

機関番号：34517

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890315

研究課題名（和文） 酸化型 DJ-1 特異的な抗体を用いたパーキンソン病簡易診断キットの開発

研究課題名（英文） The study of diagnosis for Parkinson disease at early-stage using with monoclonal antibodies against oxidized DJ-1.

研究代表者

赤澤 陽子 (YOKO AKAZAWA)

武庫川女子大学・薬学部・助手

研究者番号：50549897

研究成果の概要（和文）：現在のパーキンソン病の治療は対処療法のみであり、早期の診断と治療開始が可能になれば、飛躍的に病気の進行を遅延・抑制できると考えられるが、早期診断マーカーは未だ存在しない。本研究では家族性パーキンソン病の原因遺伝子のひとつである DJ-1 の酸化変性に着目し、それに対するモノクローナル抗体の作成および ELISA による定量測定系を構築と、それによるパーキンソン病患者の血液中の酸化 DJ-1 含量の測定を行った。その結果、薬物治療を行っていない患者群において、顕著な赤血球中酸化 DJ-1 含量の上昇が認められ、さらに酸化 DJ-1 は高分子化していることが明らかとなった。薬物投与パーキンソン病モデル動物においても、赤血球中の酸化 DJ-1 上昇と脳組織中の酸化 DJ-1 陽性細胞が認められた。本研究により、赤血球中の酸化 DJ-1 の測定はパーキンソン病の早期診断の指標となると示唆された。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanisms leading to neurodegeneration in Parkinson disease (PD) remain elusive, although many studies of evidence have indicated that oxidative stress and impairment of protein degradation system, resulting in cell death. However, idiopathic PD is essentially diagnosed clinically. The development of biomarkers for PD would afford many advantages: early diagnosis and identification of subgroups of PD. DJ-1 had recently found to be causative gene for a familial form of PD. Cysteine residue at position 106 (Cys-106) in DJ-1 was found to be oxidized preferentially under oxidative stress. In the present study, we developed specific antibodies against Cys-106-oxidized DJ-1 and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting oxidized DJ-1, and measured blood levels of oxidized DJ-1 in PD patients. It was observed that the level and an aggregated form of oxidized DJ-1 in erythrocytes of unmedicated PD patients were markedly higher than mediated PD patients and healthy subjects. Furthermore, we observed that the treatment of mice with PD model compounds results in a significant elevation of oxidized DJ-1 in erythrocytes and its positive cells in the substantia nigra in a dose- and time-dependent manner. These results suggest the involvement of oxidative modification of DJ-1 in the pathogenesis of PD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	890,000	267,000	1,157,000
年度			
年度			
計	1,890,000	567,000	2,457,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：公衆衛生学・健康科学

キーワード：蛋白質、脳神経疾患、プロテオーム、老化

1. 研究開始当初の背景

申請者は産業技術総合研究所 健康工学研究センターにて酸化ストレス負荷細胞のプロテオーム解析を行い、DJ-1 を含む酸化ストレス応答タンパク質を複数同定した。さらに、DJ-1 の活性中心である 106 番目のシステインが酸化剤の処理により優先的にスルホン酸(Cys-SO₃H)へ酸化されることを明らかとした。これらの背景のもと、酸化修飾した DJ-1 に着目し、これに対するモノクローナル抗体の作成に成功した。さらに、この抗体を用いた競合法 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)による酸化 DJ-1 の定量測定系を構築し、パーキンソン病患者の血液中の酸化 DJ-1 含量の測定を行った。その結果、健常者および薬物治療中のパーキンソン病患者群に比べ、未治療のパーキンソン病患者群では赤血球中の酸化 DJ-1 が顕著に増加していた(図 1)。さらに、詳細を検討した結果、未治療パーキンソン病群の赤血球中の酸化 DJ-1 は高分子化していることが認められた(図 2)。

