

網膜色素変性症の新しい発症機構の発見

光刺激に曝される視細胞の保護作用物質の発見と
その分泌機構におけるセマフォリンの新しい機能の発見

大阪大学免疫学フロンティア研究センター
特任准教授・豊福利彦

大阪大学免疫学フロンティア研究センター
大阪大学大学院医学系研究科呼吸器・免疫アレルギー内科
教授・熊ノ郷 淳

タイトル: Endosomal sorting by semaphorin 4A in retinal pigment epithelium supports photoreceptor survival.

掲載誌: Genes and Development (Advanced Online Publication, 3月30日)

(1) 研究背景

視覚は網膜に存在する視細胞が光の変化を脳の視覚領野に投射することで認識される。その一方で、光は細胞に強い酸化ストレスを起こし、細胞死を引き起こす。ではなぜ光を浴び続ける視細胞が細胞死に至らないのか？ 何らかの視細胞を保護する仕組みが存在するはずであり、この保護機構の破綻により生じる病気が網膜色素変性症(後天性の三大失明原因の一つ)と考えられている。従来、視細胞に接した色素上皮細胞が視細胞の保護や生存に重要であると考えられてきたが、そのメカニズムは謎であった。

(2) 概略

今回我々の研究グループは、イメージング技術と生化学的手法を駆使することで、色素上皮細胞から分泌される視細胞保護物質を同定するとともに、この物質の輸送・分泌がセマフォリン(Sema4A)によって担われていることを発見した。セマフォリンは従来神経ガイダンス因子として「細胞の外」で機能すると考えられてきたが、我々はSema4Aが「細胞の中」で物質輸送のナビゲーターとして機能していることを新たに見出した。

(3) 具体的な方法と結果

Sema4Aの視細胞保護機構

遺伝子改変技術によりSema4Aを欠損したマウスでは生直後より網膜に存在する視細胞層が脱落する(図1)。

→ 出産後に起こる変化なので、光刺激が重要と考えた。

網膜を分離し培養を行うと色素上皮細胞がないと光刺激により視細胞が細胞死を起こした(図2)。

→ 視細胞の生存には色素上皮細胞が必要である。Sema4Aは色素上皮細胞に存在することから、Sema4A自身ないし、Sema4Aに結合して分泌される未知の物質が視細胞の保護作用を有すると考えた。

酵母ツーハイブリッド法によりSema4Aの結合物質を探し、プロサポシンを同定した。網膜の培養系でSema4Aの細胞外部分とプロサポシンを培養液に補充するとプロサポシンの補充により視細胞の細胞死が抑制できた(図3)。

→ 視細胞の光刺激保護物質はプロサポシンである。

色素上皮細胞の培養系に酸化ストレス(過酸化水素水)を加えるとプロサポシンは細胞外へ放出される。ところが Sema4A 欠損色素上皮細胞ではプロサポシンは放出されず細胞内に留まっていた(図4)。

→ Sema4A の役割はプロサポシンの細胞外への放出である。

Sema4A はプロサポシンと一致して細胞膜表面まで移動する(図5)。細胞内での物質移送は低分子量G蛋白質である Rab 蛋白質が重要である。Sema4A と Rab 蛋白質との細胞内分布を調べると Sema4A と Rab11 が共存し FIP2 という分子を介して結合した(図6)。Rab11 の変異体はプロサポシンの移送を阻害した。Sema4A はプロサポシンをエクソゾームの形で細胞外へ放出する(図7)

→ Sema4A は Rab11 を制御してプロサポシン分泌に方向づける可能性がある。

一般的にプロサポシンは膜結合蛋白質であるソーチリンと結合しライソゾームへ移送され、そこで分解され酵素として作用する(図8)。Sema4A はソーチリンと競合してプロサポシンと結合した。ソーチリンを過剰にするとプロサポシンの分泌は抑制された(図9)。

