

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08288

研究課題名(和文) 神経型リソソーム病とパーキンソン病に共通する新たな神経病態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Neuropathological mechanism common to lysosomal sphingolipid storage disease and Parkinson's disease

研究代表者

松田 純子 (Matsuda, Junko)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：60363149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プロサポシン(PSAP)は、リソソームにおいてスフィンゴ脂質を分解する際に、加水分解酵素と共に必要な疎水性の糖タンパク質 - サポシン(SAPs)-A、B、C、D - の前駆体タンパク質である。PSAPのSAP-D領域のヘテロ接合性の遺伝子変異が常染色体顕性遺伝性の家族性パーキンソン病家系に報告されている。我々は、Sap-D変異マウス黒質の比較プロテオミクス解析を行い、Sap-D変異マウス黒質において、PSAPがオリゴマー化して著増し、ドパミンニューロン内にPSAP特異抗体に免疫陽性の封入体として認められることを見出した。オリゴマー化したPSAPの蓄積が神経細胞毒性を持つ可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PSAPの蓄積は、神経型リソソーム病である神経セロイドリポフスチン症や、前頭側頭葉変性症でも指摘されており、神経細胞内にオリゴマー化して異常蓄積したPSAPが、神経細胞毒性を持ち、神経変性疾患を惹起する可能性がある。本研究の成果は、Rare diseaseである神経型リソソーム病と、Common diseaseであるパーキンソン病やアルツハイマー病に共通する新たな神経病態仮説 - プロサポシノパチー (prosaposinopathy) - の提唱につながるものである。

研究成果の概要(英文)：Prosaposin (PSAP) is a precursor protein of four hydrophobic glycoproteins, called saposins (SAPs)-A, B, C, D, which are essential along with hydrolases for the degradation of sphingolipids in lysosomes. Heterozygous gene mutations in the SAP-D region of PSAP gene have been reported in patients with autosomal dominantly inherited familial Parkinson's disease. We performed a comparative proteomic analysis of the substantia nigra of Sap-D mutant mice, and found that PSAP was oligomerized and accumulated significantly in the substantia nigra of Sap-D mutant mice. Immunohistochemically, the PSAP specific antibody immuno-positive inclusion bodies were observed in the dopaminergic neurons of substantia nigra. Oligomerized and accumulated PSAP may have neurotoxicity for the dopaminergic neurons in the substantia nigra.

研究分野：小児科学、先天代謝異常症、脂質生化学

キーワード：リソソーム蓄積病 スフィンゴリポドーシス スフィンゴ脂質 プロサポシン サポシン パーキンソン病

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロサポシン (PSAP) は、リソソームにおけるスフィンゴ脂質の分解において、加水分解酵素と共に必要な、疎水性糖タンパク質である、サポシン (SAP-A、B、C、D) の前駆体タンパク質である¹²⁾。PSAP 遺伝子の変異は、小児期発症の常染色体劣性遺伝性の神経型リソソーム蓄積病である、スフィンゴリピドーシスを引き起こす。ヒトでは、全てのサポシンが欠損する PSAP 欠損症と、SAP-A、SAP-B、SAP-C それぞれの特異的な欠損症が報告されている。SAP-A、SAP-B、SAP-C 欠損症は、それぞれ、クラッペ病、異染性白質ジストロフィー、ゴーシェ病に類似した表現型を呈する。これまでに、唯一、SAP-D 欠損症の報告がなかったが、最近、我々は、世界に先駆けて、常染色体顕性遺伝性パーキンソン病の 3 家系において PSAP 遺伝子の SAP-D 領域にヘテロ接合性に遺伝子変異を同定し、PSAP 遺伝子がパーキンソン病の新たな病因遺伝子であることを報告した³⁾。

