

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640043

研究課題名(和文) Dockファミリーの分子間相互作用が神経炎症に与える影響の解明

研究課題名(英文) Dock family proteins in demyelination and neuroinflammation

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではDock3と呼ばれるタンパクが、神経炎症を引き起こす多発性硬化症などの脱髄疾患に与える影響について検討を行なった。Dock3は網膜において神経保護効果を示すことは明らかとなっていたが、髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの保護効果については不明であった。そこで、Dock3過剰発現(Dock3 Tg)マウスを活用して薬剤誘発急性脱髄モデルを作製したところ、野生型マウスと比較して脱髄症状が緩和されていることが確認された。この結果は、Dock3によるオリゴデンドロサイトの保護を示唆しており、今後は神経炎症による脱髄への治療応用に興味もたれる。

研究成果の概要(英文)：Oligodendrocytes are the myelinating cells of axons in the central nervous system and these cells are damaged in demyelinating disorders including multiple sclerosis (MS) and optic neuritis. We examined if Dock3 can suppress demyelination in a cuprizone-induced demyelination model, an animal model of MS. We demonstrate that Dock3 overexpression protects myelin in the corpus callosum following cuprizone treatment. Furthermore, we show that cuprizone demyelinates optic nerves and the extent of demyelination is ameliorated in mice overexpressing Dock3. Cuprizone treatment impairs visual function, which was demonstrated by multifocal electroretinograms, an established non-invasive method, and Dock3 overexpression prevented this effect. In mice overexpressing Dock3, Erk activation is increased, suggesting this may at least partly explain the observed protective effects. Our findings suggest that Dock3 may be a therapeutic target for demyelinating disorders.

研究分野：神経科学

キーワード：Dock3 脱髄疾患 神経変性

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) である 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、アルツハイマー病や免疫不全など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、これまで重点的に解析を継続してきた Dock3 を利用して多発性硬化症などの脱髄疾患に対する治療応用への基礎研究を行なった。特にモデル動物を用いた *in vivo* の解析を中心に、Dock3 が脱髄や神経炎症に与える影響について解明する。すでに完成済みの Dock3 過剰発現マウスを活用して神経保護・軸索再生・再髄鞘化療法の可能性について検討を行なった。

3. 研究の方法

多発性硬化症の動物モデルとして、cuprizone 誘発急性脱髄モデルを用いた。Cuprizone を含んだ餌をマウスへ数週間与え続けることで脳梁部分の脱髄を誘発することができる。Dock3 Tg マウスへ cuprizone を投与し、脳梁部分の脱髄の進行を野生型マウスと比較検討した。また、視機能の判定には非侵襲的な手法である多局所網膜電図測定を用いた。

4. 研究成果

これまで Dock3 は神経細胞に特異的に発現すると考えられていたが、申請者は新たに髄鞘を形成する oligodendrocyte にも発現することを報告した (Namekata et al. *Cell Death Dis.*, 2014)。さらに cuprizone 誘発急性脱髄モデルを Dock3 Tg マウスを用いて作成したところ、脊髄および視神経における脱髄の軽減または再髄鞘化の促進 (図 1) さらに視機能が改善することを見出した (図 2)。特に Dock3 Tg マウスの視神経では、BDNF シグナルの下流に位置する ERK (図 3) および Dock3 の GEF 活性を制御する Elmo の発現増加が認められ、Dock3 活性がさらに高まっていることが予想される。ERK が oligodendrocyte の分化・増殖能制御の一端を担うことを考慮すると、Dock3 は髄鞘の保護効果だけでなく、oligodendrocyte 前駆細胞の分化・増殖能を

促進する可能性も推測される。

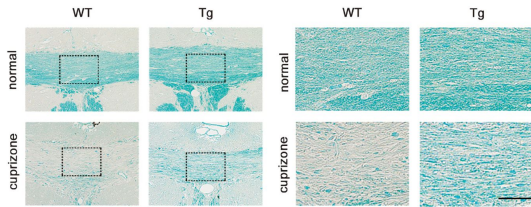


図 1 Luxol Fast blue 染色による髄鞘の染色. 野生型マウス (WT) では cuprizone 投与により顕著な脱髄が観察されるが、Dock3 Tg マウスでは (Tg) 脱髄症状が緩和された. 右写真は点線領域の拡大図.