→ Sema4A はソーチリンからプロサポシンを引き剥がして分泌への方向性を決めていた。

以上より、光などの酸化ストレスにより Sema4A がプロサポシンのライソゾームへの細胞内移送をエクソゾームを介する細胞外への分泌へ方向転換させた(図10)。

Sema4A のレチノイド再生機構

光刺激を受けた視細胞内ではレチノイドが変性する。この変性レチノイドは色素上皮細胞に戻されてそこで、新規レチノイドに再生する必要がある(図11)。

Sema4A 欠損マウスの網膜では新規レチノイドの量が激減し、色素上皮細胞での再生が行われていない (図12)。

→ Sema4A はレチノイドの輸送にも関与している可能性がある

レチノイド結合蛋白質は Sema4A と一致して細胞内で移動している。Sema4A 欠損マウスではレチノイド結合蛋白質は移動できなかった(図13 動画)。

→ Sema4A はレチノイド結合蛋白質と結合し色素上皮細胞内でレチノイドの移動の方向性を決めていた

まとめ

色素上皮細胞内では Sema4A は2つの細胞内物質輸送を制御している。

1:レチノイド再生のための輸送系、2:光刺激に対する視細胞防御機構(プロサポシン放出)

外部の光刺激の状態に応じて Sema4A は2つの経路を使い分けるナビゲーター役を担っていた(図14)。

(4) 今回の発見の意義

～網膜色素変性症の治療ターゲットの発見～

*網膜色素変性症は失明を起こす3大疾患のひとつで、その予防・治療は急務を要する。レチノイド代謝酵素異常が原因で発症する網膜色素変性症家系が報告されてきたが、我々は Sema4A がレチノイド代謝に関わる物質輸送のナビゲーターとして視細胞保護やレチノイド再生に重要であり、Sema4A が網膜色素変性症の治療ターゲットになり得ることを示した。

～「ヒトの病気の鍵分子・治療標的」であるセマフォリンの全く新しい機能の発見～

＊セマフォリンは、神経変性疾患、免疫・アレルギー疾患、癌の転移・浸潤、骨粗鬆症など「ヒトの病気の鍵分子・創薬ターゲット」として現在注目されている分子群であり、従来「細胞の外」で機能すると考えられてきた。今回我々が発見した Sema4A の「細胞の中」での物質輸送のナビゲーション機能は生物学的にも重要な発見である。

参考図

網膜の構造と機能

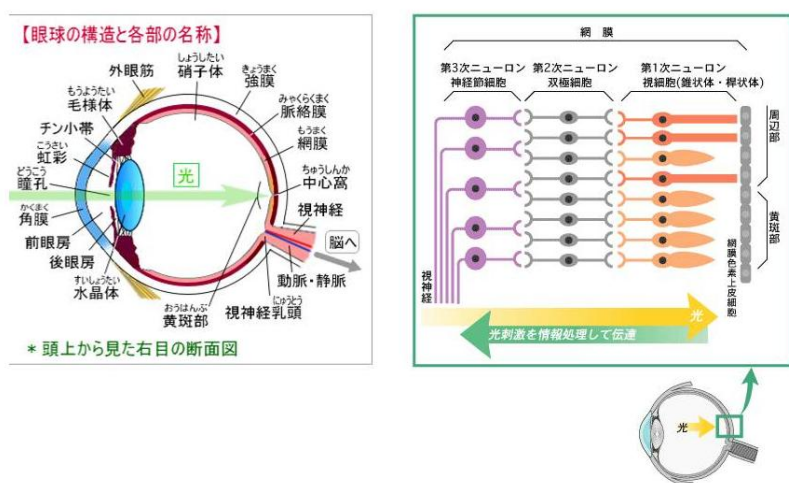
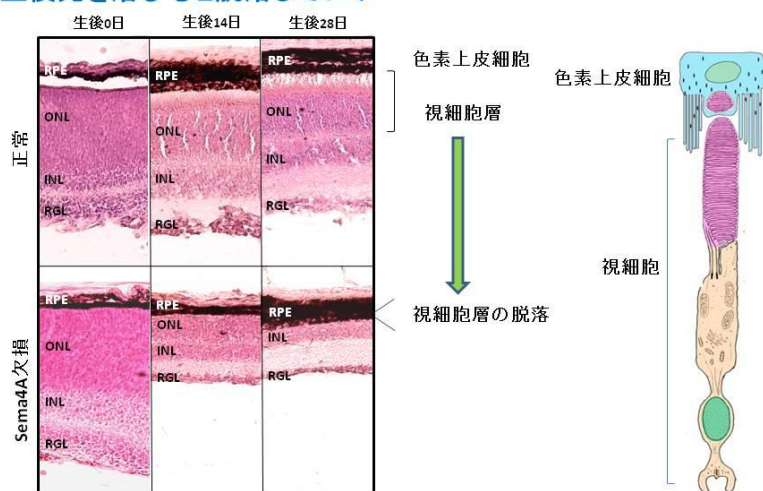


