

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790444

研究課題名(和文) Sema4Aにおける点突然変異と網膜色素変性症

研究課題名(英文) A point mutation in Semaphorin 4A associated with retinal degenerative diseases

研究代表者

野島 聡 (Nojima, Satoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40528791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：Sema4A遺伝子に点突然変異を有する種々の遺伝子改変マウスを作成し、そのうちのひとつであるF350C変異が網膜色素変性症の原因となることを証明した。更に、変異が生じることによりSema4A蛋白の立体構造が崩壊してしまい、そのせいで、Sema4Aが発現している網膜色素上皮細胞が網膜を保護する種々の物質を網膜視細胞に供給できなくなることを見出した。更に、Sema4Aを標的とする遺伝子治療をマウスの網膜に行うことにより、網膜色素変性症の発症を抑制することにも成功した。以上は、網膜色素変性症の新たな病態メカニズムを明らかにするとともに、網膜色素変性症に対する治療法につながる重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Semaphorin 4A(Sema4A) has an essential role in photoreceptor survival. In humans, mutations in Sema4A are thought to contribute to retinal degenerative diseases. Here we generate a series of knock-in mouse lines with corresponding mutations (D345H, F350C or R713Q) in the Sema4A gene and find that Sema4A F350C causes retinal degeneration phenotypes. The F350C mutation results in abnormal localization of the Sema4A protein, leading to impaired endosomal sorting of molecules indispensable for photoreceptor survival. Additionally, protein structural modelling reveals that the side chain of the 350th amino acid is critical to retain the proper protein conformation. Furthermore, Sema4A gene transfer successfully prevents photoreceptor degeneration in Sema4A F350C/F350C and Sema4A^{-/-} mice. Thus, our findings not only indicate the importance of the Sema4A protein conformation in human and mouse retina homeostasis but also identify a novel therapeutic target for retinal degenerative diseases.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：セマフォリン 点突然変異 網膜ホメオスタシス 網膜変性疾患

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症は代表的な網膜変性疾患であり、成人の失明の原因として上位を占める重大な疾患である。網膜色素変性症に対して未だ有効な治療法は確立されておらず、新たな疾患発症メカニズムの解明と治療法の確立は急務と考えられていた。

セマフォリンファミリーは、最初に見出された神経軸索の方向性を決定する神経ガイダンス因子としての機能をはじめ、組織再生、免疫調節活性、血管新生促進・抑制作用、がん抑制、骨代謝制御などの様々な作用を有する分子群であり、その中のひとつである Semaphorin 4A (Sema4A) は、免疫細胞において膜型および分泌型の Sema4A が樹状細胞の抗原提示能、ヘルパーT細胞の分化能を制御することが知られている (Kumanogoh et al, *Nature*, 2002. Kumanogoh et al, *Immunity*, 2005)。

また、Sema4A のノックアウトマウスは重度の網膜色素変性症を発症することが知られており、申請者らは近年、この網膜色素変性症の原因が網膜色素上皮から光受容体へプロサポシンといった抗アポトーシス作用を有する分子およびレチノイン酸担体蛋白の供給が行えないことに起因することを証明しており、同時に Sema4A はこれらを含む細胞内小胞の輸送を制御することを明らかにしている (Toyofuku et al, *Genes&Dev*, 2012)。

これらに合致して、ヒトにおいても、パキスタンの研究グループから、ヒト網膜色素変性症の患者において Sema4A 蛋白に遺伝子変異 (アミノ酸変異) を有する家系の存在が示唆されていた (Abid A et al, *J.Med.Genet.* 43:378-381,2006)。この報告において、3種類の Sema4A 遺伝子の変異、D345H、F350C、R713Q が網膜色素変性症患者 200 人のうち 4 人において見出されている。

2. 研究の目的

上記の家系において報告のあった Sema4A の遺伝子変異 (アミノ酸変異) について、実際に Sema4A 蛋白のたった一つのアミノ酸の変異にて網膜色素変性症を発症するのか、また発症した場合にはそれらがどういった病理学的機序にて引き起こされるのか、検証がなされていなかったため、これらの病的意義や治療標的としての可能性を検証することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

網膜色素変性症の家系において認められていた 3 種類の Sema4A 遺伝子の変異、D345H、

F350C、R713Q について、それぞれ導入した遺伝子改変マウス (ノックインマウス) を作製し、網膜色素変性症を発症するか否かおよびそれらの疾患発症メカニズムについて検証した。

