

令和元年6月11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：16K08635

研究課題名(和文) 神経保護・再生におけるDock3の機能解析

研究課題名(英文) The function of Dock3 in neuroprotection and neuroregeneration

研究代表者

行方 和彦 (NAMEKATA, Kazuhiko)

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・副参事研究員

研究者番号：70392355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスに視神経切断処置を施した後の軸索再生効果と神経細胞死の抑制効果について、アデノ随伴ウイルス(AAV)を利用した遺伝子治療の影響を検討した。DOCK3の上流にであるTrkBシグナルを遺伝子治療によって活性化すると視神経の軸索再生を促進されることを見出し学会等で発表を行った。また、同遺伝子治療では網膜神経節細胞の細胞死を抑制する効果があることも確認した。さらに緑内障モデルマウスにおいても同様に網膜神経節細胞の細胞死が抑制されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞の再生はこれまで非常に困難であると考えられてきた。しかし、本研究によって遺伝子治療などを活用して細胞内シグナル伝達を活性化することにより、軸索が再生することが改めて確認された。多発性硬化症、緑内障、脊髄損傷などの神経軸索が障害をうける疾病などに対して、遺伝子治療を活用した新たな治療法として有益な情報をもたらすことが推測される。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the gene therapy using AAV can promote axonal regeneration and neuroprotection after optic nerve injury. We demonstrated that overexpression of active TrkB in the retina by AAV induced axonal regeneration in wild-type mice after optic nerve injury. In addition, optic nerve injury-induced neural cell death in the retina was also suppressed. Our finding suggests that activation of TrkB signaling by AAV is useful for therapy of retinal degeneration such as glaucoma.

研究分野：神経化学

キーワード：Dock3 神経変性 神経再生

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

1. 研究開始当初の背景

これまで神経細胞の軸索再生は非常に困難であると考えられてきた。しかし近年の成果から、遺伝子治療によって細胞内シグナルを活性化することで、*in vivo*において強力な神経保護・軸索再生を誘導できることがわかってきた。例えば、視神経は網膜神経節細胞の軸索の集合体であり、眼球から脳後部まで長い投射が必要であることから、軸索再生研究において最も適した組織の1つである。しかしながら、現状では視神経再生の分子機序には不明な点が多く、さらなる解明が必要とされている。機能回復についてはその評価方法が重要であるが、マウスの視機能については電気生理学的手法も含めた様々な客観的解析法が存在するため、その有用性は高い。そこで本研究では網膜や視神経を利用して神経保護・軸索再生の分子機序を解明し、そこで得られた知見をさらに強力な軸索再生効果を獲得するために応用する

2. 研究の目的

(1) 多くの神経変性疾患では神経細胞死よりも先に軸索の変性が確認される。したがって、軸索変性を抑制することによって、神経細胞を保護できることが推測される。そこで、遺伝子欠損マウスなどを活用して DOCK ファミリー分子が軸索変性に与える影響について、神経炎症モデルを検討した。

(2) 疾病や障害などにより退縮した軸索を再生によって再度伸長させることができれば、治療応用への可能性が広がる。そこで、DOCK3 周辺の細胞内シグナルを活性化することによって軸索再生を促進できるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 我々はこれまで、慢性炎症性脱髄疾患である多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) の疾患モデル動物 [実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)] を活用し、神経経炎による軸索変性の治療研究を進めてきた。本解析では、DOCK ファミリー分子の遺伝子欠損マウスを活用して、肢体麻痺および視機能低下の進行への影響について検討した。特に視機能については多局所網膜電位の測定による電気生理学的な機能解析法を用いたことにより、客観的な判断を下すことができる。病態解析には、凍結切片を用いた免疫組織染色に加えて、網膜の flat mount を用いた免疫組織染色、さらには透明化組織を利用した立体画像の再構築などを行い解析した。

(2) 我々は TrkB が DOCK3 の上流シグナルの1つとして働くことを報告してきたことから、本テーマでは TrkB シグナルを増強することによって、視神経再生を促進することを試みた。野生型マウスにアデノ随伴ウイルス (AAV) によって活性化型 TrkB を発現させた2週間後に視神経挫滅処置を施し、さらに2-4週間後の神経保護および視神経再生効果について検討した。視神経挫滅後の再生軸索については、蛍光標識コレラトキシン B サブユニットによって標識し、蛍光顕微鏡で検出する。一方、機能回復の評価には多局所網膜電図 (VERIS) や視覚誘発電位 (VEP) の測定などの電気生理学的解析、および瞳孔対光反射測定、視覚的断崖テストや視運動性反応などの行動テストを用いて総合的に検討する。

