

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17019

研究課題名（和文）パーキンソン病発症メカニズムにおけるリソソーム病の新たな病態関与の探索

研究課題名（英文）Research for a new pathogenesis of lysosomal disease in Parkinson's disease onset mechanism

研究代表者

王子 悠 (Oji, Yutaka)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60777845

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）：本研究では、スフィンゴ糖脂質の代謝に関わるサポシンをコードするプロサポシン遺伝子(PSAP)が家族性パーキンソン病(PD)の原因遺伝子であることを見出した(Oji, et al. Brain 2020)。PSAP変異を持つPD患者由来の皮膚線維芽細胞やiPS細胞由来ドパミン神経を解析を行い、プロサポシンの細胞内輸送異常、オートファジー・リソソームの異常、 α -シヌクレインの凝集傾向を見出した。また、健常者由来iPS細胞にPD関連PSAP変異導入iPS細胞由来ドパミン神経細胞はゴルジ装置の異常を呈しており、ゴルジ装置異常がPD発症機序に関わる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ゴーシェ病を始めとするリソソーム病の原因遺伝子がパーキンソン病の発症に関与することが注目されており、本研究で明らかになったプロサポシン遺伝子はパーキンソン病の発症メカニズムにおけるリソソーム病の関与を強く示唆するものである。患者由来iPS細胞や皮膚線維芽細胞、パーキンソン病関連プロサポシン遺伝子変異導入iPS細胞、プロサポシン変異マウスの解析によりパーキンソン病の病態につながる可能性のある変化が見出されており、プロサポシン遺伝子の更なる機能解析によりパーキンソン病の病態が明らかになる可能性が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that the prosaposin gene (PSAP), which encodes a saposin involved in glycosphingolipid metabolism, is the causative gene of familial Parkinson's disease (PD) (Oji, et al. Brain 2020). We analyzed skin fibroblasts and iPS cell-derived dopaminergic neurons of PD patients with PSAP mutations. Then we found abnormal intracellular transport of prosaposin, abnormalities of autophagy-lysosomal system, and an aggregated α -synuclein. Additionally, PD-related PSAP mutation-introduced iPS cell-derived dopaminergic neurons exhibited abnormalities in the Golgi apparatus, which suggested that there is a possibility that Golgi apparatus abnormalities are involved in the pathogenesis of PD.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 リソソーム病 プロサポシン α -シヌクレイン スフィンゴ糖脂質 ゴルジ装置

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(以下 PD)は、中高年を好発年齢とし、中脳黒質ドパミン神経細胞脱落により振戦、無動、筋強剛などの運動障害を発症する神経変性疾患である。超高齢社会を迎える本邦において PD 患者数は増加の一途をたどっており、多大な医療資源・介護負担により医療費の増大にも影響する。治療法は主にドパミン補充を中心とした対症療法に留まり、根本治療の開発は達成されていない。疾患の進行予防を目指した疾患修飾療法の開発のためには、PD の病態解明および治療開発が喫緊の課題であるが、PD の病態メカニズムの全容は未だ明らかになっていない。近年、PD の病態解明に至る鍵のひとつとしてリソソーム病の病態関与が重要とされている。代表的なリソソーム病であるゴーシェ病の原因遺伝子 *GBA* のヘテロ接合体変異が PD 発症の最大の遺伝的リスク (Sidransky, et al. *NEJM* 2009) であることや、ゴーシェ病以外のリソソーム病、特にスフィンゴ糖脂質代謝分解の異常を来すスフィンリピドーシスの原因遺伝子もまた PD 発症における遺伝的リスクとなることが報告されている (Shachar, et al *Mov Disord* 2011, Robak, et al. *Brain* 2017, Klein et al. *Brain* 2018)。このことから「リソソーム病の病態による細胞内脂質組成変化に PD 発症に関与する共通点があるのではないか」という仮説が考えられた。そして、先行研究にて同定されたスフィンゴ糖脂質代謝機能に関与する機能を持つプロサポシン (PSAP) をコードする *PSAP* の変異を持つ常染色体顕性 PD 患者の iPS 細胞由来ドパミン神経細胞や *Psap* 変異導入マウスを用いた研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、*PSAP* 変異 PD 患者から得られた iPS 細胞由来ドパミン神経細胞や *Psap* 変異導入マウス脳を解析し、神経細胞や脳内の細胞内脂質変化を解析することを目的とする。PSAP はスフィンゴ脂質代謝酵素の活性化因子であるサポシン (sphingolipid activator protein: saposin) の前駆体である。非常に稀な発症頻度ながらも *PSAP* のホモ接合体変異は常染色体劣性遺伝性のスフィンゴリピドーシスを起こし、出生直後あるいは新生児・乳児期からの重篤な神経症状や肝脾腫をみとめゴーシェ病 型に類似した臨床所見を示すことが知られている。*PSAP* 変異 PD 患者はいずれも *PSAP* ヘテロ接合体変異であり、その臨床症状は特異性 PD に酷似している。本計画は、先行研究で見出された「*PSAP* が家族性 PD の新規原因遺伝子である」ことに注目し、ドパミン神経細胞やマウス脳の脂質組成変化を明らかにしリソソーム病の病態がいかに PD の病態に関与するかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では *PSAP* 変異 PD 患者から得られた iPS 細胞由来のドパミン神経細胞、さらに *Psap* 変異導入マウスを用いて以下の研究項目を遂行した。