4. 研究成果

変異 F350C を有する遺伝子改変マウスは、Sema4A 欠損マウスと同程度の重度の視細胞の変性を示し、変異 F350C が網膜色素変性症の原因となり得ることが動物モデルからも証明された (図 1)。残る 2 種類の点突然変異 D345H、R713Q については、病原性が認められなかった。

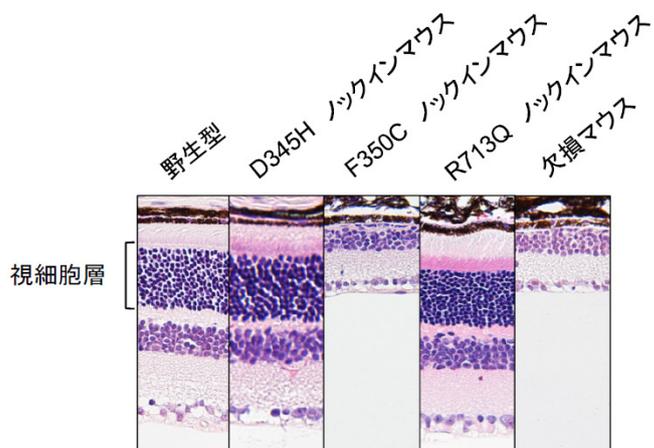


図1: 各点突然変異を有する遺伝子変異マウス (ホモ) の4週齢時点での網膜組織。このうち、変異F350Cを有するマウスは、欠損マウスと同様の網膜色素変性症の表現型を示している。

次に、変異マウスの網膜組織を用いて Sema4A (F350C) 変異蛋白の色素上皮細胞における局在を評価したところ、Sema4A (F350C) 変異蛋白は本来の局在部位である細胞膜表面に存在せず、細胞質内に留まるといった異常な局在パターンを示していることが分かった。また、すでに報告されているヒト Sema4D 蛋白の立体構造モデルを元に Sema4A の立体構造相同モデルを作成したところ、Sema4A (F350C) 変異の存在する 350 番目のアミノ酸は Sema4A 蛋白の外方に突出した部位に存在しており、その側鎖が内部の空間を埋めていることが示された (図 2)。

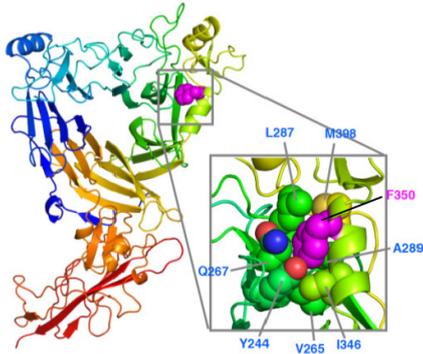


図2: Sema4A蛋白立体構造相同モデルにおいて、350番目のアミノ酸の位置を图示した。350番目のアミノ酸は蛋白の外方に突出した部分に存在しており、その側鎖は内方へ向き内部の空間を形成している。

また、培養細胞を用いた実験から、350番目に様々なアミノ酸変異を導入した際、変異アミノ酸の側鎖の体積が小さい場合には局在に異常が起こり、側鎖のある程度大きなアミノ酸に変異した場合には局在に異常が認められないことが示された。

これらの結果から、Sema4A蛋白にSema4A(F350C)変異が起こってしまうと、蛋白内部の空間が空洞になってしまい、そのせいで蛋白の立体構造が高度に崩壊し、結果正常の局在部位である細胞表面へ存在できないということが病態機序であることが示された。

当研究グループは近年、Sema4A欠損マウスの色素上皮細胞において、レチノイン酸結合蛋白およびプロサポシンという視細胞の保護に必須の蛋白の分泌能が著明に障害され、これがSema4A欠損マウスの示す網膜色素変性症の表現型の原因であることを報告している。同様の系を用いてSema4A(F350C)遺伝子改変マウスについても評価を行ったところ、網膜色素上皮からのレチノイン酸結合蛋白およびプロサポシンの分泌はSema4A欠損マウスと同程度に強く障害されていた。すなわち、立体構造の崩壊に伴い正常の局在部位へ存在できないことにより、これらの本来の生理機能が発揮できていないと考えられる。

更に、Sema4Aを標的にしたヒト網膜色素変性症患者に対する遺伝子治療の効果を検討するため、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療の実験を行った。生後1週間時点

