

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670084

研究課題名(和文) 新規バイオマーカー酸化DJ-1を用いたパーキンソン病の早期診断・早期治療法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnosis and treatment of Parkinson disease at early stage using novel biomarker oxidized DJ-1

研究代表者

齋藤 芳郎 (Yoshiro, Saito)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：70357060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：家族性パーキンソン病(PD)の原因遺伝子PARK7の遺伝子産物であるDJ-1は、酸化ストレス下で自身が酸化され、酸化DJ-1を生じる。本研究では、酸化DJ-1特異的な抗体を用い、PD患者脳内および血液中の酸化DJ-1を解析した。本研究から、初期のPD患者脳内および血液中に酸化DJ-1が生成することが明らかとなった。DJ-1の酸化はグルタチオンなどの抗酸化物質で抑制された。以上本研究から、酸化DJ-1を指標としたPDの早期診断・早期治療法の分子基盤が確立できた。

研究成果の概要(英文)：DJ-1, the product of the causative gene of a familial form of Parkinson's disease (PD), undergoes preferential oxidation at the cysteine residue at position 106 (Cys-106) under oxidative stress. In the present study using specific antibodies against Cys-106-oxidized DJ-1 (oxDJ-1), we evaluated oxDJ-1 levels in brain and blood of PD patients. It was found that DJ-1 oxidation in erythrocytes and in the brain occurs in PD patients, particularly during the early phases. DJ-1 oxidation was effectively inhibited by endogenous antioxidant glutathione. We could develop the molecular base for the diagnosis and treatment of PD at early phases based on the levels of oxDJ-1.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：パーキンソン病 酸化ストレス DJ-1 バイオマーカー モノクローナル抗体 早期診断 ELISA ドパミン神経

1. 研究開始当初の背景

家族性パーキンソン病の原因遺伝子 *PARK7* の遺伝子産物である DJ-1 は、酸化ストレス下で自身が酸化され、酸化 DJ-1 を生じる。申請者は、治療を開始する前の、ごく初期のパーキンソン病患者の赤血球中に、酸化 DJ-1 が顕著に蓄積することを発見した。この結果から、赤血球中の酸化 DJ-1 レベルが、パーキンソン病の早期診断を実現するバイオマーカーになりうると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、酸化 DJ-1 特異的な抗体を用い、パーキンソン病の早期診断・早期治療法の分子基盤確立を目的として、以下の検討を行った。

(1) パーキンソン病患者脳内および赤血球中の酸化 DJ-1 レベルを調べ、酸化 DJ-1 がパーキンソン病の早期に増加するか明らかにする。

(2) 初期のパーキンソン病患者で認められた酸化 DJ-1 の蛋白質化学的性質を調べ、赤血球中に検出された酸化 DJ-1 の生成メカニズムを明らかにする。

(3) 酸化 DJ-1 レベルの増加が、パーキンソン病モデル動物でも増加するか検証し、神経変性の進行やパーキンソン病の症状との関連性を解析する。

3. 研究の方法

(1) 酸化 DJ-1 特異的な抗体は、酸化 DJ-1 リコンビナント体を抗原として作成したマウスモノクローナル抗体を用いた。免疫染色法、Western blot 法、ELISA において、それぞれ DJ-1 KO マウス由来試料および酸化ストレスを負荷した SH-SY5Y 細胞の可溶性タンパク質画分を用い、酸化 DJ-1 特異性を確認した。

(2) 進行度合いの異なるパーキンソン病患者由来の脳切片 (健康者 4 例、レビスステージ 1~5 由来 17 例) を用い、酸化 DJ-1 抗体を用いた免疫染色を行い、神経変性の進行に伴う酸化 DJ-1 の生成について解析する。免疫染色で得られた結果について、凍結ブロックから得られるタンパク質画分の Western blot 解析により検証する。

(3) 進行度合いの異なるパーキンソン病患者由来の血液から赤血球を単離し、溶血後の遠心操作により赤血球可溶性タンパク質画分を分離する。得られた画分について、ELISA により酸化 DJ-1 レベルを測定する。赤血球画分での DJ-1 の酸化レベルを、二次元電気泳動法による解析でも検証する。血液に様々な酸化剤を加え、血液中の酸化 DJ-1 レベルが増加するか検証する。以上の解析を多検体で行い、統計処理によりパーキンソン

