

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300138

研究課題名(和文) 神経変性疾患における Dock ファミリーの機能解析と治療研究への応用

研究課題名(英文) Dock family proteins in neurodegeneration

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) 15,400,000 円、(間接経費) 4,620,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究により、グアニンヌクレオチド交換因子である Dock3 を網膜神経節細胞に過剰発現させると、グルタミン毒性による神経細胞死が抑制されることが見出された。Dock3 はグルタミン酸受容体サブユニットである NR2B の分解を促進することによって、グルタミン酸毒性を低減する。正常眼圧緑内障モデルである GLAST 欠損マウスと Dock3 過剰発現マウスを交配したところ、Dock3 の過剰発現により緑内障様症状の進行が抑制されることが判明した。一方、Dock3 は髄鞘保護にも働き、cuprizone によって誘導される脱髄症状を緩和する事も見出した。

研究成果の概要(英文)：Dock3 is a guanine nucleotide exchange factors for the small GTPase Rac1. We found that Dock3 directly binds to NR2B, an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit. In transgenic mice overexpressing Dock3 (Dock3 Tg), NR2B expression in the retina was significantly decreased and NMDA-induced retinal degeneration was ameliorated. In addition, overexpression of Dock3 protected retinal ganglion cells (RGCs) from oxidative stress. We previously reported that RGC degeneration due to glutamate neurotoxicity and oxidative stress is observed in GLAST-deficient (KO) mice. In GLAST KO mice, the NR2B phosphorylation rate in the retina was significantly higher compared with Dock3 Tg:GLAST KO mice. Consistently, glaucomatous retinal degeneration was significantly improved in GLAST KO:Dock3 Tg mice compared with GLAST KO mice. These results suggest that Dock3 overexpression prevents glaucomatous retinal degeneration by suppressing both NR2B-mediated glutamate neurotoxicity and oxidative stress.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：Dock3 緑内障 神経保護 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) dearu Dock family は Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 (Rac1, Cdc42) の活性を制御することにより、細胞内でアクチン細胞骨格の再構築を調節している。これまで GEF には Dbl- homology (DH) domain と呼ばれる共通の触媒領域が存在すると考えられてきた。しかし近年になって DH domain を欠く全く新たな GEF として Dock family が見出された。Dock family は現在までに 11 分子が知られており、いずれも DHR-1 および DHR-2 という特徴的な領域を持つ。また、Dock family は様々な組織に発現し、多くの疾患の病態に関与することが明らかになっている。

2. 研究の目的

申請者は神経細胞機能と細胞骨格制御との関係に注目し、アクチン細胞骨格を制御する GEF の研究を行ってきた。本研究ではこれまで重点的に機能解明を進めてきた Dock family である Dock3 の詳細なシグナル伝達機構を明らかにし、神経発生および神経変性疾患に与える影響を主に *in vivo* で解明することを目的とする。すでに完成済みの野生型 Dock3 過剰発現マウスを活用して緑内障や多発性硬化症などの神経変性疾患について、神経保護・軸索再生・再髄鞘化療法の可能性に挑戦する。

緑内障はわが国で最大の、そして世界でも第 2 位の失明原因である。ヒトは外部環境からの情報の 80% 以上を視覚情報に頼っており、視機能の低下は Quality of Life の点からも深刻な事態を引き起こす。最近の調査で緑内障は 40 歳以上の約 5% に発症し、潜在患者数は 500 万人とも推定されている。また今後の高齢化社会においては、さらなる患者数の増加が危惧されている。そこで Dock ファミリー分子を活用した神経保護・再生療法により、特に緑内障治療を対象にした基盤研究を行った。

3. 研究の方法

グルタミン酸は中枢神経系における主要な神経伝達物質であり、学習や記憶はもちろん、視覚においても重要なはたらきをしている。通常、細胞外のグルタミン酸濃度はグルタミン酸輸送体などによって適切に制御されているが、虚血などの病的条件下では、過剰量のグルタミン酸による興奮毒性が神経細胞死を誘導する。特にグルタミン酸受容体のサブユニット NR2B は神経細胞死に深く関与すると考えられている。そこで、Dock3 と NR2B の分子間相互作用の有無、およびグルタミン酸受容体機能への影響について生化学的、分子生物学的な解析を行った。さらに、グルタミン酸トランスポーターである GLAST を欠損した GLAST 欠損マウス (緑内障モデル動物) を利用して、Dock3 がグルタミン酸による興奮毒性