図1

Sema4A欠損マウスの網膜は一旦できるが
生後光を浴びると脱落していく



Gene & Development (in press)

図2

網膜培養系を使った実験

視細胞は色素上皮細胞がないと光刺激により脱落した

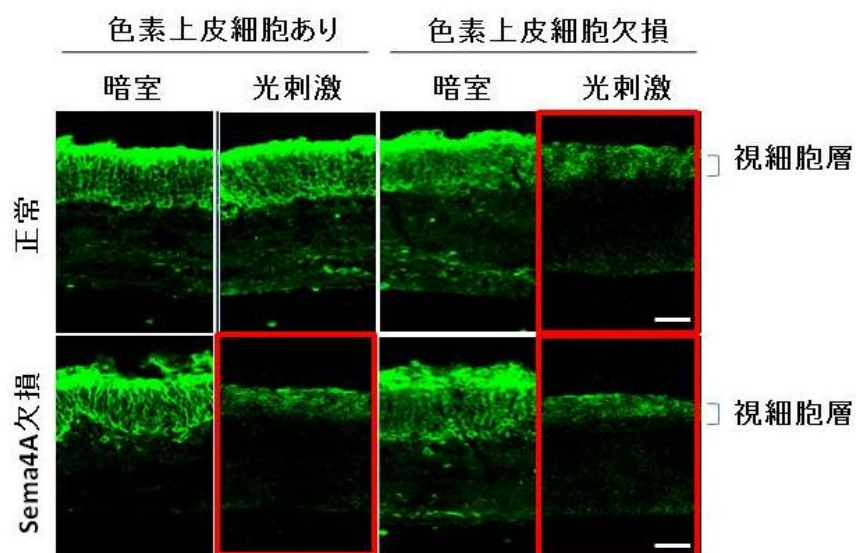


図3

網膜培養系を使った実験

プロサポシンは光刺激から視細胞を防いだ

