

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791699

研究課題名（和文） 網膜色素変性症における小胞体ストレス誘発細胞死の関与および分子機構の解明

研究課題名（英文） Involvement of endoplasmic reticulum stress in retinitis pigmentosa, and analysis of its molecular mechanism

研究代表者

鶴間 一寛 (TSURUMA KAZUHIRO)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50524980

研究成果の概要（和文）：網膜色素上皮細胞およびゼブラフィッシュにおいて変異 SEMA4A は光照射、酸化ストレスおよび小胞体ストレスに対する脆弱性に寄与した。これらの結果から小胞体ストレスは網膜色素変性症の悪化に関与し、治療ターゲットの一つとなり得ることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：SEMA4A mutants, known as a responsible gene of retinitis pigmentosa (RP), lead to susceptibility to white light irradiation, oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress in RPE cell line and zebrafish. These results suggest that ER stress is an exacerbating factor of RP and will be a novel therapeutic target for RP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 眼科学

キーワード：網膜色素変性症、SEMA4A、酸化ストレス、小胞体ストレス、光障害

## 1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症は遺伝子変異が原因で網膜の視細胞および色素上皮細胞が広範に変性する疾患である。網膜色素変性症に関連する遺伝子は多数存在しており、現在まだ確認されていない遺伝子を含めると100種類以上あると考えられている。これほど多くの遺伝子が関与しているが視細胞及び色素上皮細胞の変性のメカニズムについては最終的にアポトーシス様の細胞死を呈する以外あまり解明されていない。つまり、これらの遺伝子変異により細胞内で何が起きて細胞死に至っているかは不明である。

よく知られている網膜色素変性症の遺伝子変異の一つに rhodopsin がある。Rhodopsin の遺伝子変異は常染色体優性遺伝であり、機能的変化や機能不全以外で細胞内に何らかの影響があることが示唆されている。実際に rhodopsin の変異は細胞内で凝集体を形成することが知られている。一般的に細胞内の蛋白質の凝集体形成が病態に関連するものとしてアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ポリグルタミン病などの神経変性疾患が知られている。上記の神経変性疾患は蛋白質の品質管理の場である小胞体に異常蛋白質が蓄積することによって生

じる小胞体ストレスの関与が示唆されていることから、変異 rhodopsin も小胞体ストレスを惹起して細胞死が引き起こされ病態に関与している可能性がある。近年、変異 rhodopsin を培養細胞に発現させると小胞体ストレスの指標である BiP (GRP78) の発現の上昇が認められ、変異 rhodopsin を発現させたトランスジェニックマウスを用いても同様の結果が報告されている。また、常染色体優性遺伝をする carbonic anhydrase IV の遺伝子変異産物は、小胞体ストレスを惹起して細胞死を引き起こすことが知られている。小胞体ストレスが生じた際に生体の恒常性を維持するために小胞体ストレス応答機構が存在する。すなわち、小胞体分子シャペロンを誘導して正常な折りたたみに戻す、小胞体から細胞質への輸送を促進してユビキチン-プロテアソーム系での分解を促進する、修復、分解が困難な場合には細胞死 (アポトーシス) を促す、といった主に三つの機構からなる。Carbonic anhydrase IV 遺伝子変異はそれ自身が小胞体ストレスを惹起する折りたたみが異常な蛋白質であるが、小胞体ストレス応答機構を考慮すると、遺伝子変異により分子シャペロンの活性や誘導の阻害、小胞体から細胞質への輸送を阻害することによっても小胞体ストレスが悪化するため、最終的に細胞死を引き起こしている可能性も十分にある。

また、網膜色素変性症は病態の悪化が進行性であることや、多くの場合病態の進行に時間がかかることが知られている。特に中高齢において発症 (自覚症状として) し、その病態の進行が急性でないことなどが、小胞体ストレスが病態の原因の一つと考えられているアルツハイマー病やパーキンソン病などとその進行状況が類似している。しかしながら、rhodopsin や carbonic anhydrase IV の遺伝子変異以外によって起きる網膜色素変性症と小胞体ストレスの関与に関する報告はほとんどない。

## 2. 研究の目的

本研究では、網膜色素変性症における小胞体ストレスの関与、特に未だに研究が進んでいない遺伝子変異により引き起こされる網膜色素変性症に着目し、小胞体ストレスによる病態進行の関与をまずは細胞レベルで検証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)すでに報告されている論文等で網膜色素変性症の変異遺伝子の情報を入手し、小胞体に存在する可能性がある蛋白質を選定した (SEMA4A)。ヒト SEMA4A 遺伝子のクローニングを行い、報告されている変異を導入 (D345H, F350C, R713Q) し、動物細胞用発現ベクター

