

令和元年5月28日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07076

研究課題名(和文)細胞種特異的なASK1およびDock分子の制御による多発性硬化症の治療研究

研究課題名(英文) New therapy of multiple sclerosis through regulating cell-type specific ASK1 and Dock proteins

研究代表者

郭 曉麗 (GUO, Xiaoli)

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・主任研究員

研究者番号：50443114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：4種類の細胞特異的なASK1欠損マウスのEAEのphenotypeを確認し、ASK1/LysM KOはearly stageから、ASK1/GFAP KOはlate stageから症状が軽減することが判明した。そのメカニズムにASK1はM1 polarization、神経毒性を持つastrocyteの誘導に関与することを見出した。さらに神経炎症の増悪にはmicroglial-astrocyte crosstalkが関わる可能性を見出した。またレニン・アンジオテンシン系は神経変性を制御することを論文にまとめ、一日おきのカロリー制限による緑内障への神経保護効果が判明し論文にまとめ発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ASK1の細胞特異的な機能や既存薬剤による治療研究から網膜および視神経変性疾患など難病の発症メカニズムを解明し、治療法の開発に有用な情報を提供した。特にMSによる視神経変性に対する治療薬の開発に有用である。我々の研究成果を参考にASK1阻害剤がTocris社から発売された。また研究成果は研究所HPや医学専門websiteでも紹介されている。中国での招待講演でも研究発表を行うなど、研究成果を積極的に社会に公開する。

研究成果の概要(英文)：We generated four lines of cell-specific ASK1 knockout mice to examine the roles of ASK1 during EAE. ASK1 signaling in microglia/macrophages induces a pro-inflammatory phenotype in microglia/macrophages, which subsequently promotes the activation of astrocytes. Also, ASK1 signaling in astrocytes stimulated the production of key inflammatory mediators that further activated microglia/macrophages. Neuroinflammation was reduced from the early stages of EAE in microglia/macrophage-specific ASK1 knockout mice, while only the late-phase neuroinflammation was ameliorated in astrocyte-specific ASK1 knockout mice.

We also found that the Renin-Angiotensin System regulates neuro-degeneration in a mouse model of optic neuritis and demonstrated that caloric restriction promotes cell survival in a mouse model of normal tension glaucoma.

研究分野：神経科学

キーワード：グリア細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (Multiple sclerosis: MS) は Th1 細胞の活性化に続き、astrocyte、microglia / macrophage に起因するケモカインが炎症性細胞を動員するとされる。しかし初期病変における免疫学的研究と比較すると、炎症に二次的に関与するグリア細胞に注目した研究は非常に少ない。研究代表者はグリア活性の新たな key regulator である ASK1 の欠損マウス、あるいは ASK1 阻害剤を投与した野生型マウスでは、EAE の症状が軽症化することを報告した (Guo et al., EMBO Mol Med, 2010)。また、MS では脱髄や神経炎症に伴い神経細胞死が観察されることから、病態の悪化を抑えるにはグリアの活性抑制に加えて、神経保護治療も必要になる。最近では薬剤に加えて、カロリー制限が神経保護に有効であることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究ではMSおよびEAEにおけるグリア細胞の役割、グリア活性抑制と神経保護剤の相乗効果やカロリー制限による神経保護の有効性を、新規遺伝子改変動物およびヒト病理標本を検討することによって解明し、新たなMSの治療法確立への第一歩を踏み出したい。

3. 研究の方法

グリア細胞における ASK1 の機能を検討するため、グリア特異的欠損マウスを作成しそれらの EAE を検討する。また薬剤やカロリー制限による視神経炎や脊髄炎への治療効果を検討する。