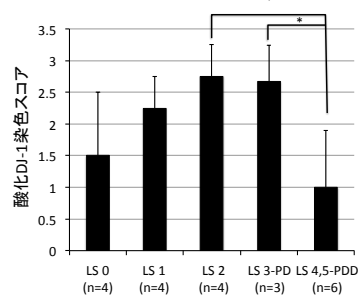
病の進行度合いと酸化 DJ-1 レベルの関連性について明らかにする。

(4) ELISA で高値を認めた赤血球画分について、ゲルろ過法によりタンパク質を分離し、各画分の酸化 DJ-1 レベルを測定する。酸化 DJ-1 が含まれる画分について、さらに分画を進め、酸化 DJ-1 が相互作用する分子を同定する。

(5) 神経毒 MPTP の投与により作成したパーキンソン病モデルカニクイザルについて、赤血球酸化 DJ-1 レベルを測定し、神経症状と酸化 DJ-1 レベルとの関連性について検証する。

4. 研究成果

(1) DJ-1 KO マウス由来の脳切片を用い、酸化 DJ-1 特異的な免疫組織染色系を確立した。ヒト由来脳切片の免疫組織染色から、酸化 DJ-1 がパーキンソン病の主な変性部位である中脳黒質のドパミン神経に多く存在することが明らかとなった。更に、進行度合いの異なる脳切片での染色結果から、神経変性の進行に伴い、ドパミン神経における酸化 DJ-1 レベルが増加し、パーキンソン病発症時に最大を示すことが明らかとなった (図 1)。パーキンソン病からさらに進行したパーキンソン病型認知症患者では、酸化 DJ-1 レベルの減少が認められた。組織免疫染色で得られた結果について、凍結脳ブロック由来タンパク質画分を用いた Western blot 解析を行った。その結果、染色の強度と一致した Western blot 解析結果が得られ、組織免疫染色で得られた結果を確認することができた。以上の結果から、ヒト中脳の黒質ドパミン神経において、酸化 DJ-1 が健康人でも存在し、パーキンソン病のごく初期から脳内で生成することが明らかとなった。



* $P < 0.05$, Tukey-Kramer, ANOVA

図 1 パーキンソン病の進行に伴う中脳黒質の酸化 DJ-1 レベルの変化

(2) 進行度合いの異なるパーキンソン病患者 150 例について、赤血球中の酸化 DJ-1 レベルを測定した。その結果、治療を開始する前のごく初期のパーキンソン病患者 (未治療パーキンソン病患者、 $n = 88$) において、健康人 ($n = 33$) および治療パーキンソン病患者 ($n = 62$) より統計的に高い酸化 DJ-1 レ

ベルが検出された(図2)。パーキンソン病の進行度合いを現す Hoehn-Yahr 値と酸化 DJ-1 レベルを比較すると、酸化 DJ-1 高値は Hoehn-Yahr 値の低い 1~2 のごく初期のパーキンソン病患者で多く認められた(図3)。以上の結果から、ヒト中脳の黒質ドパミン神経と同じく、赤血球中の酸化 DJ-1 レベルもパーキンソン病のごく初期から生成することが明らかとなった。未治療パーキンソン病患者における酸化 DJ-1 レベルの増加は、二次元電気泳動法による評価でも有意な高値を認めた。さらに、血液中に過酸化水素やラジカル開始剤などの酸化剤を加えると、赤血球中の酸化 DJ-1 レベルが増加することが明らかとなった。