を作製した。

(2)ヒト網膜色素上皮細胞由来 ARPE-19 細胞に野生型および変異型を一過性に過剰発現させ、細胞死および細胞内局在変化を観察した。また、小胞体ストレスマーカーである GRP78 の変化を測定した。網膜色素上皮細胞の機能の一つであるファゴサイトーシスを測定した。

(3)変異遺伝子を一過性に発現させたゼブラフィッシュを用いて小胞体ストレスに対する脆弱性を検討した。

## 4. 研究成果

(1)本研究では、まず小胞体ストレスの関与の可能性のある分子の選定を行った。すでに報告されている網膜色素変性症原因遺伝子の中で、小胞体に局在する蛋白質、または小胞体を經由する蛋白質すなわち膜蛋白質や分泌蛋白質に着目した。いくつかの候補遺伝子のうち、膜蛋白質である SEMA4A に着目した。SEMA4A は semaphorin 分子群に属し、血管新生や免疫系で重要な働きを担っている。また、網膜では網膜色素上皮細胞に発現しており、SEMA4A のノックアウトマウスでは網膜の形成に異常が認められる。ヒトにおいて SEMA4A の変異は3種類報告されている (D345H, F350C および R713Q)。これらの変異のうち、D345H と F350C の変異はヘテロ接合型すなわち D345H および F350C 変異体が同時に発現した場合にのみ網膜色素変性症を発症する。一方、R713Q 変異は常染色体優性遺伝で網膜色素変性症を発症する。

(2)これら変異体および野生型 SEMA4A を ARPE-19 細胞に過剰発現させたところ、野生型では主に細胞膜に局在が認められた。一方、D345H 変異体は一部細胞膜に発現が認められるものの小胞体への局在が観察された。また、F350C 変異体は細胞膜ではほとんど認められず、小胞体に多く観察された。しかし、R713Q 変異体は野生型と同様の細胞内局在を示した (図 1)。

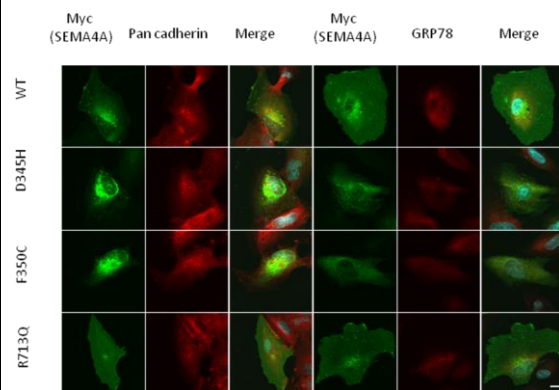


図 1 変異による SEMA4A の細胞内局在の変化

また、野生型および各変異体を発現させた細胞の生存率に差は認められなかった。変異による細胞内局在変化が認められ、小胞体に蓄積している可能性があることから、小胞体ストレスが惹起している可能性が考えられ、小胞体ストレスマーカーである GRP78 の変化をウェスタンブロットにて確認した。野生型および各種変異体を発現させた細胞において GRP78 の発現の変化は認められなかった。しかし、網膜色素変性症の増悪因子である光を細胞に照射して GRP78 の発現変化を観察したところ、F350C 変異体を発現させた細胞において GRP78 の増加が認められた。一方、光照射による細胞死は認められなかった (図 2)。

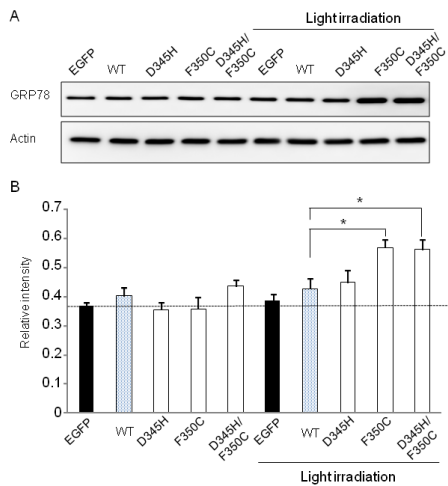


図 2 変異型 SEMA4A (F350C) は光照射により小胞体ストレスマーカー GRP78 を増加させる

次に、網膜色素上皮細胞の重要な機能の一つであるファゴサイトーシスに対する変異 SEMA4A の影響を検討した。RAPE-19 細胞は光照射によりファゴサイトーシスが低下する。F350C 変異体を発現させた細胞では光照射によるファゴサイトーシスの低下をさらに低下させた。一方、野生型や D345H 変異体、R713Q 変異体においてはそのような効果は認められなかった。また、光未照射群では変異体発現によるファゴサイトーシスの低下は認められなかった。

