

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07506

研究課題名(和文) 解糖系酵素変異に注目した新しいパーキンソン病病態解明と治療薬開発

研究課題名(英文) A novel disease modification strategy for Parkinson disease by PGK enhancement

研究代表者

笠井 高士 (KASAI, TAKASHI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70516062

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)：パーキンソン病の新しい感受性遺伝子として報告されたPGKのショウジョウバエにおける類似遺伝子Pgkの遺伝子発現を低下させるモデル動物を作成しました。このモデルにおいて特にドパミン神経においてPgkの発現を抑圧させることによって運動機能の低下、ドパミン神経減少を確認しました。こうした変化はヒトのパーキンソン病における変化と同様の変化であり、この遺伝子機能の低下がパーキンソン病モデルとして有用であることを示していました。神経全体において機能低下を誘導した場合にATP産生減少と活性酸素種の上昇が認められ、このモデルにおける障害の原因と推定されました

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病の治療を目的とした研究の一環として、最近報告された解糖系酵素PGKの欠損家系におけるパーキンソン症状に注目し、PGK遺伝子の発現抑制がどのようにパーキンソン病を引き起こしているのかを解明する研究を遂行しました。

PGK遺伝子機能を抑制したショウジョウバエにおいてドパミン神経減少を含むパーキンソン病に特徴的な変化を確認し、これらの変化がエネルギー産生障害に起因することを裏付ける結果を得ました。こうした結果はパーキンソン病治療においてPGK活性の促進が重要であることを意味しておりPGK活性促進を介した新しいパーキンソン病治療戦略を提案する足掛かりとなる成果です。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the gene encoding phosphoglycerate kinase (PGK) has been found to be susceptibility to PD. PGK is a key enzyme in the glycolytic pathway catalyzing the reaction from 1,3-diphosphoglycerate to 3-phosphoglycerate. Here, we established the PD model targeting of the *Drosophila* P<sub>gk</sub>. DA neuron-specific P<sub>gk</sub> knockdown lead to locomotive defect in both young and aged adult flies accompanied with progressive DA neuron loss with ageing. P<sub>gk</sub> knockdown in DA neuron decreased dopamine level in central nervous system (CNS) of both young and aged adult flies. These phenotypes are similar to defects observed in human PD patients, suggesting that the established P<sub>gk</sub> knockdown flies are a promising model for PD. In addition, pan-neuron-specific P<sub>gk</sub> knockdown induced low ATP level and accumulation of reactive oxygen species (ROS) in CNS of third instar larvae. These results indicate that failure of energy production system causes locomotive defects accompanied with neuronal degeneration.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：パーキンソン病 PGK

## 1. 研究開始当初の背景

Parkinson 病(PD)はアルツハイマー病に次いで多い神経変性疾患であり高齢化とともに急速に有病率が増加している。本症は未だ根治療法がなくその病態解明は高齢化社会における重要な課題である。これまで PD の病態解明はほとんどが家族性 PD の原因遺伝子同定とその機能解析によってなされてきた。既知の家族性 PD 原因遺伝子間相互作用の研究等から、PD 病態は概ね『 $\alpha$ -syn の過剰と分解障害』『不良ミトコンドリア除去障害』『レトロマー機能不全』の 3 つのメカニズムに集約されつつあり、こうした病態理解は PD の根本治療薬開発に理論的基盤を与えている。しかし全ての原因遺伝子が同定された訳ではなく、本症の根本治療の試みもようやく端緒についたに過ぎない。したがって未知の病態を解明する、あるいは既存仮説を補完する新たな PD 原因遺伝子の同定とその機能解析は依然として強く求められている。本申請に関連する X 染色体に連鎖する感受性領域すなわち PARK12 も未だ遺伝子同定がなされていない領域であり(図 1)、また本研究の対象である解糖系は普遍的なエネルギー産生系であるにも関わらず PD 病態とは関係が注目されてこなかった細胞機能の一つである。