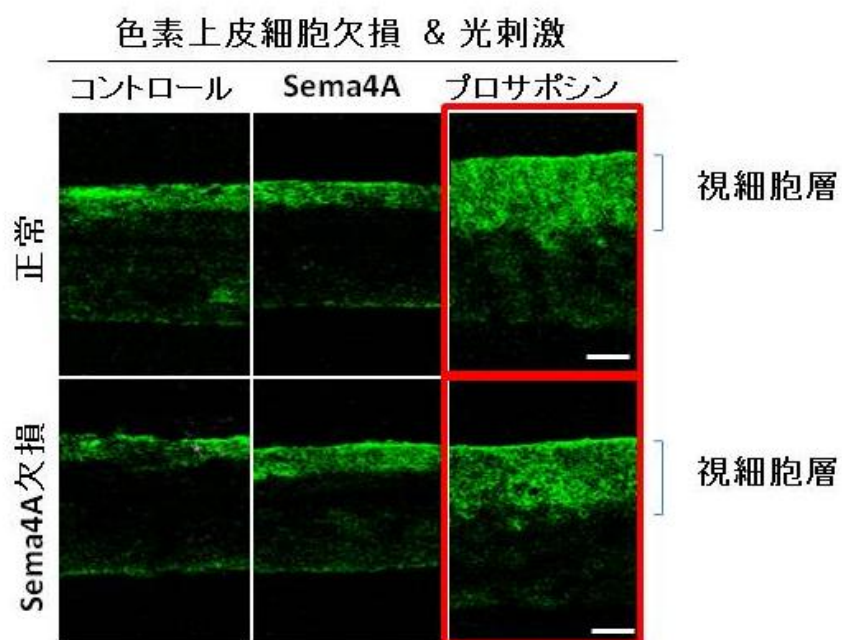


図4

色素上皮細胞を使った実験
 プロサポシンは光刺激により細胞外へ放出された
 Sema4A欠損では放出されない

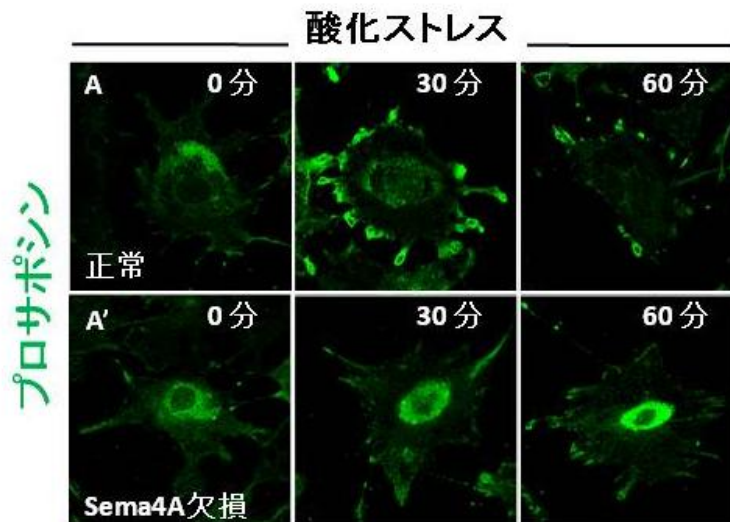


図5

色素上皮細胞を使った実験
 プロサポシンは酸化ストレスによりSema4Aと一致
 して細胞外へ放出された

