

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06904

研究課題名(和文) 家族性パーキンソン病PARK7原因遺伝子産物への作用化合物の薬理的創薬研究

研究課題名(英文) Developmental drug study targeting PARK7/DJ-1, a causative gene of familial Parkinson's disease

研究代表者

北村 佳久 (Kitamura, Yoshihisa)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：60195295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：家族性パーキンソン病PARK7の翻訳産物は、DJ-1タンパク質である。DJ-1をノックダウンさせたヒトSH-SY5Y細胞では著明に酸化ストレスによる細胞死が誘導された。一方、 α -シヌクレインはパーキンソン病において、凝集・沈着することが報告されている。本研究において、 α -シヌクレインの凝集を呈するモデルの作製、およびミクログリアによる α -シヌクレインの取り込みを評価するin vitro実験系を確立した。つまり、ヒトSNCA遺伝子を過剰発現したSH-SY5Y細胞において、 α -シヌクレインのpreformed fibrilsを処置することで、細胞内に α -シヌクレインの著しい凝集が引き起こされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PARK7/DJ-1は家族性パーキンソン病の原因遺伝子として同定されたため、当初はパーキンソン病の治療薬としての創製を試みていた。しかし、強い抗酸化ストレス能をもつことから、他の神経変性疾患に対する治療標的の候補になると考えられた。そこで、プリオンと同様に α -シヌクレインが細胞内で凝集する細胞評価系を確立した。さらに、DJ-1の抗酸化能調節部位であるC106残基に結合する化合物を見出し、その化合物に神経細胞保護効果があることを明らかにした。本研究課題で得られた研究成果により、パーキンソン病だけでなく、他の神経変性疾患にも効く新たなシード薬を見出し、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：DJ-1 protein is a normal gene product of familial Parkinson's disease PARK7. DJ-1-knocked down human SH-SY5Y cells markedly generated oxidative stress and then neural cell death. On the other hand, α -synuclein (α -syn) protein is known to accumulate the aggregated form in the brains of patients with synucleinopathies such as Parkinson's disease (PD). In this study, I establish the α -syn-aggregation system in SH-SY5Y cells and the evaluation system of microglial α -syn-phagocytosis. In addition, the exogenic treatment of preformed fibrils (PFFs) induced intracellular α -syn-aggregation in SH-SY5Y cells overexpressing the human SNCA gene. These results suggest that exogenous PFFs induced intracellular aggregation of α -syn protein harboring α -sheet structures from endogenous α -syn similar to prion-like spreading.

研究分野：薬学 薬理学

キーワード：PARK7 DJ-1 DJ-1結合化合物 α -シヌクレイン ミクログリア 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) パーキンソン病や認知症などの神経変性疾患は、神経細胞の著しい脱落が結果として生じ、原発部位に起因した特有の神経症状を呈する。パーキンソン病では α -シヌクレイン、アルツハイマー型認知症ではアミロイド- β およびリン酸化タウなどの変性タンパク質が脳内に蓄積し、酸化ストレス・小胞体ストレスが引き起こされると考えられている。しかしながら、これらの神経変性メカニズムの全容は未だ明らかにされておらず、近年これら神経変性疾患における薬がいくつか開発されているが基本的には対症療法にしか過ぎない。そのため、神経変性疾患の脳病態を解明し、新規治療薬を開発することが必須である。*PARK7/DJ-1* は北海道大学薬学部において、がん原遺伝子として単離され、オランダの研究グループにより家族性パーキンソン病の原因遺伝子 *PARK7* として同定された。研究代表者はこれまでに、野生型(正常) *PARK7/DJ-1* タンパク質はドパミン神経の酸化ストレスセンサーとして機能し神経保護作用を示すこと、家族性パーキンソン病において遺伝子変異した *PARK7/DJ-1* タンパク質はその機能を消失することを見出している。

(2) *DJ-1* の機能として、転写因子 Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) の核内移行に関わることや変性タンパク質の分解に関与することが報告されている。さらに最近、ミクログリアによる α -シヌクレインの貪食に *DJ-1* が関与することも報告されている。

このように、*DJ-1* は神経細胞およびミクログリアにおいて神経変性疾患に対する防御機構として働くことが示唆されているが、*DJ-1* がどのように機能するのか、詳細な分子機構は明らかになっていない。一方、化合物ライブラリを用いたバーチャルスクリーニングにより *DJ-1* に結合する化合物を見出し、その薬理作用として *DJ-1* の抗酸化作用を維持・増強するような機能を有することを報告してきた。しかしながら、神経細胞内における *DJ-1* 結合化合物の作用機序やミクログリアにおける *DJ-1* 結合化合物の薬理作用も解明できていない。そこで、研究代表者は、ミクログリアにおける *DJ-1* の作用解析および神経変性疾患モデルに対する *DJ-1* および *DJ-1* 結合化合物の作用を明らかにするため研究を計画した。