4. 研究成果

(1) 独自に作成した4系統の遺伝子欠損マウス (DOCK8 欠損マウス、DOCK9 欠損マウス、DOCK10 欠損マウス、DOCK10 欠損マウス) について、MOG ペプチドによる EAE マウスを製作した。Clinical score の測定結果から、DOCK8 欠損マウスが最も肢体麻痺症状の軽化が確認された。同様に網膜変性や視機能低下についても抑制されていた (図1)。また、DOCK10 欠損マウスにおいては、わずかではあるが麻痺症状の軽化が有意差をもって確認された。しかし、DOCK9 欠損マウスおよび DOCK11 欠損マウスでは、麻痺症状の軽化はほとんど確認されなかった。さらに、DOCK8 欠損マウスでは T 細胞やミクログリアなどの免疫関連細胞の機能低下が認められ

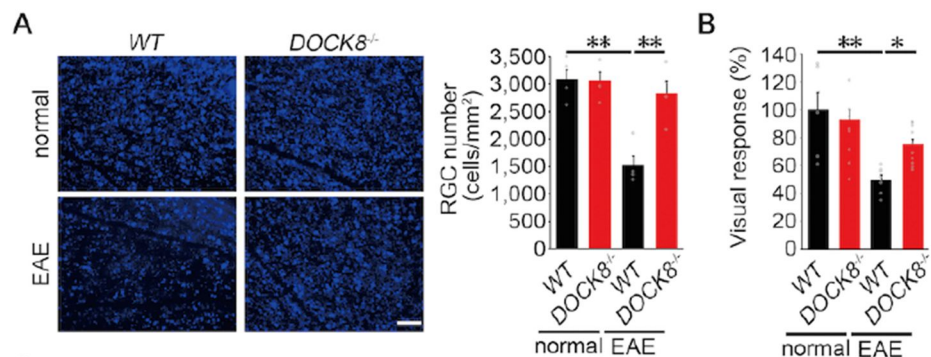


図1 EAEにおけるDOCK8欠損マウスの視機能。

(A) 野生型 (WT) EAE マウスと DOCK8 欠損 EAE マウスにおける網膜神経節細胞(RGC)を逆行性ラベリングにより検出した。この手法では正常な RGC は検出されるが、細胞死や軸索の退縮が生じた網膜神経節細胞は検出されない。(B) VERIS による視機能測定の結果。

低下が認められ

ており、神経細胞では DOCK8 の発現はほとんど確認できなかったことから、麻痺症状の軽症化は免疫機能の低下が主要な原因である可能性が高いと推測された。

一方、DOCK10 は中枢神経組織では、ミクログリアやアストロサイトに加えて神経細胞にも発現が認められた。脾臓などの免疫組織でも発現は認められたことから、CD3 抗原刺激による T 細胞の増殖実験を行ったが、T 細胞における TCR シグナルの異常は検出されなかった。しかし、ミクログリアの遊走能の低下やアストロサイトからの CCL2 産生能が野生型マウスと比較して低下していることが、初代培養を用いた解析から明らかとなった。以上の結果から、DOCK10 はグリア細胞を介して神経組織の障害を促進している可能性が考えられた。ただし、神経細胞に発現する DOCK10 の役割については未だ不明である。

(2) DOCK3 の上流にある TrkB シグナルを活性化することによって軸索再生が促進されるかについて検討した。AAV を活用して活性化型 TrkB (AAV2-TrkB) を RGC 内に発現させた後、視神経挫滅処置により神経軸索を切断する。2-4 週間後に蛍光ラベルした CTB を眼球内へ投与することで、再生軸索のみを検出した。AAV2-TrkB を投与した視神経では、挫滅部位から再生した軸索が多数確認できた (図 2)。一方、網膜 flat mount を利用した RBPMS の免疫組織染色によって障害後の残存 RGC 数を測定したところ、AAV2-TrkB を投与した網膜では残存 RGC 数が有意に増大していたことが判明した。以上の結果から、DOCK3 の上流にある TrkB シグナルを活性化することによって軸索再生効果および神経保護効果が増大することが明らかとなった。