さらに、各種ストレスが引き起こす細胞死に対する変異 SEMA4A の機能を検討した。網膜色素変性症の増悪因子である酸化ストレスとして過酸化水素、また酸化ストレスにより惹起することが知られている小胞体ストレスとしてツニカマイシンを用いて検討した。D345H 変異体を発現させた細胞では野生型と比較して有意な細胞死の増加が認められた。一方、F350C や R713Q 変異体では細胞死の増加は認められなかった (図 3)。

(3) 変異型 SEMA4A が網膜色素上皮細胞におい

て各種ストレスに対する易感受性の亢進を示した。そこで *in vivo* においても同様であるか、ゼブラフィッシュの胚を用いて検討した。ゼブラフィッシュの胚にヒト野生型 SEMA4A または変異型 (D345H および F350C) mRNA を注入して強制発現させた。同時にツニカマイシンを添加して胚における小胞体ストレスを小胞体ストレスマーカー分子である DNA-damage-inducible transcript 3 (ddit3、別名 CHOP) の mRNA 発現量を指標として定量を行ったところ。変異体を過剰発現させた胚では ddit3 の発現量が野生型と比較して有意に増加していた (図 4)。

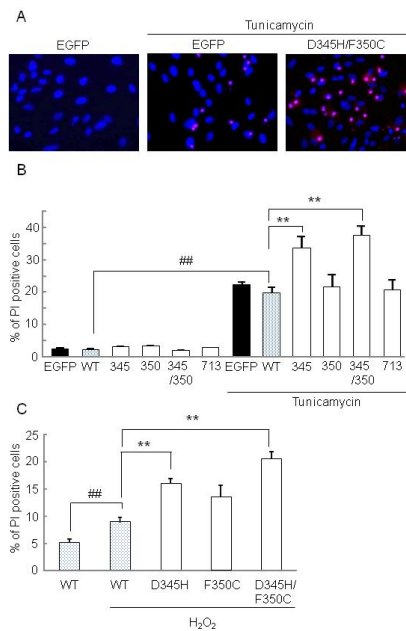


図 3 変異型 SEMA4A (D345H) は酸化ストレスおよび小胞体ストレス誘発細胞死に対して脆弱性を示す

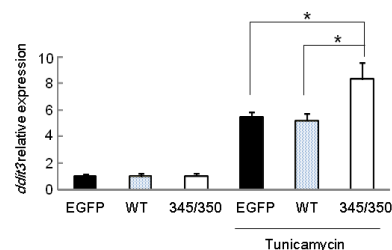


図 4 ゼブラフィッシュ胚において変異型 SEMA4A は小胞体ストレスに対する感受性を増強した

これらの結果より、D345H 変異体および F350C 変異体はストレスに対する感受性を高めることが明らかとなった。また、F350C 変異体

は網膜色素上皮細胞の機能低下やストレスの増幅と言った発症のイニシエーションに関与し、D345H 変異体はそれらストレスにより細胞死を引き起こす可能性が示唆された。実際に、D345H または F350C の変異のみでは発症せずに、両変異を対立遺伝子として有する場合にのみ発症するため、これら変異の異なった機序が同時に発現することで網膜色素変性症を惹起している可能性が示唆された。また、その作用の発現に一部小胞体ストレスが関与している可能性が示唆された。

## 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0件)

〔学会発表〕(計5件)

鶴間一寛、原英彰

網膜障害における小胞体ストレスの関与  
第6回小胞体ストレス研究会(岡山、2011、10、28)

Tsuruma K., Shimazawa M. and Hara H.

The association between retinitis pigmentosa related gene SEMA4A and endoplasmic reticulum stress.

Neuroscience 2010 (San Diego, California, 2010, 11, 13-17)

鶴間一寛、原英彰

網膜色素変性症原因遺伝子 SEMA4A の機能変化と光ストレスと小胞体ストレスの関連  
第5回小胞体ストレス研究会(東京、2010、10、29)

鶴間一寛、嶋澤雅光、原英彰

網膜色素変性症原因遺伝子 SEMA4A の機能変化と小胞体ストレスの関与  
第30回日本眼薬理学会(東京、2010、10、2-3)

鶴間一寛、嶋澤雅光、原英彰

網膜色素変性症における変異型 SEMA4A と小胞体ストレスの関与  
第117回日本薬理学会近畿部会(徳島、2010、7、8)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

鶴間 一寛 (TSURUMA KAZUHIRO)