

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460109

研究課題名(和文)酸化ストレスセンサーDJ-1を分子標的とした神経変性疾患治療薬の創製

研究課題名(英文) Study of oxydative stress sensor DJ-1 for therapeutic target of neurodegenerative diseases

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病・アルツハイマー病・認知症などの神経変性疾患の最大のリスクファクターは老化です。現在、日本は超少子・高齢化社会になりつつあります。そして、若者の労働力不足、医療費経済、神経変性疾患の重篤患者に対する介護は深刻な社会問題となっています。このため、健康で、介護が必要でなく、労働力として期待される高齢者の生長・育養が必須の課題です。本研究により、酸化ストレスセンサーのDJ-1およびその結合化合物はパーキンソン病、認知症などの神経変性疾患の治療薬のシードとして有用であることを明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is one of the causes of neurodegenerative diseases, such as Parkinson's (PD) and Alzheimer's diseases (AD). Since symptomatic disease therapies are used, identification of compounds or proteins that inhibit oxidative stress-induced neuronal cell death is necessary. DJ-1 is a causative gene product of familial PD and plays a role in anti-oxidative stress reaction. Recently, we have identified some DJ-1-binding compounds. In this study, wild-type and DJ-1-knockout mice were injected intraperitoneally with DJ-1-binding compounds in the presence or absence of neurotoxin MPTP. This research showed that DJ-1-binding compounds inhibited MPTP-induced reduction of retention time on the rotor rod bar, neuronal cell death in the substantia nigra and striatum and dopamine content in wild-type mice but not in DJ-1-knockout mice. From these results suggest that DJ-1 is one of novel therapeutic molecular targets for neurodegenerative diseases.

研究分野：神経薬理学

キーワード：DJ-1タンパク質 DJ-1結合化合物 パーキンソン病 アルツハイマー病 神経変性疾患 抗酸化作用  
ニコチン受容体

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病・認知症などの神経変性疾患の最大のリスクファクターは老化です。現在、日本は超少子・高齢化社会になりつつあります。そして、若者の労働力不足、高齢者の医療費、神経変性疾患の重篤患者に対する介護は深刻な社会問題となっています。このため、健康で、介護が必要でなく、労働力として期待される高齢者の生長・育養が必須の課題です。つまり、(1) 高齢者で発症する神経変性疾患の患者の数を減らす、あるいは発症を遅らせる(予防)薬、(2) 発症しても症状が進行しないようにする(進行遅延)薬などの新規治療戦略や治療薬の開発が望まれています。

パーキンソン病・認知症などの神経変性疾患は、著しい神経細胞の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します。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ます。また、脳卒中(脳梗塞・脳出血)がこれら神経変性疾患の発症および症状発現の増悪化に関与することも知られています。しかし、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物はいくつか開発されていますが基本的には対症療法にしか過ぎません。そのために、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期待されています。

### 2. 研究の目的

酸化ストレスセンサー DJ-1 は日本の大学の薬学部(北海道大院薬・有賀寛芳グループ)によって癌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 として同定されました。それまでに、研究代表者は北海道大学薬学部との共同研究により、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ける遺伝子変異 DJ-1 タンパク質はその機能を消失することを明らかにしていました。また、神経変性疾患におけるタンパク質の変性時および変性タンパク質の脳内蓄積時に過剰な酸化ストレスが関与することが推定されました。また、野生型 DJ-1 タンパク質は脳内の神経細胞およびグリア細胞に豊富に存在することも研究代表者は見出していました。これらのことから、DJ-1 はパーキンソン病ばかりでなく、アルツハイマー型や脳血管性認知症における新規治療の分子標的になり得ると推定し、本研究課題を計画しました。

脳神経変性メカニズムの全容は未だ明らかにされていませんが、過剰な酸化ストレスが神経変性の発症に深くかかわっているこ

とが推定されています。また、研究代表者は、野生型 DJ-1 のリコンビナントタンパク質には酸化ストレスセンサーの機能を有し、脳梗塞モデルラットにおいて、線条体へのマイクロインジェクションにより神経保護作用を示すことを予備的実験において見出していました。

以上のことから、本研究ではパーキンソン病・認知症など神経変性疾患の治療において、研究代表者たちが見出した酸化ストレスセンサー DJ-1 の新たな分子標的としての有用性を確立し、新規治療薬の創製研究を目的としました。