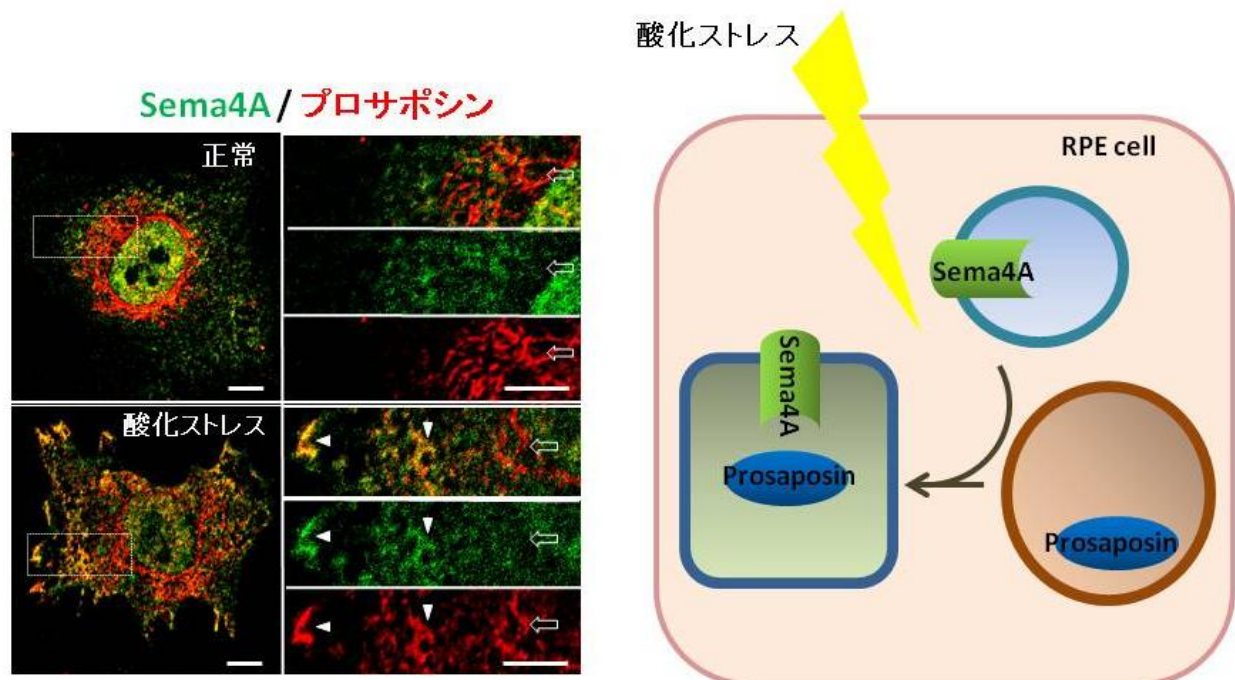


図6

Rab11 が小胞輸送の担い手である

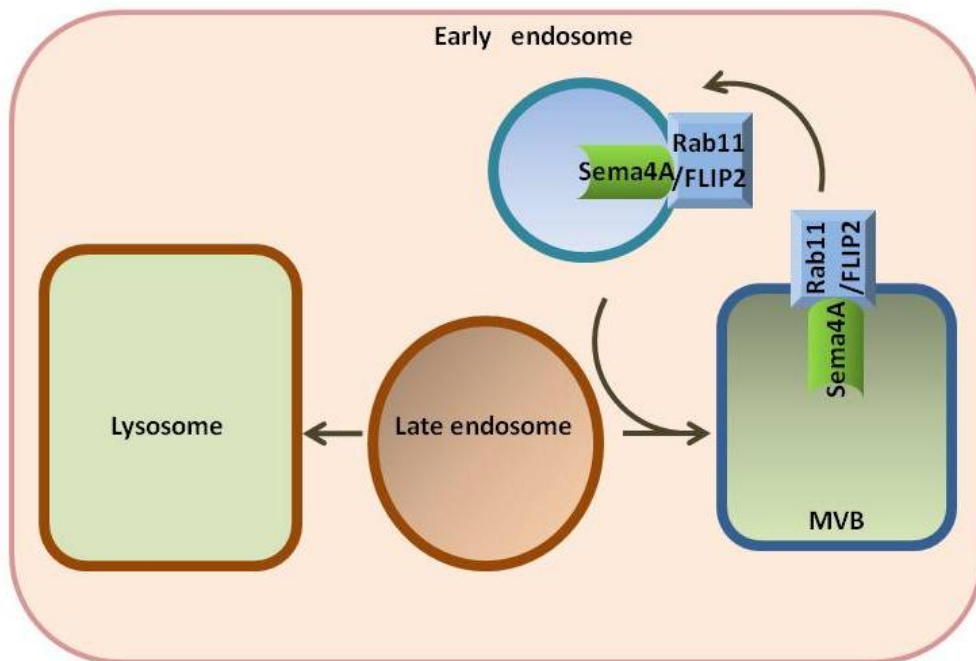


図7

生化学実験

プロサポシンは酸化ストレスによりSema4Aと一致してエクソゾームにより細胞外へ放出された

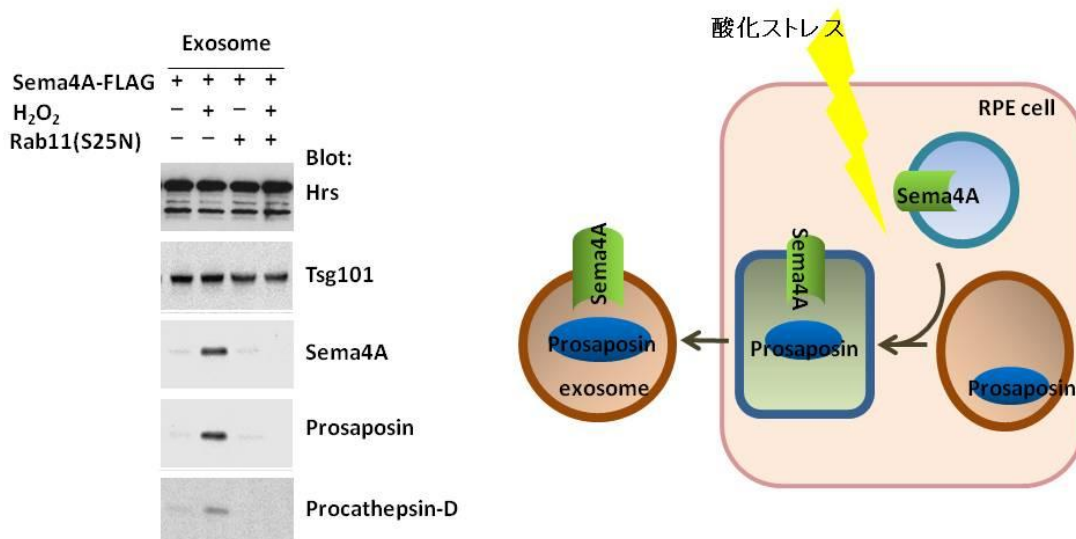


図8

モデル

