

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：34315

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07341

研究課題名(和文) シヌクレインのクリアランスを基盤とした神経変性疾患治療薬の創出

研究課題名(英文) Exploratory research of therapeutic agents for neurodegenerative diseases based on clearance of alpha-synuclein

研究代表者

脇岡 雅宣(Hijioka, Masanori)

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：50780061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)： $\alpha$ -シヌクレイン( $\alpha$ -syn)は神経細胞内に蓄積することや、細胞外に放出された $\alpha$ -synがミクログリアに作用することで脳内の炎症を惹起することが報告されている。本研究ではパーキンソン病原因遺伝子の1つであるDJ-1が $\alpha$ -synによって引き起こされる細胞応答に対してどのような作用をもつか調べた。その結果、神経細胞内においてはDJ-1の欠損により $\alpha$ -synの細胞内凝集が増加することが判明した。ミクログリアにおいては、DJ-1への結合が予測される化合物が炎症応答を減弱させることを見出した。このことから、DJ-1は $\alpha$ -synにより引き起こされる神経変性に対する治療標的となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Preceding studies showed that  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) was accumulated in neurons and extracellular  $\alpha$ -syn bound to microglia and caused inflammation in the brain of patients with synucleinopathy. In this study, I investigated the effects of DJ-1 which is one of the causative genes of Parkinson's disease to cell responses induced by  $\alpha$ -syn. I revealed that intracellular aggregation of  $\alpha$ -syn was increased in the DJ-1 deficient SH-SY5Y cells compared with WT cells. Furthermore, I found that compounds predicted to bind to DJ-1 attenuated the inflammatory response in Microglia. These data suggest that DJ-1 can be a therapeutic target for neurodegenerative disease caused by  $\alpha$ -syn.

研究分野：薬理学、神経科学、神経免疫学

キーワード： $\alpha$ -シヌクレイン DJ-1 神経細胞 ミクログリア NF- $\kappa$ B オートファジー

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

$\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ -synuclein;  $\alpha$ -syn) はパーキンソン病 (Parkinson's disease; PD) 原因遺伝子 SNCA (PARK1) 上にコードされるタンパク質であり、神経細胞内で凝集し PD の特徴的な病理所見であるレビー小体を形成することや神経傷害性を示すことが報告されている。また、近年ではレビー小体型認知症 (Dementia with Lewy Bodies; DLB) も問題視されており、 $\alpha$ -syn のクリアランスを促すことがこれらの疾患に対する治療方策となることが予想される。

一般的に  $\alpha$ -syn は神経細胞から産生され神経細胞間を伝播するとされているが、近年では脳内の免疫機能を担う細胞種であるミクログリアが  $\alpha$ -syn を取り込むことが報告され (Lee *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008)、ミクログリアが  $\alpha$ -syn のクリアランスを行うことが示唆されている。

一方で  $\alpha$ -syn がミクログリア細胞膜上の Toll 様受容体 (TLR) に作用することでミクログリアを活性化させ PD 病態の進行に関わることも報告されており、PD 時にミクログリアが病態を軽減させるか否かは不明瞭な現状である。

本研究課題において、申請者は PD 原因遺伝子 PARK7 にコードされるタンパク質である DJ-1 に着目した。既報において、DJ-1 は酸化ストレスセンサーとしての機能やシャペロンとしての機能を持つことが報告されている。また、PD においては酸化ストレスによって誘導されるドパミン神経の脱落に対して DJ-1 が神経細胞保護的に働くことが示されており、DJ-1 が PD 病態の進行を抑制させると言われている。

近年、DJ-1 は細胞内タンパク質分解系であるオートファジー・リソソーム系と密接に関わること (Krebiehl *et al.*, *PLoS One*, 2010) が報告されており、ミクログリアや神経細胞に取り込まれた  $\alpha$ -syn の分解に DJ-1 が寄与している可能性があると思定した。さらに DJ-1 は TLR 刺激時のミクログリアの活性化に対して抑制的に働くことも報告されており (Trudler *et al.*, *J. Neurochem.*, 2014)、 $\alpha$ -syn とミクログリアの相互作用にも DJ-1 が関与している可能性が大いに考えられる。

