

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640048

研究課題名(和文) Oncomodulinの機能解析と神経軸索の再生治療研究

研究課題名(英文) Functional analyses of the role of oncomodulin in axon regeneration

研究代表者

原田 高幸 (HARADA, Takayuki)

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・分野長

研究者番号：90345306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では神経軸索伸長に有用とされるOncomodulinの受容体を探索し、複数の候補分子を見出した。そしてその一部について発現実験を行ったところ、Oncomodulinによる網膜神経節細胞の軸索再生を促進する可能性を見出した。現在も残る候補分子の機能解析を継続しており、軸索再生におけるOncomodulinの機能について、さらに解明を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：We tried to identify the receptor for oncomodulin and found several possible molecules. Overexpression of some of these molecules enhanced oncomodulin-mediated axon regeneration of retinal ganglion cells in vitro. We will continue to analyze other molecules and elucidate in detail the molecular pathways for oncomodulin.

研究分野：神経科学

キーワード：軸索再生 Oncomodulin

## 1. 研究開始当初の背景

神経軸索は一旦損傷を受けるとほぼ再生することなく逆行性変性を起こし、やがては細胞体の死を誘導する。しかし癌抑制遺伝子として知られる Phosphatase and tensin homolog (PTEN) 欠損マウスの眼球内に Zymosan や cAMP analog などを投与すると、劇的な軸索再生が起きることが複数報告されている。近年では Zymosan による軸索再生を促進する蛋白として、神経損傷時に眼内に遊走するマクロファージや好中球から分泌される因子の1つである Oncomodulin (Ocm) が注目を集めている。しかし Ocm 受容体は同定されておらず、その細胞内シグナル伝達経路は十分にはわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では Ocm 受容体とそのシグナルネットワークの解明に挑み、*in vivo* における軸索再生を促進することを目的とする。

## 3. 研究の方法

Ocm の full length cDNA を bait として、マウス脳の cDNA ライブラリーを使用した yeast two-hybrid 法を行う。結合分子については full length cDNA をマウス脳から PCR でクローニングし、発現ベクターを構築する。次に発現ベクターに組み込まれた候補分子を、エレクトロポレーション法で培養網膜神経節細胞 (RGC) に発現させる。そして Ocm を 1~7 日間作用させた後に、軸索の伸長度を定量化する。さらに Ocm blocking peptide を用いて、その効果を検証する。

## 4. 研究成果

yeast two-hybrid 法により複数の結合分子が同定されたことから、特に有力と思われる分子について発現ベクターの構築を行った。これを培養 RGC に発現させたところ、Ocm による軸索伸長効果が観察されたが、その影響は *in vivo* の結果から予想されるよりは軽度であった。ただし Ocm blocking peptide によって抑制されることは確認できた。現在はその他の結合分子のベクター作成と機能解析を進める傍ら、PTEN 欠損マウスおよび Ocm 欠損マウスを用いた視神経再生の *in vivo* 研究を開始しており、軸索再生における Ocm の機能について、さらに解明を進める予定である。

## 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 18 件)

1. Harada, C., Azuchi, Y., Noro, T., Guo, X., Kimura, A., Namekata, K. and Harada, T. TrkB signaling in retinal glia stimulates neuroprotection after optic nerve injury. *American Journal of Pathology* 185(12), 3238-3247, 2015. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.08.005. 査読有
2. Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Noro, T., Harada, C. and Harada, T. Valproic acid prevents NMDA-induced retinal ganglion cell death via stimulation of neuronal TrkB receptor signaling. *American Journal of Pathology* 185(3), 756-764, 2015. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.11.005. 査読有
3. Noro, T., Namekata, K., Azuchi, Y., Kimura, A., Guo, X., Harada, C., Nakano, T., Tsuneoka, H. and Harada, T. Spermidine ameliorates neurodegeneration in a mouse model of normal tension glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56(8), 5012-5019, 2015. doi: 10.1167/iovs.15-17142. 査読有
4. Noro, T., Namekata, K., Kimura, A., Guo, X., Azuchi, Y., Harada, C., Nakano, T., Tsuneoka, H. and Harada, T. Spermidine promotes retinal ganglion cell survival and optic nerve regeneration in adult mice following optic nerve injury. *Cell Death and Disease* 6, e1720, 2015. doi: 10.1038/cddis.2015.93. 査読有
5. Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Noro, T., Azuchi, Y., Semba, K., Harada, C., Yoshida, H., Mitamura, Y. and Harada, T. Brimonidine suppresses loss of retinal neurons and visual function in a murine model of optic neuritis. *Neuroscience Letters* 592, 27-31, 2015. doi: 10.1016/j.neulet.2015.02.059. 査読有
6. Kimura, A., Guo, X., Noro, T., Harada, C., Tanaka, K., Namekata, K. and Harada, T. Valproic acid prevents retinal degeneration in a murine model of normal tension glaucoma. *Neuroscience Letters* 588, 108-113, 2015. doi: 10.1016/j.neulet.2014.12.054. 査読有
7. Katome, T., Namekata, K., Mitamura, Y., Semba, K., Egawa, M., Naito, T.,