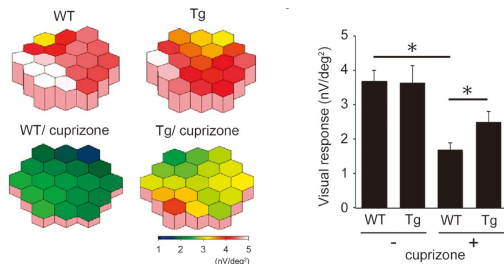


図 2 多局所網膜電位による視機能測定. Cuprizone 投与群では視機能低下が観察されるが、Dock3 Tg マウス (Tg) では視機能低下の抑制が確認できる.

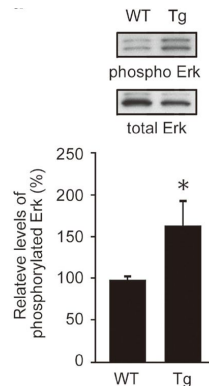


図 3 視神経組織におけるリン酸化 ERK のウェスタンブロット解析. Dock3 Tg マウス (Tg) の視神経では、野生型マウス (WT) の視神経と比較してリン酸化 ERK の増大が確認された.

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 14 件)

Noro, T., Namekata, K., Kimura, A., Guo, X., Azuchi, Y., Harada, C., Nakano, T., Tsuneoka, H. and *Harada, T. (2015) Spermidine promotes retinal ganglion cell survival and optic nerve regeneration in adult mice following optic nerve injury. doi: 10.1038/cddis.2015.93. *Cell Death and Disease* 6:e1720. 査読有
Kimura, A., Namekata, K., Guo, X., Noro, T., Harada, C. and *Harada, T.

(2015) Valproic acid prevents NMDA-induced retinal ganglion cell death via stimulation of neuronal TrkB receptor signaling. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.11.005. *American Journal of Pathology* 185: 756-764. 査読有

Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Noro, T., Azuchi, Y., Semba, K., Harada, C., Yoshida, H., Mitamura, Y. and *Harada, T. (2015) Brimonidine suppresses loss of retinal neurons and visual function in a murine model of optic neuritis. doi: 10.1016/j.neulet.2015.02.059. *Neuroscience Letters* 592:27-31. 査読有

Kimura A, Guo X, Noro T, Harada C, Tanaka K, Namekata K, Harada T. (2015) Valproic acid prevents retinal degeneration in a murine model of normal tension glaucoma. doi: 10.1016/j.neulet.2014.12.054. *Neuroscience Letters* 588:108-113. 査読有

Yanagisawa M, Aida T, Takeda T, Namekata K, Harada T, Shinagawa R, Tanaka K. (2015) Arundic acid attenuates retinal ganglion cell death by increasing glutamate/aspartate transporter expression in a model of normal tension glaucoma. doi: 10.1038/cddis.2015.45. *Cell Death and Disease* 6:e1693. 査読有

Katome, T., Namekata, K., Mitamura, Y., Semba, K., Egawa, M., Naito, T., Harada, C., Harada, T. (2015) Expression of intraocular peroxisome proliferator-activated receptor gamma in patients with proliferative diabetic retinopathy. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2014.10.010. *Journal of Diabetes and its Complications* 29, 275-281. 査読有

Namekata K, Kimura A, Kawamura K, Harada C, Harada T. (2014) Dock GEFs and their therapeutic potential: neuroprotection and axon regeneration. doi: 10.1016/j.preteyeres.2014.06.005. *Progress in Retinal and Eye Research* 43:1-16. 査読有

Namekata K, Kimura A, Harada C, Yoshida H, Matsumoto Y, Harada T. (2014) Dock3 protects myelin in the cuprizone model for demyelination. doi: 10.1038/cddis.2014.357. *Cell Death and Disease* 5:e1395. 査読有