パーキンソン病は、黒質ドパミンニューロンの変性・脱落を主病態とする神経変性疾患で、60 歳以上の約 100 人に 1 人が罹患する。ドパミン補充療法により一時的に症状を改善することができるが、根本的な治療法は未だ開発されていない。パーキンソン病の大部分は、家族歴のない孤発性発症であるが、5-10%には明らかな家族歴を有する遺伝性パーキンソン病が存在する。近年の遺伝学的検査技術の進歩により、遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子が次々と同定され、リソソームにおけるスフィンゴ脂質の分解異常症の 1 つであるゴーシェ病の責任遺伝子であるグルコシセラミド-β-グルコシダーゼ (GBA) のヘテロ接合性変異がパーキンソン病発症の最大の遺伝的リスクであることが明らかになった⁴⁾。しかし、その病態メカニズムは十分には解明されていない。

2. 研究の目的

我々は、これまでの研究で、マウス *Psap* 遺伝子の *Sap-D* 領域にジスルフィド結合を切断するミスセンス変異 (Cys509Ser) を導入し、世界に先駆けて *Sap-D* 変異マウスの作製に成功し、*Sap-D* 変異マウスでは、脳組織に水酸化脂肪酸を含有するセラミドが蓄積し、小脳プルキンエ細胞の変性脱落を特徴とする多彩な神経病理所見を呈することを報告してきた⁵⁾。パーキンソン病で主に障害されるのは中脳黒質ドパミンニューロンであることから、本研究では、*Sap-D* 変異マウス脳の黒質の比較プロテオミクス解析と神経病理学的解析を行い、*Psap* 遺伝子の *Sap-D* 領域の変異が、黒質ドパミンニューロンの細胞死を引き起こす機序を探索した。

3. 研究の方法

1) 中脳黒質の比較プロテオミクス解析

Sap-D 変異マウスおよび野生型マウスの中脳黒質から抽出したタンパク質を、Nano LC-MS/MS を用いてショットガン比較プロテオミクス解析し、有意な発現変動を示すタンパク質を同定した。同定されたタンパク質を *in silico* 解析に供し、病態関連パスウェイを抽出した。

2) 中脳黒質の神経病理学的解析

Sap-D 変異マウス (ホモ接合体 (*Sap-D*^{mt/mt}) およびヘテロ接合体 (*Sap-D*^{wt/mt})) と同胞の野生型マウスを 5、10、15、20 ヶ月齢で灌流固定し、一般染色、免疫組織染色 (チロシン水酸化酵素 (TH)、グリア細胞線維性酸性タンパク質 (GFAP)、Iba1、PSAP)、透過型電子顕微鏡観察で黒質ドパミンニューロンを比較解析した。

4. 研究成果

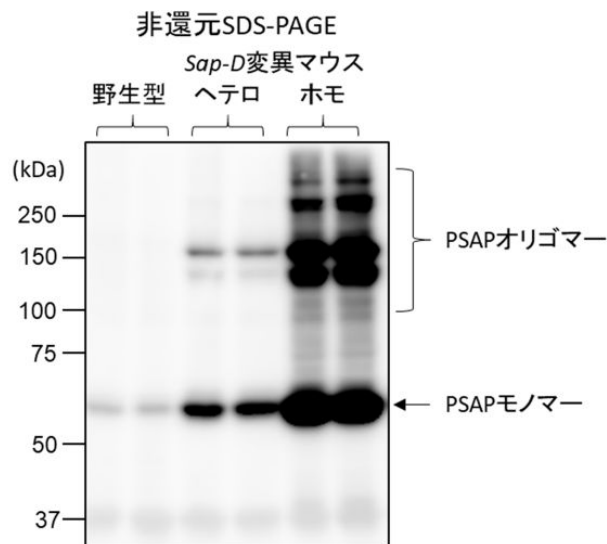
中脳黒質の比較プロテオミクス解析の結果、134 個のタンパク質が有意な変動を示し、*Sap-D*