(1) *PSAP* 変異 PD 患者の iPS 細胞由来ドパミン神経細胞の表現型の解析

PSAP 変異 PD 患者に見出された変異は PSAP のリソソーム輸送に重要とされる saposin D ドメインであったため、PSAP 細胞内局在の変化が重要と考えられた。*PSAP* 変異 PD 患者由来 iPS 神経をドパミン神経に分化させ、二重蛍光免疫染色法および共焦点顕微鏡を用いて PSAP の細胞内局在を解析した。次にリソソーム機能評価のためにオートファジーフラックスアッセイやリソソーム酵素活性の測定により *PSAP* saposin D 変異 PD 患者由来 iPS 細胞ドパミン神経のリソソーム機能を解析した。リソソーム機能障害は PD の病理学的 hallmark である Lewy 小体の主要構成蛋白である α -シヌクレインの分解の停滞に関与するため、 α -シヌクレインの解析を行った。PSAP はリソソームにおけるスフィンゴ糖脂質分解を活性化するタンパク質であるため、質量分析法による脂質解析を行った。

(2) *Psap* saposin D ドメイン変異 (p.C509S) 導入マウスにおける中脳 tyrosine-hydroxylase (TH) 陽性神経細胞脱落の解析・脳の脂質解析

Psap saposin D ドメイン変異 (p.C509S) 導入マウス (ホモ接合体変異) は saposin D の loss of function を生じリソソーム病であるファーバー病のモデルとして報告されており、脳のセラミド蓄積や小脳変性が報告されている (Matsuda, et al. *Hum Mol genet* 2004)。本研究では、*Psap* 変異導入マウス (ホモ接合体変異・ヘテロ接合体変異) の脳組織染色を、TH 抗体を用いて行った。中脳 TH 陽性神経細胞カウントにより変性の有無を解析した。また、*Psap* saposin D ドメイン変異 (ホモ接合体変異・ヘテロ接合体変異) の脳脂質解析を行った。

4. 研究成果

(1) *PSAP* 変異 PD 患者の iPS 細胞由来ドパミン神経細胞の表現型

PD 関連 *PSAP* saposin D ドメイン変異は PSAP の輸送異常をもたらす常染色体顕性 PD の 3 家系に見出された *PSAP* 変異はいずれもサポシン D ドメインの変異 (p.Q453P, p.C451_L477del, p.C412Y) であった。PSAP の saposin D ドメインは PSAP のリソソーム輸送において重要な機能を持つドメインとされており、*PSAP* saposin D 変異により PSAP の細胞内局在が変化する可能性が考えられた。PSAP 抗体と小胞体マーカーである PDI 抗体を用いて蛍光二重免疫染色法を行い共焦点顕微鏡で解析を行ったところ、*PSAP* 変異 PD 患者由来 iPS 細胞ドパミン神経では、PSAP が細胞内に異常蓄積し、その一部が小胞体マーカーである PDI と共局在していることを見出した (Oji, et al. *Brain* 2020)。さらに *PSAP* 変異 PD 患者由来 iPS 細胞