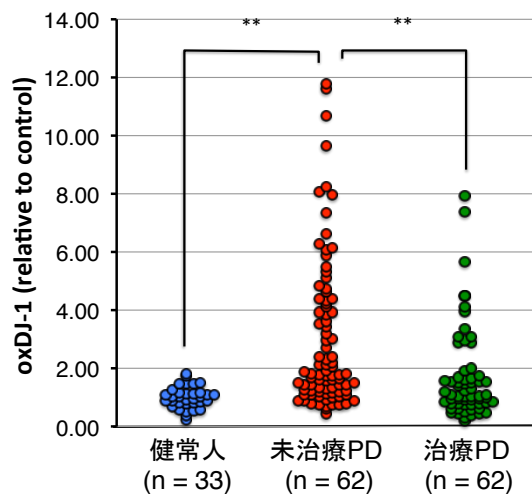


図2 未治療パーキンソン病患者の赤血球における酸化 DJ-1 レベルの増加

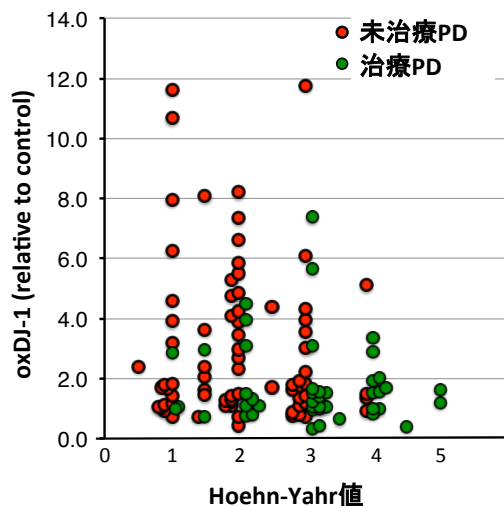


図3 酸化 DJ-1 レベルと Hoehn-Yahr 値の関連

(3) ELISA で高値を認めた未治療パーキンソン病患者由来の赤血球画分について、ゲルろ過法を用いてタンパク質を分離し、各画分の酸化 DJ-1 レベルを測定した。その結果、酸化 DJ-1 が低分子および高分子画分に検出された(図4)。低分子画分の酸化 DJ-1 は、酸化 DJ-1 に対する抗体による免疫沈降で回

収でき、質量分析法による解析から Cys106 の酸化が確認された。低分子画分で検出された酸化 DJ-1 は、2 量体に相当する分子量のところに検出された。一方、高分子画分に検出された酸化 DJ-1 は、免疫沈降による回収は困難であった。そのため、陰イオンカラムクロマトグラフィーによりさらに分離を行い、酸化 DJ-1 が含まれる画分に共存するタンパク質を質量分析法により同定した。その結果、DJ-1 と相互作用することが知られている HSP90 および 20S プロテアソームが検出された。20S プロテアソームと酸化 DJ-1 の相互作用について、リコンビナント酸化 DJ-1 と精製 20S プロテアソームを用いて解析した結果、両者の相互作用が確認された。両者の相互作用に HSP90 は影響しなかった。これより、未治療パーキンソン病患者の赤血球中において、酸化 DJ-1 が一部 20S プロテアソームと相互作用すると考えられた。最近、DJ-1 は 20S プロテアソーム阻害活性を持つことが報告された。他方、パーキンソン病患者の赤血球中に高分子化した α -シヌクレインなどの異常タンパク質が蓄積することも報告されている。本研究で得られた知見から、酸化 DJ-1 が 20S プロテアソームを阻害し、赤血球中への異常タンパク質蓄積に関与する可能性が考えられた。

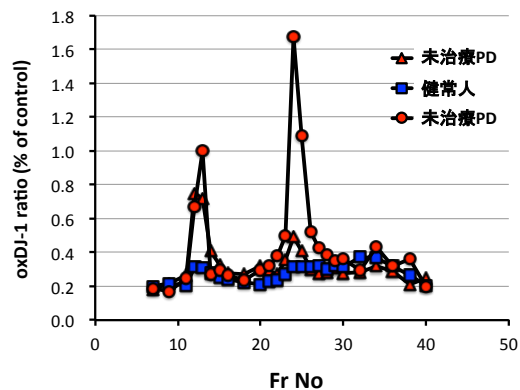


図4 赤血球中における酸化 DJ-1 の分布

(4) 神経毒である MPTP を投与したカニクイザル (n=4) から経時的に採血を行い、赤血球可溶性画分を単離した。得られたサンプルについて、酸化 DJ-1 レベルを ELISA で測定した所、個体差が認められた統計的に有意な酸化 DJ-1 レベルの増加が認められた(図5)。手足の震え等の神経症状との関連について解析した結果、酸化 DJ-1 の増加は神経症状が起こる前に一端増加が認められ、急性期の増加が示唆された。また、神経症状が出た後も酸化 DJ-1 レベルの増加が見られ、神経障害以降にも酸化 DJ-1 レベルが増加すると考えられた。以上、本研究によりパーキンソン病カニクイザルモデルにおいても、血液中の酸化 DJ-1 レベルが増加することが示された。