酸化ストレスの無い細胞ではプロサポシンはソーチリンと結合してライソゾームへ移動し分解される

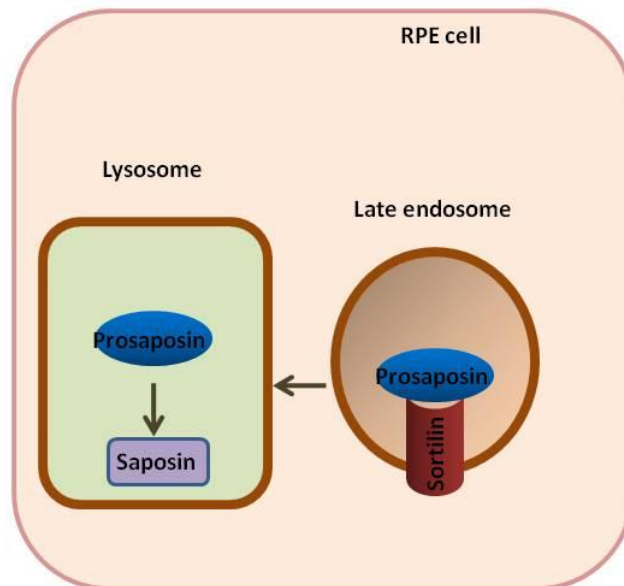


図9

生化学実験

Sema4Aはプロサポシンとソーチリンの結合を濃度依存的に抑制した

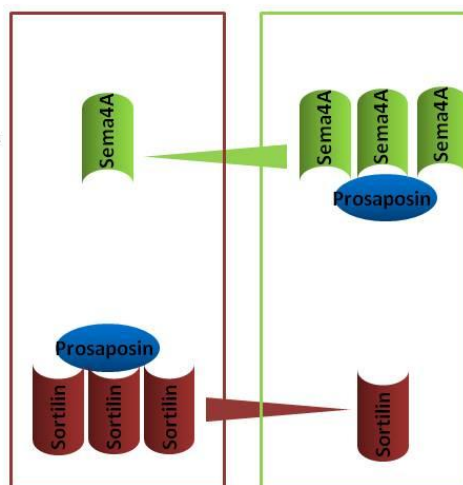
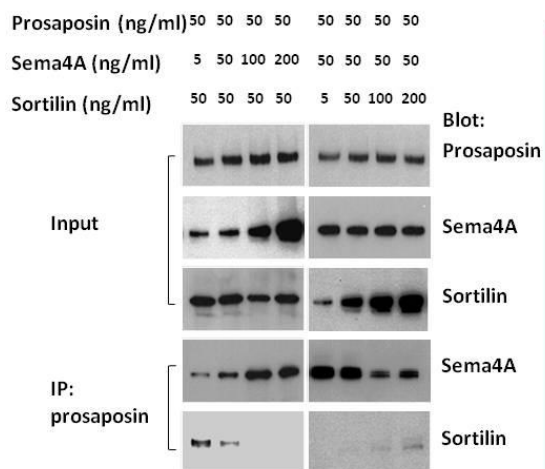


