

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20954

研究課題名（和文）網膜色素変性症に関する新規リン脂質代謝経路の同定と病態解明

研究課題名（英文）Identification and Pathophysiology of a Novel Phospholipid Metabolic Pathway Involved in Retinitis Pigmentosa

研究代表者

小野 喬 (Ono, Takashi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80966010

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：網膜色素変性症は、網膜色素上皮細胞と視細胞の進行性の変性により視野が狭窄する疾患である。本研究は、遺伝性の網膜色素変性症の原因遺伝子の一つであるPNPLA6が、網膜色素上皮細胞においてリゾホスファチジルコリンを経てグリセロホスホコリンを生成するユニークなホスホリパーゼB活性を持つことを明らかにした。眼でPNPLA6を欠損させたマウスは、網膜色素上皮細胞と視細胞の変性を生じたことから、PNPLA6を軸としたリン脂質の代謝が網膜の恒常性維持に必須であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、PNPLA6が既存概念とは異なるホスホリパーゼB活性を有することに着目し、未解明だった網膜色素変性症のメカニズムを、膜リン脂質の新陳代謝機構を切り口として脂質生化学的観点から解明する独自のものである。膜リン脂質の代謝産物の補填が、網膜色素変性症の予防治療に有効である可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Retinitis pigmentosa is a disease in which progressive degeneration of retinal pigment epithelial cells and photoreceptors results in visual field defect. This study shows that PNPLA6, one of the genes responsible for inherited retinitis pigmentosa, has a unique phospholipase B activity that produces glycerophosphocholine via lysophosphatidylcholine in retinal pigment epithelial cells. Mice lacking PNPLA6 in the eye developed degeneration of retinal pigment epithelial cells and photoreceptor cells, indicating that phospholipid metabolism with PNPLA6 as the axis is essential for retinal homeostasis.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素変性 リン脂質 コリン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症は視細胞と網膜色素上皮細胞の機能をびまん性に障害する進行性の疾患であり、遺伝性網脈絡膜疾患の中でも最も頻度が高く、本邦における視覚障害の原因の第2位を占める難病である。本疾病は常染色体優性あるいは劣性遺伝、X連鎖性遺伝形式が知られ、これまでに50種類以上の原因遺伝子が同定されている。近年、脂質代謝酵素の一群である PLA<sub>2</sub> 分子群のうち、iPLA<sub>2</sub>/PNPLA ファミリーに属する PNPLA6 の遺伝子変異が、神経障害、運動失調、網膜色素変性症などと関連することが報告され、PNPLA6-related disorders と呼ばれ注目を集めている。この PNPLA6 点変異の大部分は常染色体劣性遺伝であり、触媒ドメイン中に存在することから、網膜変性は PNPLA6 の酵素活性の喪失に基づき生じることが想定された。一方、生体内における PNPLA6 の生理機能やその生物学的意義については、マウスにおける *Pnpla6* の全身性欠損は胎生期に致死的な異常をもたらすことや、神経特異的欠損により神経変性が生じることから、PNPLA6 は生命活動を維持する上で極めて重要な役割を担うことが示唆されているものの、本酵素の生体組織における標的基質や産物、細胞応答制御に関する詳細は未解明であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、PNPLA6 の下流で膜リン脂質の新陳代謝を介した網膜の恒常性の調節に関わる新しい代謝経路を同定し、臨床応用に結び付け新規概念を提唱することである。PLA<sub>2</sub> は膜リン脂質を分解して脂肪酸とリゾリゾリン脂質を遊離し、生理活性脂質である脂質メディエーターの動員の鍵酵素として知られているが、申請者はこの既成概念とは異なり、PNPLA6 が網膜色素上皮細胞において膜リン脂質 PC の *sn*-1 位と *sn*-2 位の双方から脂肪酸をそれぞれ遊離し、リゾホスファチジルコリン (LPC) を経てグリセロホスホコリン (GPC) を生成するユニークなホスホリパーゼ B (PLB) 活性を持つことを見出した。本研究は、臨床的知見を契機に、PNPLA6 が既成概念とは異なる酵素活性 (PLB) を持つことに着目し、未解明である膜リン脂質の新陳代謝と網膜変性の関連を解析した。

### 3. 研究の方法

本研究では、網膜における PNPLA6 の発現を解析するとともに、細胞レベルにおける PNPLA6 のノックダウンあるいは強制発現、個体レベルにおける *Pnpla6* の欠損の影響について解析を行った。

#### (1) 個体レベルの検討

Cre-loxP 遺伝子組換えを利用し、タモキシフェン誘導性に *Pnpla6* を欠損させることができる時期特異的 *Pnpla6* 欠損マウスを作成した。本欠損マウスにタモキシフェンを腹腔内投与もしくは点眼投与することにより *Pnpla6* を欠損させ、光干渉断層計撮影により網膜の層構造を解析するとともに、HE 染色や免疫染色、透過電子顕微鏡を用いた網膜組織の超微細構造解析などを行うことにより、網膜変性について評価した。これに加え、網膜色素上皮特異的 *Pnpla6* 欠損マウスを作成し、網膜の組織学的構造変化および網膜電図による光応答能について評価した。

