

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06586

研究課題名(和文) 神経変性疾患シヌクレイノパチーのストレスセンサーDJ-1に関する薬理的創薬研究

研究課題名(英文) Pharmacological study of stress sensor DJ-1 on neurodegenerative disorder synucleinopathy

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスセンサーDJ-1をノックダウンさせたヒトSH-SY5Y細胞では著明に細胞死が増悪された。一方、 $\alpha$ -シヌクレインは神経変性疾患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。本研究において $\alpha$ -シヌクレインの凝集を呈するモデルをin vitro細胞系およびin vivoマウスモデルを作製を試みた。、およびミクログリアによる $\alpha$ -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。さらに、DJ-1結合化合物Compound-23を12週間投与した。in vivo脳内の凝集体形成は抑制傾向が認められたが、残念ながら有意な変化は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

7型家族性パーキンソン病の原因遺伝子としてDJ-1は同定されたため、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、他の神経変性疾患シヌクレイノパチー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 $\alpha$ -シヌクレインが細胞内で凝集する細胞評価系をin vitro培養系およびin vivoマウスモデルを確立した。残念ながら、見出したDJ-1の結合化合物-23はin vitro計では有意に有効であったが、in vivo系では傾向はみられた。本研究課題で得られた研究成果はシヌクレイノパチーに効く新たなシード薬となりうる。

研究成果の概要(英文)：Stress sensor DJ-1-knocked down human SH-SY5Y cells markedly generated oxidative stress and then neural cell death. On the other hand,  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -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  $\alpha$ -syn-aggregation system in in vitro SH-SY5Y cells and in vivo mouse model. In brief, a microinjection of preformed fibrils (PFFs) into the striatum induced intracellular  $\alpha$ -syn-aggregation in the mouse cerebral cortex, striatum and substantia nigra. Subsequently, DJ-1-binding compound-23 was injected for 12-weeks. This results indicated that the formation of Lewy body-like inclusion in the mouse brain were slightly inhibited, unfortunately but not significant.

研究分野：薬学 薬理学

キーワード：DJ-1 酸化ストレスセンサー DJ-1結合化合物  $\alpha$ -シヌクレイン シヌクレイノパチー 神経変性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 認知症やパーキンソン病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。レビー小体型認知症・パーキンソン病では $\alpha$ -シヌクレイン、アルツハイマー型認知症ではアミロイド- $\beta$  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。酸化ストレスセンサーDJ-1 は最初がん原遺伝子として単離され、その後7型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)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 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 $\alpha$ -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(compound-23)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(compound-23)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(compound-23)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ている。一方、研究代表者の研究グループは、さらに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(compound-23)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) 酸化ストレスセンサーDJ-1 は家族性パーキンソン病の原因遺伝子としても同定されたため、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、 $\alpha$ -シヌクレインやアミロイド- $\beta$  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、その化合物(compound-23)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(compound-23)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(compound-23)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 結合化合物の有用性を検討する。

*In vivo* ではC57BL/6マウスを用いてシヌクレイノパチーモデルを作製し、DJ-1 結合化合物 (compound-23) を投与し、病態生理学的、行動薬理的に解析する。

(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 (compound-23) 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 $\alpha$ -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 $\alpha$  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食食機構の解明および薬理的調節：

ミクログリアには $\alpha$ -シヌクレインやアミロイド- $\beta$  タンパク質を食食し除去する機構が存在する。最近の研究により、 $\alpha$ -シヌクレインの食食に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食食を評価する。また、DJ-1 結合化合物による食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、 $\beta$ アミロイド沈着による老人斑の蓄積を抑える研究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。 $\alpha$ -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) 7型家族性パーキンソン病PARK7 の正常遺伝子産物は、酸化ストレスセンサー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、 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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ることを確認した。

(2) *In vivo*動物実験において、シヌクレイノパチーのマウスモデルの作製条件を検討した。しかし、*in vitro*実験系と同様にDulbecco's PBS (D-PBS) で作製したPFFsをマウスの右線条体にマイクロインジェクション (微量注入) して12週後、投与側 (右側) の線条体、黒質、大脳皮質にリン酸化(S129)p- $\alpha$ -syn蓄積を認められるマウスの割合は38%、31%、38%だった。fibrils作製時に使用する緩衝液の組成はPFFsの凝集性および伝播性に影響するといふ報告があったので、6.8 mM Na<sup>+</sup>含有リン酸緩衝液(6.8-Na)、157 mM Na<sup>+</sup>含有リン酸緩衝液(157-Na)およびD-PBSを用いfibrilsを作製した。それぞれのfibrilsおよびPFFsをチオフラビンTアッセイにより $\beta$ シート構造の形成を測定した。157-NaおよびD-PBSで作製したfibrilsおよびPFFsの調製時における蛍光強度は低かった。そして、それぞれのPFFsをマウスの右線条体に微量注入し、12週間後にp- $\alpha$ -syn蓄積の有無を解析した。157-Naで作製したPFFsを注入したマウスは投与側および投与した反側でも蓄積が認められた。