### 3. 研究の方法

これまでに、*in silico* バーチャルスクリーニングにより文部科学省の大学化合物ライブラリー(UCP 化合物)に登録されている約 3 万個の化合物から、野生型 DJ-1 タンパク質の 106 番システイン残基の還元型および二酸化型 DJ-1 タンパク質に結合する化合物を数個同定しています。これらの化合物について、ヒト神経芽細胞 SH-SY5Y 細胞を用いた *in vitro* 実験および下記の神経変性疾患モデル動物を用いた *in vivo* 実験を行って、その有用性について解析しました。

**(1) 脳梗塞モデル動物(ラット):** 中大脳動脈閉塞・再環流したラットにおいて、DJ-1 結合化合物を線条体内にマイクロインジェクションして、神経化学的に神経保護作用を示すかどうかについて解析しました。

**(2) パーキンソン病モデル動物(ラット):** 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) を黒質にマイクロインジェクションして作製するパーキンソン病モデルラットにおいて、*in silico* バーチャルスクリーニングにより見出した DJ-1 タンパク質に結合する化合物を黒質内にマイクロインジェクションして、*in vivo* 実験系で行動薬理的に、その有効性について解析しました。

**(3) パーキンソン病モデル動物(マウス):** ミトコンドリア毒のロテノン を 56 日間経口投与あるいはドパミン神経毒 MPTP を 4 日間腹腔内投与することにより作製するパーキンソン病モデルマウスに対して、DJ-1 結合化合物を末梢投与(腹腔内投与)して、*in vivo* において脳血液関門を通過し、有効性を発揮できるかについて行動薬理的に解析しました。

**(4) アルツハイマー病モデル動物(マウス):** 家族性アルツハイマー病から見出されたプレセニリン 1 およびアミロイド前駆体タンパク質(APP)の変異遺伝子を強制発現している PS/APP マウスを使用し、脳内 A $\beta$  プラークの形成および記憶障害について、

DJ-1 の関与の可能性について免疫組織化学的に解析しました。

これらの解析を行うことによりパーキンソン病、脳梗塞、認知症の治療ターゲットとして、総合的に DJ-1 結合化合物の有効性を検討しました。

#### 4 . 研究成果

まず、*in silico*バーチャルスクリーニングにより見出した Compounds-A, -B, -23 をヒト SH-SY5Y 細胞を用いた *in vitro* 実験系において、細胞保護作用を明らかにしました。また、脳梗塞モデルラットの線条体へのマイクロインジェクションにより、線条体および大脳皮質の神経細胞保護作用を見出しました。また、パーキンソン病モデルラットの黒質へのマイクロインジェクションにより、黒質ドパミン神経細胞死が抑制されました。

さらに、DJ-1 遺伝子を欠損(ノックアウト)したマウス(DJ1-KOマウス)を用い解析しました。無処置のマウス黒質線条体系におけるドパミン神経細胞数ならびにドパミン神経線維密度は、DJ-1 遺伝子をノックアウトしても、しなくても、著しい変化ならびに行動異常も認められませんでした。この DJ1-KO マウスにドパミン神経毒 MPTP を 30mg/kg、4 日間、腹腔内投与することにより作製するパーキンソン病モデルマウスについて検討しました。

DJ-1 結合化合物 compound-23 を DJ1-KO マウスへの MPTP 投与 1 時間前に 0~3mg/kg 腹腔内投与しました。MPTP の連続投与により、正常マウスおよび DJ1-KO マウスの線条体のドパミン量・ドパミン神経線維密度および黒質のドパミン神経細胞数は有意に減少し、運動機能も低下しました。Compound-23 の腹腔内投与により、これらのドパミン神経障害は有意に改善されました。

一方、家族性アルツハイマー病から見出されたアミロイド、プレセニリン 1 遺伝子の変異遺伝子を導入したマウスを用いて検討したところ、過剰な活性酸素はタンパク質の変性および凝集に関与すること、変性アミロイドタンパク質の細胞外凝集によりミクログリアが活性化し集積することを見出しました。これらのことから、アルツハイマー型認知症における老人斑形成に DJ-1 減少あるいは機能低下が推定されました。このように本研究によって、酸化ストレスセンサー DJ-1 は、脳梗塞、パーキンソン病およびアルツハイマー型認知症の新規の治療ターゲットとして有望であることが明らかとなりました。さらに、DJ-1 結合化合物ばかりでなくニコチン受容体アゴニストも、神経変性疾患の創薬シードになることを明らかにしました。このように本研究により、意義深い研究成果を得ることができました。

