunita. K. Suzuki-Utsunomiya. A. Akatsuka. M. Koike. M. Aoki. Y. Uchiyama. Y. Itoyama. and J.-E. Ikeda: Loss of ALS2/Alsin Exacerbates Motor Dysfunction in a SOD1H46R-Expressing Mouse ALS Model by Disturbing Endolysosomal Trafficking, PLoS One 5, 3, p.e9805(2010).
10) S. Sasaki: Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis, J Neuropathol Exp Neurol 70, 5, pp.349–359(2011).
11) S. Maday. K. E. Wallace. and E. L. F. Holzbaur: Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons, J. Cell Biol. 196, 4, pp.407–417(2012).
12) N. Li Jeon. H. Baskaran. S. K. W. Dertinger. G. M. Whitesides. L. Van de Water. and M. Toner: Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device., Nat. Biotechnol. 20, 8, pp.826–830(2002).
13) A. M. Taylor. S. W. Rhee. C. H. Tu. D. H. Cribbs. and C. W. Cotman: Microfluidic Multicompartment Device for Neuroscience Research, Langmuir 19, 5, pp.1551–1556(2003).
14) A. M. Taylor. M. Blurton-jones. S. W. Rhee. D. H. Cribbs. and W. Carl: A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and Transport, Nat. Methods 2, 8, pp.599–605(2005).
15) K. a. Southam. A. E. King. C. a. Blizzard. G. H. McCormack. and T. C. Dickson: Microfluidic primary culture model of the lower motor neuron-neuromuscular junction circuit, J. Neurosci. Methods 218, 2, pp.164–169(2013).
16) A. Ionescu. E. E. Zahavi. T. Gradus. K. Ben-Yaakov. and E. Perlson: Compartmental microfluidic system for studying muscle–neuron communication and neuromuscular junction maintenance, Eur. J. Cell Biol. (2015).
17) S. Calafate. A. Buist. K. Miskiewicz. V. Vijayan. G. Daneels. B. de Strooper. J. de Wit. P. Verstreken. D. Moechars. B. de Strooper. J. de Wit. P. Verstreken. and D. Moechars: Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation, Cell Rep. 11, 8, pp.1–8(2015).
18) A. Kunze. S. Lengacher. E. Dirren. P. Aebischer. P. J. Magistretti. and P. Renaud: Astrocyte-neuron co-culture on microchips based on the model of SOD mutation to mimic ALS., Integr. Biol. (Camb). 5, 7, pp.964–75(2013).
19) M. S. Feiler. B. Strobel. A. Freischmidt. A. M. Helferich. J. Kappel. B. M. Brewer. D. Li. D. R. Thal. P. Walther. A. C. Ludolph. K. M. Danzer. and J. H. Weishaupt: TDP-43 is intercellularly transmitted across axon terminals, J. Cell Biol. 211, 4, pp.897–911(2015).
20) E. Wulf. a Deboben. F. a Bautz. H. Faulstich. and T. Wieland: Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 9, pp.4498–4502(1979).
21) R. Gundersen and J. Barrett: 1979_Gunderson-science.pdf, Science (80-.). 206, 4422, pp.1079–1080(1979).
22) Y. Li. Y.-C. Jia. K. Cui. N. Li. Z.-Y. Zheng. Y.-Z. Wang. and X.-B. Yuan: Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor., Nature 434, 7035, pp.894–898(2005).
23) E. Perlson. G.-B. Jeong. J. L. Ross. R. Dixit. K. E. Wallace. R. G. Kalb. and E. L. F. Holzbaur: A Switch in Retrograde Signaling from Survival to Stress in Rapid-Onset Neurodegeneration, J. Neurosci. 29, 31, pp.9903–9917(2009).
24) L. Sooyeon. S. Yutaka. and N. Ralha A: Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer'slike axonal dystrophy, J Neurosci 31, 21, pp.7817–7830(2011).

25) R. Perrot and J. Julien: Real-time imaging reveals defects of fast axonal transport induced by disorganization of intermediate filaments., FASEB J. 23, 9, pp.3213–25(2009).
26) J. P. Pandey and D. S. Smith: A Cdk5-Dependent Switch Regulates Lis1/Ndel1/Dynein-Driven Organelle Transport in Adult Axons, J. Neurosci. 31, 47, pp.17207–17219(2011).
27) J. Magrané. M. A. Sahawneh. S. Przedborski. Á. G. Estévez. and G. Manfredi: Mitochondrial dynamics and bioenergetic dysfunction is associated with synaptic alterations in mutant SOD1 motor neurons., J. Neurosci. 32, 1, pp.229–42(2012).