

セマフォリン 4A の遺伝子異常に起因する新たな網膜変性疾患の病態機序の発見

<概要>

大阪大学大学院医学系研究科の野島聡助教、豊福利彦准教授、熊ノ郷淳教授(免疫学フロンティア研究センター兼任)らは、緑内障、糖尿病性網膜症と並ぶ後天性の 3 大失明原因の一つである網膜色素変性症の新たな発症メカニズムを発見しました。

網膜色素変性症は、その原因となる遺伝子異常の同定や発症のメカニズムの解明、治療法の開発は現在危急の課題となっています。

本研究グループは、Sema4A 遺伝子に点突然変異を有する種々の遺伝子改変マウスを作成し、Sema4A タンパクのある特定の場所の一つのアミノ酸変異が網膜色素変性症の原因となることを証明しました。更に、変異が生じることにより Sema4A タンパクの立体構造が崩壊してしまい、そのせいで、Sema4A が発現している網膜色素上皮細胞が「慢性的かつ恒常的な酸化ストレスである光刺激」から網膜を保護する種々の物質を網膜に供給できなくなることを見出しました。更に、Sema4A 遺伝子をマウスの網膜に投与することで、網膜色素変性症の発症を抑制することにも成功しました。

以上の成果は、網膜色素変性症の新たな病態メカニズムを明らかにするとともに、網膜色素変性症に対する治療法につながる成果です。

<論文>

本研究成果は、平成 25 年 1 月 30 日午前 1 時(日本時間)発行の Nature Communications で公開されます。

“A point mutation in *Semaphorin 4A* associates with defective endosomal sorting and causes retinal degenerative diseases”

(小胞輸送に関わり網膜変性疾患の原因となるセマフォリン 4A の点突然変異)

<戦略的創造研究推進事業 チーム型研究 (CREST)>

- ・ 研究領域「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」(研究総括:宮坂昌之)
- ・ 研究課題名:「慢性炎症におけるガイドランス因子の病的意義の解明とその制御」
- ・ 研究代表者: 大阪大学大学院医学系研究科教授 熊ノ郷 淳)
- ・ 研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 30 年 3 月

また、この研究は神戸理研 CDB の高橋政代プロジェクトリーダー、大阪大学蛋白室研究所の高木淳一教授らとの共同研究による成果です。

<研究の背景>

網膜色素変性症は代表的な網膜変性疾患であり、網膜視細胞の進行性の変性を来す眼科疾患である。網膜色素変性症は成人の失明の原因として上位を占める重大な疾患であり、後天性の三大失明原因の一つとされている。有効な治療法は現在まで確立されていない。病気の原因としていくつかの原因遺伝子が報告されているが、それらの異常による症例は網膜色素変性症全体の中ではごく一部であり、新たな疾患発症メカニズムの解明と治療法の確立が危急の課題となっている。

セマフォリン 4A (Sema4A) は網膜色素上皮に発現するタンパクであり、私たちの研究グループによる Sema4A 遺伝子欠損マウスの解析で、Sema4A 欠損下で重度の網膜の視細胞変性を来すことが明らかになっていた。また、ヒトにおいても、パキスタンの研究グループから、ヒト網膜色素変性症の患者において Sema4A タンパクに一アミノ酸変異を有する家系の存在が示唆されていた。しかしながら、実際に Sema4A タンパクのたった一つのアミノ酸の変異で網膜色素変性症を発症するのかについては不明であった。

これらの背景を元に、本研究グループは、これらの点突然変異による疾患発症の有無、発症の解明、更に Sema4A を標的とした疾患治療の有効性を検討した。

<研究の内容>

・点突然変異 *Sema4A*^{F350C} が網膜色素変性症の原因であることを発見

3 種類の点突然変異、*Sema4A*^{D345H}, *Sema4A*^{F350C}, *Sema4A*^{R713Q} が網膜色素変性症の原因となり得るかを検証するため、これらの遺伝子異常を有する遺伝子改変マウス(ノックインマウス)を作成した。このうち、変異 *Sema4A*^{F350C} を有する遺伝子改変マウスは、*Sema4A* 欠損マウスと同程度の重度の視細胞の変性を示し、変異 *Sema4A*^{F350C} が網膜色素変性症の原因となり得ることが動物モデルからも証明された(図 1)。残る 2 種類の点突然変異 *Sema4A*^{D345H}, *Sema4A*^{R713Q} については、病原性が認められなかった。

・変異 *Sema4A*^{F350C} の病原性が、蛋白立体構造の崩壊に起因することを発見

変異マウスの網膜組織を用いて *Sema4A*^{F350C} 変異蛋白の色素上皮細胞における局在を評価したところ、*Sema4A*^{F350C} 変異蛋白は本来の局在部位である細胞膜表面に存在せず、細胞質内に留まるという異常な局在パターンを示していることが分かった。また、すでに報告されているヒト Sema4D 蛋白の立体構造モデルを元に *Sema4A* の立体構造相同モデルを作成したところ、*Sema4A*^{F350C} 変異の存在する 350 番目のアミノ酸は *Sema4A* 蛋白の外方に突出した部位に存在しており、その側鎖が内部の空間を埋めていることが示された(図 2)。また、培養細胞を用いた実験から、350 番目に様々なアミノ酸変異を導入した際、変異アミノ酸の側鎖の体積が小さい場合には局在に異常が起こり、側鎖のある程度大きなアミノ酸に変異した場合には局在に異常が認められないことが示された。これらの結果から、*Sema4A* 蛋白に *Sema4A*^{F350C} 変異が起こってしまうと、蛋白内部の空間が空洞になってしまい、そのせいで蛋白の立体構造が高度に崩壊し、結果正常の局在部位である細胞表面へ存在できないということが病態機序であることが示された。

