

令和 6 年 5 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07466

研究課題名(和文) 解糖系酵素(PGK)活性促進による新規パーキンソン病治療戦略

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：解糖系酵素欠損症であるホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)欠損症に関する研究から、この酵素欠損症がパーキンソン病(PD)を発症させることを発見した。血液解析により、PGK活性が若年性パーキンソン病の発症に関連することが示された。本研究のもう一つのテーマであるPGKノックダウン・ショウジョウバエを用いた遺伝的相互作用解析では、いくつかのノックアウト系統との交配により、強い相互作用を持つ遺伝子を同定した。相互作用が見られた遺伝子の内、興味深いものとしてSima(ショウジョウバエ低酸素誘導因子)が挙げられる。これらの知見をもとに、低酸素誘導を介したパーキンソン病の新たなプロジェクトに進む予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、従来不透明であった解糖系酵素活性とパーキンソン病発症の関係がより明確になった。特に孤発性パーキンソン病においても解糖系酵素の変化が認められたことにより、解糖系酵素活性の賦活によるパーキンソン病治療というアプローチはより現実的なものと理解できるようになった。さらに従来の解糖系酵素活性賦活方法はPGKに限定されたものであったが、今回PGKと相互作用する遺伝子を複数特定したことにより、パーキンソン病を治療ないし予防する方法について従来と異なるアプローチによって実現できることが示された。

研究成果の概要(英文)：Our research on phosphoglycerate kinase (PGK) deficiency, a glycolytic enzyme deficiency, has led us to discover that this enzyme deficiency causes juvenile Parkinson's disease (PD) in individuals with the disease. Blood biomarker analysis has shown that PGK activity is associated with the development of juvenile Parkinson's disease. In genetic interaction analysis using PGK knockdown *Drosophila*, which is another subject of this study, we identified genes with strong interactions through crosses with several knockout lines. The interaction was observed in Sima (*Drosophila* hypoxia-inducible factor). Based on these findings, we are going to move on to a new project for Parkinson's disease via hypoxia induction.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：パーキンソン病 解糖系酵素 PGK

1. 研究開始当初の背景

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修飾治療の開発は高齢化社会における重要な課題である。PD の病態理解は家族性 PD の原因遺伝子の機能解析によってなされてきた。各遺伝子機能は多岐にわたるが概ね『 α -syn の過剰と分解障害』『不良ミトコンドリア除去障害』『小胞輸送機能不全』の三機序に集約されつつあり、こうした病態理解は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、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新たな PD 原因遺伝子の同定・機能解析は治療開発において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：PARK12 も未だ遺伝子同定がなされていない領域であり、研究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。

申請者は最近、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 上の PGK1 にコードされ、その変異は伴性劣性遺伝する。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 Parkinsonism 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高い。さらに申請者は PGK ノックダウンショウジョウバエ (PGK-KD fly) を確立し、このモデルにおいて PD に合致した表現型 (運動能力低下とドパミン神経変性) を確認するとともに PGK-KD が解糖系機能低下 ATP 産生低下 ROS 産生上昇 ドパミン神経変性というカスケードを通して PD 症状を発症していることを示した。本酵素欠損における PD 発症が酵素活性低下 (loss of function) によって説明可能であることを示した申請者ら一連の報告は本領域に一定のインパクトをもたらし、『PGK1 変異は機序不明であった感受性領域 PARK12 の原因の一部を占めている』という理解が受け入れられるようになり、同時に『PGK 酵素活性向上による PD 治療・予防が可能になる』という新しい作業仮説に基づいた研究が世界的に活発化した。特に最近の注目すべき成果として quinazoline 誘導体系 1 遮断薬 (terazosin 等) が PGK 活性亢進作用をもち PD モデル動物に対する治療効果があること、さらにはこれらの薬物の服用者は PD を発症しにくいとする報告がなされたことが挙げられる。

一方でこの新しい治療コンセプトを実現する上で解決すべき二つの課題が残されていた。その第一は、(1)ほとんどの PD 患者は発症前段階から一定程度の起立性低血圧を有しているため quinazoline 誘導体のような旧世代型 遮断薬に対する忍容性に乏しく (非常に強い起立性低血圧が誘発される)、実臨床に用いるには 遮断作用のない PGK enhancer を新規探索する必要があること。第二の問題点は PGK 活性低下だけが PD 発症原因ではないため、(2)PGK enhancer による治療対象は PGK 酵素活性が遺伝要因 (PGK ヘテロ保因者および低活性 variant) ないし加齢・環境要因によって低下している患者群に必然的に限定される点にある。現状では PGK 酵素活性測定は古典的方法に依存しており、PD のような頻度の高い疾患に対応できる効率的な計測系が確立していないため、PGK enhancing 治療に適した患者を現在の技術では効果的にスクリーニングできず、また治療効果判定もできないことの二点である。

2. 研究の目的

以上の課題に取り組むため申請者は下記目的をもって研究を開始した。

これまでに確立した PGK-KD ショウジョウバエの表現型と相互作用する遺伝子群を特定し、PGK 調節遺伝子群に対して薬物的干渉を加えることによる新しい PGK 活性調節方法を探索する。PGK 酵素活性をパーキンソン病患者コホートの赤血球において測定し健常者との差異および患者情報との相関を検証することにより PGK 酵素活性と PD 発症の関係を孤発性パーキンソン病において検証する。

3. 研究の方法

PGK-KD ショウジョウバエを用いた PGK 調節遺伝子群の同定

TH ドライバーによるドパミン神経選択的発現ドライバーを用いて、ドパミン神経選択的 PGK-KD ショウジョウバエ系統を樹立し、その表現型を確認した。Pathway analysis と共同研究者間のコンセンサスミーティングの内容を統合し、PGK と相互作用を有することが期待される複数の遺伝子を抽出した。それぞれの遺伝子に対する欠損系統を作成または入手し、PGK-KD 系統と交配し PGK 活性と相互作用を有する遺伝子群の特定を行った。

PGK 活性測定系統の確立と患者コホートにおける赤血球中 PGK 活性測定

PGK 本来の化学反応である 1,3-bPG + ADP → 3-PG + ATP の逆反応、すなわち 3-PG+ATP 基質として添加し、産生される 1,3-bPG に対して第二段階反応として大過剰量の NADH から還元される NAD+量の経時的増加を比色観察することによって PGK 活性を定量する系を利用した。本測定系を赤血球溶解液に最適化し、個体間誤差および測定プレート間誤差を解消するための複数の手法を試行し、安定してヒト赤血球における PGK 活性を測定可能な系を確立した。これまでの診療過程において入手している、健常対照者およびパーキンソン病患者、PGK 欠損症患者における PGK 活性を測定し、臨床症状との相関を検証した。

4. 研究成果

PGK-KD ショウゴウ ヨウバ I を用いた PGK 調節遺伝子群の同定

ドパミン神経選択的 PGK-KD ショウゴウ ヨウバ I は幼虫期の移動速度(Crawling speed)に有意な低下が確認された。同表現型をもとに、PGK との相互作用が期待される複数の遺伝子群および家族性パーキンソン病原因遺伝子の内、機能喪失型変異によって発症する遺伝子群、計 11 種に対して交配実験を行ったところ、有意な相互作用を認められた 2 つの遺伝子を特定した。その内、一種類は保険収載薬剤において既にヒトにおいて薬物的に機能促進が可能な sima(ヒトにおける HIF1)であった。本分子の活性調節による PGK の活性変化の誘導およびヒトにおける HIF1 活性化薬剤の食餌投与による神経保護効果の検証を今後遂行する予定。

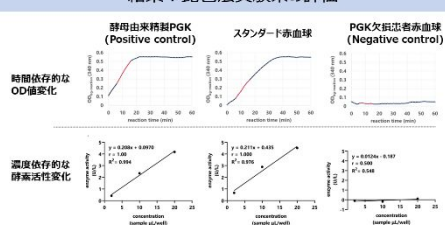
PGK 活性測定系統の確立と患者コホートにおける赤血球中 PGK 活性測定

赤血球溶解液における PGK は安定的に測定することができた。患者ごとの誤差はヘモグロビン濃度によって補正した。また無視できないプレート間誤差が存在したが、複数の誤差補正手法を統計的に検証し最もプレート間誤差の少ない補正手法を用いることによって安定的な測定を確立した。

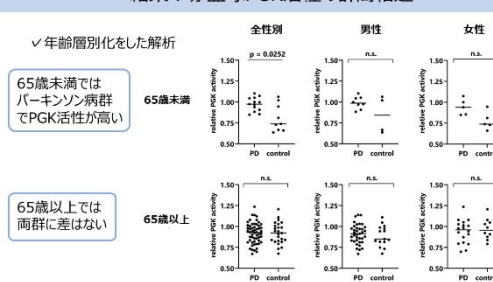
68 人の PD 患者と 34 人の年齢をマッチさせた無関係の対照者および PGK 欠損患者由来サンプルを対象とした。同手法によって測定される PGK 活性は全ての対象者において測定可能であったが、PGK 欠損患者赤血球では活性は検出感度以下であった。PD 群の PGK 活性は、全年齢を対象とした場合には両群間に有意差はなかったが、65 歳以下の参加者では対照群より有意に高かった。この現象は PGK 活性は対照群において加齢と正の相関がみられているのに対して、PD 群ではこうした相関は存在せず、若年の時点から既に対照群における高齢者と同様に PGK 活性が上昇していることに起因していた。興味深いことに PD 群における偏相関による多変量解析では、PGK 活性は線条体におけるドーパミントランスポーターシンチグラフィーの特異的結合比と負の相関を示した。すなわち PGK 活性が高いほど、ドパミン神経変性は高度であることが示された。PGK 活性はレボドパ換算 1 日投与量と有意な相関を示しておらず、ドパミン神経変性と PGK 活性上昇の関係はレボドパ投与量を調節したのちも保存された。

以上の結果は当初に予測していた、PD 患者群において PGK 活性が上昇しているという結果とは異なったものであったが、少なくとも以下の推論を可能にする。すなわち 1) 赤血球中の PGK 活性の上昇は、比較的若い患者や正常老化における PD の病態と関連している；2) 線条体の変性の程度は PGK 活性の上昇と関連している。これらの結果は、PGK 測定法を PD の診断的バイオマーカーとして、また PGK 増強治療を治療的にモニターするために応用する場合に重要な考慮点であると結論した。

結果：比色法実験系の評価



結果：赤血球PGK活性の群間相違



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ohmichi Takuma, Kasai Takashi, Shinomoto Makiko, Kitani-Morii Fukiko, Fujino Yuzo, Menjo Kanako, Mizuno Toshiki	4. 巻 18
2. 論文標題 Serum leucine-rich 2 glycoprotein as a potential biomarker for systemic inflammation in Parkinson's disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0282153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0282153	査読の有無 無
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 Kojima Yuta, Kasai Takashi, Noto Yu-ichi, Ohmichi Takuma, Tatebe Harutsugu, Kitaoji Takamasa, Tsuji Yukiko, Kitani-Morii Fukiko, Shinomoto Makiko, Allsop David, Teramukai Satoshi, Mizuno Toshiki, Tokuda Takahiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Amyotrophic lateral sclerosis: Correlations between fluid biomarkers of NfL, TDP-43, and tau, and clinical characteristics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0260323 ~ 0260323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0260323	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 Fujino Yuzo, Kasai Takashi, Kitani-Morii Fukiko, Ohmichi Takuma, Shinomoto Makiko, Menjo Kanako, Mizuno Toshiki	4. 巻 91
2. 論文標題 Impaired age-dependent increases in phosphoglycerate kinase activity in red blood cells of Parkinson's disease patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parkinsonism & Related Disorders	6. 最初と最後の頁 128 ~ 134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parkreldis.2021.09.016	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0件

〔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	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)	
研究分担者	渡邊 義久 (Yoshihisa Watanabe) (50363990)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	

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