

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06511

研究課題名(和文) CRMPをターゲットとした神経損傷・神経変性疾患治療戦略開発

研究課題名(英文) Study to develop therapeutic strategy of neurodegenerative disorders by targeting on CRMP

研究代表者

大島 登志男 (Ohshima, Toshio)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：20311334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経発生や神経再生に関与しているCRMPをターゲットとした神経変性疾患の治療を目指した研究を行った。具体的には、CRMP4の抑制とCRMP2のリン酸化抑制が神経再生や神経変性に与える効果をマウスで検討した。その結果、6-OHDAを線条体に注入するパーキンソン病(PD)モデルで、CRMP4遺伝子欠損がドーパミン神経(DN)脱落を抑制することを示した。また、CRMP2のリン酸化抑制により、視神経損傷後の視神経変性が抑制され、神経軸索再生が促進することを明らかにした。さらに、CRMP2のリン酸化抑制がMPTP薬剤誘導型PDモデルでもDNの脱落を抑制し、神経軸索の変性を抑止す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

本研究は、神経発生や神経再生に関与しているCRMPをターゲットとした神経変性疾患の治療を目指して行われた。結果として、6-OHDAを線条体に注入するパーキンソン病(PD)モデルにおいて、CRMP4遺伝子欠損がドーパミン神経(DN)脱落を抑制することが示された。また、CRMP2のリン酸化抑制により、視神経損傷後の視神経変性が抑制され、神経再生が促進することが明らかとなった。さらに、CRMP2のリン酸化抑制がMPTP薬剤誘導型PDモデルでもDNの脱落を抑制し、神経軸索の変性を抑止した。以上実験結果から、神経変性疾患の治療法としてCRMPをターゲットとした創薬が有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We conducted experimental research to develop therapeutic strategy for the treatment of patients with neurodegenerative disorders by targeting on CRMPs which are involved in neural development and regeneration. Using mice, we examined the effect of loss of CRMP4 and suppression of CRMP2 phosphorylation on neural degeneration and regeneration. We found that loss of CRMP4 suppressed the decline of dopaminergic neurons in substantia nigra after 6-OHDA injection into striatum. By inhibiting CRMP2 phosphorylation, regeneration of optic nerve was promoted after optic nerve injury. Suppressed degeneration of axonal terminals of dopaminergic neurons in substantia nigra was also observed after MPTP treatment, suggesting a potential of therapeutic strategy to treat neurodegenerative disorders by manipulation of CRMPs.

研究分野：神経科学

キーワード：神経変性疾患 神経再生 マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経疾患の治療が困難である理由は、中枢神経系の乏しい再生能力にある。神経再生を妨げる機構の存在がその原因のひとつであり、その細胞内シグナルに関連した因子として CRMP が注目されている。我々は、CRMPs の脳発達における機能解析に加えて、神経再生における役割について脊髄損傷モデルを用いた検討を行ってきた。その結果、CRMP2 のリン酸化を抑制した CRMP2KI マウスや CRMP4KO マウスにおいて神経炎症が軽度で脊髄損傷後の機能回復が良いことを見出し報告した。また、MPTP 誘導型パーキンソン病モデルでも MPTP のドーパミン神経毒性に対する反応が CRMP4KO では軽症であることを報告している。これらを踏まえて、CRMP をターゲットした神経変性疾患の治療の可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究は CRMP をターゲットとした神経変性疾患治療法開発に向けて、ヒトの病態に近いモデルマウスを用いて、CRMP の遺伝子改変の効果及び LKE などの CRMP2 のリン酸化を抑制する薬剤の効果を一明らかにすることを目的とした。神経変性疾患としてはパーキンソン病を、視神経損傷を神経再生のモデルとして用いた。

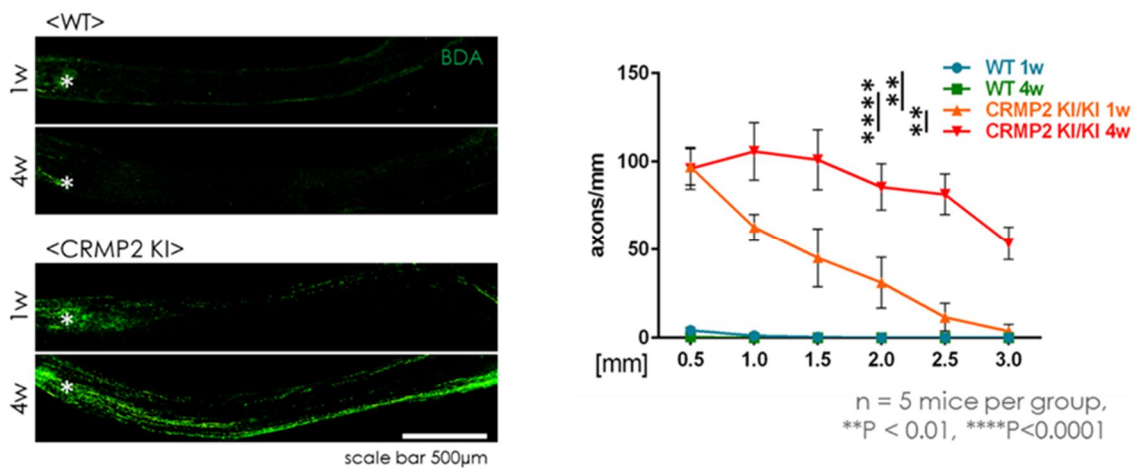
3. 研究の方法

- (1) パーキンソン病のマウスモデルとしては、6-OHDA の線条体への注入や MPTP の腹腔投与などによる薬剤誘導型モデルとヒト家族性パーキンソン病の家系に見られる遺伝子変異をマウスに導入したトランスジェニックマウスモデルがあり、本研究では、これらのパーキンソン病モデルマウスを用いて、遺伝子改変の効果と薬剤の効果を検討した。
- (2) 神経再生のモデルとして、視神経損傷からの神経軸索再生に着目し、視神経損傷による網膜神経 (神経節細胞) の脱落や、視神経再生を組織学的、生化学的に解析した。視神経軸索の再生は、トレーサーを眼内に注入して、視神経を標識し、標識された神経軸索を損傷部位からの一定距離に存在する標識された軸索数を数値化して、神経再生を評価する方法で行なった。