DJ-1 に関する研究は、最近、研究代表者たち以外でも国内外において広く行われてきた。そして、*DJ-1* がミクログリアにおける α -シヌクレインの貪食に関与するという知見も報告されている。研究代表者の研究グループは *DJ-1* の活性調節部位である C106 残基に注目した研究を展開しており、この部位に結合する低分子化合物の薬効を報告してきた。そのため、*DJ-1* という分子への着目という点では競合グループが存在するが、創薬というゴールを見据えた化合物の探索という点において、研究代表者たちがリードしている。本研究課題は、*DJ-1* のさらなる機能や *DJ-1* 結合化合物の詳細な薬理作用を探索するという点で有望な研究であると考えている。

2. 研究の目的

(1) *PARK7/DJ-1* は家族性パーキンソン病の原因遺伝子として同定されたため、当初はパーキンソン病の治療薬としての創製を試みていたが、強い抗酸化ストレス能をもつことから、酸化ストレスを病因とする種々の神経変性疾患に対しても、治療標的になると考えた。また、*DJ-1* は異常タンパク質の除去にも関わることが示唆されていることから、 α -シヌクレインやアミロイド- β のクリアランスを促進するための治療標的としても注目している。

(2) 研究代表者は、*DJ-1* の抗酸化能調節部位である C106 残基に結合する化合物をバーチャルスクリーニングにより見出しており、その化合物に神経細胞保護効果があることを見出してきた。

本研究課題では *in vitro* での詳細な作用メカニズムの解析や、*in vivo* 動物モデルを用いた解析により種々の神経変性疾患に対する *DJ-1* 結合化合物の薬理作用を明らかにしていく。さらに、研究代表者たちが見出した *DJ-1* 結合化合物が *DJ-1* の抗酸化能および異常タンパク質の除去能を増強させ、種々の神経変性疾患モデルに対して有効性を発揮すれば、これまで行われてきた研究とは一線を画した、創薬につながる研究になると期待し、本研究課題を実施した。

3. 研究の方法

(1) *DJ-1* による抗酸化能発揮の分子メカニズムの解明および薬理的調節：

DJ-1 タンパク質は活性酸素種(ROS)を直接の基質として除去するといわれているが、他のメカニズムとして、Nrf2 の核内移行に基づく抗酸化因子(ヘムオキシゲナーゼ-1 やグルタチオン合成酵素)の発現を誘導することも報告されている。しかしながら、その作用メカニズムは明確ではないため、ヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y 細胞を用いて分子薬理的な解析を行う。また、*DJ-1* ノックダウン細胞を作成し、野生型と *DJ-1* ノックダウン細胞を比較し、さらに *DJ-1* 結合化

物の有用性を検討する。

In vivo ではマウスおよびラットを用いてパーキンソン病モデルを作製し、DJ-1 結合化合物を投与した際の Nrf2 下流の抗酸化因子の発現量変化や病態軽減作用を調べる。

(2) DJ-1 による異常タンパク質除去機構の薬理的調節：

神経細胞内においてはユビキチン・プロテアソーム系やオートファジーなど、変性タンパク質の除去機構が存在する。DJ-1 はオートファジーによるタンパク質分解に関与することが知られており、これに対して DJ-1 結合化合物が促進作用を有するか調べる。研究代表者の過去の研究において、神経細胞内への α -シヌクレインの蓄積が DJ-1 のノックダウンで増強するという基礎的知見を得ており、DJ-1 結合化合物による DJ-1 の機能増強が α -シヌクレインの蓄積を軽減するか解析する。

(3) ミクログリアにおける DJ-1 による異常タンパク質貪食機構の解明および薬理的調節：

ミクログリアには α -シヌクレインやアミロイド- β タンパク質を貪食し除去する機構が存在する。最近の研究により、 α -シヌクレインの貪食に DJ-1 の関与が報告されていることから、種々の異常タンパク質の除去に DJ-1 が関与し、それを DJ-1 結合化合物が促進できると予想した。マウスミクログリア細胞株 BV-2 細胞を用いて DJ-1 の変異体を作製し、変異 DJ-1 をもつ BV-2 細胞における種々の変性タンパク質の貪食を評価する。また、DJ-1 結合化合物による貪食能の亢進が見られるか評価する。