ドパミン神経の細胞ライセートをエンドグリコシダーゼ H(Endo-H)で処理しウェスタンブロット法により PSAP 抗体を用いて PSAP の解析を行ったところ、PSAP 変異 PD 患者由来 iPS 細胞ドパミン神経細胞では Endo-H 感受性 PSAP が増加していることが明らかとなった(Oji, et al. Brain 2020)。つまり、PD 関連 PSAP saposin D ドメイン変異では、PSAP が小胞体に局在変化をし、さらに糖鎖修飾が不完全となることが示唆された。PSAP の細胞内異常蓄積については、ウェスタンブロット法でも確認しており、PSAP 変異 PD 患者由来 iPS 細胞ドパミン神経の細胞ライセートについて PSAP 抗体を用いて確認した(Oji, et al. Brain 2020)。

PD 関連 PSAP saposin D ドメイン変異はリソソーム障害を起こす

PSAP 変異 PD 患者由来 iPS 細胞ドパミン神経をリソソーム阻害薬である E64d(30 μ M)と pepstatin A(15 μ M)で 24 時間処理した後、細胞ライセートを作製しウェスタンブロット法によりオートファゴソームマーカーである LC3 抗体を用いてオートファジーフラックスアッセイを行った。PSAP 変異 PD 患者由来 iPS 細胞ドパミン神経では、健常者由来細胞と比べて定常状態で LC3-II のタンパク量が増加し、オートファジーフラックスが停滞していることが見出された(Oji, et al. Brain 2020)。さらに、PSAP 変異 PD 患者由来皮膚線維芽細胞を電子顕微鏡で解析したところ、オートリソソーム・オートファゴソーム様の構造物が健常者由来細胞と比較して顕著に増加・膨大していた(Oji, et al. Brain 2020)。これらの所見は PD 関連 PSAP 変異によりリソソーム障害が惹起されることが示唆される。一方で、リソソーム酵素であるグルコセレブロシダーゼや ガラクトシダーゼの酵素活性の測定では、PSAP 変異 PD 患者由来 iPS 細胞ドパミン神経においても明らかに低下するという実験結果は得られなかった。

PD 関連 PSAP 変異は α -シヌクレイン凝集をもたらし

PSAP saposin D ドメイン変異は 3 家系が報告されているが剖検例に関する知見は得られておらず、Lewy 小体の存在については確認されていない。しかしながら、PD の診断に用いられる MIBG 心筋シンチグラフィで取り込み低下の所見を示した症例が存在することからは、Lewy 小体が関与する病態である可能性が示唆された。PSAP 変異 PD 患者由来 iPS 細胞ドパミン神経を海面活性剤である Triton-X を用いて細胞分画を行い、超遠心法により Triton-X 不溶性画分と Triton-X 可溶性画分とに分けた。ウェスタンブロット法により α -シヌクレイン抗体を用いてそれぞれの画分における α -シヌクレインを解析した。健常者由来細胞では Triton-X 不溶性画分における α -シヌクレインがほとんど同定されなかったのに対し、PSAP 変異 PD 患者由来 iPS 細胞ドパミン神経では Triton-X 不溶性画分に α -シヌクレインが同定された(Oji, et al. Brain 2020)。PSAP 変異 PD 患者由来 iPS 細胞ドパミン神経の細胞ライセートを Real time quaking induced conversion (RT-QulC) 法により解析した。健常者由来細胞では α -シヌクレインの凝集カーブが検出されなかったが、PSAP 変異 PD 患者由来 iPS 細胞ドパミン神経では 3 種類の変異いずれにおいても、 α -シヌクレイン凝集カーブが検出された(Oji, et al. Brain 2020)。以上により、PD 関連 PSAP 変異は α -シヌクレイン凝集に関与することが示唆された。

PD 関連 PSAP 変異 iPS 細胞ドパミン神経における ganglioside の変化

健常者由来 iPS 細胞に PD 関連 PSAP 変異である p.C412Y 変異を CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて導入し、PSAP p.C412Y 変異細胞(ホモ接合体変異・ヘテロ接合体変異)を作製した。健常者由来細胞と PSAP p.C412Y 変異細胞とをそれぞれ質量分析法(LC-MS/MS)を用いて脂質解析を行った。PSAP p.C412Y 変異細胞ではホモ接合体変異・ヘテロ接合体変異いずれにおいても GM1 ガングリオシドが減少し、GD3 が増加していることが見出された。ガングリオシド GM1 は PD の病態に関与することが報告されており、 α -シヌクレイン凝集とも関連することが示唆されている。GM1 ガングリオシドの低下が PSAP 変異とどのように関連し、PD の病態に影響するかについて更なる研究が今後必要である。

