

スフィンゴ糖脂質代謝と神経変性疾患のクロストーク

分担研究者： 松田純子（川崎医科大学 病態代謝学 教授）

研究要旨

スフィンゴ糖脂質(GSL)は生体膜の構成脂質で、そのライソゾームにおける分解異常症であるスフィンゴリピドーシスは小児期に重篤な神経症状を引き起こす。一方、スフィンゴリピドーシスの一つであるグルコシルセラミド(GlcCer)の分解異常症 - ゴーシェ病 - の責任遺伝子 GlcCer- β -glucosidase(GBA)のヘテロ接合性変異はパーキンソン病の危険因子であることが明らかになり、スフィンゴリピドーシスと様々な神経変性疾患との関係が注目されている。本研究では、GSL のライソゾームにおける分解に必須のスフィンゴ脂質活性化タンパク質 - サポシン(SAP)およびその前駆体蛋白質であるプロサポシン(PSAP)の遺伝子改変マウスを用いて、黒質 - 線条体ドーパミンニューロン及び網膜の解析を行い、GSL 代謝異常およびSAPs/PSAPが、神経変性疾患の中でもパーキンソン病及び神経セロイドリポフスチン症の発症と密接に関連していることを見出した。

A . 研究目的

本研究班においては、3 年間で主に下記の 3 つの課題に取り組んだ。

- 1) 平成 26 年度：GM2 ガングリオシドーシスの診断基準作成
- 2) 平成 27-28 年度：ライソゾーム病・ペルオキシゾーム病の全国疫学調査
- 3) 平成平成 26-28 年度：ライソゾーム病の病態解明及び治療法開発に関する基礎的研究
 - a) 遺伝性脱髄疾患 - クラッペ病 - に対する新規治療法の開発研究
 - b) スフィンゴ糖脂質代謝と神経変性疾患のクロストーク

本報告書においては、3)のライソゾーム病の病態解明及び治療法開発に関する基礎的研究のうち b) スフィンゴ糖脂質代謝と神経変性疾患のクロストークについて記述する。

スフィンゴ糖脂質(GSL)は生体膜の構成脂質で、そのライソゾームにおける分解異常症スフィンゴリピドーシスは小児期に重篤な神経症状を引き起こす。一方、スフィンゴリピドーシスの一つであるグルコシルセラミド(GlcCer)の分解異常症 - ゴーシェ病 - の責任遺伝子 GlcCer- β -glucosidase(GBA)のヘテロ接合性変異はパーキンソン病の危険因子であることが明らか

、スフィンゴリピドーシスと様々な神経変性疾患との関係が注目されている。本研究では、GSL のライソゾームにおける分解に必須のスフィンゴ脂質活性化タンパク質 - サポシン(SAPs)およびその前駆体蛋白質であるプロサポシン(PSAP)の遺伝子改変マウスが、いずれも神経変性疾患を発症するという知見を踏まえ、GSL 代謝異常と神経変性疾患、中でもパーキンソン病及び神経セロイドリポフスチン症(Neural Ceroid Lipofuscinosis (NCL))との関連を明らかにすることを目的とした。

B . 研究方法

サポシン C ノックアウトマウス(SAP-C-KO)およびサポシン D ノックアウトマウス(SAP-D KO)由来の脳組織を用い、組織病理学的手法で黒質 - 線条体のドーパミンニューロンの変性・脱落の有無を解析した。

プロサポシン過剰発現マウス(PSAP-Tg)の網膜を組織病理学的、生化学的手法により解析し、網膜病変と SAPs/PSAP 発現量との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子組み換え実験および遺伝子改変動物を用いる動物実験については、川崎医科大学組換え DNA 実験安全委員会および

動物実験委員会の承認を受けており、その規則に従い適正に実験を行っている。

C . 研究結果

SAP-C KO、SAP-D KO から脳組織標本を作製し、黒質 - 線条体のドーパミンニューロンに着目して、光学顕微鏡観察 (一般染色)、共焦点顕微鏡観察 (免疫組織染色) を行った。その結果、SAP-D KO 脳において、ドーパミンニューロンのマーカーである抗 Tyrosine hydroxylase (TH) 抗体を用いた免疫組織染色で、TH 陽性黒質 - 線条体ドーパミンニューロンの数の減少、形態異常を認めた。抗 SAP-B 抗体との多重免疫組織染色で、TH 陽性ニューロンに SAPs/PSAP の異常蓄積を認めた。Western blot 解析では SAP-D KO 脳組織において PSAP の著明な蓄積を認めた。