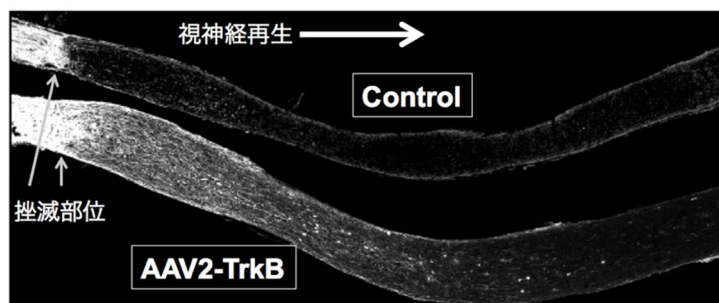


図 2 AAV2-TrkB による視神経再生.

活性化型 TrkB を組み込んだ AAV をマウス眼球へ投与し、2 週間後に視神経挫滅処置を施した。さらにその 2 週間後に蛍光ラベルした CTB を眼球へ投与し、再生軸索のみを 3 日間ラベルした。マウスは灌流後に視神経の組織切片を作製して顕微鏡にて再生軸索を観察した。

(3) DOCK3 遺伝子の変異が小児発達異常を引き起こす可能性について検討を行った。ワシントン大学との共同研究により、小児発達異常の患者の DOCK3 遺伝子の解析を行い、3 名の患者から DOCK3 遺伝子の変異を発見した。1 名の患者は stop codon が出現する変異であり、他 2 名はいずれも 1 アミノ酸置換であることが明らかとなった。しかし、1 アミノ酸置換の変異部位が DOCK3 活性ドメイン近傍にあることから、DOCK3 の Ra1 に対する GEF 活性を測定したところ活性の低下が確認された。以上の結果から、ヒトにおける DOCK3 の活性低下は、小児の発達異常を引き起こす可能性があることが示された (雑誌論文 1)。

(4) 我々は TrkB 受容体が網膜神経節細胞などの網膜神経細胞から特異的に TrkB が欠損する領域特異的欠損マウスを作製し、グルタミン酸毒性に対する耐性が低下することを報告した。このマウスを長期間に渡って観察したところ、生後 6 ヶ月以降では網膜神経節細胞の細胞死が生じており、次第に視機能も低下することが判明した。一方、眼圧は常に正常範囲であることから、新たな正常眼圧緑内障モデルとして活用できる可能性が考えられた。さらに、以上のような疾患モデルマウスを用いた研究手法と既存薬検討に関する最近の研究成果について総説にまとめたので報告した (雑誌論文 2)。

(5) 細胞膜透過型である N-acetylcysteine (NAC) は、細胞内に移行すると cysteine に変換されて glutathione の合成を促進する。酸化ストレスの抑制は緑内障を含め多くの神経変性疾患の有効な治療戦略であり得ることから、今回我々は 2 種類の正常眼圧緑内障モデルマウスである EAAC1 および GLAST 欠損マウスに対する NAC の神経保護効果を検討した。EAAC1 欠損マウスの網膜神経節細胞層で観察された glutathione の発現低下と酸化ストレスマーカーおよび autophagy マーカーの発現上昇は NAC 投与により改善された。また EAAC1 欠損マウスに NAC を投与したところ、網膜変性と視機能低下の抑制が確認されたが、GLAST 欠損マウスでは NAC 投与による改善はほとんど確認されなかった。 (雑誌論文 3)。

(6) 野生型マウスに視神経挫滅処置を施すと、神経栄養因子の 1 つである Neuritin の mRNA が有意に増加する。Neuritin は IGF-1 受容体シグナルを増強することから、Neuritin が神経保護に関与する可能性が推測された。そこで Neuritin 欠損マウスを用いて、同様に視神経挫滅モデルを作製したところ、受傷後 7 日目での網膜神経節細胞死が有意に増加していた。これは Neuritin 欠損マウスでは野生型マウスと比較して、視神経損傷後の網膜における ERK および AKT の活性上昇が低下していたことから、神経保護効果が得られなかったと考えられた (雑誌論文 4)。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