図10

モデル

光刺激によりSema4Aはプロサポシンに結合してエクソゾームを介して細胞外へ放出された

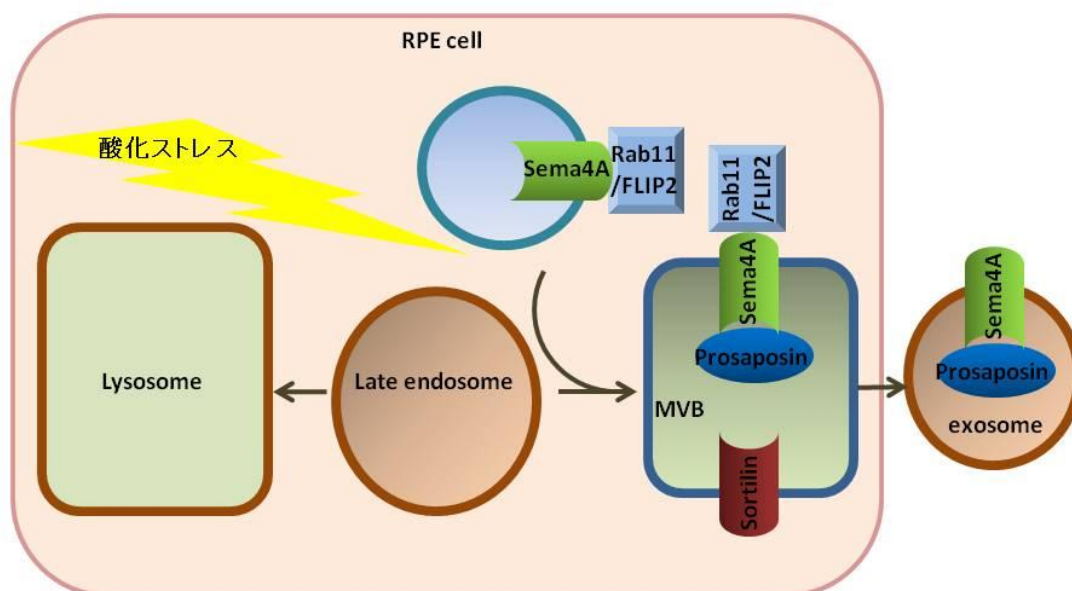


図11

色素上皮細胞によるレチノイド代謝サイクルは視細胞で作られた変性レチノイドを再生する

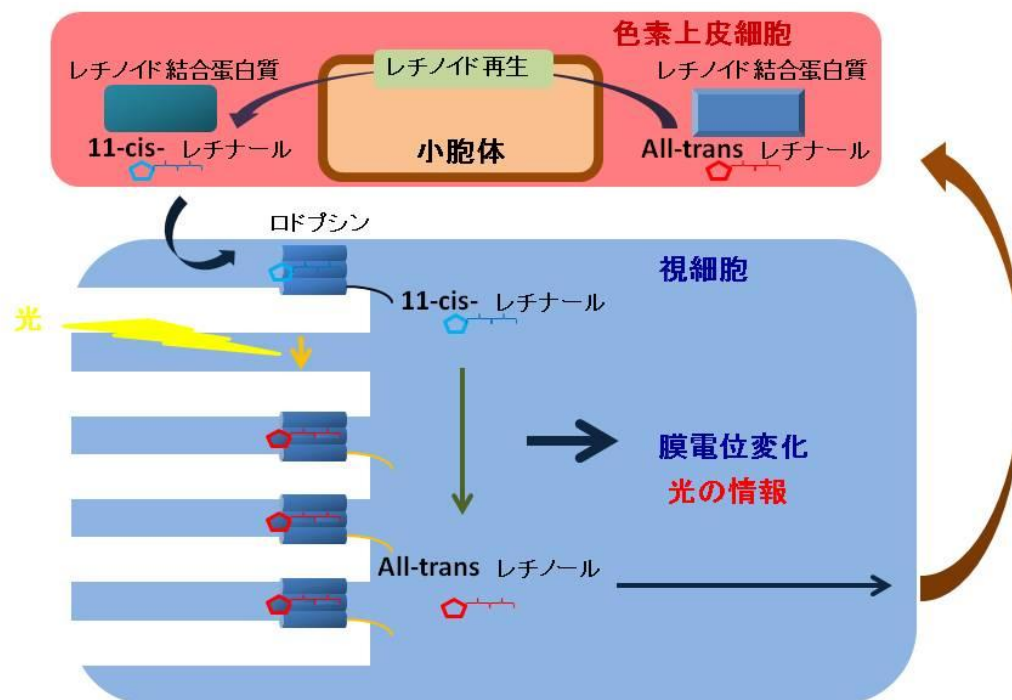


図12

網膜に存在するレチノイド代謝産物のHPLC解析