から神経を保護するかについて網膜神経節細胞の残存数計測によって判定を行った。

一方、Dock3 は神経細胞だけでなく、髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトにも発現していることを見出している。したがって、Dock3 による細胞作用が髄鞘保護にも効果的である可能性が推測された。申請者は cuprizone 誘発急性脱髄モデルの安定的な作製に成功していることから、Dock3 過剰発現マウスにおける cuprizone 誘導性の脱髄について組織免疫学的、生化学的な解析を行った。さらに Dock3 過剰発現マウスを用いた多発性硬化症のモデル動物 (EAE マウス) の脱髄・再髄鞘化についても検討を行った。

4. 研究成果

本研究の解析から NR2B の細胞内ドメインが、Dock3 と結合することを見出した。通常、野生型マウスの眼球に過剰量のグルタミン酸を投与すると、網膜神経節細胞が死滅して減少する。ところが Dock3 過剰発現マウスでは、グルタミン酸投与後の NR2B 発現量が野生型マウスと比較して有意に減少し、神経細胞死も抑制されていた (図 1A)。グルタミン酸投与後の網膜神経節細胞の残存数を計測したところ、Dock3 過剰発現マウスでは細胞死が抑制されていた (図 1B)。Dock3 は細胞表面における NR2B の発現量を低減することで、グルタミン酸毒性を抑制した可能性がある。実際に Dock3 過剰発現マウス由来の培養網膜神経節細胞では、グルタミン酸負荷後のカルシウム流入と神経細胞死が抑制される。また詳しいメカニズムは不明であるが、Dock3 過剰発現マウス由来の培養網膜神経節細胞は、過酸化水素による細胞死についても耐性を発揮することが確認された。

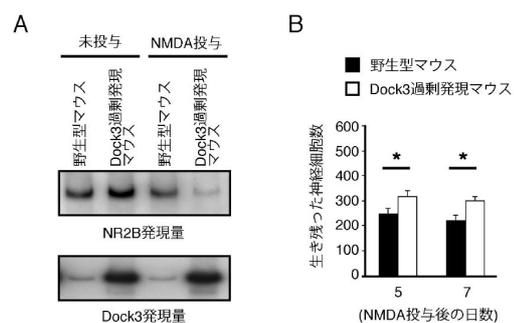


図1 Dock3がグルタミン酸毒性による網膜神経節細胞死に与える影響。(A) Dock3過剰発現マウスでは野生型マウスと比較して、NR2Bの発現量が減少している。(B) グルタミン酸毒性による網膜神経節細胞死が抑制されている。

さらに、正常眼圧緑内障モデル動物である GLAST 欠損 (KO) マウスと Dock3 過剰発現マウスを交配し、網膜組織の神経保護効果が得られるかどうかを検討したところ、GLAST

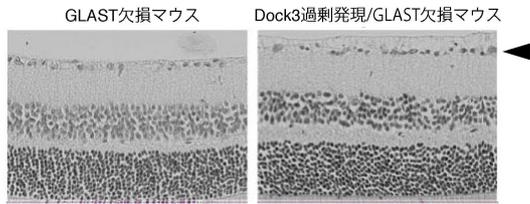


図2 Dock3 が緑内障の進行に与える影響。(左)GLAST 欠損マウスでは緑内障の進行(網膜神経節細胞が減少し、網膜が薄くなる状態)が観察される。(右) Dock3 過剰発現マウスとの交配により、GLAST 欠損マウスにおける緑内障の進行は抑制されていた。矢頭：網膜神経節細胞