1. Wiltout K, Ferrer A, van de Laar I, Namekata K, Harada T, Klee EW, Zimmerman MT, Cousin MA, Kempainen JL, Babovic-Vuksanovic D, van Slegtenhorst MA, Aarts-Tesselaar CD, Schnur RE, Andrews M, Shinawi M. Variants in DOCK3 cause developmental delay and hypotonia. *Eur J Hum Genet*. 2019 Apr 11. doi: 10.1038/s41431-019-0397-2. 査読有
2. Harada, C., Kimura, A., Guo, X., Namekata, K. and Harada, T. (2019). Recent advances in genetically modified animal models of glaucoma and their roles in drug repositioning. *Br J Ophthalmol* 103(2), 161–166. doi: 10.1136/bjophthalmol-2018-312724. 査読有
3. Sano, H., Namekata, K., Kimura, A., Shitara, H., Guo, X., Harada, C., Mitamura, Y. and Harada, T. (2019) Differential effects of *N*-acetylcysteine on retinal degeneration in two mouse models of normal tension glaucoma. *Cell Death and Disease* 10(2), 75. doi: 10.1038/s41419-019-1365-z. 査読有
4. Azuchi, Y., Namekata, K., Shimada, T., Guo, X., Kimura, A., Harada, C., Nishigaki, A., Yamagata, K. and Harada, T. (2018) Role of neuritin in retinal ganglion cell death in adult mice following optic nerve injury. *Scientific Reports* 8(1), 10132. doi: 10.1038/s41598-018-28425-7. 査読有
5. Akaiwa, K., Namekata, K., Azuchi, Y., Guo, X., Kimura, A., Harada, C., Mitamura, Y. and Harada, T. (2018) Topical ripasudil suppresses retinal ganglion cell death in a mouse model of normal tension glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 59(5), 2080-2089. doi: 10.1167/iovs.17-23276. 査読有
6. Akiyama, G., Azuchi, Y., Guo, X., Noro, T., Kimura, A., Harada, C., Namekata, K. and Harada, T. (2017) Edaravone prevents retinal degeneration in adult mice following optic nerve injury. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 58(11), 4908-4914. doi: 10.1167/iovs.17-22250. 査読有
7. Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Harada, C. and Harada, T. (2017) Renin-angiotensin system regulates neurodegeneration in a mouse model of optic neuritis. *American Journal of Pathology* 187(12):2876-2885. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.08.012. 査読有
8. Akaiwa, K., Namekata, K., Azuchi, Y., Guo, X., Kimura, A., Harada, C., Mitamura, Y. and Harada, T. (2017) Edaravone suppresses retinal ganglion cell death in a mouse model of normal tension glaucoma. *Cell Death and Disease* 8, e2934. doi: 10.1038/cddis.2017.341. 査読有
9. Azuchi, Y., Kimura, A., Guo, X., Akiyama, G., Noro, T., Harada, C., Nishigaki, A., Namekata, K. and Harada, T. (2017) Valproic acid and ASK1 deficiency ameliorate optic neuritis and neurodegeneration in an animal model of multiple sclerosis. *Neuroscience Letters* 639, 82–87. doi: 10.1016/j.neulet.2016.12.057. 査読有
10. Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Harada, C. and Harada, T. (2017). ASK1 in neurodegeneration. *Advances in Biological Regulation* 66:63-71. doi: 10.1016/j.jbior.2017.08.003. 査読有
11. Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Noro, T., Harada, C. and Harada, T. (2017). Targeting oxidative stress for treatment of glaucoma and optic neuritis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017, 2817252. doi: 10.1155/2017/2817252. 査読有
12. Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Harada, C. and Harada, T. (2017). Dock3-NMDA receptor interaction as a target for glaucoma therapy. *Histology and Histopathology* 32(3), 215-221. doi: 10.14670/HH-11-820. 査読有
13. Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Harada, C. and Harada, T. (2016). Neuroprotection, growth factors and BDNF-TrkB signaling in retinal degeneration. *International Journal of Molecular Sciences* 17(9), pii: E1584. doi:10.3390/ijms17091584. 査読有
14. Guo, X., Kimura, A., Azuchi, Y., Akiyama, G., Noro, T., Harada, C., Namekata, K. and Harada, T. (2016) Caloric restriction promotes cell survival in a mouse model of normal tension glaucoma. *Scientific Reports* 6, 33950. doi: 10.1038/srep33950. 査読有

[学会発表](計 17 件)

