

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792024

研究課題名（和文） Dock3 による緑内障と視神経炎の治療戦略

研究課題名（英文） New therapy for glaucoma and optic neuritis using Dock3

研究代表者

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・研究員

研究者番号：60569143

研究成果の概要（和文）：網膜神経節細胞の軸索伸長を促進する新たな guanine nucleotide exchange factor である Dock3 には、グルタミン酸毒性と酸化ストレスから神経細胞を保護する作用があることを見出した。さらに Dock3 過剰発現マウスと緑内障モデル動物を交配した場合には、緑内障様の神経変性が抑制されることを確認した。

研究成果の概要（英文）：We previously showed that neuron-specific Dock3, a new member of the guanine nucleotide exchange factors for the small GTPase Rac1, induces axonal outgrowth in retinal ganglion cells (RGCs). In this study, we found that Dock3 protects RGCs from both glutamate neurotoxicity and oxidative stress. We also demonstrated that Dock3 overexpression prevents glaucomatous retinal degeneration in GLAST deficient mice, a model of normal tension glaucoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：Dock3、緑内障、視神経炎

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 緑内障は我が国で最大の失明原因となっているが、眼圧下降以外には evidence のある治療法が開発されていないのが現状である。また視神経再生についても十分な検討が行われているとは言い難い。そこで新たな神経保護および再生療法についてのブレークスルーが求められる状況にある。

(2) 我々の研究グループでは新たな guanine nucleotide exchange factor (GEF) である Dock3 に注目した研究を展開している。Dock3 はアルツハイマー病の原因遺伝子産物である Presenilin に結合する新規タン

パク質として発見され、アミロイド前駆体タンパクの分解を促進したり、アルツハイマー病患者の脳で減少することなどが報告されたが、病態との関係は不明のままである。しかし Dock3 は Rho family 低分子量 G タンパク質である Rac1 の活性化を介してアクチン繊維の再構築を促進することにより、神経軸索の形成に関与する可能性がある。そこで実際に Dock3 過剰発現 (Dock3 Tg) マウスを用いて視神経損傷モデルを作製したところ、野生型マウスと比較して視神経軸索の再生が有意に促進されることが確認された (Namekata et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2010)。

(3) また日本人で最も多い緑内障の病型である正常眼圧緑内障について、グルタミン酸受容体輸送体である GLAST 遺伝子の欠損マウスが、疾患モデルとして活用可能であることが報告されている (Harada et al., J Clin Invest, 2007)。したがって GLAST 欠損マウスにおいて Dock3 による治療効果を確認できれば、新たな神経保護療法へとつながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では中枢神経系に特異的に発現する GEF の1つである Dock3 について、神経保護作用の有無を検討する。特に網膜神経節細胞 (RGC) に対する保護効果のメカニズムを解明し、さらに緑内障モデル動物における治療効果を in vivo で解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 培養 RGC に Dock3 を過剰発現させて主要なグルタミン酸受容体である NR2B の発現量を生化学的に解析する。また同細胞にグルタミン酸を投与し、細胞毒性に対する耐性の変化を定量化する。

(2) 野生型マウスおよび Dock3 Tg マウスの眼球内にグルタミン酸を投与し、RGC 死の定量を行う。

(3) 野生型マウス由来の培養 RGC に Dock3 を過剰発現させ、過酸化水素を負荷した後に、細胞死の定量を行う。

(4) 緑内障モデルマウス (GLAST 欠損マウス) と Dock3 Tg マウスを交配することにより、RGC 細胞死および視神経軸索変性に対する Dock3 の保護効果を、免疫染色や生化学的手法を用いて検討する。

## 4. 研究成果

(1) Dock3 を過剰発現させた細胞では、細胞膜上のグルタミン酸受容体 NR2B の発現量が減少し、グルタミン酸刺激による細胞死が抑制されることを見出した。実際に Dock3 Tg マウスの眼球内にグルタミン酸を投与すると、野生型マウスよりも生存する RGC 数が多く、グルタミン酸毒性に対する耐性が増していた。