- Harada, C. and Harada, T. Expression of intraocular peroxisome proliferator-activated receptor gamma in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Journal of Diabetes and its Complications* 29, 275–281, 2015. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2014.10.010. 査読有
8. Yanagisawa, M., Aida, T., Takeda, T., Namekata, K., Harada, T., Shinagawa, R. and Tanaka, K. Arundic acid attenuates retinal ganglion cell death by increasing glutamate/aspartate transporter (GLAST) expression in a model of normal tension glaucoma. *Cell Death and Disease* 6, e1693, 2015. doi: 10.1038/cddis.2015.45. 査読有
9. Keino, H., Watanabe, T., Sato, Y., Shudo, K., Kitaoka, Y., Harada, T. and Okada, A.A. Retinoic acid receptor stimulation ameliorates experimental autoimmune optic neuritis. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 43(6), 558-567, 2015. doi: 10.1111/ceo.12308. 査読有
10. 行方和彦、安土ゆり子、原田高幸. CLARITY 法によるマウス網膜・視神経の透明化. 「特集：電気泳動のフロンティア 2015」電気泳動 59(2), 103-105, 2015. 査読なし
11. 原田高幸. 網膜変性疾患における神経保護. *神経眼科* 32(3), 234-239, 2015. 査読なし
12. Namekata, K., Kimura, A., Kawamura, K., Harada, C., and Harada, T. Dock GEFs and their therapeutic potential: Neuroprotection and axon regeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* 43, 1-16, 2014. 10.1016/j.preteyeres.2014.06.005. 査読有
13. Namekata, K., Kimura, A., Harada, C., Yoshida, H., Matsumoto, Y. and Harada, T. Dock3 protects myelin in the cuprizone model for demyelination. *Cell Death and Disease* 5, e1395, 2014. doi: 10.1038/cddis.2014.357. 査読有
14. Semba, K., Namekata, K., Kimura, A., Harada, C., Mitamura, Y. and Harada, T. Brimonidine prevents neurodegeneration in a mouse model of normal tension glaucoma. *Cell Death and Disease* 5, e1341, 2014. doi: 10.1038/cddis.2014.306. 査読有
15. Semba, K., Namekata, K., Guo, X., Harada, C., Harada, T. and Mitamura, Y. Renin-angiotensin system regulates neurodegeneration in a mouse model of normal tension glaucoma. *Cell Death and Disease* 5, e1333, 2014. doi: 10.1038/cddis.2014.296. 査読有
16. Semba, K., Namekata, K., Kimura, A., Harada, C., Katome, T., Yoshida, H., Mitamura, Y. and Harada, T. Dock3 overexpression and p38 MAPK inhibition synergistically stimulate neuroprotection and axon regeneration after optic nerve injury. *Neuroscience Letters* 581, 89–93, 2014. doi: 10.1016/j.neulet.2014.08.034. 査読有
17. 行方和彦、原田高幸. 視神経再生. 特集 2: 「視覚を用いた脳科学研究」*脳* 21 17(4), 85-88, 2014. 査読無
18. 原田高幸. 視神経再生療法の未来. 特集: 再生医療とコンピュータサイエンス. *四国医学雑誌* 70(1,2), 7-12, 2014. 査読無
- 〔学会発表〕(計 19 件)
1. 原田高幸. 網膜神経節細胞への介入戦略. シンポジウム「網膜病態に対する神経保護研究の最前線」第 120 回 日本眼科学会総会. 平成 28 年 4 月 7 日 仙台国際センター (宮城県仙台市)
2. Takayuki Harada, Atsuko Kimura, Takahiko Noro, Xiaoli Guo, Kazuhiko Namekata, Chikako Harada. Neuroprotection by valproic acid and spermidine in a mouse model of normal tension glaucoma. 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2015.10.20., Chicago, USA.
3. Xiaoli Guo, Kazuhiko Namekata, Atsuko Kimura, Takahiko Noro, Chikako Harada, Takayuki Harada. Brimonidine suppresses loss of retinal neurons and visual function in murine models of glaucoma and optic neuritis. 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience. 2015.10.19., Chicago, USA.