#### 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 7 件)

- 1) Masatoshi Inden, Kazuyuki Takata, Daijiro Yanagisawa, Eishi Ashihara, Ikuo Tooyama, Shun Shimohama, and Yoshihisa Kitamura:  $\alpha 4$  nicotinic acetylcholine receptor modulated by galantamine on nigrostriatal terminals regulates dopamine receptor-mediated rotational behavior. *Neurochem. Int.* (査読有), **94 (Mar.)**, 74-81 (2016). doi: 10.1016/j.neuint.2016.02.008.
- 2) Akihiro Matsumura, Suuichirou Suzuki, Naotoshi Iwahara, Shin Hisahara, Jun Kawamata, Hiromi Suzuki, Ayano Yamauchi, Kazuyuki Takata, Yoshihisa Kitamura, and Shun Shimohama: Temporal changes of CD68 and  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor expression in microglia in Alzheimer's disease-like mouse models. *J. Alzheimer's Dis.* (査読有), **44 (2)**, 409-423 (2015). doi: 10.3233/JAD-141572.
- 3) Kazuko Takahashi-Niki, Ayako Inafune, Naruyuki Michitani, Yoshitaka Hatakeyama, Kotaro Suzuki, Mai Sasaki, Yoshihisa Kitamura, Takeshi Niki, Sanae M.M. Iguchi-Arigo, and Hiroyoshi Arigo: DJ-1-dependent protective activity of DJ-1-binding compound no. 23 against neuronal cell death in MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease. *J. Pharmacol. Sci.* (査読有), **127(3)**, 305-10 (2015). doi: 10.106/j.jpshs.2015.01.010.
- 4) Ryo Saito, Masayuki Kaneko, Yoshihisa Kitamura, Kazuyuki Takata, Koichi Kawada, Yasunobu Okuma, and Yasuyuki Nomura: Effects of oxidative stress on the solubility of HRD1, a ubiquitin ligase implicated in Alzheimer's disease. *PLoS One* (査読有), **9(5)**, e94576 (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0094576.
- 5) Natsuka Tashiro, Kaneyasu Nishimura, Kanako Daido, Tomoe Oka, Mio Todo, Asami Toshikawa, Jun Tsushima, Kazuyuki Takata, Kanji Yoshimoto, Kiyokazu Agata, and Yoshihisa Kitamura: Pharmacological assessment of methamphetamine-induced behavioral hyperactivity mediated by dopaminergic transmission in planarian *Dugesia japonica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有), **449**, 412-418 (2014). doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.059.

- 6) Syuuichirou Suzuki, Jun Kawamata, Takashi Matsushita, Akihiro Matsumura, Shin Hisahara, Kazuyuki Takata, Yoshihisa Kitamura, William Kem, and Shun Shimohama: 3-[(2,4-Dimethoxy)Benzylidene]-Anabasein Dihydrochloride (DMXBA) Protects Against 6-Hydroxydopamine-Induced Parkinsonian Neurodegeneration through  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor Stimulation in Rats, *J. Neurosci. Res.* (査読有), **91**, 462-471 (2013). doi: 10.1002/jnr.23160.
- 7) Masatoshi Inden, Kazuyuki Takata, Kaneyasu Nishimura, Yoshihisa Kitamura, Eishi Ashihara, Kanji Yoshimoto, Hiroyoshi Ariga, Osamu Honmou, and Shun Shimohama: Therapeutic effects of human mesenchymal and hematopoietic stem cells on rotenone-treated parkinsonian mice. *J. Neurosci. Res.* (査読有), **91**, 62-72 (2013). doi: 10.1002/jnr.23128.
- 〔学会発表〕(計 10件)
- 1) 位田雅俊, 北村佳久, 下濱俊: パーキンソン病モデルにおけるガラントミンのニコチン受容体を介した薬物旋回運動. 第127回日本薬理学会近畿部会, 2015年6月26日 長良川国際会議場 (岐阜県).
- 2) 若林亮介, 高田和幸, 中村誠宏, 大矢博己, 菅 倫子, 川幡尚平, 福田浩紀, 赤路健一, 松田久司, 北村佳久, 芦原英司: Wnt/ $\beta$ -catenin 経路阻害化合物のスクリーニング系の構築. 第64回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2014年10月11日 京都薬科大学 (京都府).
- 3) 河西翔平, 高田和幸, 黒田絵莉子, 杉野友紀, 北村佳久, 芦原英司: アルツハイマー病の細胞治療法の開発を目指した、骨髄由来細胞、ミクログリアおよびマクロファージの定性・機能解析. 第64回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2014年10月11日 京都薬科大学 (京都府).
- 4) 戸田侑紀, 高田和幸, 中川由布子, 川上光, 藤岡周助, 小林数也, 服部恭尚, 北村佳久, 赤路健一, 芦原英司: がん細胞へホーミングする glioblastoma 由来エクソソームの解析～がん標的化技術応用のための指向性決定因子の探索～. 第64回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2014年10月11日 京都薬科大学 (京都府).
- 5) Yuki Toda, Kazuyuki Takata, Yuko Nakagawa, Hikaru Kawakami, Shusuke Fujioka, Kazuya Kobayashi, Yasunao Hattori,