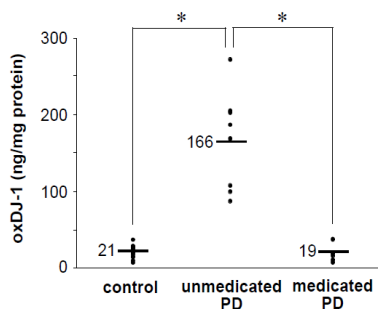


図 1 パーキンソン病患者赤血球中の酸化 DJ-1 含有量

健常者および薬物治療中パーキンソン病群、未治療群の赤血球中の酸化 DJ-1 を ELISA により測定した。(* $p < 0.01$, ANOVA Tukey)

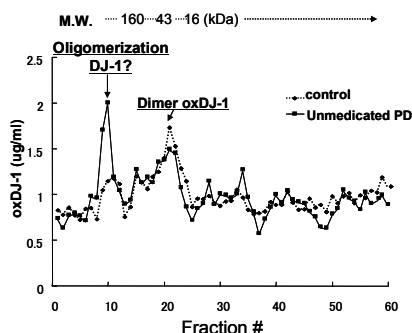


図 2 赤血球中の酸化 DJ-1 の高分子化

健常者および未治療パーキンソン病患者の赤血球を分子ふるいカラムにより分画し、各画分の酸化 DJ-1 含量を ELISA 法により測定した。

2. 研究の目的

本研究の最終目標はこの抗体を用いた酸化 DJ-1 測定により血液検体からパーキンソン病を診断できる手法の実用化である。そのため、本提案研究では酸化 DJ-1 の高分子化に着目し、その構造(重合タンパク質の組成)や疾患との相関性や、パーキンソン病モデル動物における酸化 DJ-1 の変動の追跡により、疾患と酸化 DJ-1 上昇のメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

パーキンソン病態と酸化 DJ-1 蓄積の詳細を解析するため、薬物投与によるパーキンソン病モデル動物を作成して、赤血球中(ELISA)および脳組織中(組織免疫染色)の酸化 DJ-1 の経時的な変化を追跡した。

また、未治療パーキンソン病患者群で認められた酸化 DJ-1 の高分子化の構造を解析するため、臨床検体の高分子化した酸化 DJ-1 値と薬物治療の相関を検討した。さらに、リコンビナントタンパク質を作成し、DJ-1 の酸化状態と高分子化への影響を検討した。

4. 研究成果

(1)パーキンソン病モデル動物の構築と酸化 DJ-1 レベルの追跡(論文①)

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)または 6-hydroxydopamine (6-OHDA)によるパーキンソン病モデル動物を作成し、経時的な血液および脳組織の酸化 DJ-1 含量の測定を行った。MPTP は 15 mg/kg・2 時間おきにマウスに腹腔内投与(i.p.)を 1-3 回行い、投与 1 日目~10 週間後まで経時的に採血および脳組織を摘出した。MPTP 投与後 3 日目以降において線条体のドーパミン含量の有意な低下が認められ、3 回投与群では、コントロール群の 1/7 程度まで減少した(10.1 ng/g tissue→1.3 ng/g tissue)。

赤血球中の酸化 DJ-1 は MPTP の量および時間依存的に増加した(図 3)。さらに、15 mg/kg 3 回投与 1 週間後の中脳・黒質部位において、酸化 DJ-1 陽性細胞が認められた(図 4)。

Table 1
Striatal levels of DA in mice administered with MPTP^a

Time after MPTP treatment	Control	15 mg/kg × 1	15 mg/kg × 2	15 mg/kg × 3
3 days	10.1 ± 2.0	3.5 ± 0.5 ^b	3.7 ± 0.7 ^b	1.3 ± 0.5 ^b
1 week	10.1 ± 3.0	9.5 ± 3.0	4.6 ± 2.0 ^b	2.2 ± 1.0 ^b
10 weeks	12.2 ± 2.0	7.9 ± 2.0	7.7 ± 0.9 ^b	3.0 ± 2.0 ^b

^a Mice at 8 weeks of age were administered one to three times of 15 mg/kg MPTP by i.p. injection at 2-3h intervals. At indicated time after MPTP treatment, dopamine levels of striatum were measured by HPLC-ECD as described. Mean values were expressed as ng per g tissue (n = 6-8 in each group).
^b p < 0.05 (Tukey, ANOVA) when compared with control.