4. Takayuki Harada. TrkB signaling in Müller glia stimulates neuroprotection after optic nerve injury. European Association for Vision and Eye Research (EVER) 2015 Congress. 2015.10.9., Acropolis convention center, Nice, France.
5. Takayuki Harada. Mechanisms of RGC death in a murine model of normal tension glaucoma. "Pathogenesis of retinal ganglion cell death in glaucoma animal models" World Glaucoma Congress 2015. 2015.6.7., Hong Kong Convention and Exhibition Centre, Hong Kong.
6. 原田高幸. プリモニジンの神経保護効果を極める. シンポジウム「緑内障に対する神経保護効果を極める」第119回日本眼科学会総会. 平成27年4月17日 ロイトン札幌 (北海道札幌市)
7. Guo X., Namekata K., Kimura A., Noro T., Harada C., Harada T. Brimonidine protects retinal neurons and visual function in a murine model of optic neuritis. 第119回日本眼科学会総会. 平成27年4月17日 ロイトン札幌 (北海道札幌市)
8. 仙波賢太郎、行方和彦、木村敦子、原田知加子、三田村佳典、原田高幸. プリモニジンは正常眼圧緑内障モデルマウスにおける神経変性を抑制する. 第119回日本眼科学会総会. 平成27年4月17日 札幌芸文館 (北海道札幌市)
9. 行方和彦、木村敦子、郭 曉麗、原田知加子、原田高幸. Dock3はERKシグナルを介して視神経の脱髄を抑制する. 第119回日本眼科学会総会. 平成27年4月16日 ロイトン札幌 (北海道札幌市)
10. Takayuki Harada. Glia-neuron interactions during retinal degeneration. Mini-symposium "Microglia: key to understand neural development and pathology" 2015.3.1., Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University (OIST), Okinawa.
11. Takayuki Harada. Neuroprotection and optic nerve regeneration in a mouse model of normal tension glaucoma. The UK-Japan Retinal Degeneration Symposium. 2015.3.12., UCL Institute of Ophthalmology, London, UK.
12. Atsuko Kimura, Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Takahiko Noro, Chikako Harada, Takayuki Harada. Valproic acid protects retinal neurons from NMDA-induced neurotoxicity via stimulation of neuronal TrkB receptors. 2015 Asia-ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2015.2.18, Pacifico Yokohama, Yokohama, Kanagawa.
13. Takahiko Noro, Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Yuriko Azuchi, Tadashi Nakano, Hiroshi Tsuneoka, Takayuki Harada. Spermidine stimulates neuroprotection and optic nerve regeneration following optic nerve injury. 2015 Asia-ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology). 2015.2.18, Pacifico Yokohama, Yokohama, Kanagawa.
14. 原田高幸. 網膜変性疾患における神経保護. シンポジウム「網膜・視神経の神経保護と再生」第52回日本神経眼科学会. 平成26年12月12日 幕張メッセ (千葉県千葉市)
15. Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Chikako Harada, Takayuki Harada. Dock8/10 regulate severity of inflammatory demyelination disorder. The ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2014. Annual Meeting. 2014.5.8, Orlando, USA.
16. Xiaoli Guo, Kazuhiko Namekata, Chikako Harada, Takayuki Harada. Combined inhibition of angiotensin II type 1 receptor and ASK1 significantly attenuates autoimmune optic neuritis. The ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2014. Annual Meeting. 2014.5.8, Orlando, USA.
17. Xiaoli Guo, Kazuhiko Namekata, Chikako Harada, Takayuki Harada. Inhibition of angiotensin II ameliorates autoimmune optic neuritis by suppressing innate immune responses. World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology (WOC) 2014. 2014.4.5., Tokyo International Forum,

Chiyoda-ku, Tokyo.

18. 仙波賢太郎、行方和彦、郭 曉麗、原田高幸、三田村佳典. RAS の阻害は正常眼圧緑内障モデルマウスにおける神経細胞死を抑制する. 第 118 回 日本眼科学会総会. 平成 26 年 4 月 5 日 帝国ホテル (東京都千代田区).
19. Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Chikako Harada, Takayuki Harada. Dock3 protects retinal neurons in a mouse model of normal tension glaucoma. World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology (WOC) 2014. 2014.4.3., Tokyo International Forum, Tokyo.

〔図書〕(計 1 件)

1. Harada, C. and Harada, T. Neurotrophic factors. pp. 99-112. In: Neuroprotection and Neuroregeneration for Retinal Diseases. Springer Japan (2014).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：視神経保護剤  
発明者：原田高幸、他 3 名。  
権利者：公益財団法人東京都医学総合研究所  
種類：特許  
番号：特願 2015-092696  
出願年月日：平成 27 年 4 月 30 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 高幸 (HARADA Takayuki)  
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・分野長  
研究者番号：90345306