病態モデル動物を用いた解析に関して、研究代表者は過去にアルツハイマー病モデルマウスにおいてミクログリアの貪食能を亢進させることで老人斑の蓄積を抑える研究 (Takata, Kitamura, et al., *J. Biol. Chem.*, 2010) を行ってきた経験があるため、アルツハイマー病モデルにおける異常タンパク質蓄積に関する研究のノウハウを有している。 α -シヌクレインの蓄積を伴う神経細胞モデル、さらに動物モデルについても確立を試みる。さらに、それらのモデルの作用解析も行う予定である。

4. 研究成果

(1) 骨髄幹細胞および造血幹細胞は分化細胞に比べ、DJ-1 タンパク質の発現量が高かった。これらの幹細胞から分化させたミクログリア様細胞はアミロイド- β を貪食・除去した。

(2) 扁形動物プラナリアの脳ドパミン神経ネットワークの再構築にプラナリアの DJ-1 が関与することが明らかとなった。さらに、脳ドパミン神経再生の位置情報の認識機能に MEK/ERK 経路が調節することが推定された。

(3) 家族性パーキンソン病 PARK7 の正常遺伝子産物は、DJ-1 タンパク質として見出している。DJ-1 をノックダウン (KD) させたヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞では著明に酸化ストレスによる細胞死が誘導された。一方、 α -シヌクレインはパーキンソン病をはじめとしたシヌクレイノパチーにおいて、凝集・沈着することが報告されているタンパク質である。本研究課題において α -シヌクレインの凝集を呈するモデルの作製、およびミクログリアによる α -シヌクレインの取り込みを評価する *in vitro* 実験系を確立した。つまり、ヒト SNCA 遺伝子を安定的に過剰発現した SH-SY5Y 細胞を作成し、これに対して α -シヌクレインの preformed fibrils (PFFs) を処置することで、プリオン凝集と同様に、細胞内に α -シヌクレインの凝集が著しく引き起こされた。また、マウスミクログリア細胞株 BV-2 細胞に対しては PFFs を処置することにより細胞内への取り込みが起こることを確認した。さらに、マウス脳内へ PFFs を投与することによって脳内に α -シヌクレインの凝集を呈するモデルが作製できた。

(4) α -シヌクレイン PFFs によって誘導されるヒト SH-SY5Y 細胞内における α -シヌクレインの凝集体形成は、ニコチン性アセチルコリン受容体刺激により抑制された。

< 引用文献 >

Kazuyuki Takata, Yoshihisa Kitamura, Mana Saeki, Maki Terada, Sachiko Kagitani, Risa Kitamura, Yasuhiro Fujikawa, Alfred Maelicke, Hidekazu Tomimoto, Takashi Taniguchi, and Shun Shimohama, Galantamine-induced amyloid- β clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 285 (No. 51), , December 17, 2010, 40180–40191