変異マウスにおいて増加していたのは 21 個で、PSAP、HEXB、PPT1、CTSD、CTSB、LAMP1 などのリソソーム関連因子が含まれていた。減少していたのは 13 個で、Ca²⁺-ATPase である ATP2B と ATP2B3、皮質形成異常の病因の 1 つである PI4KA が含まれていた (表 1)。抗 PSAP 抗体を用いたイムノブロット解析の結果、*Sap-D* 変異マウス脳では PSAP が著増し、一部はオリゴマー化していた (図 1)。

表 1

Uniprot ID	Protein name	Peptides used for quantitation	Confidence score	Anova (p)	Fold change <i>Sap-D</i> ^{hi/mt} /WT	Description
Q8BFQ1	PSAP	1	49.69	0.001	7.0966	Prosaposin
Q3TYK4	PRKAR1A	1	25.39	0.0462	6.7583	Prkar1a
Q9QZM0	UBQLN2	1	27.76	0.0312	5.9368	Ubiquilin-2
Q3TXR9	HEXB	1	25.96	0.0013	4.3202	Beta-hexosaminidase
P03995	GFAP	4	229.41	0.0203	3.9046	Glial fibrillary acidic protein
O88531	PPT1	1	45.03	0.0006	3.2117	Palmitoyl-protein thioesterase 1
P18242	CTSD	1	37.09	0.0021	3.0879	Cathepsin D
P10605	CTSB	1	90.15	0.0011	2.0935	Cathepsin B
P11438	LAMP1	1	37.43	0.0019	2.0251	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1
P26041	MSN	1	131.18	0.0021	1.8199	Moesin
Q62465	VAT1	1	33.31	0.0052	1.6377	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog
G3X8R0	REEP5	2	56.69	0.0007	1.5952	Receptor expression-enhancing protein 5
P62140	PP1CB	1	69.93	0.0293	1.5621	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit
P63241	ELF5A	1	19.65	0.0049	1.4856	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1
Q8BKP1	TPD52L2	1	29.83	0.0041	1.4777	Tumor protein D52-like 2
Q9WV55	VAPA	2	61.28	0.0427	1.4316	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A
Q922Q6	PNUTL1	1	20.1	0.0386	1.4132	Septin-5
Q05890	CLU	1	17.01	0.0291	1.3621	Clusterin
Q8BV14	QDPR	2	102.04	0.0174	1.3419	Dihydropteridine reductase
P20029	HSPA5	16	968.2	0.0475	1.3336	Endoplasmic reticulum chaperone BiP
Q55UC3	CANX	5	299.77	0.015	1.187	Calnexin
Q6PCX2	SLC6A1	1	21.45	0.041	0.8654	Transporter
Q61166	MAPRE1	1	33.08	0.0468	0.8142	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1
Q8JZQ9	EIF3B	4	251.86	0.0325	0.8061	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B
P14231	ATP1B2	2	91.63	0.0452	0.7719	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2
Q99KX1	MLF2	4	154.42	0.0362	0.7368	Myeloid leukemia factor 2
A2RRR3	CLASP2	2	113.88	0.0272	0.6957	Clasp2 protein
Q8VDN2	ATP1A1	12	1197.03	0.0194	0.6704	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1
F8WHB1	ATP2B2	3	342.11	0.0186	0.6697	Calcium-transporting ATPase
P46737	BRCC3	1	28.78	0.0262	0.6052	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36
Q0VF55	ATP2B3	3	261.47	0.0034	0.5921	Calcium-transporting ATPase
Q55V64	MYH10	6	368.91	0.0309	0.5186	Myosin-10
Q68FF6	GIT1	1	28.16	0.0177	0.0527	ARF GTPase-activating protein GIT1
AOA156GWJ7	PI4KA	1	41.35	0.0323	0.035	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha

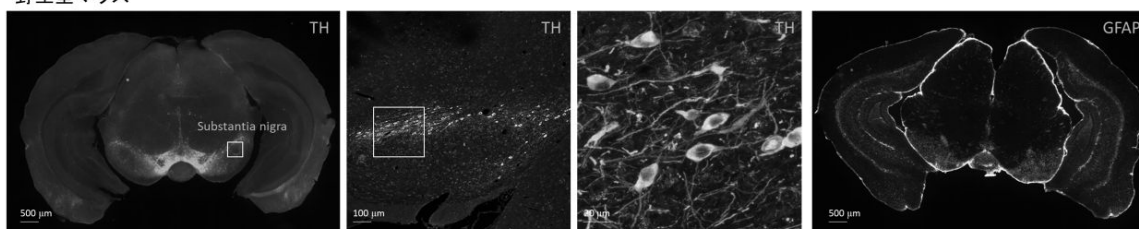
図 1



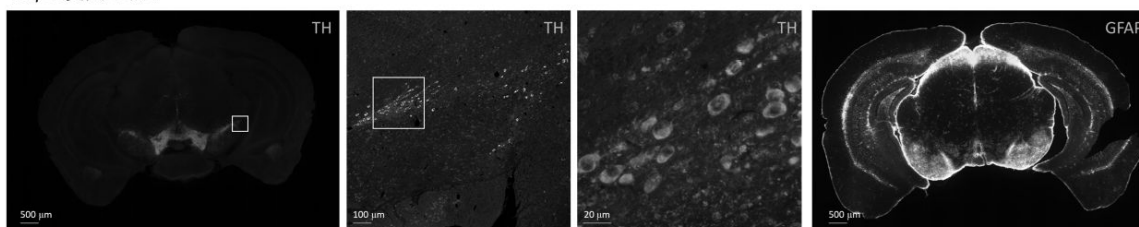
Sap-D 変異マウス脳の神経病理学的解析の結果、*Sap-D* 変異マウスでは黒質ドパミンニューロンの変性脱落とグリオシスを認めた (図 2)。PSAP 特異抗体を用いた免疫組織染色の結果、*Sap-D* 変異マウス脳では PSAP の発現が上昇し、中でも、大脳皮質 V 層の大型神経細胞、海馬 CA3 領域の錐体神経細胞、黒質ドパミンニューロン内には、主として小胞体内に PSAP 免疫陽性の封入体が認められた。

図 2

野生型マウス



Sap-D変異マウス



成人期発症の多くの神経変性疾患では神経細胞内に異常タンパク質の蓄積を認め、“Proteinopathy”と呼ばれて、その神経病態において、本質的な役割を果たしていると考えられている。パーキンソン病では α -シヌクレインが、アルツハイマー病ではアミロイド β 蛋白質とタウが異常蓄積することが知られており、それぞれシヌクレイノパチー (α -Synucleinopathy)、タウオパチー (Tauopathy) と総称されている。

PSAPのリソソームへの輸送にはSAP-D領域が必要であるとされており、Sap-D変異マウスではPSAPの輸送障害により、PSAPが細胞内に異常蓄積すると推定される。PSAPの蓄積は神経型リソソーム病である神経セロイドリポフスチン症や前頭側頭葉変性症でも指摘されており、細胞内にオリゴマー化して異常蓄積したPSAPが神経細胞毒性を持ち、神経型リソソーム病を含む神経変性疾患を惹起する可能性がある。今後は、モデル細胞、神経細胞、グリア細胞の初代培養を用いた実験系を用いて、“プロサポシノパチー (prosaposinopathy)”という新たな病態仮説の検証に取り組む。

< 引用文献 >

- 1) 松田純子：スフィンゴ脂質活性化タンパク質-サポシン-の生理機能と疾患。 *生化学* 89: 808-819 (2017)。
- 2) Sandhoff K. : My journey into the world of sphingolipids and sphingolipidoses。 *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 88: 554-582 (2012)
- 3) Oji Y, Hatano T, Ueno SI, Funayama M, Ishikawa KI, Okuzumi A, Noda S, Sato S, Satake W, Toda T, Li Y, Hino-Takai T, Kakuta S, Tsunemi T, Yoshino H, Nishioka K, Hattori T, Mizutani Y, Mutoh T, Yokochi F, Ichinose Y, Koh K, Shindo K, Takiyama Y, Hamaguchi T, Yamada M, Farrer MJ, Uchiyama Y, Akamatsu W, Wu YR, Matsuda J, Hattori N. : Variants in saposin D domain of prosaposin gene linked to Parkinson's disease。 *Brain* 143:1190-1205 (2020)
- 4) Sidransky E, et al. : Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease。 *N. Engl. J. Med.* 361:1651-1661 (2009)