4. 研究成果

(1) 4種類の細胞特異的なASK1欠損マウスのEAEのphenotypeを確認し、ASK1/LysM KO (microglia / macrophage特異的)はearly stageから、ASK1/GFAP KO (astrocyte特異的)はlate stageから症状が軽減することが判明した。Microarray解析の結果からmicroglia / macrophageに特異的なASK1欠損EAEマウスの脊髄では、M1マーカーの発現が低下することを見出し、in vitroの実験からASK1はM1 polarizationに関与することがわかった。またMicrogliaにおけるASK1は神経毒性を持つastrocyte (A1 astrocyte)の誘導に関与することを見出した。神経炎症を増悪させるmicroglia/macrophage, astrocyteの働きは、各時期によって異なることがわかった。さらにその増悪にはmicroglial-astrocyte crosstalkが関わる可能性を見出した。

(2) 近年ではレニン・アンジオテンシン系が、自己免疫疾患の発症に関与することが報告されている。そこでアンジオテンシンII (AngII) 受容体拮抗薬 (ARB) であるcandesartanをEAEマウスに経口投与したところ、視神経の脱髄、網膜神経節細胞死や視機能低下が抑制されることがわかった (図1)。AngIIはastrocyteにおけるToll-like receptor (TLR)-4の発現とmonocyte chemotactic protein-1等のケモカインの産生を促進するが、それらはcandesartanあるいはNF- κ B阻害剤によって抑制可能であった。以上の結果はグリアにおけるAngII受容体 - NF- κ B - TLR4 pathwayが視神経炎の治療標的になること、また比較的副作用が少ない既存薬であるARBが、視神経炎の治療に有効な可能性を示しており興味深い (雑誌論文5)。

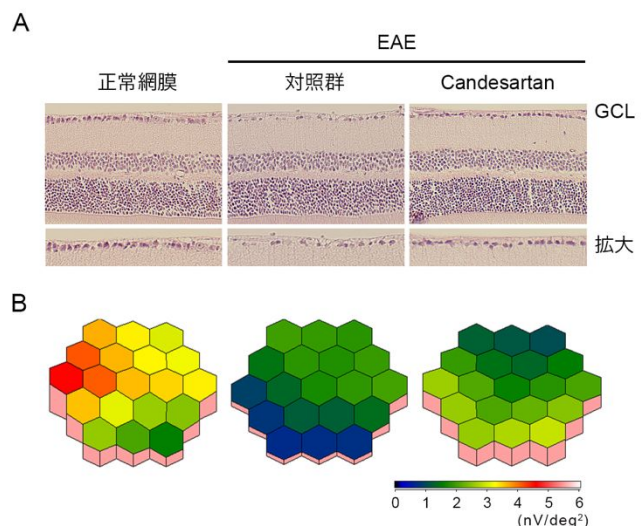


図1 Candesartan 投与による網膜変性と視機能低下の抑制。A: EAE マウスでは網膜神経節細胞の減少が観察されるが、candesartan 投与により一部抑制された。B: 多局所網膜電位による視機能解析。Candesartan 投与群では視機能が保たれることがわかる。GCL: ganglion cell layer.

(3) 一方、近年ではカロリー制限が神経保護に有効であることが報告されている。我々は緑内障モデルEAAC1欠損マウスを活用して、一日置きの絶食によって網膜神経節細胞死を抑制できるか検討した。その結果、生後5週齢から12週齢まで、一日置きの絶食をしたマウスでは網膜神経節細胞死が抑制され、視機能障害も改善することがわかった(図2)。このメカニズムを検討したところ、絶食により血中ケトン体濃度や網膜におけるヒストンのアセチル化が上昇し、複数の神経栄養因子や抗酸化ストレス遺伝子の発現量が増加することが確認された(雑誌論文11)。以上の結果は食品の選択やカロリー制限が生活習慣病だけでなく、緑内障の進行抑制にも有用な可能性を示唆する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