PSAP-Tg 網膜では、出生時には正常であった視細胞が 3 週齢頃から脱落し始め、5 週齢までには完全に脱落することが明らかになった。一方、プロサポシンノックアウトマウス (PSAP-KO) 網膜には視細胞の変性脱落を認めなかった。これらの結果から、網膜での PSAP の発現量の上昇が網膜視細胞死を惹起していると示唆された。

D . 考察

GSL は哺乳動物の生体膜の outer leaflet に存在する膜脂質で、細胞内外のシグナル伝達にかかわる生体膜上の超分子構造「脂質ラフト」の構成成分として注目されている。GSL の発現は合成と分解の代謝バランスによって厳格にコントロールされており、その代謝異常は様々な疾患と関連している。中でも、ライソゾームにおける GSL の分解異常はスフィンゴリピドーシスと呼ばれる、主として小児期に重篤な神経症状で発症する希少難病を引き起こす。

近年、スフィンゴリピドーシスの一つであるグルコシルセラミド (GlcCer) の分解異常症であるゴーシェ病の責任遺伝子 GlcCer- β -glucosidase (GBA) のヘテロ接合性変異がパーキンソン病の危険因子であることが明らかになり (Sidransky E, et al. N. Engl. J. Med. 2009)、Rare disease であるスフィンゴリピドーシスと Common disease である様々な神経変性疾患との関係が注目されている。GSL 代謝とパーキンソン病の関連については、多くの研究者が、ゴーシェ病の責任遺伝

子である GBA、その活性化タンパク質である SAP-C あるいは蓄積物質である GlcCer との関係に着目して研究を行っている。

我々は SAP-C KO、SAP-D KO に加え、PSAP-Tg を世界に先駆けて作製・解析しており、本研究によって、SAP-D KO はパーキンソン病の疾患モデルマウスとして有用であることを見出した。現在、マウス脳組織およびマウス胎児線維芽細胞 (MEF)、iPS 由来ドーパミンニューロンを用いて、PSAP および SAPs の蓄積と黒質 - 線条体のドーパミンニューロンの変性・脱落のメカニズムの解明に取り組む準備を進めている。

NCL は視力障害がほぼ必発の神経変性疾患で、現在 14 個 の原因遺伝子が同定されている。しかし、その神経病態は十分には解明されておらず、有効な治療法も存在しない。NCL の少なくとも 3 つにおいて SAPs の蓄積が指摘されているが、その病態への関与は不明である。本研究で見出した PSAP-Tg における網膜視細胞死は、網膜での PSAP の発現量の上昇が NCL における網膜視細胞死、視力障害を惹起している事を示唆しており、PSAP-Tg は NCL の病態における SAPs/PSAP の関与を解明する糸口になる有用なモデルマウスであるといえる。

E . 結論

本研究によって、SAP-D KO はパーキンソン病の疾患モデルマウスとして、PSAP-Tg は NCL の疾患モデルマウスとして有用であることを見出した。

今後は、PSAP および SAPs によるパーキンソン病および NCL 発症のメカニズムを個体レベル、細胞レベルで解明することに取り組む。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) **松田純子**: シアリドーシス 神経症候群 . 日本臨牀 . 2014 年 6 月 20 日発行別冊 p.792-795.
- 2) Yoneshige A, Muto M, Watanabe T, Hojo H, **Matsuda J**. The effects of chemically synthesized saposin C on glucosylceramide- β -glucosidase. *Clin Biochem*. 2015, 48 (16-17): 1177-1180.
- 3) **松田純子**. 糖鎖蓄積症 . 糖鎖の新機能開発

・応用ハンドブック． - 創薬・医療から食品開発まで - .(株)エヌ・ティ・エス , 2015年8月12日発行 p.215-220.

- 4) Yamamoto T, **Matsuda J**, Dateki S, Ouchi K, Fujimoto W. Numerous intertriginous xanthomas in infant: A diagnostic clue for sitosterolemia. *J Dermatol.* 2016, 43 (11):1340-1344.
- 5) Ono S, **Matsuda J**, Saito A, Yamamoto Y, Fujimoto W, Shimizu H, Dateki S, and Ouchi K. A case of sitosterolemia due to compound heterozygous mutations in ABCG5: clinical features and treatment outcomes obtained with colestimide and ezetimibe. *Clin Pediatr Endocrinol*, 2017, 26 (1), 17-23.