Semba, K., Namekata K., Kimura, A.,

Harada, C., Katome, T., Yoshida, H., Mitamura, Y. and *Harada, T. (2014) Dock3 overexpression and p38 MAPK inhibition synergistically stimulate neuroprotection and axon regeneration after optic nerve injury. doi: 10.1016/j.neulet.2014.08.034. *Neuroscience Letters* 581:89-93. 査読有

Semba K, Namekata K, Kimura A, Harada C, Mitamura Y, Harada T. (2014) Brimonidine prevents neurodegeneration in a mouse model of normal tension glaucoma. doi: 10.1038/cddis.2014.306. *Cell Death and Disease* 5:e1341. 査読有

Semba K, Namekata K, Guo X, Harada C, Harada T, Mitamura Y. (2014) Renin-angiotensin system regulates neurodegeneration in a mouse model of normal tension glaucoma. doi: 10.1038/cddis.2014.296. *Cell Death and Disease* 5:e1333. 査読有

Namekata K, Kimura A, Kawamura K, Guo X, Harada C, Tanaka K, Harada, T. (2013) Dock3 attenuates neural cell death due to NMDA neurotoxicity and oxidative stress in a mouse model of normal tension glaucoma. doi: 10.1038/cdd.2013.91. *Cell Death and Differentiation* 20:1250-1256. 査読有

Bai N, Hayashi H, Aida T, Namekata K, Harada T, Mishina M, Tanaka K. (2013) Dock3 interaction with a glutamate-receptor NR2D subunit protects neurons from excitotoxicity. doi:10.1186/1756-6606-6-22. *Molecular Brain* 6:22. 査読有

Katome, T., Namekata, K., Guo, X., Semba, K., Kittaka, D., Kawamura, K., Kimura, A., Harada, C., Ichijo, H., Mitamura, Y. and Harada, T. (2013) Inhibition of ASK1-p38 pathway prevents neural cell death following optic nerve injury. doi: 10.1038/cdd.2012.122. *Cell Death and Differentiation* 20:270-280. 査読有

[学会発表](計14件)

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 2015.4.16, 北海道札幌市 ロイトン札幌

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
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
行方和彦 神経変性疾患における神経保護・軸索再生の研究. 第17回東邦大学理学部生物分子科学賞記念講演. 2015.1.6 東邦大学 千葉県船橋市. (招待講演)
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, USA Orlando
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, USA Orlando
Xiaoli Guo, Kazuhiko Namekata, Chikako Harada, Takayuki Harada. Inhibition of Angiotensin II Ameliorates Autoimmune Optic Neuritis by Suppressing Innate Immune Responses. The 2014 World Ophthalmology Congress, 2014. 4. 3, Tokyo International Forum, Tokyo
Kazuhiko Namekata, Xiaoli Guo, Chikako Harada, Takayuki Harada. Dock3 protects retinal neurons in a mouse model of normal tension glaucoma. The 2014 World Ophthalmology Congress, 2014. 4. 3, Tokyo International Forum, Tokyo
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 2014.4.5, 帝国ホテル 東京都
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, USA San Diego.
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, USA San Diego
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, USA San Diego.
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, 東京国際フォーラム. 東京都 (招待講演)
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, 東京国際フォーラム. 東京都

〔図書〕(計6件)

行方和彦、原田高幸. (2014)特集2:「視覚を用いた脳科学研究」 視神経再生. 脳 21 Vo1.17 No.4
仙波賢太郎、行方和彦、郭 曉麗、原田知加子、原田高幸、三田村佳典. レニン-アンジオテンシン系は正常眼圧緑内障モデル動物における神経変性を制御する. 日本眼科学会雑誌 118(12), 1037, 2014.
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動物における神経変性を抑制する. 日本眼科学会雑誌 118(12), 986, 2014
Namekata, K. (2014) Optic nerve regeneration. In: Neuroprotection and Neuroregeneration for Retinal Diseases. pp. 341-356. Springer Japan. (Nakazawa, T., Kitaoka, Y., Harada, T., eds). ISBN 978-4-431-54965-9
行方和彦、原田高幸. (2014). 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

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

〔その他〕

ホームページ等

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

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