表 1 MPTP 投与による線条体ドーパミンの減少

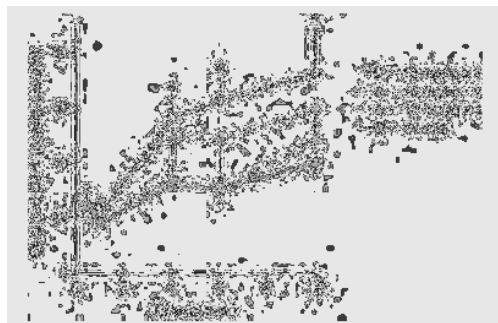


図 3 MPTP 投与マウスの赤血球中酸化 DJ-1 の増加

マウスに 15 mg/kg 2 時間おきに 1~3 回投与し、経時的に採血、赤血球中の酸化 DJ-1 含量を ELISA により測定した。

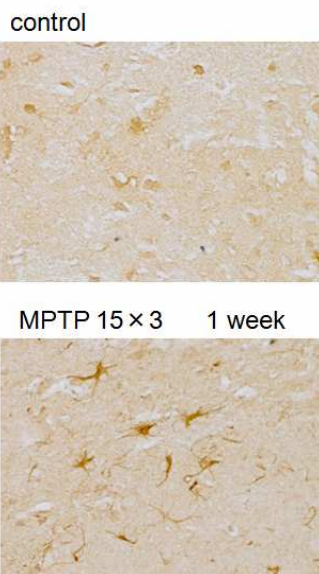


図 4 MPTP 投与マウス中脳 - 黒質における酸化 DJ-1 発現

MPTP(15 mg/kg × 3 回)または生理食塩水投与 1 週間後の脳組織における酸化 DJ-1 を組織免疫染色により検出した。

6-OHDA は脳固定器を用いてラット中脳-黒質に 0.4 μg/2 μl 投与し、その後、経時的な採血と、赤血球中の酸化 DJ-1 含量の測定

ELISA により行った。6-OHDA 投与 2 週間後以降における有意な酸化 DJ-1 の上昇が認められた(図 5)。

ヒトパーキンソン病検体における赤血球中の酸化 DJ-1 値の上昇を、薬物投与によるモデル動物においても再現できた。これらの結果から、赤血球中の酸化 DJ-1 含量の測定はパーキンソン病の診断に有効であることが示唆された。

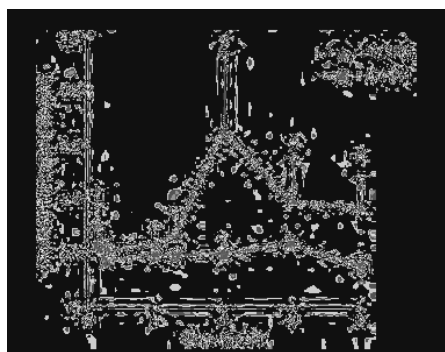


図 5 6-OHDA 投与ラットにおける赤血球中の酸化 DJ-1 の上昇

6-OHDA 投与ラットより経時的に採血を行い、競合法 ELISA を用いて酸化 DJ-1 含量を測定した。*p < 0.05 (Tukey, ANOVA)

(2) ヒト臨床検体の高分子化酸化 DJ-1 の測定

パーキンソン病患者および健常者の赤血球を分子ふるいカラムにより分画し、10 番目のフラクションの酸化 DJ-1 を競合法 ELISA 法により測定した。全酸化 DJ-1 の結果(図 1)と高い相関が得られ、未治療パーキンソン病の赤血球中には高分子化した酸化 DJ-1 が蓄積していると考えられた(図 6)。