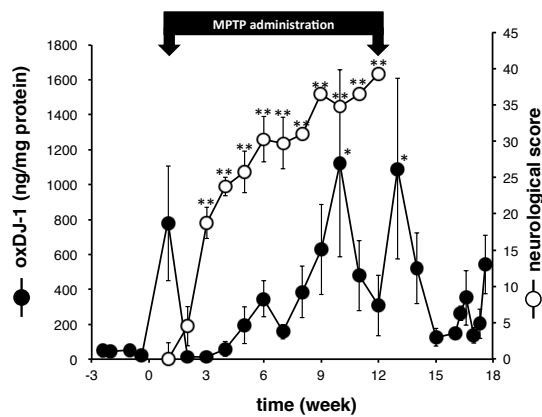


図 5 パーキンソン病モデルカニクイザルにおける酸化 DJ-1 レベルおよび神経症状の変化

(5) 以上本研究より、脳内および赤血球中において、パーキンソン病のごく初期に酸化 DJ-1 レベルが増加することが明らかとなった。パーキンソン病の発症・進展には、酸化ストレスが関与することが知られているが、未だ治療法まで発展していない。DJ-1 の酸化は、抗酸化物質グルタチオンで抑制できることが明らかとなっている。以上の知見から、酸化 DJ-1 高値のパーキンソン病患者に、グルタチオンなどの抗酸化物質の投与が有効であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

① **Yoshiro Saito**, Tomohiro Miyasaka, Hiroyuki Hatsuta, Kazuko Takahashi-Niki, Kojiro Hayashi, Yuichiro Mita, Osamu Kusano-Arai, Hiroko Iwanari, Hiroyoshi Ariga, Takao Hamakubo, Yasukazu Yoshida, Etsuo Niki, Shigeo Murayama, Yasuo Ihara, and **Noriko Noguchi** (2014) Immunostaining of oxidized DJ-1 in human and mouse brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 査読有、**73**, 714-728. doi: 10.1097/NEN.0000000000000087.

② Ikuko Ogawa, **Yoshiro Saito**, **Kazumasa Saigoh**, Yoshie Hosoi, Yoshiyuki Mitsui, **Noriko Noguchi**, and Susumu Kusunoki (2014) The significance of oxidized DJ-1 protein (oxDJ-1) as a biomarker for Parkinson's disease. *Brain and Nerve*, 査読有、**66**, 471-477.

③ **Yoshiro Saito** (2014) Oxidized DJ-1 as a possible biomarker of Parkinson's disease. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 査読有、**54**, 138-44. doi: 10.3164/jcfn.13-108.

④ **斎藤 芳郎** (2013) パーキンソン病におけるバイオマーカーの現状-マイケル J フォックス財団の取り組み ファルマシア、**49**、870-872

[学会発表] (計 14 件)

① **Yoshiro Saito**, Yuichiro Mita, Kojiro Hayashi, Takuma Kashi, Yuto Kataoka, Asa Iwasaki, and **Noriko Noguchi**. Distribution of oxidized DJ-1 in human and mouse brain- Effects of aging process SFRBM's 22th Annual Meeting, Boston USA, 20 November 2015.

② **Yoshiro Saito**, Tomohiro Miyasaka, Hiroyuki Hatsuta, Kazuko Takahashi-Niki, Hiroyoshi Ariga, Shigeo Murayama, Yasuo Ihara, **Noriko Noguchi**. Immunostaining of oxidized DJ-1 in human and mouse brain. Neuroscience 2014, Washington DC, USA, 17 November 2014.

[図書] (計 2 件)

① **斎藤 芳郎**、**野口 範子** 医歯薬出版株式会社 (2015) 神経変性とレドックス-パーキンソン病関連分子 DJ-1 のレドックス制御機能 レドックス UPDATE、第 4 章、224-228

② **斎藤 芳郎**、**野口 範子** 診断と治療社 (2014) パーキンソン病と酸化ストレス 酸化ストレスの医学、第 2 版、264-271

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

https://kenkyudb.doshisha.ac.jp/rd/html/japanese/researchersHtml/108016/108016_Researcher.html

<http://systemlifescience.wix.com/system-life-science#!dj-1/clou3>

<https://www.doshisha.ac.jp/news/2015/05/15/news-detail-2383.html>

<https://www.doshisha.ac.jp/news/2014/09/09/news-detail-1848.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斎藤 芳郎 (SAITO, Yoshiro)
同志社大学・生命医科学部・准教授
研究者番号：70357060

(2) 連携研究者

野口 範子 (NOGUCHI, Noriko)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号：40198578

西郷 和真 (SAIGO, Kazumasa)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：50319688