

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861476

研究課題名(和文) プロサポシントランスジェニックマウスにおける網膜視細胞変性の病態解析

研究課題名(英文) Pathological analyses of retinal degeneration in prosaposin transgenic mice

## 研究代表者

小野 公嗣(Ono, Koji)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：00548597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：プロサポシン(PSAP)は4つのサポシンの前駆体タンパク質であるが、細胞外に分泌され、独自の生物機能を有すると推定されている。網膜色素上皮細胞(RPE)からのPSAPの分泌に関わるセマフォリン4Aの欠損症は網膜色素変性症を引き起こす。本研究では、PSAP欠損マウス(PSAP-KO)及びPSAP過剰発現マウス(PSAP-Tg)の網膜の表現型解析を行った。PSAP-KOの網膜では明らかな視細胞の変性脱落を認めなかったのに対し、PSAP-Tgの網膜では5週齢までに視細胞が完全脱落した。以上の結果より、視細胞あるいはRPE内におけるPSAPの発現量の上昇が視細胞死を惹起することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Prosaposin (PSAP) is a precursor protein of four saposins, which are required for the intra lysosomal degradation of sphingolipids, and is also secreted into extra-cellular space as a trophic factor. The deficiency of semaphorin 4A (Sema4A), were reported to cause photoreceptor cell degeneration due to the impaired secretion of PSAP from the retinal pigment epithelial cells (RPE). In the present study, we characterized the retinal phenotypes of Psap knock-out (Psap-KO) mice and PSAP transgenic (PSAP-Tg) mice which have strong, stable, and ubiquitous expression of PSAP. In the retinas of Psap-KO mice, no apparent photoreceptor cell degeneration were observed. In contrast, in the retinas of PSAP-Tg mice, almost all the photoreceptor cells were disappeared by 6 weeks of age. These findings indicate that PSAP and SAPs play a critical role in retina, and intra-cellular accumulation of PSAP and SAPs cause retinal photoreceptor cell degeneration.

研究分野：脂質生化学

キーワード：プロサポシン サポシン 網膜色素変性症 視細胞 網膜色素上皮細胞 オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ糖脂質は、哺乳動物の生体膜を構成する脂質成分のひとつである。スフィンゴ糖脂質がライソゾームにおいて分解されるには、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。一方で 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だけではなく、パラクラインあるいはオートクラインに独自の生理機能を有することが示唆されている。しかし、*in vivo* の機能に関してはいまだ不明な点が多い (参考文献)。

セマフォリンは、当初神経ガイダンス因子とされてきた分子群であるが、その活性は神経のみならず、免疫調節、血管・脈管形成、がんの転移・浸潤、骨代謝調節などの多彩な作用を有していることが明らかになってきている。豊福らは、網膜色素変性症の原因遺伝子の 1 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 (RPE) に発現する Sema4A は PSAP と相互作用し、細胞外への PSAP の分泌に必須であることを報告している (参考文献)。その後、網膜色素変性症患者に見いだされた Sema4A 遺伝子変異を導入した細胞においても細胞外への PSAP の分泌が障害されていることが報告された (参考文献)。これらの事実から、Sema4 欠損による視細胞脱落の一つの原因は、RPE からの PSAP 分泌の減少による視細胞保護作用の欠失であろうと考えられている。

一方、PSAP の SAPs への分解にかかわるカ

テプシン D の欠損マウスでも Sema4A-KO と極めてよく似た網膜の病理変化を示すことが報告されている (参考文献)。

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、いずれの報告例も出生直後あるいは新生児・乳児期早期から全般性の痙攣発作を起こすなどの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おり、網膜視細胞の変性所見の有無に関する記述はない。1996 年に、藤田らによって作製された PSAP ノックアウトマウス (Psap-KO) は全サポシンの欠損により全身組織に多彩な GSL が蓄積し、重篤な神経症状を呈して生後 30 日前後で死亡することが明らかにされているが、Psap-KO マウスの網膜病変に関する詳細な報告はなされていない (参考文献)。共同研究者である松田らは全身組織で安定的に PSAP を過剰発現する PSAP トランスジェニックマウス (PSAP-Tg) の作製に成功している (投稿準備中)。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、PSAP-KO および PSAP-Tg の網膜病変を病理組織学的、生化学的に解析し、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を目的とする。得られた成果は網膜色素変性症の病態解明と新たな治療法の創出につながる可能性がある。

## 3. 研究の方法

(1) PSAP-KO および PSAP-Tg の網膜の病理組織学的解析

PSAP-KO および PSAP-Tg の網膜を出生直後から日齢を追って (日齢 5 から 5 日間隔で日齢 40 まで) 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。

(2) 眼球における PSAP、SAPs の発現変化お

## よび相互作用タンパク質の発現解析

PSAP-KO および PSAP-Tg の眼球を出生後から日齢を追って（日齢 5 から 5 日間隔で日齢 40 まで）採取し、PSAP、SAPs およびの相互作用タンパク質（Sortilin、Lamp-1、Cathepsin D）の発現を Western blot 法および免疫組織化学染色により解析した。

### (3) 眼球におけるオートファジーフラックス解析

PSAP-KO および PSAP-Tg の眼球を出生後から日齢を追って（日齢 5 から 5 日間隔で日齢 40 まで）採取し、LC3-I、LC3-II、p62 の Western blot 解析を行った。また、抗 LC3 抗体を用いて網膜組織の免疫組織化学染色を行った。