(3) 157-Naで調製した $\alpha$ -syn PFFsを右側線条体に真央黒インジェクション後、12週間1日1回、DJ-1 結合化合物 (compound-23) を連続投与したマウスにおいて、大脳皮質、線条体、黒質にレビー

小体様 $\alpha$ -syn凝集体の蓄積が抑制される傾向が認められた。残念ながら、有意な薬効は認められなかった。しかしながら、DJ-1 結合化合物 (compound-23) はシヌクレイノパチーのシード薬として、期待できる。

(4) 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。さらに、Wnt/ $\beta$ カテニン遺伝子ノックダウンにより、尾側の再生に頭部が再生し、脳ドパミン神経ネットワークが再構築することを見出した。

## 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 5件）

1. 著者名 Takata Kazuyuki, Kimura Hiroyuki, Yanagisawa Daijiro, Harada Koki, Nishimura Kaneyasu, Kitamura Yoshihisa, Shimohama Shun, Tooyama Ikuo	4. 巻 27 (9)
2. 論文標題 Nicotinic Acetylcholine Receptors and Microglia as Therapeutic and Imaging Targets in Alzheimer's Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2780 ~ 2780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27092780	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, Ikemoto Yusuke, Fukao Kosuke, Inoue Takeshi, Kobayakawa Tatsuki, Nishimura Kaneyasu, Takata Kazuyuki, Agata Kiyokazu, Kitamura Yoshihisa	4. 巻 47 (9)
2. 論文標題 MEK/ERK Signaling Regulates Reconstitution of the Dopaminergic Nerve Circuit in the Planarian <i>Dugesia japonica</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2558 ~ 2567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-020-03226-5	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 Inden Masatoshi, Takagi Ayaka, Kitai Hazuki, Ito Taisei, Kurita Hisaka, Honda Ryo, Kamatari Yuji O., Nozaki Sora, Wen Xiaopeng, Hijioka Masanori, Kitamura Yoshihisa, Hozumi Isao	4. 巻 22
2. 論文標題 Kaempferol Has Potent Protective and Antifibrillogenic Effects for $\alpha$ -Synuclein Neurotoxicity In Vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11484 ~ 11484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222111484	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 Futokoro Risa, Hijioka Masanori, Arata Moe, Kitamura Yoshihisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Lipoxin A4 Receptor Stimulation Attenuates Neuroinflammation in a Mouse Model of Intracerebral Hemorrhage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 162 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/brainsci12020162	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 Fujimaki Ayaka, Ohuchi Kazuki, Takizawa Shinnosuke, Murakmi Takanori, Kurita Hisaka, Hozumi Isao, Wen Xiaopeng, Kitamura Yoshihisa, Wu Zhiliang, Maekawa Yoichi, Inden Masatoshi	4. 巻 13 (1)
2. 論文標題 The neuroprotective effects of FG-4592, a hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitor, against oxidative stress induced by alpha-synuclein in N2a cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-42903-7	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Matsubayashi Koto, Xiaopeng Wen, Hijioka Masanori, Inoue Takeshi, Agata Kiyokazu, Kitamura Yoshihisa
2. 発表標題 Reconstitution of dopaminergic nerve circuit in planarian, an invertebrate flatworm
3. 学会等名 The 21st Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Osaka, 2023.1 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野崎空, 脇岡雅宣, 岩下夏未, 難波純也, 文小鵬, 北村佳久
2. 発表標題 ガラントミンはオートファジーを活性化することにより -シヌクレインタンパク質の凝集を抑制する
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会, 神戸 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩下夏未, 野崎空, 脇岡雅宣, 文小鵬, 北村佳久
2. 発表標題 -シヌクレイン凝集体のクリアランスにおけるガラントミンの作用解析
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会, 大阪 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Iwashita Natsumi, Wen Xiaopeng, Nozaki Sora, Hijioka Masanori, Kitamura Yoshihisa
2. 発表標題 Galantamine reduced $\alpha$ -synuclein aggregation by inducing autophagy activation of the $\alpha$ 7-nicotinic acetylcholine receptors
3. 学会等名 19th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Glasgow (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wen Xiaopeng, Hijioka Masanori, Inoue Takeshi, Agata Kiyokazu, Kitamura Yoshihisa
2. 発表標題 MEK/ERK signaling promotes the regeneration of dopaminergic neuron circuit in the planarian, an invertebrate flatworm
3. 学会等名 19th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Glasgow (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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

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

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