KO:Dock3 過剰発現マウスでは、GLAST KO マウスで観察される緑内障様症状である網膜神経節細胞の消失が抑制されることがわかった(図2)。さらにNR2BのTyr1472におけるリン酸化状態を調べたところ、GLAST KO マウスではリン酸化が亢進していたが、GLAST KO:Dock3 過剰発現マウスでは野生型マウスと同レベルまで低下していた。Dock3 と結合したNR2BではTyr1472のリン酸化が抑制され、細胞内部への引き込みと分解が促進されたために、グルタミン毒性から保護されたことが考えられる。

一方、Dock3 過剰発現マウスに cuprizone を投与したところ、脳梁部位での脱髄が軽症化していることが抗MBP抗体を用いた組織免疫染色により判明した。しかしながら、Dock3 過剰発現マウスを利用して多発性硬化症のモデル動物(EAEマウス)を作製したが、脱髄の軽症化は認められなかった。これはEAEでは免疫細胞の攻撃による脱髄の症状が強力であったために、保護効果が見られなかったと推測された。

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 8件)

1. Namekata K, Kimura A, Kawamura K, Guo X, Harada C, Tanaka K, Harada T. Dock3 attenuates neural cell death due to NMDA neurotoxicity and oxidative stress in a mouse model of normal tension glaucoma. *Cell Death and Differentiation* 20:1250-1256, 2013. 査読有
2. Bai N, Hayashi H, Aida T, Namekata K, Harada T, Mishina M, Tanaka K. Dock3 interaction with a glutamate-receptor NR2D subunit protects neurons from excitotoxicity. *Molecular Brain* 4;6:22, 2013. 査読有
3. 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. 査読有

平成24年9月23日 毎日新聞朝刊28面で報道

4. Katome T, Namekata K, Naito T, Semba K, Guo X, Harada C, Harada T, Mitamura Y. Expression of promyelocytic leukemia protein and vascular endothelial growth factor in aqueous humor and vitreous fluid in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Research and Clinical Practice* 98(2): e9-e11, 2012. 査読有
5. 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. 査読有
6. Namekata K, Harada C, Guo X, Kimura A, 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. 査読有
7. Harada C, Guo X, Namekata K, Kimura A, Nakamura K, Tanaka K, Parada LF, Harada T. Glia- and neuron-specific functions of TrkB signaling during retinal degeneration and regeneration. *Nature Communications* 2:189, 2011. 査読有
8. Guo X, Harada C, Namekata K, Kimura A., Mitamura Y., Yoshida H., Matsumoto Y., Harada T. Spermidine alleviates severity of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 52(5): 2696-2703, 2011. 査読有

[学会発表](計 13件)