2. 学会発表

- 1) **松田純子** : スフィンゴ糖脂質の機能と疾患 - 遺伝子改変マウスから見えてきたこと - 第9回香川先天代謝異常症研究会 特別講演 2014年11月7日 高松 .
- 2) **松田純子**、小野公嗣、武藤真長、米重あづさ . : プロサポシン過剰発現マウスは網膜視細胞変性を呈する . 第87回日本生化学会大会 . 2014年10月15-18日 京都 .
- 3) 小野公嗣、武藤真長、米重あづさ、**松田純子** . : プロサポシンノックアウトマウス網膜の組織病理学的解析 . 第87回日本生化学会大会 . 2014年10月15-18日 京都 .
- 4) 久樹晴美、只野 - 有富桂子、宮川誠、大熊 - 栗林恵美子、内田俊也、**松田純子**、戸田年総、岡崎具樹 . : Saposin D 欠損マウスは腎尿細管性アシドーシスを引き起こす - 炭酸脱水酵素(CA2)の異常が原因か? 第87回日本生化学会大会 . 2014年10月15-18日 京都 .
- 5) **松田純子** : スフィンゴ糖脂質のセラミド骨格の構造多様性が担う生物機能 . 第56回 日本脂質生化学会 . 2014年6月6-7日 大阪 .
- 6) 小野佐保子、**松田純子**、齋藤亜紀、山本剛伸、藤本亘、近河日智、森内浩幸、伊達木澄人、尾内一信 . : コレスチミド/エゼチニブ併用療法が有効であったシトステロール血症の1歳女児例 . 第118回日

本小児科学会学術集会 2015年4月16-19日 大阪 .

- 7) **松田純子**、小野公嗣、武藤真長、米重あづさ、吉村 眞一 : プロサポシン過剰発現マウスは網膜視細胞の変性脱落を呈する . 第57回 日本脂質生化学会 . 2015年5月28-29日 東京 .
- 8) **Matsuda J**, Ono K, Watanabe T, Yoneshige A, Muto M, Suzuki A. : Central nervous system pathology in the phytosphingolipid-deficient mouse. 25th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry. August 23-27, 2015, Cairns, Australia.
- 9) Ono K, Muto M, Yoneshige A, Yoshimura S, **Matsuda J** . : Role of prosaposin in retinal degeneration. 25th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry. August 23-27, 2015, Cairns, Australia.
- 10) **松田純子**、小野公嗣、渡辺 昂、鈴木明身 : スフィンゴ糖脂質セラミド骨格の構造多様性が担う生物機能の解明 . 第20回日本ライソゾーム 病研究会 2015年10月2-3日 東京 .
- 11) 小野佐保子、**松田純子**、齋藤亜紀、山本剛伸、藤本亘、近河日智、森内浩幸、伊達木澄人、尾内一信 : コレスチミド・エゼチニブ併用療法が有効であったシトステロール血症の1歳女児例 . 第49回日本小児内分泌学会学術集会 2015年10月8-10日 東京 .
- 12) **松田純子** : スフィンゴ脂質代謝異常症の基礎と臨床 . 第5回 岡山ライソゾーム病セミナー (特別講演) 2015年11月12日 岡山 .
- 13) **松田純子** : スフィンゴ糖脂質の機能と疾患 - 遺伝子改変マウスから見えてきた生物機能 - . 第5回 岡山ライソゾーム病セミナー (招待講演) 2015年11月26日 倉敷 .
- 14) **松田純子**、小野公嗣、鈴木衣子、鈴木明身 . : フィトスフィンゴ脂質欠損マウス中枢神経系の病態解析 . BMB2015 (第87回日本生化学会大会と第38回日本分子生物学会年会の合同大会) 2015年12月1-4日 神戸 .

- 15) **松田純子**：スフィンゴ脂質の構造多様性が担う生物機能 .東北薬科大学 分子生体膜研究所セミナー(招待講演)2015年12月14日 仙台 .
- 16) **松田純子**：スフィンゴ糖脂質の機能と疾患. 第1回 稀少疾患セミナー(特別講演)2016年3月5日 立命館大学 BKC キャンパス .
- 17) **松田純子**：スフィンゴ脂質代謝異常の基礎と臨床 ~ Rare disease から Common disease へ ~ 第51回 順天堂大学 神経学セミナー(招待講演)2016年7月8日 東京 .
- 18) 小野佐保子、**松田純子**、河野美奈、赤池洋人、荻田聡子、升野光雄、尾内一信：Septo-Optic Dysplasia の2症例. 第50回日本小児内分泌学会学術集会 2016年10月16-17日 東京 .
- 19) 森本優一、河野美奈、寺西英人、赤池洋人、宮田一平、**松田純子**、升野光雄、寺田喜平、尾内一信：症候性低血糖のコントロールに難渋した3番染色体長腕部分トリソミー、9番染色体短腕部分モノミーの一例 .第68回 中国・四国小児科学会 2016年10月29-30日 高松 .
- 20) **松田純子**：スフィンゴ糖脂質の機能と疾患 ~ Rare disease から Common disease へ ~ 第89回 日本小児科学会 岡山地方会(教育講演)2016年12月4日 岡山 .

G . 知的財産権の出願・登録状況

(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