## 4. 研究成果

PSAP-KO および PSAP-Tg 網膜の病理組織学的解析の結果、PSAP-KO 網膜は、病末期 4 週齢においても視細胞の変性脱落は明らかではなく、電顕観察で網膜神経節細胞（RGC）や RPE に膜様の封入体が認められるのみであった。一方、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 Sema4A 欠損マウス網膜と同様にほぼ完全に脱落した。電顕観察では視細胞外節が高度に破綻し、RPE や浸潤マクロファージ様細胞内に視細胞外節を含むファゴゾームが多数認められた。

PSAP 強制発現が引き起こす視細胞脱落メカニズムを解明するために、眼球における PSAP、SAPs の発現変化および相互作用タンパク質（Sortilin、Lamp-1、Cathepsin D）の発現解析を行った。その結果、PSAP-Tg においては、PSAP、SAPs 共に発現が上昇していたが、PSAP の発現上昇がより顕著であった。抗 Sap-B 抗体および抗 PSAP 特異抗体を用いた野生型マウス網膜の免疫組織化学染色では、PSAP は RGC に優位に発現し、RPE に

は発現が乏しく、SAPs は RPE に優位に発現していた。

PSAP 相互作用タンパク質の発現解析では、PSAP-Tg において Sortilin の発現量が減少していた。Sortilin の発現低下の分子メカニズムの解明は今後の課題である。

RPE は、視細胞外節をファゴサイトーシスにより取り込み（参考文献 ）、オートファジーによる消化を行うことによって外節に含まれるレチノイドを再利用することが知られており、その破綻は視細胞死を惹起すると推定されている（参考文献 ）。そこで、PSAP-Tg 眼球のオートファジーフラックス解析を行った。その結果、病初期である 2 週齢の PSAP-Tg 網膜において、LC3- / 比の上昇と p62 の発現低下が認められ、オートファジーの活性化が示唆された。LC3 の発現を免疫組織化学染色では、野生型マウスの網膜では RPE にのみ発現を認めたのに対し、PSAP-Tg 網膜では視細胞の細胞体からなる外顆粒層において LC3 の染色強度の上昇が顕著であった。

本研究の成果から PSAP-Tg は網膜色素変性症の病態を解明する上で有用なモデル動物であることが明らかになった。さらに、PSAP-KO で視細胞死を認めなかったことから、Sema4 欠損による視細胞脱落の一つの原因は、RPE から分泌される PSAP の減少による視細胞保護作用の欠失ではなく、PSAP の細胞内への蓄積である可能性が示された。PSAP の発現量の上昇が網膜視細胞を引き起こす分子メカニズムとして、レチノイド輸送の異常やオートファジー異常の可能性が示唆されたが、より詳細な *in vitro* の再現実験が必要である。

PSAP は網膜色素変性症の病態に深く関わっており、今後も PSAP-Tg を用いた網膜色素変性症の病態解明に取り組んでいく。

### < 引用文献 >

Konrad Sandhoff, Proc. Jpn. Acad. Ser. B

Phys. Biol. Sci. 88, (2012), 554-582.

Toshihiko Toyofuku, Satoshi Nojima, Takako Ishikawa, Hyota Takamatsu, Tohru Tsujimura, Akiyoshi Uemura, Junko Matsuda, Takaharu Seki, Atsushi Kumanogoh, Genes Dev. 26, (2012), 816-829.

Satoshi Nojima, Toshihiko Toyofuku, Hiroyuki Kamao, Chie Ishigami, Jun Kaneko, Tatsusada Okuno, Hyota Takamatsu, Daisuke Ito, Sujin Kang, Tetsuya Kimura, Yuji Yoshida, Keiko Morimoto, Yohei Maeda, Atsushi Ogata, Masahito Ikawa, Eiichi Morii, Katsuyuki Aozasa, Junichi Takagi, Masayo Takahashi, Atsushi Kumanogoh, Nat. Commun. 4, (2013), 1406-1415.

Masato Koike, Masahiro Shibata, Yoshiyuki Ohsawa, Hiroshi Nakanishi, Tomoyuki Koga, Satoshi Kametaka, Satoshi Waguri, Takashi Momoi, Eiki Kominami, Christoph Peters, Kurt von Figura, Paul Saftig, Yasuo Uchiyama, Mol. Cell Neurosci. 22, (2003), 146-161.

Nobuya Fujita, Kinuko Suzuki, Marie T. Vanier, Brian Popko, Nobuyo Maeda, Andreas Klein, Margarete Henseler, Konrad Sandhoff, Hiroyuki Nakayasu, Kunihiko Suzuki, Hum. Mol. Genet. 5, (1996), 711-725.

Michael L Woodruff, Zhongyan Wang, Hae Yun Chung, T Michael Redmond, Gordon L Fain, Janis Lem, Nat. Genet. 35, (2003), 158-164.

Ji-Young Kim, Hui Zhao, Jennifer Martinez, Teresa Ann Doggett, Alexander V. Kolesnikov, Peter H. Tang, Zsolt Ablonczy, Chi-Chao Chan, Zhenqing Zhou, Douglas R. Green, Thomas A. Ferguson, Cell, 154, (2013), 365-376.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1) Ono Koji, Muto Masanaga, Yoneshige Azusa, Yoshimura Shinichi, Matsuda Junko, Role of prosaposin in retinal degeneration, 25th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, 2015/08/26, Cairns, Australia (Cairns Convention Center).

2) 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, 2015/05/29, 一橋大学一橋講堂 (東京千代田区)

3) 小野公嗣, 武藤真長, 米重あづさ, 松田純子, 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, 2014/10/18, 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都府左京区)

4) 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, 2014/10/18, 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都府左京区)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/study/info.php?id=211>

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小野 公嗣 (ONO, KOJI )

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 00548597