1. Takayuki Harada, Takahiko Noro, Kazuhiko Namekata, Atsuko Kimura, Nanako Hashimoto, Keiko Moriya-Ito, Xiaoli Guo, Chikako Harada, Tadashi Nakano, Takashi Inoue, Erika Sasaki. Spontaneous normal tension glaucoma in aged marmosets. *World Glaucoma Congress*, 2019
2. Yuriko Azuchi, Kazuhiko Namekata, Tadayuki Shimada, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Chikako Harada, Atsuko Nishigaki, Kanato Yamagata, Takayuki Harada. Loss of neuritin accelerates RGC loss and retinal degeneration in adult mice following optic nerve injury. *Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, 2018

3. Atsuko Kimura, Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Yuriko Azuchi, Chikako Harada, Takayuki Harada. Can valproic acid treat neurodegenerative diseases? International Conference on Neurovascular and Neurodegenerative Diseases, 2018
4. Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Nobutaka Arai, Chikako Harada, Takayuki Harada. DOCK8 regulates microglial activity in neuroinflammation. International Congress of Neuropathology, 2018
5. Atsuko Kimura, Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Yuriko Azuchi, Chikako Harada, Takayuki Harada. Manipulation of retinal glutamate levels by overexpression of GLAST reduces retinal ganglion cell death in an experimental model of glaucoma. International Congress of Neuropathology, 2018
6. Takayuki Harada, Kei Akaiwa, Kazuhiko Namekata, Yuriko Azuchi, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Chikako Harada, Yoshinori Mitamura. Topical ripasudil prevents retinal ganglion cell death in a mouse model of normal tension glaucoma. European Glaucoma Society Congress, 2018
7. Xiaoli Guo, Kazuhiko Namekata, Yuriko Azuchi, Atsuko Kimura, Takahiko Noro, Chikako Harada, Takayuki Harada. Dock10 deficiency reduces neuroinflammation in optic neuritis. ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting, 2018
8. 赤岩慶、行方和彦、安土ゆり子、郭 暁麗、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、日本眼科学会総会、2018
9. 郭 暁麗、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網膜神経節細胞及び視機能の保護、日本眼科学会総会、2017
10. 行方和彦、郭 暁麗、木村敦子、原田知加子、新井信隆、原田高幸、神経炎症における Dock8 の機能解析、日本神経病理学会総会、2017
11. 郭 暁麗、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、日本神経病理学会総会、2017
12. Yuriko Azuchi, Atsuko Kimura, Chikako Harada, Kazuhiko Namekata, Takayuki Harada. Role of glial and neuronal TrkB signaling in protection of retinal ganglion cells following optic nerve injury. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2017
13. 仙波賢太郎、行方和彦、郭 暁麗、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、日本眼科学会総会、2016
14. Yuriko Azuchi, Atsuko Kimura, Xiaoli Guo, Takahiko Noro, Goichi Akiyama, Magdalena Drożdż, Chikako Harada, Atsuko Saito, Kazuhiko Namekata, Takayuki Harada. ASK1 deficiency and valproic acid synergistically reduce demyelination and visual impairment in experimental autoimmune encephalomyelitis. Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2016
15. Takayuki Harada, Kazuhiko Namekata, Atsuko Kimura, Takahiko Noro, Chikako Harada. Neuroprotection and optic nerve regeneration for glaucoma therapy: contribution of oxidative stress in animal models of normal tension glaucoma. Major identified players in glaucoma – genes and signaling pathways. International Congress of Eye Research, 2016
16. Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Chikako Harada, Takayuki Harada. Dock8 deficiency suppresses microglial migration and neuroinflammation. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2016
17. Xiaoli Guo, Kazuhiko Namekata, Atsuko Kimura, Takahiko Noro, Goichi Akiyama, Yuriko Azuchi, Chikako Harada, Takayuki Harada. Dietary restriction promotes cell survival in a mouse model of normal tension glaucoma. Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

未来を話そう！プロジェクト研究の紹介

<http://www.igakuken.or.jp/project/to-tomin/to-pro26.html>

プロジェクト研究等 医学研で行われている研究活動

<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/retina.html>

網膜・視神経変性疾患の病態解明と治療法

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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：原田高幸

ローマ字氏名：HARADA takayuki

研究協力者氏名：郭 曉麗

ローマ字氏名：GUO xiaoli

研究協力者氏名：木村敦子

ローマ字氏名：KIMURA atsuko