においてSema4A欠損マウスおよびSema4A(F350C)遺伝子改変マウスに対してウイルス溶液の網膜下注射を行い、色素上皮細胞特異的に野生型Sema4A蛋白を発現させたところ、本来であれば視細胞が完全に変性・消失してしまうはずの4週齢の時点においても視細胞層は有意に保たれており、Sema4Aを標的とする遺伝子治療について良好な結果が得られた(図3)。この治療効果は、少なくとも4ヶ月間持続していた。

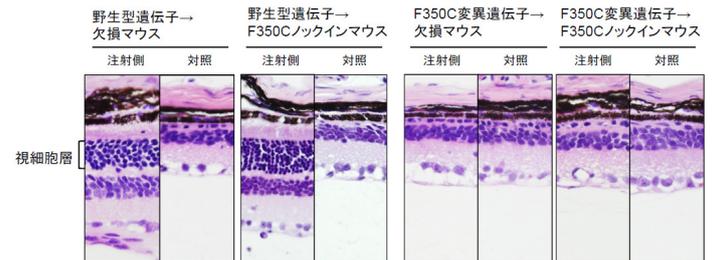


図3: 野生型(正常)Sema4A遺伝子ないしF350C変異Sema4A遺伝子をそれぞれSema4A欠損マウス、F350Cノックインマウスに導入した後の4週齢での網膜組織。野生型Sema4A遺伝子にて遺伝子治療を行うことにより視細胞の変性が有意に抑制できており、遺伝子治療が成功していると考えられる。

これらの結果は、ヒトおよびマウスの網膜の恒常性維持にSema4A蛋白質およびその立体構造が重要であることを示すのみでなく、網膜変性疾患の新規の治療標的としての可能性をも示唆した意義深いものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

A point mutation in *Semaphorin 4A* associates with defective endosomal sorting and causes retinal degeneration.

Nojima S, Toyofuku T, Kamao H, Ishigami C, Kaneko J, Okuno T, Takamatsu H, Ito D, Kang S, Kimura T, Yoshida Y, Morimoto K, Maeda Y, Ogata A, Ikawa M, Morii E, Aozasa K, Takagi J, Takahashi M, Kumanogoh A.

Nature Communication. 2013 Jan 29;4:1406. doi: 10.1038/ncomms2420.

Endosomal sorting by Semaphorin 4A in retinal pigment epithelium supports photoreceptor survival.

Toyofuku T, Nojima S, Ishikawa T, Takamatsu H, Tsujimura T, Uemura A, Matsuda J, Seki T, Kumanogoh A. ***Genes&Development***. 2012 Apr 15; 26(8): 816-29.

[学会発表] (計4件)

第49回日本臨床分子医学会学術集会、2012年04月13日～2012年04月14日、京都・みやこめっせ、「Semaphorin4Aにおける点突然変異と網膜色素変性症」

第101回日本病理学会総会、2012年04月26日～2012年04月28日、京王プラザホテル、「Semaphorin4Aにおける点突然変異と網膜色素変性症」

第22回日本サイトメトリー学会学術集会、2012年06月29日～2012年06月30日、千里ライフサイエンスセンター、「A point mutation in *Semaphorin 4A*, associated with defective endosomal sorting for chronic oxidative stress, causes retinal degenerative diseases.”

JST-CREST International Symposium、2013年02月12日～2013年02月13日、一橋記念講堂、「A point mutation in *Semaphorin 4A*, associated with defective endosomal sorting for chronic oxidative stress, causes retinal degenerative diseases.”

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

[その他]
ホームページ等

日刊工業新聞、2013年01月
『網膜色素変性症 治療に道』

大阪大学免疫学フロンティアセンター公式ホームページ、2013年01月
『新たな網膜変性疾患の病態機序を発見(熊ノ郷教授が Nat Commun に掲載)』

Nature Communications 注目の論文, natureasia.com, 2013年01月
『エンドソームでの選別異常に関連し網膜変性の原因となる Semaphorin 4A 中の点突然変異と Sema4A を用いた網膜疾患治療への応用』

マイナビニュース、2013年02月
『阪大、「網膜色素変性症」の新たな発症メカニズムを発見』

6. 研究組織

(1)研究代表者

野島 聡 (大阪大学 大学院医学系研究科 病態病理学 助教)

研究者番号：40528791

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

熊ノ郷 淳 (大阪大学 大学院医学系研究科 呼吸器・免疫アレルギー内科学 教授)

研究者番号：10294125