(2) *Psap* saposin D ドメイン変異(p.C509S)導入マウスにおける中脳 TH 陽性神経細胞脱落の解析・脳の脂質解析

Psap saposin D ドメイン変異(p.C509S)導入マウスでは中脳 TH 陽性神経細胞が脱落する

Psap saposin D ドメイン変異(p.C509S)導入マウス(ホモ接合体変異・ヘテロ接合体変異)の脳組織染色により、中脳 TH 陽性神経細胞カウントを行い変性の有無を解析したところ、18 月齢の高齢マウスにおいてホモ接合体変異マウス、ヘテロ接合体変異マウスのいずれにおいても中脳 TH 陽性神経細胞の有意な減少が見出された(Oji, et al. Brain 2020)。ホモ接合体変異マウスは 35 週齢程度から運動障害を呈し、ヘテロ接合体変異マウスは 60~65 週齢で運動障害が起こることが確認されているが、TH 陽性細胞の減少が起こる時期、つまり変性が開始する時期が運動障害とどのように関連するのかが今後の更なる研究が必要である。ヘテロ接合体変異マウスにおける小脳変性の有無も今後の解析予定である。

Psap 変異導入マウス(ホモ接合体変異)ではセラミドの蓄積が起こる

Psap saposin D ドメイン変異(p.C509S)導入マウスのホモ接合体変異・ヘテロ接合体変異マウス、野生型のマウスの全脳について質量分析を用いて脂質解析を行った。ホモ接合体変異マウスでは、既報と同様にセラミドの蓄積が見られたのに対し、ヘテロ接合体変異では野生型と比較しても明らかな脂質変化が見出されなかった。ホモ接合体変異マウスにおけるセラミドの蓄積は saposin D の活性化対象となる酸性セラミダーゼの機能欠損である可能性が考えられる。実際に、ホモ接合体変異マウス脳のウェスタンブロット法では野生型マウスと比較して酸性セラミダー

ゼのタンパク量の顕著な減少がみられた。しかし、一方ではヘテロ接合体変異マウスの酸性セラミダーゼのタンパク量は野生型と比較し変化がなかった。 で確認した中脳 TH 陽性神経細胞の脱落、つまりドパミン神経細胞変性はホモ接合体変異マウス、ヘテロ接合体変異いずれにおいても確認されていることから、PSAP 変異によるスフィンゴ脂質の分解異常や脂質変化のみでは TH 陽性神経細胞の脱落、つまり PD の病態は説明できない可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yutaka Oji	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

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yutaka Oji
2. 発表標題 Variants in the saposin D domain of prosaposin gene are linked to Parkinson's disease
3. 学会等名 Movement Disorder Society MDS virtual congress（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王子悠
2. 発表標題 神経筋疾患の理解、治療に向けた研究の最前線 パーキンソン病はライソゾーム病か？
3. 学会等名 日本人類遺伝学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yutaka Oji
2. 発表標題 Variants in Saposin D Domain of Prosaposin Gene are Linked to Parkinson's Disease
3. 学会等名 145th Annual Meeting American Neurological Association（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王子悠, 波田野琢, 上野真一, 船山学, 石川景一, 奥住文美, 常深泰司, 李元哲, 松田純子, 服部信孝
2. 発表標題 Variants in saposin D domain of prosaposin gene linked to Parkinson's disease
3. 学会等名 第61回日本神経学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yutaka Oji, Taku Hatano, Shin-Ichi Ueno, Manabu Funayama, Kei-ichi Ishikawa, Ayami Okuzumi, Shigeto Sato, Yuanzhe Li, Taiji Tsunemi, Hiroyo Yoshino, Kenya Nishioka, Matthew J Farrer, Yasuo Uchiyama, Wado Akamatsu, Yih-Ru Wu, Junko Matsuda, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Variants in the saposin D domain of prosaposin gene are linked to Parkinson's disease
3. 学会等名 International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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