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kuroda E., Takata K., Nishimura K., Oka H., Sueyoshi M., Aitani M., Kouda A., Satake S., Shima C., Toda Y., Nakata S., Kitamura Y., and Ashihara E.	4. 巻 73 (1)
2. 論文標題 Peripheral blood-derived microglia-like cells decrease amyloid- burden and ameliorate cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer 's disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Alzheimers Dis.	6. 最初と最後の頁 413-429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-190974	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 Kawanishi S., Takata K., Itezo S., Nagayama H., Konoya S., Chisaki Y., Toda Y., Nakata S., Yano Y., Kitamura Y., Ashihara E.	4. 巻 64
2. 論文標題 Bone-marrow-derived microglia-like cells ameliorate brain amyloid pathology and cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Alzheimer 's Dis.	6. 最初と最後の頁 563-585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-170994	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 Kuroda Eriko, Nishimura Kaneyasu, Kawanishi Shohei, Sueyoshi Mari, Ueno Fumitaka, Toji Yumiko, Abo Naoko, Konishi Toko, Harada Koki, Satake Shiho, Shima Chiaki, Toda Yuki, Kitamura Yoshihisa, Shimohama Shun, Ashihara Eishi, Takata Kazuyuki	4. 巻 438
2. 論文標題 Mouse Bone Marrow-derived Microglia-like Cells Secrete Transforming Growth Factor- 1 and Promote Microglial A Phagocytosis and Reduction of Brain A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 217 ~ 228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.05.004	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 Hijioka Masanori, Futokoro Risa, Ohto-Nakanishi Takayo, Nakanishi Hiroki, Katsuki Hiroshi, Kitamura Yoshihisa	4. 巻 85
2. 論文標題 Microglia-released leukotriene B4 promotes neutrophil infiltration and microglial activation following intracerebral hemorrhage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 106678 ~ 106678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2020.106678	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 Hijioka Masanori, Kitamura Kanori, Yanagisawa Daijiro, Nishimura Kaneyasu, Takata Kazuyuki, Inden Masatoshi, Kitamura Yoshihisa	4. 巻 144
2. 論文標題 Neuroprotective effects of 5-aminolevulinic acid against neurodegeneration in rat models of Parkinson's disease and stroke	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 183 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.07.012	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 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 脇岡雅宣, 懐理紗, 香月博志, 北村佳久
2. 発表標題 脳内出血病態形成過程におけるロイコトリエンB4の機能解析.
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hijioka M., Futokoro R. and Kitamura Y.
2. 発表標題 Analysis of the functions of leukotriene B4 and lipoxin A4 to the neutrophil invasion into hematoma in vitro model of intracerebral hemorrhage.
3. 学会等名 Neuro2019 第42回 日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深尾昂佑, 脇岡雅宣, 小早川達貴, 池本有佑, 北村佳久
2. 発表標題 MEK阻害薬によるプラナリアの個体再生およびドパミン神経再生の抑制.
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 懐理紗, 脇岡雅宣, 北村佳久
2. 発表標題 LXA4受容体刺激は脳内出血モデルマウスの運動機能障害を軽減する.
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野崎空, 脇岡雅宣, 辻尚仁, 北村佳久
2. 発表標題 ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞における α -シヌクレイン凝集に対するガランタミンの作用.
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hijioka M., Kurauchi Y., Hisatsune A., Seki T., Koga T., Kitamura Y., Yokomizo T., Shimizu T. and Katsuki H.
2. 発表標題 Leukotriene B4-BLT1 axis exacerbates neutrophil invasion and motor dysfunction after intracerebral hemorrhage in mice.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (京都) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾上徹, 脇岡雅宣, 北村佳久
2. 発表標題 BV-2ミクログリアにおけるTLR2を介した炎症反応に対するDJ-1結合化合物の作用
3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2018 (福岡)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴慧司, 脇岡雅宣, 有賀寛芳, 北村佳久
2. 発表標題 アルツハイマー病モデルマウスの認知機能障害に対するDJ-1結合化合物の作用解析
3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2018 (福岡)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hijioka M., Futokoro R. and Kitamura Y.
2. 発表標題 Leukotriene B4 secreted by microglia promotes neutrophil invasion into hematoma of mice with intracerebral hemorrhage.
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会 (大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北村佳久, 脇岡雅宣, 北村叶里, 柳沢大治郎, 西村周泰, 高田和幸, 位田雅俊
2. 発表標題 半側性パーキンソン病モデルラットにおけるドパミン神経細胞死に対する 5-アミノレブリン酸の抑制作用
3. 学会等名 第137回日本薬理学会近畿部会 (オンライン開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野崎空, 脇岡雅宣, 辻尚仁, 北村佳久
2. 発表標題 ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞における α -シヌクレインタンパク質の細胞内凝集体形成に対するガランタミンの抑制作用
3. 学会等名 第43回 日本神経科学大会 (オンライン開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野崎空, 脇岡雅宣, 辻尚仁, 北村佳久
2. 発表標題 ニコチン性アセチルコリン受容体を介したガラントミンの α -シヌクレイン凝集抑制作用
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会 (オンライン開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深尾昂佑, 脇岡雅宣, 北村佳久
2. 発表標題 プランナリアにおけるドパミン神経の再生に関するアセチルコリンの作用解析
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会 (オンライン開催)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 北村佳久, 脇岡雅宣, 高橋良輔	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 372
3. 書名 神経・筋・精神 / 麻酔・鎮痛	

1. 著者名 脇岡雅宣, 天ヶ瀬紀久子, 北村佳久	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本看護協会出版会	5. 総ページ数 216
3. 書名 認知症plus予防教育	

〔産業財産権〕

〔その他〕

教員紹介
<http://www.ritsumei.ac.jp/ph/educators/detail.html?id=27>
研究概要・研究業績
<http://research-db.ritsumei.ac.jp/Profiles/118/0011784/profile.html>

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
研究分担者	脇岡 雅宣 (Hijioka Masanori) (50780061)	立命館大学・薬学部・助教 (34315)	変更：2020年12月1日 名古屋市立大学

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
---------	---------