### 2. 研究の目的

(1) 「神経細胞およびミクログリアにおける  $\alpha$ -syn の取り込みおよび蓄積に対する DJ-1 の作用解析」

本研究では神経細胞内およびミクログリア細胞内における  $\alpha$ -syn の取り込みおよび蓄積に焦点を当て、これらを解消するための治療標的の探索を目的とする。本研究では治療標的の候補分子として DJ-1 に注目し、特に、神経細胞内の  $\alpha$ -syn 凝集に対する DJ-1 の作用を明らかにする。

(2) 「 $\alpha$ -syn によるミクログリア活性化に対する DJ-1 の治療標的としての有用性探索」

ミクログリアは細胞膜上の TLR を介して活性化し、炎症応答を誘導することが知られている。また、 $\alpha$ -syn が TLR を刺激することで炎症を惹起することが近年報告されている。そこで、DJ-1 が  $\alpha$ -syn によって惹起される炎症応答に対して抑制作用を示すか、また、我々が過去に見出した DJ-1 への結合が予想される低分子化合物が炎症応答に対して抑制作用をもたらすか調べる。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に対し、ヒト SNCA 遺伝子を過剰発現させ、 $\alpha$ -syn pre-formed fibrils (pffs) を 48 時間添加することで細胞内の  $\alpha$ -syn 凝集を惹起した。実験に用いた  $\alpha$ -syn は大腸菌 BL21 株を用いた強制発現系で産生させ、その後、精製した。Pffs 添加後の細胞は固定後に免疫染色に供した。また、タンパク質を回収し、western blot による発現解析も行った。

(2) マウスミクログリア細胞株 BV-2 細胞に対して、線維凝集した  $\alpha$ -syn あるいは TLR2 リガンドであるペプチドグリカン (PGN) を処置し (3–30  $\mu$ g/mL)、24 時間後に細胞を回収、total RNA を精製後 Real-time PCR による各種炎症性サイトカインの発現量解析を行った。DJ-1 結合化合物は既報と同様のものを用い (Kitamura *et al.*, *Mol. Neurodegener.*, 2011)、PGN に対して前処置した (0.3–1  $\mu$ M)。DJ-1 結合化合物の作用メカニズムの探索のため、PGN 処置後の細胞は固定後に免疫染色に供した。また、タンパク質を回収し、western blot による発現解析も行った。

### 4. 研究成果

(1) SH-SY5Y 細胞において SNCA 遺伝子の一過性過剰発現および pffs の添加は  $\alpha$ -syn の細胞内凝集を誘導した。この時確認された細胞内凝集はチオフラビン T 陽性の凝集であることも分かった。これに対して DJ-1 をノックダウンした SH-SY5Y 細胞においては  $\alpha$ -syn の細胞内凝集の著名な増加が確認された (図 1)。

また、同タイミングにおけるタンパク質発現量の変動を調べたところ、オートファジーに関連するタンパク質 (LC3 および p62) の発現量に変動がみられており、DJ-1 の欠損によりオートファジー系の破綻が起こり、これに起因して  $\alpha$ -syn の細胞内凝集が促進されることが示唆された。

一方でミクログリアにおける  $\alpha$ -syn 取り込みに対する DJ-1 の作用解析に関しては研究期間内に成果を得ることができなかったが、今後も研究を継続していく。

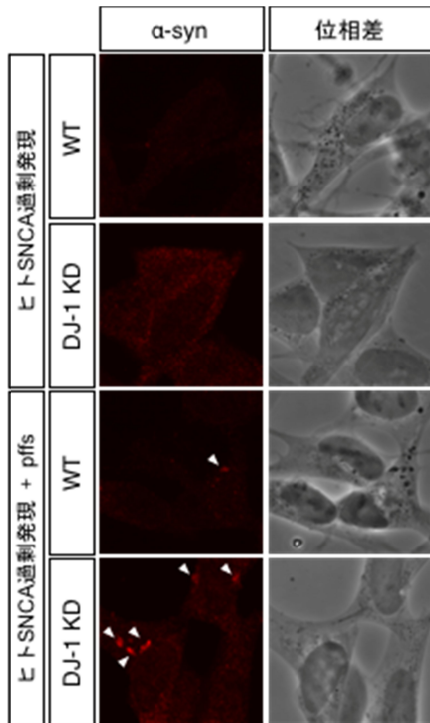


図 1: ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において、DJ-1 の欠損により  $\alpha$ -syn 細胞内凝集形成の促進がみられた