5) Matsuda J, Kido M, Tadano-Aritomi K, Ishizuka I, Tominaga K, Toida K, Takeda E, Suzuki K, Kuroda Y. : Mutation in saposin D domain of sphingolipid activator protein gene causes urinary system defects and cerebellar Purkinje cell degeneration with accumulation of hydroxy fatty acid-containing ceramide in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* 13: 2709-2723 (2004).

図表の説明:

表 1 : *Sap-D* 変異マウス黒質の比較プロテオミクス解析で有意な変動を示した遺伝子一覧 (300 日齢、n=5、 $p < 0.05$)

図 1 : *Sap-D* 変異マウス脳 of PSAP 特異抗体によるイムノプロット結果 (300 日齢、同胞)

図 2 : *Sap-D* 変異マウス黒質の TH および GFAP 抗体による免疫組織染色結果 (300 日齢、同胞)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Inamura N, Go S, Watanabe T, Takase H, Takakura N, Nakayama A, Takebayashi H, Matsuda J, Enokido Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Reduction in MIR-219 expression underlies cellular pathogenesis of oligodendrocytes in a mouse model of Krabbe disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Pathology	6. 最初と最後の頁 e12951
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bpa.12951.	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 -
1. 著者名 Oji Y, Hatano T, Ueno SI, Matsuda J (31/32), Hattori N.	4. 巻 143
2. 論文標題 Variants in saposin D domain of prosaposin gene linked to Parkinson's disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 1190-1205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/brain/awaa064.	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 小林正久、松田純子、笹井英雄、石毛信之、大橋十也、井田博幸.	4. 巻 30
2. 論文標題 新生児マススクリーニングでC5-OH 持続高値例の遺伝子型についての検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本マススクリーニング学会誌	6. 最初と最後の頁 53-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
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 春石和子、三木淳司、荒木俊介、後藤克聡、赤池洋人、松田純子、尾内一信、桐生純一.	4. 巻 37
2. 論文標題 視覚障害を契機に副腎白質ジストロフィーと診断された1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 神経眼科	6. 最初と最後の頁 165-170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
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 Oji Y, Hatano T, Matsuda J (31/32), Hattori N.	4. 巻 143
2. 論文標題 Variants in saposin D domain of prosaposin gene linked to Parkinson's disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 1190-1205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awaa064.	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 Ono S, Matsuda J, Watanabe E, et al.	4. 巻 6
2. 論文標題 Novel neuroblastoma amplified sequence (NBAS) mutations in a Japanese boy with fever-triggered recurrent acute liver failure.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Genome Var	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-018-0035-5	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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 松田純子
2. 発表標題 小児代謝疾患における神経変性のメカニズム
3. 学会等名 第20回 高松国際パーキンソン病シンポジウム in TOKYO (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田純子、渡邊悦子、郷 慎司
2. 発表標題 サボシンD変異マウスの神経病態解析
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田純子、渡邊悦子、郷 慎司
2. 発表標題 サボシンD変異マウスの神経病態解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊悦子、郷 慎司、松田純子
2. 発表標題 サボシンD変異マウス脳ではプロサボシンがオリゴマー化する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田純子、渡邊悦子、郷 慎司
2. 発表標題 サボシンD変異マウスの神経病態解析
3. 学会等名 第61回日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2019年

〔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	渡邊 悦子 (Watanabe Etsuko) (70378610)	川崎医科大学・医学部・助教 (35303)	

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
---------	---------