1. Sano, H., Namekata, K., Kimura, A., Shitara, H., Guo, X., Harada, C., Mitamura, Y. and Harada, T. Differential effects of N-acetylcysteine on retinal degeneration in two mouse models of normal tension glaucoma. *Cell Death and Disease* 10(2), 75, 2019. doi: 10.1038/s41419-019-1365-z. 査読有
2. Harada, C., Kimura, A., Guo, X., Namekata, K. and Harada, T. Recent advances in genetically modified animal models of glaucoma and their roles in drug repositioning. *British Journal of Ophthalmology* 103(2), 161-166, 2019. doi: 10.1136/bjophthalmol-2018-312724. 査読有
3. Akaiwa, K., Namekata, K., Azuchi, Y., Sano, H., Guo, X., Kimura, A., Harada, C., Mitamura, Y. and Harada, T. Topical ripasudil suppresses retinal ganglion cell death in a mouse model of normal tension glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 59(5), 2080-2089, 2018. doi: 10.1167/iovs.17-23276. 査読有
4. Azuchi, Y., Namekata, K., Shimada, T., Guo, X., Kimura, A., Harada, C., Nishigaki, A., Yamagata, K. and Harada, T. Role of neuritin in retinal ganglion cell death in adult mice following optic nerve injury. *Scientific Reports* 8(1), 10132, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-28425-7. 査読有
5. Guo, X., Namekata K., Kimura A., Harada C. and Harada T. The renin-angiotensin system regulates neurodegeneration in a mouse model of optic neuritis. *American Journal of Pathology* 187 (12), 2876-2885, 2017. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.08.012. 査読有
6. Akaiwa, K., Namekata, K., Azuchi, Y., Guo, X., Kimura, A., Harada, C., Mitamura, Y. and Harada, T. Edaravone suppresses retinal ganglion cell death in a mouse model of normal tension glaucoma. *Cell Death and Disease* 8, e2934, 2017. doi: 10.1038/cddis.2017.341. 査読有
7. Akiyama, G., Azuchi, Y., Guo, X., Noro, T., Kimura, A., Harada, C., Namekata, K. and Harada, T. Edaravone prevents retinal degeneration in adult mice following optic nerve injury. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 58(11), 4908-4914, 2017. doi: 10.1167/iovs.17-22250. 査読有
8. Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Harada, C. and Harada, T. ASK1 in neurodegeneration. *Advances in Biological Regulation* 66:63-71, 2017. doi:

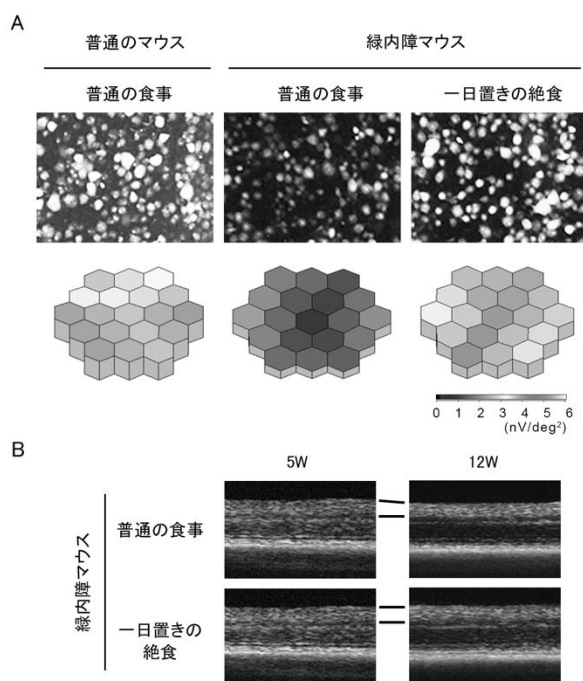


図2 一日置きの絶食による網膜変性の抑制効果. A: 逆行性ラベリングにより、緑内障マウスでは網膜神経節細胞の減少が観察されるが(中)、一日置きの絶食により抑制され、視機能解析から網膜機能が保たれていることがわかる. B: OCTによる網膜のイメージング. 同一網膜の観察を5週齢(左)と12週齢(右)に行った. 一日置きの絶食マウスでは、12週齢における網膜内層の厚みが保たれていることがわかる.