申請者らはごく最近、酵素欠損症である phosphoglycerate kinase(PGK)欠損症家系を解析しヘテロ保因者に若年性 PD を生じることが示した。PGK は解糖系酵素であり、PGK 欠損症は従来、筋型糖原病に分類されてきた。PGK は Xq21.1 上に存在する PGK1 にコードされているため、その機能喪失変異は、伴性劣性遺伝し男児にのみ発症する。解糖系を主たるエネルギー源として用いる赤血球および筋肉に障害が生じやすく主要徴候は溶血性貧血・横紋筋融解である。本症の稀な神経合併症として非典型的な Parkinson 症状を合併することは従来から知られていた。一方で本遺伝子異常の女性保因者は無症状であると信じられてきたが我々の報告した家系では PGK 欠損症の男児とそのヘテロ保因者である母親の両方に Parkinson 症状を認め、特に母親は PD として典型的な所見を呈していた点が特徴的であった。両名とも既知 PD 原因遺伝子変異を認めなかったため PGK1 遺伝子変異はヘテロ保因者においても早発性 PD を発症すると解釈された。PGK1 の遺伝子座は過去に報告された X 染色体に連鎖する PD 疾患感受性領域(Xq21-25:PARK12)に一致するので本遺伝子は PARK12 の原因ないし原因遺伝子の一つである可能性が極めて高い。以上の背景および研究経緯から申請者らは『解糖系酵素である PGK 酵素活性低下がドパミン神経機能低下を生じ PD の原因となりうる』さらには『PGK 酵素機能を薬物介入によって調節・補完することが PD 病態を抑制しうる』との仮説をもって以下の研究計画を遂行することが PD の病態解明と治療法開発に全く新しい知見をもたらすと考えた。

## 2. 研究の目的

申請者の目標は『PGK 機能低下がドパミン神経障害をもたらすことを検証するモデル動物の確立』、『モデルを用いた病態解明』とした

研究遂行に当たりマウスを用いた方がヒト病態に近いが、モデル確立に時間を費やし治療薬開発まで期限内に到達できない可能性が高い。幸い PGK を含む解糖系酵素は全生物に共通するので対象を哺乳動物に限定する必要はない。そこで申請者はショウジョウバエを対象として研究を遂行することを志向した。

## 3. 研究の方法

Step 1: knock down 系統の確立: PGK 欠損症の Parkinson 症状発症機序について既報告は機能喪失、すなわち解糖系機能障害に基づくエネルギー産生障害を想定してきた。Pgc knock down 系統が開発されているので申請者はそれらをストックセンターより入手し研究期間短縮を図った。本系統と既に確立した全身 GAL4 発現系統、複眼特異的 GAL4 発現系統、全神経系 GAL4 発現系統、ドパミン細胞特異的 GAL4 発現系統を交配し対応する細胞特異的 Pgc 機能喪失モデルを構築した。

Step 2: 全身発現、複眼特異的発現、全神経発現、ドパミン細胞特異発現系の表現型評価:

各モデル系の表現型を評価する。寿命、複眼形態、運動能力、神経筋接合部微細形態を定量的に評価する。ドパミン細胞特異的 GAL4 発現系では、運動能力、ドパミン神経残存数、昆虫サーカディアンリズム測定装置を用いて、サーカディアンリズムや活動量に変化も検討した。

Step 3: 代表的家族性 PD の原因遺伝子変異導入モデルとの交配により、Pgc 機能喪失系統の表現型が増強ないし抑圧されるかを検討する。表現型が促進された場合は該当遺伝子の過剰発現系と交配して表現型が抑圧されるかどうかを検証する