1. Kazuhiko Namekata, Chikako Harada, Xiaoli Guo, Takayuki Harada. Dock8 is a therapeutic target for CNS inflammation. 43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2013.11.10, San Diego.
2. 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, 2013.11.10, San Diego.
3. Xiaoli Guo, Kazuhiko Namekata, Chikako Harada, Takayuki Harada. Interaction between renin-angiotensin and innate immune systems in autoimmune neuroinflammation. 43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2013.11.10, San Diego
 4. 行方和彦. Dock3 を活用した網膜・視神経再生研究 シンポジウム「網膜再生医療の現状と今後」 第 117 回日本眼科学会総会 2013.4.4, 東京. (招待講演)
 5. 香留崇、仙波賢太郎、行方和彦、原田高幸、三田村佳典 ASK1-p38 経路の阻害は視神経外傷による神経細胞死を抑制する 第 117 回日本眼科学会総会 2013.4.4, 東京.
 6. Namekata K, Harada C, Guo X, Kimura A, Harada T. The role of Dock3 in axon regeneration following optic nerve injury. Poster session: Retinal cell biology, XX International Congress of Eye Research (ISER 2012), 2012.7.24., Berlin, Germany.
 7. Guo X, Harada C, Namekata K, Kimura A, Harada T. ASK1 inhibition ameliorates optic neuritis by modulating glial innate immunity. Oral session: Macrophages and microglial regulation of ocular inflammation. XX International Congress of Eye Research (ISER2012), 2012.7.23., Berlin, Germany.
 8. 行方和彦 緑内障のモデルマウス網膜におけるタウのリン酸化. タウ研究ミーティング 2012 2012.6.10, 同志社大学. (招待講演)
 9. 原田高幸、行方和彦、原田知加子 Dock3 によるマウス視神経軸索再生効果の検討. 第 116 回日本眼科学会総会 2012.4.6, 東京
 10. Harada T, Guo X, Namekata K, Luis F. Parada, Harada C. Glia- and neuron-specific functions of TrkB signaling during retinal degeneration and regeneration. 8th World Congress of Neuroscience, International Brain Research Organization (IBRO) 2011.7.18., Florence, Italy.
 11. Guo X., Harada C., Namekata K., Kimura A., Ichijo H. & Harada T. ASK1 inhibition ameliorates optic neuritis by modulating glial innate immunity. 26th Asia Pacific Academy of Ophthalmology (APAO) Congress, 2011.3.22, Sydney.
 12. Harada T., Namekata K., Guo X., Tanaka K., Ichijo H. & Harada C. ASK1 deficiency attenuates neural cell death in a mouse model of normal tension glaucoma. 26th Asia Pacific Academy of Ophthalmology (APAO) Congress, 2011.3.22., Sydney.
 13. Namekata K., Harada C., Guo X. & Harada T. Optic Nerve Regeneration is Enhanced in Dock3 Overexpressing Transgenic Mice. 26th Asia Pacific Academy of Ophthalmology (APAO) Congress, 2011.3.22, Sydney.
- 〔図書〕(計 8 件)
1. 行方和彦、原田高幸. (2013). Dock3 は正常眼圧緑内障モデルマウスにおいてグルタミン酸毒性と酸化ストレスによる神経細胞死を抑制する. BioMed サーカス.com 研究論文ハイライト http://biomedcircus.com/paper_03_20.html
 2. 香留 崇、行方和彦、郭 暁麗、仙波賢太郎、橘高大二、川村和人、木村敦子、原田知加子、一條秀憲、三田村佳典、原田高幸. (2013). ASK1-p38 経路の阻害は視神経外傷後の神経細胞死を抑制する. 日本眼科学会雑誌 117: 161
 3. 行方和彦、原田高幸. (2012). 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視神経軸索の再生を促進する. BioMed サーカス.com 研究論文ハイライト http://biomedcircus.com/paper_03_01.html
 4. 行方和彦、原田幸. (2012). 神経軸索の再生における Dock3 の機能. 日本生化学会誌 84 (5), 368
 5. 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. 日本眼科学会誌 116(5), 527, 2012.
 6. 郭 暁麗、原田知加子、行方和彦、木村敦子、三田村佳典、吉田 寛、松本 陽、原田高幸. (2011). Spermidine 投与による実験的自己免疫性脳脊髄炎の軽症化. 日本眼科学会雑誌 115(8), 729.
 7. 原田知加子、郭 暁麗、行方和彦、木村敦子、中村和昭、田中光一、Luis F. Parada、原田高幸. (2011). 網膜の変性と再生過程におけるグリアおよび神経特異的な TrkB シグナルの機能解析. 日本眼科学会雑誌 115(7), 637.
 8. 郭 暁麗、原田知加子、行方和彦、松沢

厚、Monsterrat Camps、Hong Ji、
Dominique Swinnen、Catherine
Jorand-Lebrun、Mathilde Muzerelle、
Pierre-Alain Vitte、Thomas Rückle、
木村敦子、神山邦子、松本 陽、一條秀
憲、原田高幸。(2011). TLR-ASK1-p38
経路による神経炎症と脱髄症状の制御。
日本眼科学会雑誌 115(5), 485.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：Dock8 を含む神経炎症又は脱髄疾患の
予防又は治療用医薬組成物

発明者：原田高幸、行方和彦、郭 曉麗

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 2013-026753

出願年月日：平成 25 年 2 月 18 日

国内外の別：国内

〔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

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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

木村 敦子 (KIMURA, Atsuko)

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：60569143

渡邊 快記 (WATANABE, Hayaki)

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：70595587