

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791884

研究課題名(和文) 視神経の変性と再生における Dock8 および ASK1 の機能解明

研究課題名(英文) Analysis of Dock8 and ASK1 functions in optic nerve regeneration

研究代表者

橘高 大二 (KITAKA, Daiji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・研究員

研究者番号：50623782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、免疫系の細胞による免疫応答が網膜神経節細胞の保護や視神経軸索の再生に与える影響を調べることで、国内での失明原因1位の緑内障や視神経炎の発症抑制ならびに治療へと応用することを目的としている。申請者は自然免疫反応や細胞死を制御する ASK1 の機能解析、および視神経再生との関連について視神経軸索損傷モデルを利用して調べた。その結果、ASK1 は炎症反応を介して軸索再生因子の産生に大きく寄与していることが明らかとなった。ASK1 欠損したマクロファージでは、軸索再生因子の放出が著しく減少し、炎症反応を介した視神経再生能が低下していた。

研究成果の概要(英文)：Neurons are normally unable to regenerate their axons in the central nervous system, but neuroinflammation induced by a proinflammatory agent such as zymosan stimulates axonal regeneration. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is an evolutionarily conserved mitogen-activated protein kinase kinase (MAP3K) and plays important roles in neural cell death and inflammation. In the present study, we found that zymosan-stimulated optic nerve regeneration is severely suppressed in ASK1-deficient mice. ASK1 was required for the zymosan-stimulated migration of macrophages into the mouse retina, and oncomodulin production in macrophages and retinal Muller glia. However, ASK1 deficiency in retinal ganglion cells had no effect on axonal outgrowth. These results suggest that ASK1 signaling in non-neuronal cells plays important roles in zymosan-stimulated optic nerve regeneration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：ASK1 視神経再生 炎症

1. 研究開始当初の背景

Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) は酸化ストレスなどの外部環境に反応して p38 MAPK や JNK へのシグナル伝達を行い、自然免疫反応の増強やアポトーシスの誘導を行う (Matsuzawa et al., *Nat Immunol*, 2005)。申請者の研究グループでは虚血による神経細胞死が ASK1 KO マウスで抑制されること (Harada et al., *Am J Pathol*, 2006) や、ASK1 がグリアにおける自然免疫系の活性化、即ち Toll-like receptors (TLRs) のシグナル伝達経路に関与することを見出した。また自己免疫疾患である多発性硬化症の疾患モデル動物「実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE)」マウスにおいては、新規に合成された ASK1 阻害薬が有効であることを確認した (Guo et al., *EMBO Molecular Medicine*, 2010)。また ASK1 は、傷害を受けた組織へのマクロファージの動員及びその活性化に必要とされ、免疫応答の制御に関与する (Osaka et al., *J Cell Biol*, 2007)。そこで ASK1 が軸索再生に与える影響について、マクロファージとの関係に着目しながら、ASK1 KO マウスの視神経損傷モデルを用いて検討した。

外傷などにより切断された神経軸索は再生することなく、恒久的な神経障害を引き起こすと考えられてきた。しかしマウス視神経を用いた研究などから、切断された軸索においても再生が可能であることが明らかとなっている。このような軸索の再生には nerve growth factor (NGF) などの神経栄養因子の投与や軸索伸長阻害因子の除去などが有効であるが、最近ではこれらに加えて免疫細胞であるマクロファージなどによる免疫応答も、軸索再生に大きく関与すると考えられつつある (Gensel et al., *J Neurosci*, 2009)。特に視神経においては活性化マクロファージから放出される oncomodulin と呼ばれるタンパク質が、軸索再生を著しく促進することが報告されるなど (Yin et al., *Nat Neurosci*, 2006)、免疫応答と軸索再生の関係が注目を集めている。そこで本研究では自然免疫と細胞死に関与する ASK1 遺伝子が軸索再生に与える影響について検討した。

2. 研究の目的

本研究では、マクロファージなどによる免疫応答が網膜神経節細胞の保護や軸索再生に与える影響を解明する。そしてその成果を、緑内障や視神経炎の発症抑制ならびに治療

へと応用することを最終的な目的とする。このような目的に近づく第一歩として、自然免疫反応や細胞死を制御する ASK1 の機能に注目した。申請者は ASK1 KO マウスでは視神経軸索傷害による網膜神経細胞死が顕著に軽症化するデータを得ており (図 1)、ASK1 KO マウスでは軸索再生が増大している可能性が推測された。また、ASK1 の下流で神経細胞死を誘導するシグナル伝達経路を調べたところ、WT では視神経軸索傷害後の網膜において p38 の活性が 3 時間後に著しく増大していたが、ASK1 KO マウスではそのような p38 の活性化は全く認められなかった。したがって視神経軸索傷害による神経細胞死には、ASK1/p38 のシグナル伝達が深く関与することが予想された。

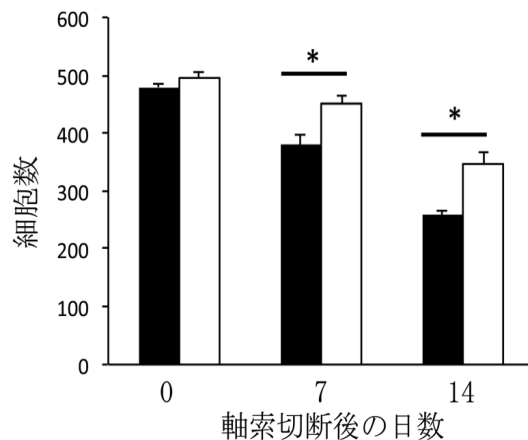


図 1 視神経軸索傷害による神経細胞死. ASK1 KO マウスでは WT と比較して、軸索損傷後に生存している網膜神経節細胞数が有意に多い. 黒: WT マウス, 白: ASK1 KO マウス.