## 4. 研究成果

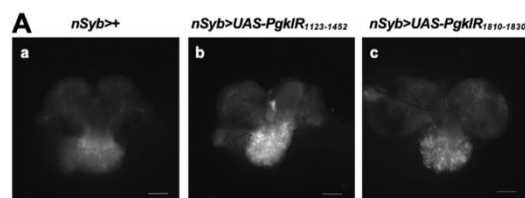
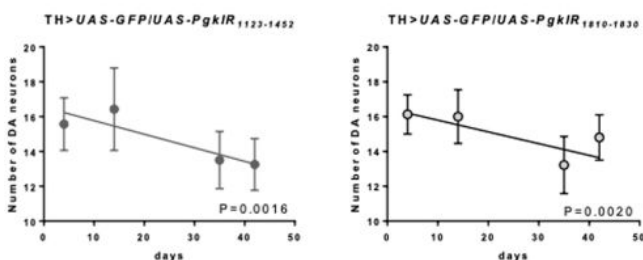
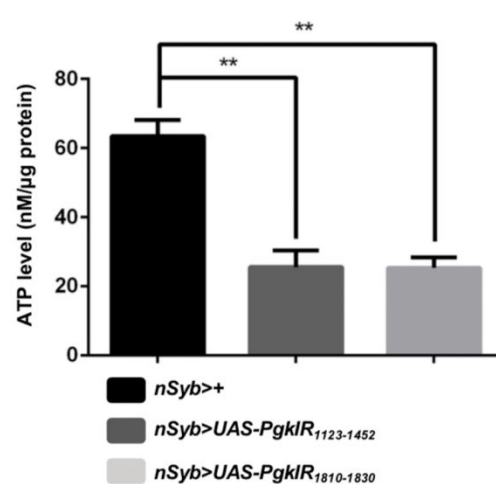
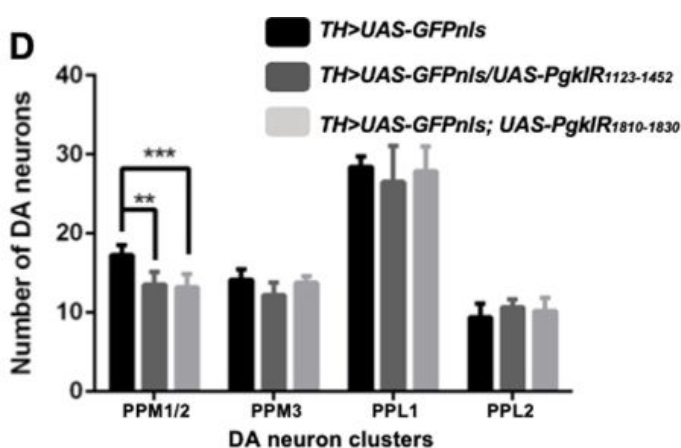
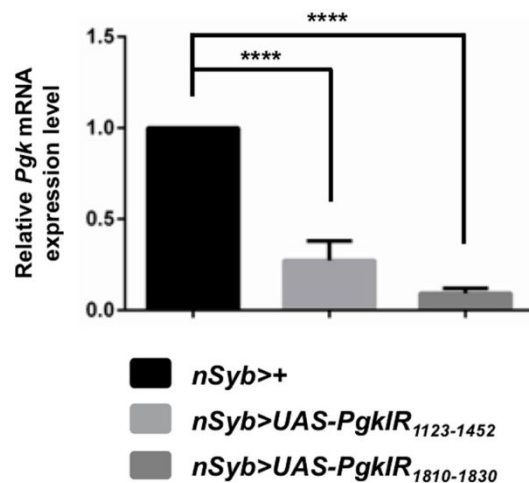
PGK1 のショウジョウバエにおける ortholog である Pgc に対し Pgc knock down 系統を 2 系統において、いずれの系統においても Pgc 蛋白発現量の減少を Western blot 法によって確認した。

図上

さらにこれらの系統と既に確立されている全身 GAL4 発現系統(Act5c-GAL4)、複眼特異的 GAL4 発現系統(GMR-GAL4)、全神経系 GAL4 発現系統(elav-GAL4)、ドパミン細胞特異的 GAL4 発現系統(TH-

GAL4)を交配させ各細胞特異的P<sub>gk</sub> loss of functionモデルを構築した。

- 全身発現系統、複眼特異的発現系統、全神経発現系統、ドパミン細胞特異的発現系統における表現型を確認し、
- 1) 全身発現系統は蛹致死であること
  - 2) 複眼特異発現系において複眼形態の粗造化が生じること
  - 3) 全神経発現系において幼虫運動能力の低下が生じること ATP 産生能が極端に低下し ROS 産生亢進を生じること
  - 4) ドパミン神経特異的発現系において幼虫・成虫の運動能力が低下し、日内活動リズムに変化を生じることを確認した。また P<sub>GK</sub> KD 系統においてドパミン含有量が減少することを確認した(図下左)。
  - 5) さらにドパミン神経障害が生じる原因として全神経系 KD 系統の幼虫脳において ROS 活性化と ATP 産生減少が関与していることを明らかにした。(図下右)



以上の結果を総括し、P<sub>gk</sub> 機能喪失によって ATP 産生低下が生じ、ROS の活性化を介してドパミン神経変性を生じ、運動能力低下、日内行動変化を生じると考えた。こうした病態仮説は既存の PD における病態と矛盾していない。

一方で他の PD 病原因遺伝子群、Pakin PINK1 SNCA 変異系統等との交配実験は COVID19 流行下において研究自体に大きな制限が加わったこともあり進捗が十分でなかった。研究機関の延長を申請したが達成できなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Joe Shimizu, Takashi Kasai, Hideki Yoshida, Anh M Huynh, Yumiko Nakao-Azuma, Makiko Shinomoto, Takahiko Tokuda, Toshiki Mizuno, Masamitsu Yamaguchi	4. 巻 139
2. 論文標題 Novel Drosophila model for parkinsonism by targeting phosphoglycerate kinase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochemistry Internatinal	6. 最初と最後の頁 104816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2020.104816	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 該当する
1. 著者名 Ohmichi Takuma, Kasai Takashi, Shinomoto Makiko, Matsuura Jun, Koizumi Takashi, Kitani-Morii Fukiko, Tatebe Harutsugu, Sasaki Hidenao, Mizuno Toshiki, Tokuda Takahiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Quantification of Blood Caffeine Levels in Patients With Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy by Caffeine ELISA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 580127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2020.580127	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 Kitani-Morii Fukiko, Kasai Takashi, Horiguchi Go, Teramukai Satoshi, Ohmichi Takuma, Shinomoto Makiko, Fujino Yuzo, Mizuno Toshiki	4. 巻 16
2. 論文標題 Risk factors for neuropsychiatric symptoms in patients with Parkinson's disease during COVID-19 pandemic in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 245864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0245864	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 Shinomoto Makiko, Kasai Takashi, Tatebe Harutsugu, Kitani-Morii Fukiko, Ohmichi Takuma, Fujino Yuzo, Allsop David, Mizuno Toshiki, Tokuda Takahiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Cerebral spinal fluid biomarker profiles in CNS infection associated with HSV and VZV mimic patterns in Alzheimer's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Neurodegeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40035-020-00227-w	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 該当する

1. 著者名 Makiko Shinomoto, Takashi Kasai, Harutsugu Tatebe, Masaki Kondo, Takuma Ohmichi, Masafumi Morimoto, Tomohiro Chiyonobu, Naoto Terada, David Allsop, Isao Yokota, Toshiki Mizuno, Takahiko Tokuda	4. 巻 14
2. 論文標題 Plasma neurofilament light chain: A potential prognostic biomarker of dementia in adult Down syndrome patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plos One	6. 最初と最後の頁 e0211575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0211575	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 該当する

1. 著者名 Takashi Kasai, Yuta Kojima, Takuma Ohmichi, Harutsugu Tatebe, Yukiko Tsuji, Yu-Ichi Noto, Fukiko Kitani-Morii, Makiko Shinomoto, David Allsop, Toshiki Mizuno, Takahiko Tokuda	4. 巻 6
2. 論文標題 Combined use of CSF NfL and CSF TDP-43 improves diagnostic performance in ALS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Clinical Translational Neurology	6. 最初と最後の頁 2489-2502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/acn3.50943	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 該当する

1. 著者名 Shinomoto Makiko, Kasai Takashi, Tatebe Harutsugu, Kondo Masaki, Ohmichi Takuma, Morimoto Masafumi, Chiyonobu Tomohiro, Terada Naoto, Allsop David, Yokota Isao, Mizuno Toshiki, Tokuda Takahiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Plasma neurofilament light chain: A potential prognostic biomarker of dementia in adult Down syndrome patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0211575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0211575	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 Ohmichi Takuma, Kasai Takashi, Kosaka Tadashi, Shikata Keisuke, Tatebe Harutsugu, Ishii Ryotaro, Shinomoto Makiko, Mizuno Toshiki, Tokuda Takahiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Biomarker repurposing: Therapeutic drug monitoring of serum theophylline offers a potential diagnostic biomarker of Parkinson's disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0201260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0201260	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takashi Kasai , Jo Shimizu , Yumiko Azuma , Hideki Yoshida , Masamitsu Yamaguchi , Takahiko Tokuda , Toshiki Mizuno.
2. 発表標題 The loss of Pgc in Drosophila causes locomotive defects with dopaminergic neuronal degeneration
3. 学会等名 第60回 日本神経学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Shimizu J, Kasai T, Yoshida H, Yamaguchi M.
2. 発表標題 Analysis of novel Parkinson ' s disease (PD)-causing gene using Drosophila melanogaster.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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	山口 政光  (Yamaguchi Masamitsu)  (00182460)	京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授   (14303)	
研究分担者	中雄 裕美子(東裕美子)  (Nakao Yumiko)  (00453093)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教   (24303)	
研究分担者	徳田 隆彦  (Tokuda Takahiko)  (80242692)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授   (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	吉田 英樹  (Hideki Yoshida)  (30570600)	京都工芸繊維大学・応用生物学系・准教授    (14303)	

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