#### (2) 細胞レベルの検討

ヒト正常網膜色素上皮細胞 (ARPE19) およびマウス視細胞 (661W) を用いて、PNPLA6 の発現を siRNA によりノックダウン、あるいはヒト疾患で認められる PNPLA6 点変異体を強制発現させ、細胞の形態や応答 (増殖、接着など) の変化について、電子顕微鏡、定量的 PCR、免疫染色、経上皮電気抵抗測定などにより解析した。さらに、トランスクリプトミクス、メタボロミクス、リポドミクスからなる統合的オミクス解析を実施し、PNPLA6 が動かす細胞代謝や脂質代謝の包括的な同定を試みた。

### 4. 研究成果

網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 において、PNPLA6 をノックダウンすると、細胞内コリンの減少、呼吸関連代謝物や ATP 産生の減少とともに、ミトコンドリアの形態異常、細胞増殖や接着の異常が認められた。これらの細胞異常は、培地にコリンを補充することで改善された。コリンから PC の *de novo* 合成に関与する Kennedy 経路の関連分子をノックダウンすると、PNPLA6 ノックダウンと同様の増殖異常が観察された。

タモキシフェン点眼により眼特異的に本酵素をノックアウトすると、網膜の菲薄化、網膜色素上皮細胞のミトコンドリア異常、視神経 disc 構造の変性と TUNEL 陽性細胞の増加、光反応性の低

下が認められた。この網膜変性は、コリンを点眼して補充することで正常化した。これらの結果から、PNPLA6 は網膜色素上皮細胞の PC を GPC に分解する過程でコリンを産生し、膜リン脂質代謝を促進して網膜の恒常性を維持することが示唆された

さらに、視細胞はコリンが不足すると細胞死を生じた。視細胞における PNPLA6 発現は乏しいことから、コリンが網膜色素上皮細胞から視細胞に細胞間供給される新規メカニズムを想定した。その結果、ARPE-19 は細胞上清中にコリンを遊離しており、PNPLA6 をノックダウンすると遊離コリンが減少していた。視細胞は細胞外のコリンをコリントランスポーターを介して取り込んでおり、コリン欠損条件では増殖抑制、形態学的異常、ミトコンドリア機能障害を呈することが明らかとなった。今後は、新しい膜リン脂質合成による視細胞機能制御に寄与しているかどうかを標識したコリンによるトレーシング実験で詳細に解析することを計画している。さらに、膜リン脂質代謝の欠損は、酸化修飾された劣化リン脂質の蓄積をもたらすことから、酸化脂質による細胞死（フェロトーシス）が PNPLA6 欠損に基づく網膜変性と関連しているかどうかを検証する予定である。

2022 年度は、本研究成果を(1)眼科分子生物学研究会（横浜）、(2)眼薬理学会（奈良）、(3)生化学会大会（名古屋）、(4)東京大学生命科学シンポジウム（東京）において発表し、(1)にて奨励賞、(3)にて若手優秀賞、(4)にて優秀ポスター賞を獲得した。2023 年度は、本研究成果を(1) 日本眼科学会（東京）、(2) International Conference on the Bioscience of Lipids（スペイン）で発表し、(2)において Best poster award を受賞した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小野喬、武富芳隆、曾我朋義、徳岡涼美、小田吉哉、相原一、村上誠
2. 発表標題 網膜色素変性症の原因遺伝子PNPLA6の網膜色素上皮細胞における役割
3. 学会等名 第25回眼科分子生物学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野喬、武富芳隆、相原一、村上誠
2. 発表標題 脂質代謝酵素PNPLA6は網膜色素上皮細胞と視細胞の相互作用を介して恒常性の維持に関わる
3. 学会等名 第42回日本眼薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野喬、武富芳隆、曾我朋義、徳岡涼美、小田吉哉、相原一、村上誠
2. 発表標題 脂質代謝酵素PNPLA6はコリン経路を通じて網膜の恒常性の維持に関わる
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野喬、武富芳隆、相原一、村上誠
2. 発表標題 リン脂質代謝酵素PNPLA6の欠損は網膜変性をもたらす
3. 学会等名 第21回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takashi Ono, Yoshitaka Taketomi, Makoto Aihara, Makoto Murakami
2. 発表標題 Patatin-like phospholipase PNPLA6 regulates retinal homeostasis by regulating choline availability through phospholipid turnover
3. 学会等名 International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野 喬
2. 発表標題 リン脂質生合成・リモデリングと網膜変性
3. 学会等名 第127回日本眼科学会総会
4. 発表年 2023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
---------	---------