(2) Dock3 を過剰発現させた培養 RGC で

は過酸化水素による細胞死が減少し、酸化ストレス耐性も亢進することがわかった。

(3) Dock3 Tg マウスと GLAST 欠損マウスを交配したところ、GLAST 欠損マウスと比較してより多くの RGC が生存し、網膜内層の形態も保たれるなど、緑内障の進行が抑制されることがわかった。したがって今後は Dock3 の遺伝子治療により緑内障の予防が可能か、さらに検討を進める予定である。

## 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 11 件)

1. Namekata, K., Kimura, A., Kawamura, K., Guo, X., Harada, C., Tanaka, K. and 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 (in press) 査読有
2. 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. Cell Death and Differentiation 20(2), 270-280, 2013. doi:10.1038/cdd.2012.122. 査読有
3. 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、査読無、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。日眼会誌 117(2), 161, 2013.
4. Namekata, K., Watanabe, H., Guo, X., Kittaka, D., Kawamura, K., Kimura, A., Harada, C. and Harada, T. Dock3 regulates BDNF-TrkB signaling for neurite outgrowth by forming a ternary complex with Elmo and RhoG. Genes to Cells 17(8), 688-697, 2012. doi:

- 10.1111/j.1365-2443.2012.01616.x.  
査読有
5. Namekata, K., Harada, C., Guo, X., Kimura, A., Kittaka, D., Watanabe, H. and Harada, T. Dock3 stimulates axonal outgrowth via GSK-3 $\beta$ -mediated microtubule assembly. *Journal of Neuroscience* 32(1), 264-274, 2012. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4884-11.2012. 査読有
  6. 行方和彦、原田知加子、郭 曉麗、木村敦子、橘高大二、渡邊快記、原田高幸、査読無、Dock3はグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )による微小管重合を介して軸索伸長を促進する。日眼会誌 116(5), 527, 2012.
  7. Harada, C., Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Nakamura, K., Tanaka, K., Parada, L.F., and Harada, T. Glia- and neuron-specific functions of TrkB signalling during retinal degeneration and regeneration. *Nature Communications* 2: 189, 2011. doi: 10.1038/ncomms1190. 査読有
  8. Guo, X., Harada, C., Namekata, K., Kimura, A., Mitamura, Y., Yoshida, H., Matsumoto, Y., and Harada, T. Spermidine alleviates severity of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52(5), 2696-2703, 2011. doi: 10.1167/iovs.10-6015. 査読有
  9. 郭 曉麗、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、査読無、Spermidine 投与による実験的自己免疫性脳脊髄炎の軽症化。日眼会誌 115(8), 729, 2011.
  10. 原田知加子、郭 曉麗、行方和彦、木村敦子、中村和昭、田中光一、Luis F. Parada、原田高幸、査読無、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。日眼会誌 115(7), 637, 2011.
  11. 郭 曉麗、原田知加子、行方和彦、松本 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、査読無、TLR-ASK1-p38 経路による神経炎症と脱髄症状の制御。日眼会誌 115(5), 485, 2011.
- [学会発表] (計 3 件)
1. Kazuhiko Namekata, Chikako Harada, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Takayuki Harada. The role of Dock3 in axon regeneration following optic nerve injury. XX International Congress of Eye Research (ISER 2012). 2012.7.24., Berlin, Germany.
  2. Xiaoli Guo, Chikako Harada, Kazuhiko Namekata, Atsuko Kimura, Takayuki Harada. Session "Macrophages and microglial regulation of ocular inflammation" ASK1 inhibition ameliorates optic neuritis by modulating glial innate immunity. XX International Congress of Eye Research (ISER2012). 2012.7.23., Berlin, Germany.
  3. Xiaoli Guo, Chikako Harada, Kazuaki Nakamura, Atsuko Kimura, Hidenori Ichijo, Takayuki Harada. ASK1 inhibition ameliorates optic neuritis by modulating glial innate immunity. The 26th Asia Pacific Academy of Ophthalmology (APAO) Congress. 2011.3.22., Sydney, Australia.
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
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・研究員  
研究者番号：60569143
- (2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし