

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893163

研究課題名(和文) DJ-1欠失誘導性ミトコンドリア膜透過性遷移孔開口によるパーキンソン病新規モデル

研究課題名(英文) To generate and analyze new Parkinson's disease mice model with increased oxidative stress

研究代表者

山口 浩雄 (YAMAGUCHI, Hiroo)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00701830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ドパミンニューロン内の、ミトコンドリア機能異常、酸化ストレスがドパミンニューロン障害にどのように関与しているか、またPD (Parkinson's disease) 原因遺伝子であるDJ-1がどのように関与しているかの研究を進めるため、ドパミンニューロン特異的に酸化ストレス(特にミトコンドリア内において)を生じるマウスの作成を進めている。現在までに、TH- CreER Tgマウスのコロニー、SOD2 (Superoxide dismutase-2) flox/flox マウスのコロニー、DJ-1 KO (knock out) マウスのコロニーを作成し、これらマウスの交配を進めている。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the dopaminergic neuronal death in PD(Parkinson's disease), we try to generate the dopaminergic neuron specific conditional knockout mice in which Superoxide dismutase-2(SOD2) is conditionally knocked out in dopaminergic neuron. We have established TH- CreER Tg mice and SOD2 (Superoxide dismutase-2) flox/flox mice colonies. To investigate the role of DJ-1, a responsible gene for PD, in the dopaminergic neuronal death, we will breed DJ-1 KO mice with dopaminergic neuron specific SOD2 conditional knockout mice and analyze.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

劣性遺伝を示す家族性パーキンソン病 (PD; Parkinson's disease)の原因遺伝子として、これまでに、DJ-1、PINK1 及び Parkin が報告された。**私たちは DJ-1 欠損線維芽細胞 (DJ-1^{-/-} cell) では、野生型と比較し、Reactive oxygen species (ROS) が増加し、ミトコンドリア膜電位($\Delta\Psi_m$)が低下し、permeability transition pore(mPTP)の opening が増加することを報告した(1)(図 1-3)。**

図 1 DJ-1^{-/-} cell における

$\Delta\Psi_m$ の低下

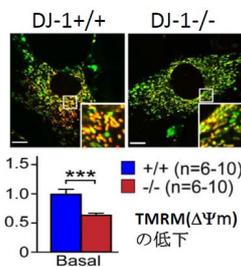


図 2 DJ-1^{-/-} cell における

mPTP の opening 増加

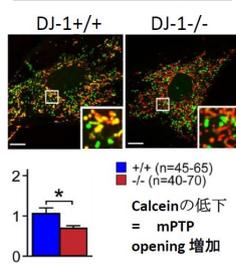
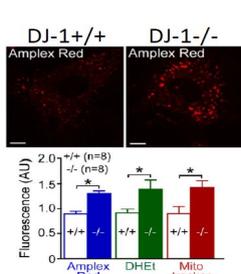


図 3 DJ-1^{-/-} cell における

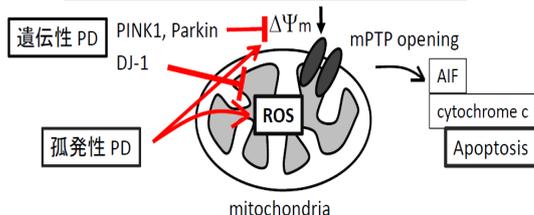
ROS の増加



同様のミトコンドリア異常を PINK1 欠損線維芽細胞においても認めたことから(研究協力者;2)、私たちは、これらの

家族性 PD の機序としてミトコンドリア機能異常($\Delta\Psi_m$ の低下、mPTP の opening 増加)と、それが誘導する細胞死という共通のメカニズムを初めて提唱した。孤発性 PD でも剖検脳でミトコンドリア異常がみられ、ミトコンドリア呼吸鎖を障害する mPTP が PD を誘発することから、**孤発性 PD においても同様の病態機序が存在するとの仮説(図 4)を立てた。**

図 4 PD におけるミトコンドリア障害



さらに、DJ-1^{-/-} cell におけるミトコンドリア $\Delta\Psi_m$ の低下と mPTP の opening 増加は、抗酸化剤である glutathione 及び N-Acetyl-Cystein (NAC)の投与により、回復することを示した。加えて、野生型線維芽細胞に酸化ストレス剤である H₂O₂ または pyocyanin を投与するとミトコンドリア $\Delta\Psi_m$ の低下と mPTP opening 増加が引き起こされた。これらのことは、細胞内およびミトコンドリアにおいて DJ-1 が ROS の産生を抑制することでミトコンドリア $\Delta\Psi_m$ の低下と mPTP の opening の増加を抑制していることを示す(1)。

他方、**私たちは DJ-1 が劣性遺伝性 PD の原因遺伝子であるにもかかわらず、DJ-1 ノックマウスが黒質ドパミンニューロンの変性脱落を示さないことを報告した(3)。**

DJ-1 欠損線維芽細胞では酸化ストレスがミトコンドリア機能異常 ($\Delta\Psi_m$ の低下、mPTP の opening 増加)を引き起こすが、DJ-1 単独ノックアウトマウスでは酸化傷害の蓄積はなく、黒質ドパミンニューロンの変性脱落はなかった。したがって、**実験動物の飼育条件下では黒質ドパミンニューロンに負荷となる酸化ストレスが抗酸化作用に比べて相対的に不足している可能性が高い。**そこで、私たちは DJ-1 ノックアウトマウス(DJ-1^{-/-})に、スーパーオキシド(O₂⁻)を酸素と過酸化水素へ不均化する酸化還元酵素で、ミトコンドリアに同化する SOD2(Superoxide Dismutase2) ノックアウトマウス(SOD2^{+/-})を交配させることで、ミトコンドリアでの抗酸化作用が不十分な DJ-1^{-/-} SOD2^{+/-} マウスを作成し、PD マウスモデルを樹立することを目的とする。

2. 研究の目的

私たちは、家族性パーキンソン病の原因遺伝子である DJ-1 の欠損線維芽細胞で

ROS の増加、ミトコンドリア $\Delta\Psi_m$ の低下、mPTP の opening 増加を報告した。本研究では DJ-1 欠損培養ドパミンニューロンや DJ-1 をノックダウンしたヒト iPS 細胞由来培養ドパミンニューロンを用いて、蛍光染色法 (TMRM, Calcein) で測定したミトコンドリア機能 ($\Delta\Psi_m$, mPTP の opening) を改善する薬剤探索と DNA array 解析により、**DJ-1 欠失によるミトコンドリア異常から細胞死へ至る経路の制御因子を明らかにする**。DJ-1 ノックアウトマウス (DJ-1^{-/-}) と SOD2 (Superoxide Dismutase2) ノックアウトマウス (SOD2^{+/-}) を交配させ DJ-1^{-/-} SOD2^{+/-} マウスを作成し、**抗酸化作用を低減させることで PD マウスモデルを樹立する**。

3. 研究の方法

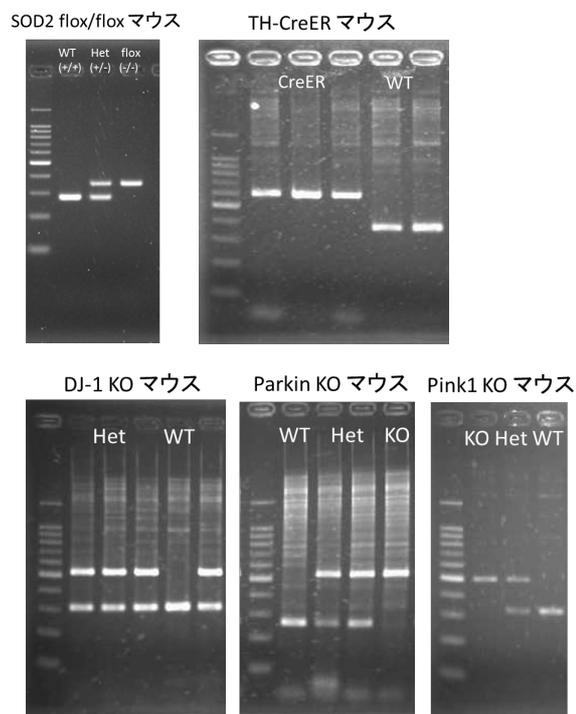
当初の実験計画では、DJ-1 ノックアウトマウス (DJ-1^{-/-}) と SOD2 (Superoxide Dismutase2) ノックアウトマウス (SOD2^{+/-}) を交配させ DJ-1^{-/-} SOD2^{+/-} マウスを作成し、抗酸化作用を軽減させることで、PD モデルマウスを作成することをめざしていたが、研究開始後に、同様の DJ-1^{-/-} SOD2^{+/-} マウスの解析が論文発表された(4)。それによると、DJ-1^{-/-} SOD2^{+/-} マウスでは、黒質ドパミンニューロンの変性脱落は認められなかった。このことは、SOD2^{+/-} マウスでは抗酸化作用の軽減が十分ではないことを示している。そこで、私たちは当初の計画を変更し、ドパミンニューロン特異的に SOD2 が欠損するマウスの作成を試みることにした (千葉大学 清水博士との共同研究)。また、DJ-1 KO (knock out) マウスのコロニーを作成し、ドパミンニューロン特異的に SOD2 が欠損するマウスとの交配を行う。さらに、Parkin KO マウス、PINK1KO マウスのコロニーを作成し、ドパミンニューロン特異的に SOD2 が

欠損するマウスとの交配を行う。これらのマウスを樹立後、解析を行う。

4. 研究成果

現在までに、TH- CreER Tg マウスのコロニー、SOD2 (Superoxide dismutase-2) flox/flox マウスのコロニー、DJ-1 KO (knock out) マウスのコロニーを作成し、これらマウスの交配を進めている (図5)。さらに、Parkin KO マウス、PINK1KO マウスのコロニーを作成した。今後、ドパミンニューロン特異的に SOD2 が欠損するマウスとの交配を進める。

図5 マウスコロニーの作成 (マウス genotyping)



<引用文献>

1. Giaime E*, Yamaguchi H*, Gautier CA, Kitada T, Shen J. Loss of DJ-1 does not affect mitochondrial respiration but increases ROS production and mitochondrial permeability transition pore opening. PLoS ONE. 2012, 7:e40501. *These authors contributed equally to this work.
2. Gautier CA, Giaime E, Caballero E, Núñez L, Song Z, Chan D, Villalobos C, Shen J. Regulation of mitochondrial permeability

transition pore by PINK1. Mol Neurodegener. 2012 May 25;7:22.

3. Yamaguchi H, Shen J. Absence of dopaminergic neuronal degeneration and oxidative damage in aged DJ-1-deficient mice. Mol Neurodegener. 2007 May 29;2:10.
4. Hennis MR, Seamans KW, Marvin MA, Casey BH, Goldberg MS. Behavioral and neurotransmitter abnormalities in mice deficient for Parkin, DJ-1 and superoxide dismutase. PLoS One. 2013 Dec 26;8(12):e84894.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

山口浩雄 DJ-1 (PARK7) の研究の現状とその機能 医学のあゆみ 247: 1038-1046 (2013)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 浩雄 (YAMAGUCHI, Hiroo)

九州大学病院 助教

研究者番号: 00701830

(2) 連携研究者 (共同研究者)

清水 孝彦 (SHIMIZU, Takahiko)

千葉大学医学部、准教授

研究者番号: 40301791

吉良 潤一 (KIRA, Jun-ichi)

九州大学医学部、教授

研究者番号: 40183305