Yoshihisa Kitamura, Kenichi Akaji, and Eishi Ashihara: Cancer cell tropism of glioblastoma-derived exosomes regulated by their lipid components. FEBS EMBO 2014, 2014年9月1日 Palais des Congrès (France).

- 6) 戸田侑紀, 高田和幸, 中川由布子, 川上光, 藤岡周助, 小林数也, 服部恭尚, 北村佳久, 赤路健一, 芦原英司: がん細胞選択的ドラッグデリバリー応用を目的としたエクソソームの脂質組成解析. 第6回日本RNAi研究会 2014年8月29日 グランドプリンスホテル広島 (広島県).
- 7) 杜氏裕美子, 高田和幸, 河西翔平, 高田哲也, 北村佳久, 芦原英司: アルツハイマー病の細胞治療法開発に向けた骨髄由来細胞の  $A\beta$  貪食機能と内在性ミクログリアへの作用解析. 日本薬学会第134年会, 2014年3月29日 熊本市総合体育館 (熊本県).
- 8) 北村佳久, 高田和幸, 下濱俊, 芦原英司: パーキンソン病モデルマウスにおけるヒト由来幹細胞の神経保護用. 第13回日本再生医療学会総会 (京都), 2014年3月5日 国立京都国際会館 (京都府).
- 9) 高田和幸, 北村佳久, 金井美乃里, 太田垣健人, 富永淳, 松井香保里, 弓倉梓, 芦原英司, 下濱俊: リバステグミンの神経保護作用機序ならびに認知機能障害改善作用の解析. 第32回日本認知症学会学術集会, 2013年11月9日 松本市総合体育館 (長野県).
- 10) 富永淳, 高田和幸, 太田垣健人, 松井香保里, 池上倫代, 弓倉梓, 北村佳久, 下濱俊, 芦原英司: アルツハイマー病治療薬リバステグミンの神経機能改善に関する解析. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2013 (熊本), 2013年8月31日 熊本大学薬学部 (熊本県).

〔図書〕(計 2件)

- 1) Kazuyuki Takata, Shohei Kawanishi, Yumiko Touji, Tetsuya Takada, Yoshihisa Kitamura, and Eishi Ashihara: Development of Cell Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Using Animal Models. *Animal Models in Human Disease: Applications, Outcomes and Controversies*, Edited by Sean A. Murray, pp. 87-103, NOVA Science Publishers (2013).
- 2) Kaneyasu Nishimura, Yoshihisa Kitamura, Kiyokazu Agata, and Jun Takahashi: A Survey of the Molecular Basis for the

Generation of Functional Dopaminergic Neurons from Pluripotent Stem Cells: Insights from Regenerative Biology and Regenerative Medicine. *Neural Stem Cells*, Edited by Luca Bonfanti, pp.271-286, In Tech Europe (2013).

〔その他〕

ホームページ等

<http://research-db.ritsumei.ac.jp/Profiles/118/0011784/profile.html>

## 6．研究組織

### (1)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