Sema4A欠損網膜ではレチノイドの再生ができない

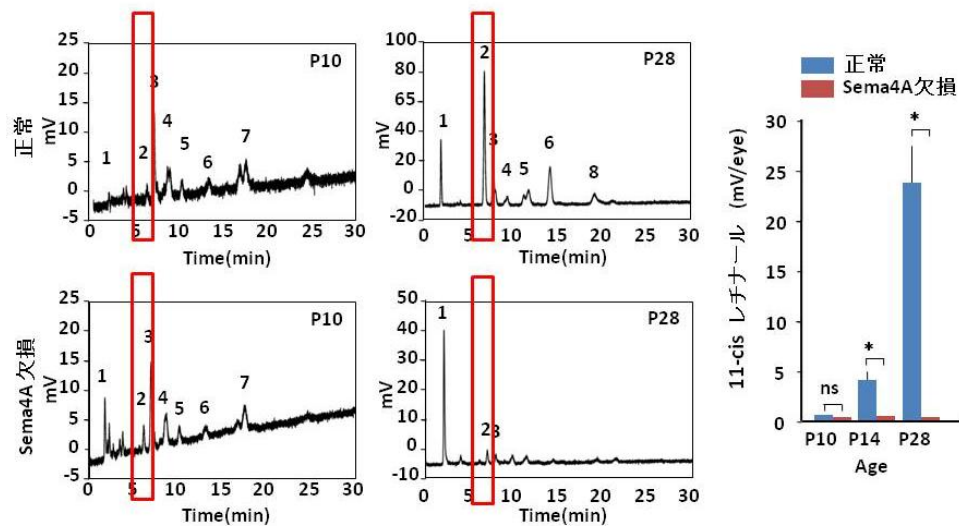


図13

レチノイド結合分子はSema4A存在下で細胞内輸送された。この輸送は同期的して起こる

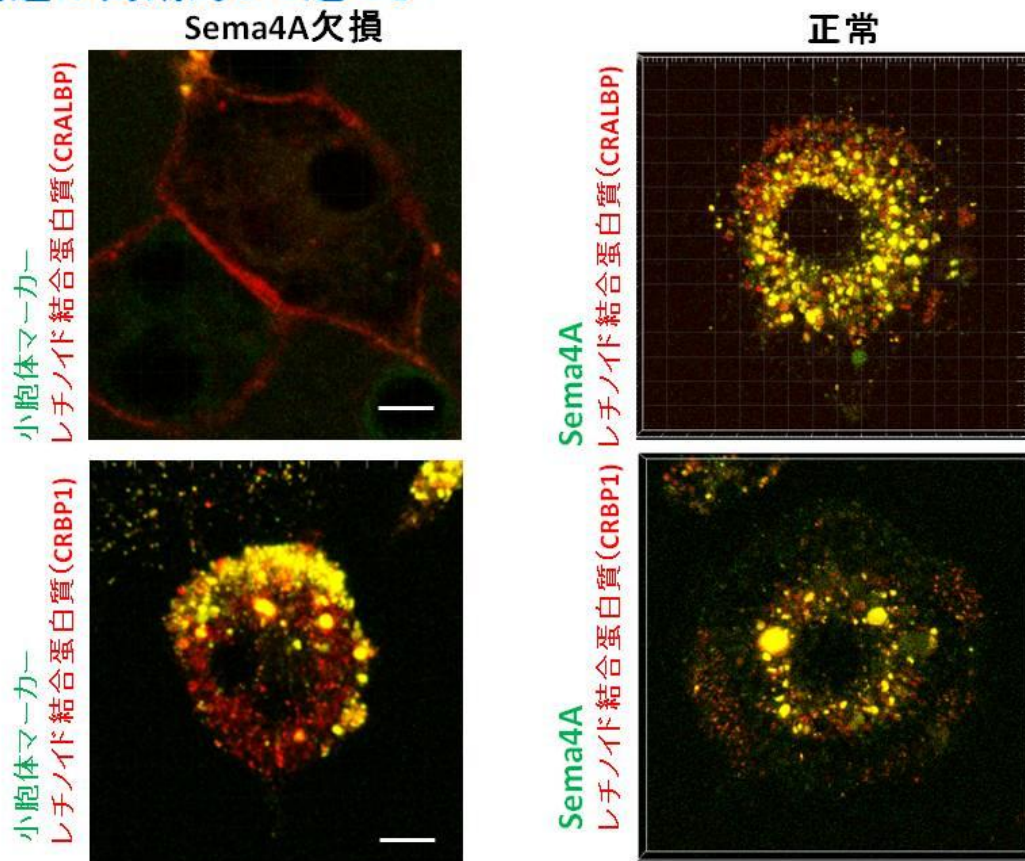


図14

Sema4Aは色素上皮細胞内の細胞内輸送を制御し、視細胞の生存、機能維持を行っている