- 10.1016/j.jbior.2017.08.003. 査読有
9. Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Harada, C. and Harada, T. Dock3-NMDA receptor interaction as a target for glaucoma therapy. *Histology and Histopathology* 32(3), 215-221, 2017. doi: 10.14670/HH-11-820. 査読有
 10. Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Noro, T., Harada, C. and Harada, T. Targeting oxidative stress for treatment of glaucoma and optic neuritis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2817252. 2017. doi: 10.1155/2017/2817252. 査読有
 11. Azuchi, Y., Kimura, A., Guo, X., Akiyama, G., Noro, T., Harada, C., Nishigaki, A., K., Namekata, K. and Harada, T. Valproic acid and ASK1 deficiency ameliorate optic neuritis and neurodegeneration in an animal model of multiple sclerosis. *Neuroscience Letters* 639:82-87, 2017. doi: 10.1016/j.neulet.2016.12.057. 査読有
 12. Guo, X., Kimura, A., Azuchi, Y., Akiyama, G., Noro, T., Harada, C., Namekata, K. and Harada, T. Caloric restriction promotes cell survival in a mouse model of normal tension glaucoma. *Scientific Reports* 6:33950, 2016. doi: 10.1038/srep33950. 査読有
 13. Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Harada, C., and Harada, T. Neuroprotection, Growth Factors and BDNF-TrkB Signalling in Retinal Degeneration. *International Journal of Molecular Sciences* 17(9), 2016. pii: E1584. 査読有

[学会発表](計 21 件)

1. Harada T., Noro T., Namekata K., Kimura A., Hashimoto N., Moriya-Ito K., Guo X., Harada C., Nakano T., Inoue T. and Sasaki E.
Spontaneous normal tension glaucoma in aged marmosets.
8th World Glaucoma Congress (WGC 2019), 2019
2. Azuchi Y., Namekata K., Shimada T., Guo X., Kimura A., Harada C., Nishigaki A., Yamagata K. and Harada T.
Loss of neuritin accelerates RGC loss and retinal degeneration in adult mice following optic nerve injury.
48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2018
3. Kimura A., Namekata K., Guo X., Azuchi Y., Harada C. and Harada T.
Can valproic acid treat neurodegenerative diseases?
International Conference on Neurovascular and Neurodegenerative Diseases, 2018
4. Namekata K., Guo X., Kimura A., Arai N., Harada C. and Harada T.
DOCK8 regulates microglial activity in neuroinflammation
19th International Congress of Neuropathology, 2018
5. Kimura A., Namekata K., Guo X., Azuchi Y., Harada C. and Harada T.
Manipulation of retinal glutamate levels by overexpression of GLAST reduces retinal ganglion cell death in an experimental model of glaucoma.
19th International Congress of Neuropathology, 2018
6. Harada T., Akaiwa K., Namekata K., Azuchi Y., Guo X., Kimura A., Harada C., Mitamura Y.
Topical ripasudil prevents retinal ganglion cell death in a mouse model of normal tension glaucoma.
13th European Glaucoma Society Congress, 2018
7. Guo X., Namekata K., Azuchi Y., Kimura A., Noro T., Harada C. and Harada T.
Dock10 deficiency reduces neuroinflammation in optic neuritis.
The ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2018 Annual Meeting, 2018
8. 赤岩慶、行方和彦、安土ゆり子、郭 曉麗、木村敦子、原田知加子、三田村佳典、原田高幸. 正常眼圧緑内障モデルマウスを用いた Edaravone による網膜神経節細胞保護効果の検討.
第122回日本眼科学会総会 2018
9. 郭 曉麗、行方和彦、木村敦子、原田知加子、新井信隆、原田高幸.
細胞種特異的なASK1遺伝子の欠損が神経炎症に与える影響の検討.
第58回 日本神経病理学会総会: 2017
10. 郭 曉麗、木村敦子、安土ゆり子、秋山悟一、野呂隆彦、原田知加子、行方和彦、原田高幸.
カロリー制限による正常眼圧緑内障モデルにおける神経細胞及び視機能の保護.
第121回 日本眼科学会総会: 2017
11. Guo X., Namekata K., Kimura A., Noro T., Akiyama G., Azuchi Y., Harada C. and Harada T. Dietary restriction promotes cell survival in a mouse model of normal tension glaucoma.
第2回 TMED フォーラム: 2017
12. Guo X., Namekata K., Kimura A., Noro T., Akiyama G., Azuchi Y., Harada C. and Harada T. Dietary restriction promotes cell survival in a mouse model of normal