4. 研究成果

- (1) 6-OHDA を片側線条体へ注入すると注入側の中脳黒質のドーパミン神経細胞の脱落を引き起こす。このモデルで、野生型と CRMP4KO での比較を行ない、CRMP4KO マウスにおいて中脳黒質のドーパミン神経細胞の脱落が軽度であり、惹起されるミクログリアの反応も抑制されていることを明らかにした (Li et al., *Neurochem Res* 2020)。この研究成果から、CRMP4 がドーパミン神経変性に関与している可能性が示唆されるとともに、CRMP4 の抑制がドーパミン神経の変性を抑制する可能性が示唆された。
- (2) MPTP 誘導型パーキンソン病モデルにおいて、CRMP2 の Cdk5 リン酸化部位である Ser522 をリン酸化されない Ala に置換した CRMP2KI マウスでは、中脳黒質から線条体へ投射するドーパミン神経の軸索変性が野生型の場合に比べて少ないことを見出し報告した (Togashi et al., *Genes Cells*, 2019)。この研究成果から、神経細胞の変性過程で Cdk5 活性が上昇して、CRMP2 のリン酸化が亢進することが中脳黒質のドーパミン神経の変性に関与する可能性が示唆され、その抑制がドーパミン神経の軸索変性を抑制する可能性を示していると考えた。
- (3) MPTP 誘導型パーキンソン病モデルにおいて LKE が中脳黒質のドーパミン神経の脱落と炎症反応を抑制することを報告した (Togashi et al., *J Neurol Sci* 2020)。CRMP2KI マウスを用いた研究成果をヒト臨床に応用する場合、CRMP2 のリン酸化を抑制する LKE などの薬剤投与が候補となるが、LKE の CRMP2 のリン酸化抑制が今回得られた結果の作用機序の一つとして示唆される。
- (4) ヒトのパーキンソン病の病態に近いモデルである alpha-synuclein トランスジェニックマウスへの遺伝子改変及び薬剤の効果について、生化学的方法と組織学的方法により検討を続けている。
- (5) 視神経損傷をマウスで行ない、網膜での神経細胞死や視神経軸索の変性・再生に与える遺伝子改変の効果を検討した。その結果、CRMP2KI マウスでは視神経損傷後の軸索変性が抑制されることが明らかとなった (Kinoshita et al., *BBRC* 2019)。また、神経再生については生化学的に再生神経軸索のマーカーである GAP43 の発現が視神経損傷後の CRMP2KI マウスの網膜と視神経で野生型の場合に比べて上昇しており、CRMP2KI マウスにおいて視神経の再生が促進されていることが示唆された。

神経再生を評価するため BDA による視神経標識を行ない、CRMP2KI における神経再生の促進を組織学的にも確認した（下図）。さらに、網膜の神経節細胞の脱落も抑制されていることが明らかとなった（Kondo et al., Sci Rep 2019）。これらの研究成果をプレスリリースした（<https://www.waseda.jp/top/news/64897>）。



トレーサーBDA を眼内に注入して再生した神経軸索を可視化した。グラフはそれを数値化したもので、CRMP2KI で神経再生が促進していることが明らかとなった。図は発表論文の Kondo et al., Sci Rep 2019 より。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kinoshita Y, Kondo S, Takahashi K, Nagai J, Wakatsuki S, Araki T, Goshima Y, Ohshima T	4. 巻 514
2. 論文標題 Genetic inhibition of CRMP2 phosphorylation delays Wallerian degeneration after optic nerve injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BBRC	6. 最初と最後の頁 1037-1039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.05.060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kondo S, Takahashi K, Kinoshita Y, Nagai J, Wakatsuki S, Araki T, Goshima Y, Ohshima T	4. 巻 9
2. 論文標題 Genetic inhibition of CRMP2 phosphorylation at serine 522 promotes axonal regeneration after optic nerve injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 7188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43658-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Togashi K, Hasegawa M, Nagai J, Tonouchi A, Masukawa D, Hensley K, Goshima Y, Ohshima T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Genetic suppression of CRMP2 phosphorylation improves outcome in MPTP-induced Parkinson's model mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 31-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Togashi Kentaro, Hasegawa Masaya, Nagai Jun, Kotaka Ken, Yazawa Arina, Takahashi Miyuki, Masukawa Daiki, Goshima Yoshio, Hensley Kenneth, Ohshima Toshio	4. 巻 413
2. 論文標題 Lanthionine ketimine ester improves outcome in an MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease via suppressions of CRMP2 phosphorylation and microglial activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 116802 ~ 116802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2020.116802	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Li Wenting, Goshima Yoshio, Ohshima Toshio	4. 巻 45
2. 論文標題 Loss of Collapsin Response Mediator Protein 4 Attenuates 6-Hydroxydopamine-Induced Impairments in a Mouse Model of Parkinson's Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2286 ~ 2301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-020-03086-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------