(2) BV-2 細胞に対して、線維凝集した  $\alpha$ -syn を処置したところ、処置後 24 時間において TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  の mRNA 発現量が有意に増加した。また、TLR2 リガンドである PGN を処置したところ、処置濃度依存的に各種炎症性サイトカイン mRNA 量の増加が確認できた。また、TLR2 刺激直後に nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) のサブユニットの 1 つである p65 タンパク質の局在を免疫染色により調べたところ、p65 の核内移行が確認された。

PGN 刺激による炎症の惹起に対して、DJ-1 結合化合物(Comp)を処置したところ、部分的にはあるが、Comp の処置濃度依存的に各種炎症性サイトカイン mRNA 量の産生が抑制された(図 2)。

また、p65 タンパク質の局在を免疫染色により調べたところ、PGN に誘導される p65 の核内移行が Comp の処置により抑制されていた。さらに核内の p65 タンパク質を western blot によって検出したところ、免疫染色同様に、PGN によって核内での増加が確認され、Comp の処置で抑制がみられた。さらに、NF- $\kappa$ B の核移行シグナルを阻害する分子である inhibitor of  $\kappa$ B(I $\kappa$ B)のタンパク質発現量も Comp の処置により減少した。

よって DJ-1 を標的とする化合物が NF- $\kappa$ B 等の TLR 下流のシグナル伝達を抑制することで  $\alpha$ -syn によって惹起される脳内での炎症応答を抑制できることが示唆された。

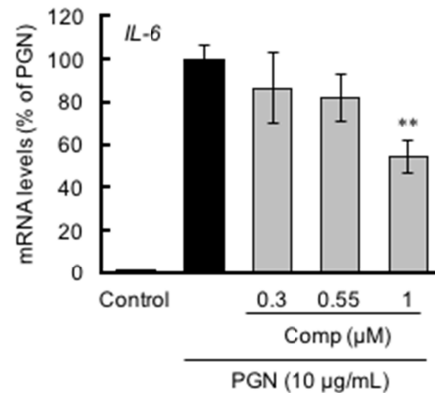


図 2: マウスミクログリア細胞株 BV-2 細胞において、Comp の処置により PGN で誘導される IL-6 mRNA の発現量増加が抑制された

#### <引用文献>

Lee *et al.*, Clearance and deposition of extracellular alpha-synuclein aggregates in microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol.372, 2008, pp.423–428.

Krebiehl *et al.*, Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson's disease-associated protein DJ-1. *PLoS One.* Vol.5, 2010, e9367.

Trudler *et al.*, DJ-1 deficiency triggers microglia sensitivity to dopamine toward a pro-inflammatory phenotype that is attenuated by rasagiline. *J. Neurochem.* Vol.129, 2014, pp. 434–447.

Kitamura *et al.*, Neuroprotective effect of a new DJ-1-binding compound against neurodegeneration in Parkinson's disease and stroke model rats. *Mol. Neurodegener.* Vol.6, 2011, 48.

#### 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)

Hijioka M., Inden M., Yanagisawa D., Kitamura Y., DJ-1/PARK7: A New Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders., *Biological and Pharmaceutical Bulletin.*, 査読有, Vol.40, 2017, pp.548–552. DOI: 10.1248/bpb.b16-01006

〔学会発表〕(計 3 件)

尾上徹, 肱岡雅宣, 北村佳久. DJ-1 結合化合物はマウスミクログリアにおいて TLR2 を介した炎症反応を抑制する. 第 138 回日本薬理学会関東部会. 2018.

Kitamura Y. and Hijioka M. DJ-1-binding compound ameliorates spatial learning and memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. 2018.

Tanaka C., Hijioka M., Onoue T. and Kitamura Y. DJ-1 binding compound attenuates TLR2-mediated inflammatory reactions in BV-2 microglia. 第 41 回 日本神経科学大会. 2018.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

立命館大学研究者情報データベース

( <http://research-db.ritsumei.ac.jp/Profiles/126/0012513/profile.html> )

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

肱岡 雅宣 ( HIJIOKA, Masanori )

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：50780061