- tension glaucoma. Poster 228.07, 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience: 2016
13. Namekata K., Guo X., Kimura A., Harada C. and Harada T. Dock8 deficiency suppresses microglial migration and neuroinflammation. Poster 230.20, 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience: 2016
 14. Kimura A., Namekata K., Guo X., Azuchi Y., Noro T., Akiyama G., Harada C. and Harada T. Overexpression of GLAST protects retinal ganglion cells following optic nerve injury. XXII International Congress of Eye Research (ISER 2016): 2016.9.26., Tokyo (Japan). 2016
 15. Azuchi Y., Kimura A., Guo X., Noro T., Akiyama G., Drozd M., Harada C., Saito A., Namakata K. and Harada T. ASK1 deficiency and valproic acid synergistically reduce demyelination and visual impairment in experimental autoimmune encephalomyelitis. Poster P3-238, The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society: 2016
 16. Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Noro, T., Azuchi, Y., Harada, C. and Harada, T. Valproic acid suppresses retinal ganglion cell death in mouse models of normal tension glaucoma. Poster G1P-5, 14th IGAKUKEN International Symposium, IGAKUKEN Summit for Japan and Korea Science Leaders 2016: 2016
 17. Noro, T., Namekata, K., Kimura, A., Guo, X., Azuchi, Y., Harada C. and Harada, T. Spermidine stimulates neuroprotection and optic nerve regeneration following optic nerve injury. Poster G1P-4, 14th IGAKUKEN International Symposium, IGAKUKEN Summit for Japan and Korea Science Leaders 2016: 2016
 18. Azuchi, Y., Guo, X., Kimura, A., Noro, T., Akiyama, G., Drożdż, M., Harada, C., Saito, A., Namekata K. and Harada, T. Combinatorial therapy with ASK1 deficiency and valproic acid in a murine model of multiple sclerosis. Poster G1P-6, 14th IGAKUKEN International Symposium, IGAKUKEN Summit for Japan and Korea Science Leaders 2016: 2016
 19. Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Noro, T., Harada, C. and Harada, T. Neuroprotective effects of valproic acid in mouse models of normal tension glaucoma. Poster P-20, TOBIRA 第5回研究交流フォーラム: 2016
 20. 仙波賢太郎、行方和彦、郭 曉麗、原田知加子、原田高幸. レニン-アンジオテンシン系は正常眼圧緑内障モデルマウスにおける神経変性を制御する。
第120回 日本眼科学会総会 日本眼科学会学術奨励賞記念講演 2016
- 21. 招待講演**
郭 曉麗. 神経細胞死亡或髓鞘脱落等神经系统疾病的药物研发
(New therapeutic targets on neurodegenerative and demyelination diseases)
Overseas Chinese, Chinese and High-level Talents Travel to Jiangsu. 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

1. 研究成果 (Am J Pathol, 2017) が以下のサイトで紹介された。
MEDICINE INNOVATES
Role of Renin-Angiotensin System in Optic Neuritis
<https://medicineinnovates.com/mechanism-of-action/role-renin-angiotensin-system-optic-neuritis/>
2. 研究成果 (Sci Report, 2016) が以下のサイトで紹介された。
公益財団法人東京都医学総合研究所
カロリー制限による網膜神経細胞死の抑制に成功
<http://www.igakuken.or.jp/topics/2016/0927.html>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者
なし

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2) 研究協力者
なし

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。