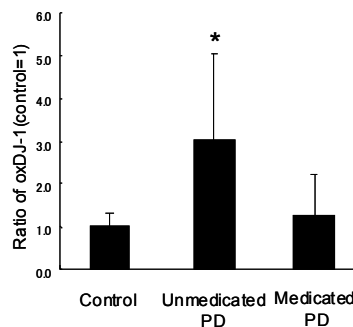


図 6 未治療パーキンソン病赤血球中の高分子化した酸化 DJ-1 の蓄積

健常者およびパーキンソン病(薬物治療中と未治療)の赤血球を分子ふるいカラムにより分画し、フラクション No.10 の酸化 DJ-1 含量を ELISA 法により測定した。

(3) リコンビナントタンパク質における DJ-1 タンパク質の酸化状態と高分子化

DJ-1 の酸化状態と高分子化に対する関与を、リコンビナントタンパク質を用いて検討した。リコンビナント DJ-1 を過酸化水素により酸化し、酸化 DJ-1 タンパク質を調製した。それぞれのタンパク質をゲルフラクションで分画後に SDS-PAGE および CBB 染色によりタンパク質を染色した。未酸化 DJ-1 は高分子側にバンドが認められなかったが、酸化により高分子側にバンドが現れ、酸化による高分子化が認められた(図 7)。

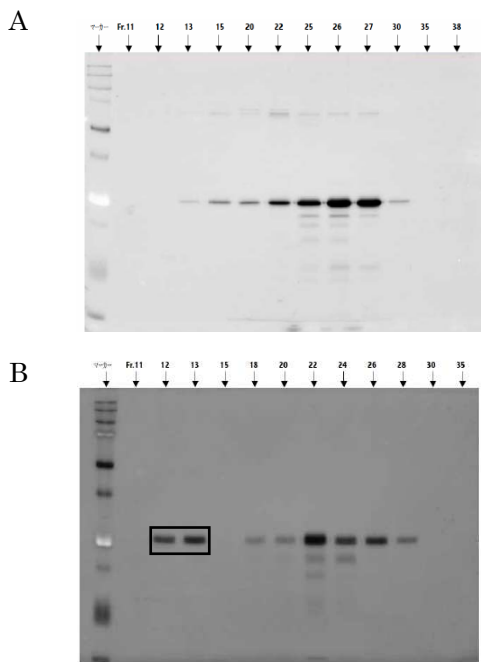


図 7 リコンビナント酸化 DJ-1 タンパク質の高分子化

未酸化 DJ-1(A)または酸化 DJ-1(B)リコンビナントタンパク質を作成し、分子カラムにより分画後に各フラクションを SDS-PAGE および CBB 染色によって解析した。

以上の研究成果から、パーキンソン病態と酸化 DJ-1 の蓄積には関与が認められ、さらに DJ-1 の酸化は高分子化を誘導することを明らかとした。さらなる酸化 DJ-1 蓄積と高分子化のメカニズムを解明することにより、パーキンソン病の血液からの早期診断システムの実用化を目指す。

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 1 件)

1. 赤澤陽子、斎藤芳郎、浜窪隆雄 他 10 名
“Elevation of oxidized DJ-1 in the brain and erythrocytes of Parkinson disease model animals” Neuroscience Letters, 査読有, 483, 201-205, 2010

[学会発表] (計 2 件)

1. 赤澤陽子、斎藤芳郎 他 11 名 「酸化 DJ-1 とパーキンソン病(2):臨床検体の測定」第 62 回日本酸化ストレス学会学術集会、2009 年 6 月 11 日、九州大学医学部百年講堂
2. 斎藤芳郎、赤澤陽子 他 6 名 「パーキンソン病モデルにおける脳内および赤血球酸化 DJ-1 の増加」、第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会、2010 年 6 月 24 日、神奈川県民ホール

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

特になし

○取得状況 (計 0 件)

特になし

[その他]

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤澤 陽子 (YOKO AKAZAWA)

武庫川女子大学 薬学部 助手

研究者番号：50549897

(2) 研究分担者

特になし

(3) 連携研究者

特になし