3. 研究の方法

ASK1 KO マウスを用いて、視神経損傷による神経細胞死の抑制や軸索再生の促進がみられるかどうか、病理組織学的手法を用いて定量的に解析する。特に視神経損傷後の視機能については、最新の電気生理学的手法である多局所網膜電位の測定を通して、同一個体を経時的にかつ客観的に評価することが可能である。当研究室ではすでに視神経軸索傷害の手法を確立しており、本研究計画の遂行に支障はないものと考えられる。

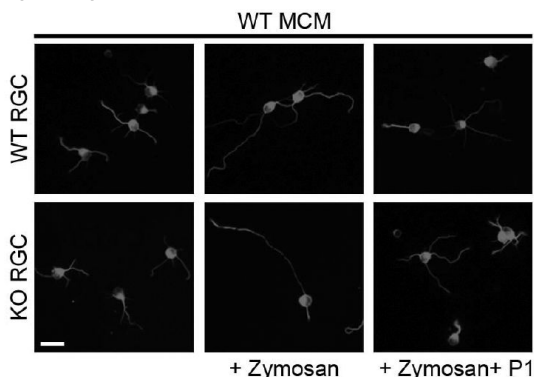
神経細胞に発現する ASK1 の機能を解析する方法として、ASK1 KO マウスからもうまく神経節細胞初代培養を作製し、軸索伸長の様子を顕微鏡で観察する。さらに軸索伸長を促進するとされる oncomodulin の相乗効果の有

無を検討した。一方、ASK1 KO マウスから腹腔マクロファージを回収し、NGF、BDNF、oncomodulin などの因子の放出量を、RT-PCR 法によって定量的に解析した。また ASK1 KO マウスを用いて視神経損傷モデルを作製し、障害後の視神経におけるマクロファージの活性状態を免疫組織化学的に検討した。

4. 研究成果

視神経外傷後に炎症誘発性試薬の Zymosan を眼球内に投与すると、網膜にマクロファージが集積する。このマクロファージから産生される栄養因子の中で、特に oncomodulin というタンパク質が視神経軸索の再生促進に重要であることがわかってきた。一方 ASK1 は MAP3K の 1 つであり、網膜神経節細胞 (RGC) 死や神経炎症の制御に関与することをすでに報告した。近年では他の MAP3K (dual leucine zipper kinase; DLK) が神経軸索再生に関与するという報告がなされていることから、今回我々は ASK1 が視神経再生に与える影響を検討した。

ASK1 KO マウスを用いて視神経軸索障害モデルを作成したところ、Zymosan 投与後に網膜に浸潤するマクロファージ数が野生型マウス (WT) に比べて減少するとともに、視神経軸索の伸長がほぼ完全に抑制された。次に培養マクロファージにおいて Zymosan 刺激後の Oncomodulin 産生量を調べたところ、ASK1 KO 由来のマクロファージでは Ocm 産生量が大きく低下していた。そこで WT RGC と ASK1 KO マクロファージの混合培養を行うと、RGC の軸索伸長は抑制された。また WT RGC と WT マクロファージの混合培養細胞に oncomodulin-blocking peptide(P1)を加えたところ、やはり RGC の軸索伸長は抑制された (図 2)。



(図 2) 培養 RGC の軸索伸長. 培養 RGC に Zymosan 刺激マクロファージ培養液を投与したところ、軸索伸長効果が認められた。

一方、ASK1 の下流の MAPK である p38/JNK の activator (Anisomycin) を Zymosan と共に WT マウスの眼球内に投与したところ、マクロファージの浸潤と Oncomodulin の産生が増加し、視神経再生がさらに促進された。これらの結果は ASK1 シグナルの制御を標的とした、新たな視神経再生療法の可能性を示唆する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Katome, T., Namekata, K., Guo, X., Semba, K., Kittaka, D., Kawamura, K., Kimura, A., Harada, C., Ichijo, H., Mitamura, Y. and Harada, T. Inhibition of ASK1-p38 pathway prevents neural cell death following optic nerve injury. *Cell Death and Differentiation* 20:270-280, 2013
査読あり
2. Namekata K, Watanabe H, Guo X, Kittaka D, Kawamura K, Kimura A, Harada C, Harada T. Dock3 regulates BDNF-TrkB signaling for neurite outgrowth by forming a ternary complex with Elmo and RhoG. *Genes Cells*. 17 (8): 688-97, 2012
査読あり
3. Namekata K, Harada C, Guo X, Kimura H, Kittaka D, Watanabe H, and Harada T. Dock3 stimulates axonal outgrowth via GSK-3 -mediated microtubule assembly. *Journal of Neuroscience* 32 (1): 264-274, 2012
査読あり

[学会発表](計 1 件)

1. Daiji Kittaka, Kazuhiko Namekata, Takuji Kurimoto, Xiaoli Guo, Chikako Harada, Takayuki Harada. Roles of ASK1 in neuroprotection and axonal regeneration after optic nerve injury. 43rd Annual Meeting of the Society for

Neuroscience, 1 . 2013.11.10, San Diego.

〔図書〕(計 1 件)

1. 行方和彦、原田知加子、郭 暁麗、木村敦子、橘高大二、渡邊快記、原田高幸. Dock3 はグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 (GSK-3)による微小管重合を介して軸索伸長を促進する。日本眼科学会会誌 116(5), 527, 2012.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

橘高 大二 (KITAKA Daiji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・研究員

研究者番号 : 50623782

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし