

スフィンゴリピドーシスの病態解明および治療法開発に関する研究

分担研究者：松田 純子（川崎医科大学 特任教授）

研究要旨

スフィンゴ糖脂質のライソゾームにおける分解にはライソゾーム酵素に加えてサポシンと呼ばれる糖タンパク質が必要である。プロサポシンは4種類のサポシン A、B、C、D の前駆体タンパク質であるとともに細胞外にも分泌されることから独自の生物機能が示唆されている。我々はプロサポシンの新規機能を探索する目的でプロサポシン強発現マウス (PSAP-Tg) の表現型解析を行った。PSAP-Tg マウスは正常に出生し寿命は1年以上であったが、組織病理学的解析の結果、PSAP-Tg マウスの網膜では視細胞が生後3週齢ころから脱落し、生後5週齢には完全に消失することが明らかになった。網膜におけるプロサポシン/サポシンの発現をイムノプロットと免疫組織染色で検討したところ、プロサポシン/サポシンは網膜色素上皮細胞、視細胞外節、神経節細胞に強い発現が認められた。一方、プロサポシンノックアウトマウスおよびサポシン A、C、D の各欠損マウスには網膜変性の所見を認めなかった。神経セロイドリポフスチノーシスのモデル動物であるカテプシン D 欠損マウスも PSAP-Tg マウスに類似した網膜変性を呈することから、PSAP-Tg マウスは神経セロイドリポフスチノーシスおよび網膜色素変性症の病態解析において有用なモデル動物となることが期待される。

A. 研究目的

スフィンゴ糖脂質は哺乳動物の生体膜を構成する重要な脂質成分である。スフィンゴ糖脂質のライソゾームにおける分解には疎水性のスフィンゴ糖脂質と親水性の加水分解酵素を相互作用させるためにサポシン (SAPs) と呼ばれる疎水性の糖タンパク質が必要である。SAP-A、-B、-C、-D は前駆体タンパク質であるプロサポシン (PSAP) がライソゾームに運ばれ、プロテアーゼによる分解を受けて生成される。一方、PSAP は脳脊髄液や母乳、精液などの体液中に豊富に存在し、細胞外に分泌されることから、SAPs の前駆体タンパク質としての機能に加え、独自の生理機能を有することが示唆されている (Sandhoff K. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 88, 554-582, 2012.) (図 1)。

ヒト PSAP 欠損症はこれまでに世界で4家系

の報告があるが、いずれの報告例も重篤な神経症状と著明な肝脾腫を呈し、新生児早期に死亡している。1996年に藤田らによって作製されたプロサポシンノックアウトマウス (Psap-KO) は全SAPsの欠損により全身組織に多彩なスフィンゴ糖脂質が蓄積し、重篤な神経症状を呈して生後30日前後で死亡する (Fujita N. et al. *Hum. Mol. Genet.* 5, 711-725, 1996.)。

我々は、これまでの研究でSAP-A、SAP-C、SAP-Dの特異的欠損マウスを世界に先駆けて作製し、スフィンゴ脂質蓄積症 (スフィンゴリピドーシス) の病態解明に取り組んできた。本研究では、いまだ不明な点が多いPSAPの新規機能を探索する目的でPSAPトランスジェニックマウス (PSAP-Tg) の表現型解析を行った。

B. 研究方法と結果

1) PSAP トランスジェニックマウスの作製

東海大学医学部分子生命科学の吉村真一博士らとの共同研究によって、マウス ROSA26 遺伝子座位に CAG-ヒト PSAP cDNA-PolyA カセットを挿入し、プロサポシントランスジェニックマウス (PSAP-Tg) を製作した (Otsuka M. et al. *Nucleic Acids Res.*38 (22) e198, 2010.) (図 2)。出生した PSAP-Tg マウスから各臓器を採取し、抗ヒト SAP-B 抗体を用いたイムノプロット解析を行った結果、脳を含む全身組織で PSAP を強く発現していることが確認できた。また、*Psap* KO マウスとの交配実験の結果、トランスジーンを持つ *Psap* KO マウスでは *Psap* KO マウスの致死性やスフィンゴ脂質の蓄積がレスキューされ、トランスジーン由来のヒト PSAP はマウス体内において正常に機能することが確認できた (図 2)。これらの結果から、PSAP-Tg マウスは PSAP を全身で安定的に過剰発現するマウスであることがわかった。

2) PSAP-Tg マウスの表現型解析

PSAP-Tg マウスは正常に出生し、寿命は 1 年以上であった。組織病理学的解析の結果、5 週齢の PSAP-Tg マウスでは網膜の視細胞が完全に消失することが明らかになった。そこで、PSAP-Tg マウスの網膜変性が、いつ、どこで始まるのかを明らかにする目的で、日齢 5 から 5 日間隔で経時的に網膜の組織標本作製し、組織学的解析 (一般組織染色、免疫組織化学染色並びに電子顕微鏡による超微形態観察) を行った。その結果、PSAP-Tg マウスの網膜は正常に形成され、2 週齢頃までは野生型マウスと差異を認めないが、3 週齢頃から視細胞の変性が始まり、5 週齢ではほぼ完全に視細胞が脱落することがわかった (図 3)。アストログリアのマーカ

る GFAP (Glia Fibrillary Acidic Protein) とマイクログリア・マクロファージのマーカである Iba1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1) で免疫組織染色を行ったところ、PSAP-Tg マウスの網膜では視細胞の変性・脱落に伴って、著明なグリオシスとマイクログリア・マクロファージ様細胞の浸潤が認められた。また、PSAP-Tg マウスの網膜には視細胞層を中心に自己蛍光物質が認められた。

次に網膜組織の電顕観察を行ったところ、日齢 30 の PSAP-Tg マウスの網膜では、視細胞の外節が変性し、内節部分には膜様封入体を含むファゴゾーム様構造が観察された。視細胞の核からなる外顆粒層には、核質が濃縮した核が多数認められ、視細胞が細胞死に陥っていることが推定された。日齢 44 では視細胞が完全に消失し、多数のファゴゾーム様構造を含むマイクログリア・マクロファージ様細胞が浸潤していた。網膜色素上皮細胞には、ファゴゾーム様構造の増加は認められなかったが、電子密度の高い一層の膜に囲まれたライソゾーム様構造物が増加傾向にあった。

一方、*Psap*-KO マウスおよび *Sap*-A、C、D の各欠損マウスには病末期においても網膜変性の所見を認めなかった。これらの結果から、PSAP-Tg マウスにおける網膜変性は PSAP の過剰発現によって引き起こされていると推測された。

3) 網膜における PSAP、SAPs の発現解析

眼球における PSAP/SAPs の発現をイムノプロットで、検討したところ、マウス PSAP、ヒト PSAP とともに強く発現していた。次に網膜の免疫組織染色で局在を検討したところ、野生型マウス、PSAP-Tg マウスともに PSAP/ SAPs は網膜色素上皮細胞、視細胞外節、神経節細胞に強く発現していた。PSAP-Tg マウスでは活性化アストログリアにも強い発現が認められた。

C. 考察と展望

PSAP には SAPs の前駆体タンパク質としての機能に加え、独自の生理機能が示唆されているがいまだ不明な点が多い。本研究によって PSAP-Tg マウスの網膜では網膜色素上皮細胞に隣接する錐体、桿体からなる視細胞層が 3 週齢頃から進行性に変性・脱落することが明らかになった。

これまでに PSAP の SAPs への分解にかかわるカテプシン D の欠損マウスが網膜変性を呈することが報告されている (Koike M. et al. *Mol. Cell Neurosci.* 22, 146-161, 2003.)。カテプシン D は神経セロイドリポフスチノーシス (NCLs) の原因遺伝子の一つである。NCLs は網膜病変による視力障害、てんかん、精神退行を特徴とする進行性神経変性疾患で、現在 14 の原因遺伝子 (CLN1 - CLN14) が知られており、カテプシン D 欠損症を含むいくつかの病型では SAP-A および D の細胞内蓄積を認める。

一方、セマフォリン研究を行っている豊福らは、網膜色素変性症の原因遺伝子の一つであるセマフォリン 4A (Sema4A) のノックアウトマウス (Sema4A-KO) が網膜視細胞の変性を呈することを見出し、その分子メカニズム解析から、網膜色素上皮細胞に発現する Sema4A は PSAP と相互作用し、細胞外への PSAP のエキソサイトーシスに必須であることを発見した (Toyofuku T. et al. *Genes Dev.* 26, 816 -829, 2012.)。豊福らは、培養網膜色素上皮細胞が酸化ストレス下で細胞外に PSAP を分泌すること、Sema4A-KO マウスではそれが阻害されていることを示し、PSAP の視細胞保護作用が欠失するために視細胞が脱落すると推論している。しかし、我々の解析では、*Psap*-KO マウスは病末期においても網膜変性を呈さないことから Sema4 欠損による視細胞脱落の原因は、PSAP が網膜色素上皮細胞内にとどまることが原因であると考えられる。

PSAP-Tg マウスの解析結果に加え、上述の報告は PSAP/SAPs の細胞内蓄積と網膜変性の関連を示唆している。今後はその分子メカニズムを明らかにする必要がある。そのため、我々は、網膜色素上皮細胞あるいは視細胞において PSAP と相互作用する分子の同定を試みている。PSAP は脂質結合能をもつ疎水性タンパク質であることから、レチノイドやレチノイド関連タンパク質と相互作用する可能性がある。視細胞では、外節部の細胞膜に存在するオプシンが 11-cis-retinal と結合してロドプシンを構成し、光刺激による 11-cis-retinal から all-trans-retinal への異性化で膜電位変化が起こり視覚が形成される。All-trans-retinal は網膜色素上皮細胞へ輸送され、visual cycle により再生されて、再び視細胞へ供給される。一方、網膜色素上皮細胞は視細胞の外節をファゴサイトーシスにより取り込み、ライソゾームで分解してレチノイドとして再利用している。PSAP-Tg マウスの網膜におけるレチノイド代謝産物量の測定や色素上皮細胞におけるオートファジーフラックスの解析によって、PSAP-Tg マウスの網膜における病態機構の一端が明らかにできるだろう。

網膜色素変性症は失明の主要原因であり、神経セロイドリポフスチノーシス (NCLs)をはじめ多くのライソゾーム病では網膜色素変性症を合併する。PSAP-Tg マウスの解析により、網膜における PSAP の機能と視細胞変性の分子メカニズムを明らかにすることは、ライソゾーム病態解明に加え、網膜色素変性症の病態メカニズムの解明、予防や治療方法の開発にもつながることが期待される。

D. 結論

PSAP-Tg マウスの網膜では色素上皮細胞に隣接する視細胞層が進行性に変性・脱落することを発見した。プロサポシンにはサポシンの前駆体タンパク質としての機能に加え、独自の生理機能が

示唆されていたが不明な点が多かった。今回の研究によって網膜におけるプロサポシンの新たな機能が示された。これが契機となりプロサポシン、サポシン研究の新しい展開がなされると予想される。

PSAP-Tg マウスを用いた動物実験計画書は東海大学の「遺伝子組換え実験安全委員会」および「動物実験委員会」、川崎医科大学の「組換え DNA 実験安全委員会」および「動物実験委員会」から承認を得て施行された。

E. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) Murakami, I, Mitsutake, S, Kobayashi, N, Matsuda, J, Suzuki, A, Shigyo, T, Igarashi, Y.: Improved high-fat diet-induced glucose intolerance by an oral administration of phytosphingosine. Biosci. Biotechnol. Biochem. 77, 194-197. 2013.
- 2) 松田純子：シアリドーシス．先天代謝異常ハンドブック．中山書店．p.212-213, 2013.

2. 学会発表

- 1) Matsuda J, Ono K, Muto M, Yoneshige A, Yoshimura S.: Overexpression of prosaposin causes severe retinal degeneration in mouse. 第 55 回日本先天代謝異常学会 2013 年 11 月 27-29 日 舞浜 .
- 2) 久樹晴美、只野 - 有富桂子、宮川誠、内田俊也、松田純子、戸田年総、岡崎具樹 . : Saposin D 欠損マウスの 2D-DIGE タンパク質発現解析 - 炭酸脱水酵素(CA2)との関連. 第 86 回日本生化学会大会. 2013 年 9 月 11-13 日 横浜 .

F. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

図1 プロサポシンとサポシンの構造

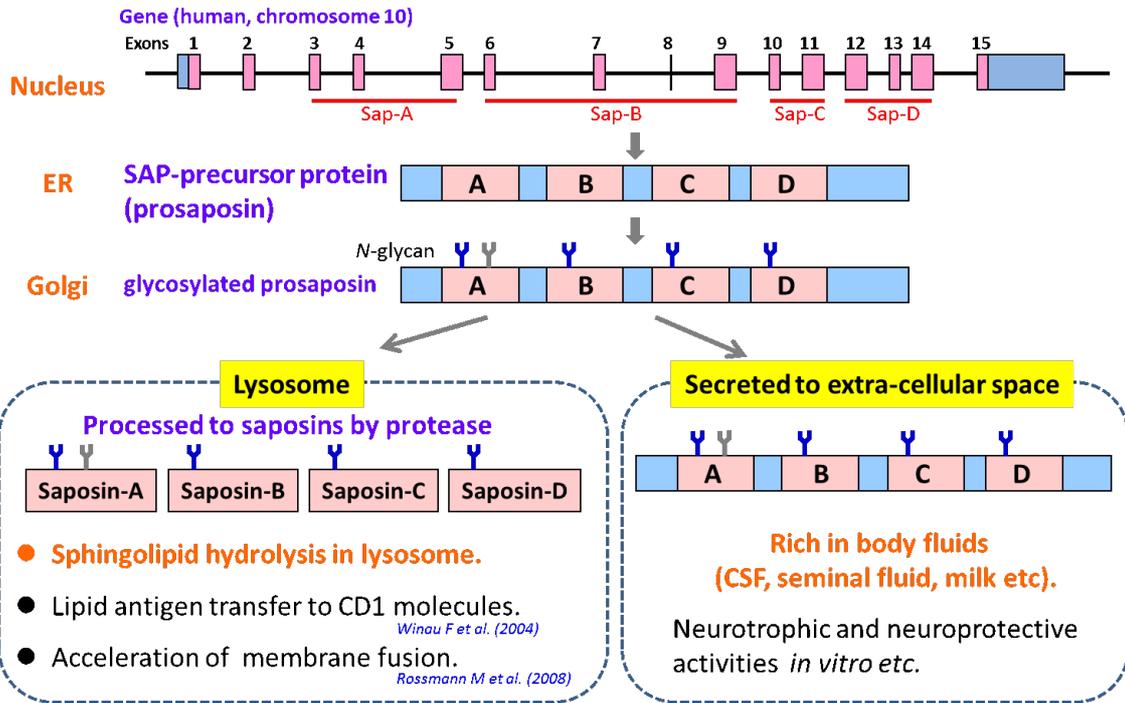
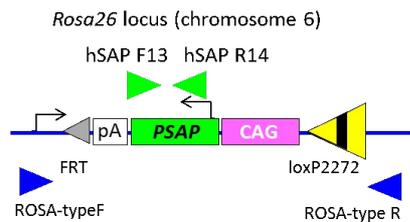


図2 プロサポシントランスジェニックマウスの作製

Targeted insertion of human *PSAP* cDNA into *Rosa26* locus

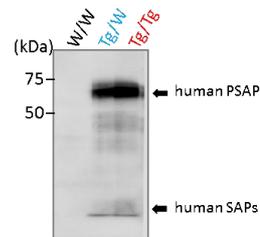
Reference: Ohtsuka M et al., *Nucleic Acids Res* (2010).



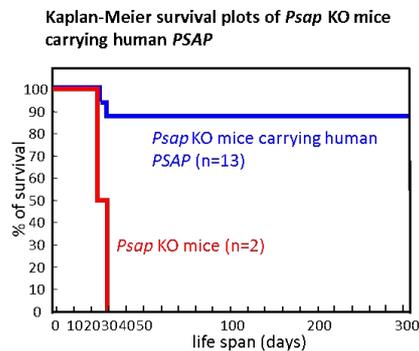
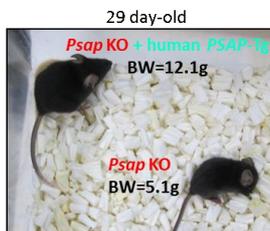
Western blot of human PSAP

anti-human SAP-B antibody

Brain tissue



Lethal phenotypes of *Psap* KO mice were rescued by the expression of human PSAP



No accumulation of GSLs in the tissues of *Psap* KO mice carrying human PSAP

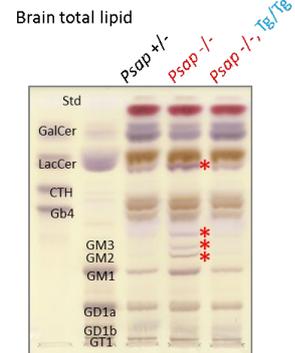
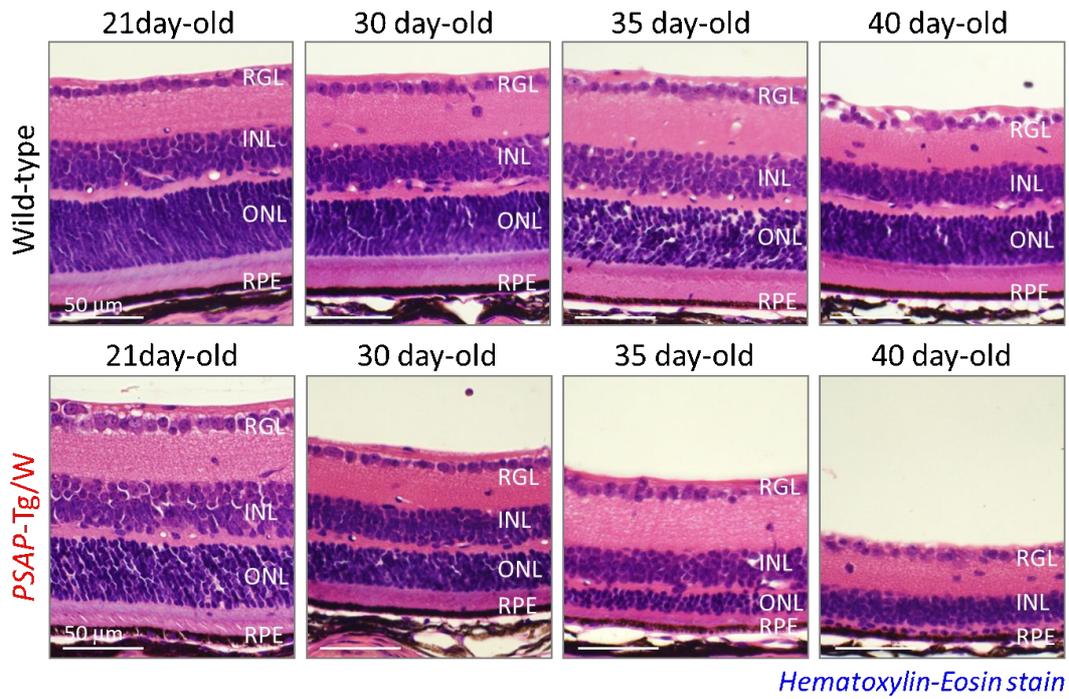


図3 プロサボシントランスジェニックマウスの網膜組織所見



Hematoxylin-Eosin stain

RGL: retinal ganglion layer	INL: inner nuclear layer
ONL: outer nuclear layer	RPE: retinal pigment epithelium