●変異 *Sema4A*^{F350C} により、「慢性的かつ恒常的な酸化ストレスである光刺激」から網膜を保護する生理活性物質の色素上皮細胞からの分泌が障害されていることを発見

当研究グループは近年、*Sema4A* 欠損マウスの色素上皮細胞において、レチノイン酸結合蛋白およびプロサポシンという視細胞の保護に必須の蛋白の分泌能が著明に障害され、これが *Sema4A* 欠損マウスの示す網膜色素変性症の表現型の原因であることを報告している。同様の系を用いて *Sema4A*^{F350C} 遺伝子改変マウスについても評価を行ったところ、網膜色素上皮からのレチノイン酸結合蛋白およびプロサポシンの分泌は *Sema4A* 欠損マウスと同程度に強く障害されていた。すなわち、立体構造の崩壊に伴い正常の局在部位へ存在できないことにより、これらの本来の生理機能が発揮できていないと考えられる。

●*Sema4A* が網膜色素変性症に対する遺伝子治療の治療標的となり得ることを発見

Sema4A を標的にしたヒト網膜色素変性症患者に対する遺伝子治療の効果を検討するため、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療の実験を行った。生後 1 週間時点において *Sema4A* 欠損マウスおよび *Sema4A*^{F350C} 遺伝子改変マウスに対してウイルス溶液の網膜下注射を行い、色素上皮細胞特異的に野生型 *Sema4A* 蛋白を発現させたところ、本来であれば視細胞が完全に変性・消失してしまうはずの 4 週齢の時点においても視細胞層は有意に保たれており、*Sema4A* を標的とする遺伝子治療について良好な結果が得られた(図 3)。この治療効果は、少なくとも 4 ヶ月間持続していた。

<今回の成果の意義と今後の展開>

今回の発見の意義は以下の 4 点である。

- 「慢性的かつ恒常的な酸化ストレスである光刺激」からの網膜保護に *Sema4A* が必須であることの見出。
- *Sema4A* タンパクの一つのアミノ酸変異により網膜色素変性症を発症することの見出。
- *Sema4A* 変異による網膜色素変性症発症が、*Sema4A* 蛋白の立体構造の崩壊に起因することの見出。
- *Sema4A* の遺伝子治療が網膜色素変性症に対する有効な治療法の一つとなり得ることの証明。

今後、以下の検討・検証を進めて行く必要がある。

- ◆ パキスタン以外の網膜色素変性症家系における *Sema4A* 変異の検索。
- ◆ 網膜色素変性症の早期診断・早期治療への応用。
- ◆ 今回の結果は *Sema4A* の異常を持ったマウスに対して *Sema4A* を標的とする治療を行ったものであるが、*Sema4A* が様々な網膜保護物質の分泌に関わっていることから、他の遺伝的素因による網膜色素変性症に対しても *Sema4A* を用いた遺伝子治療が奏功する可能性。

<セマフォリン (Semaphorin)>

セマフォリン分子群は元々、発生過程における神経細胞の軸索の方向性を決定する因子として同定された分子群であるが、現在その機能は神経系にとどまらず免疫、器官形成、血管新生、癌の進展など、様々な局面にて働くことが明らかとなっている。

<参考図>

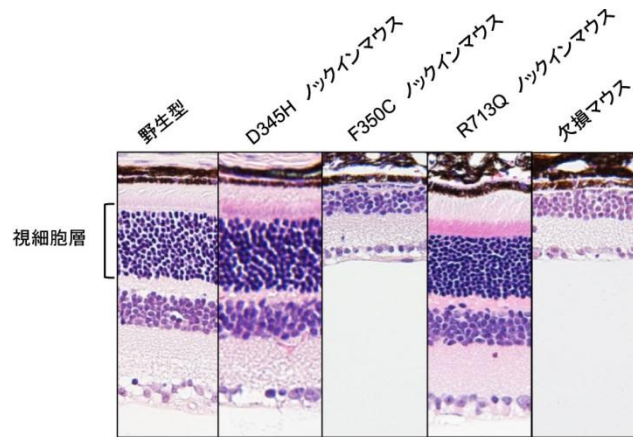


図1: 各点突然変異を有する遺伝子変異マウス(ホモ)の4週齢時点での網膜組織。このうち、変異F350Cを有するマウスは、欠損マウスと同様の網膜色素変性症の表現型を示している。

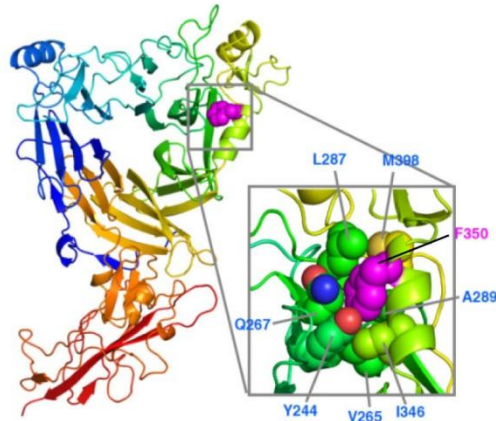


図2: Sema4A蛋白立体構造相同モデルにおいて、350番目のアミノ酸の位置を図示した。350番目のアミノ酸は蛋白の外方に突出した部分に存在しており、その側鎖は内方へ向き内部の空間を形成している。

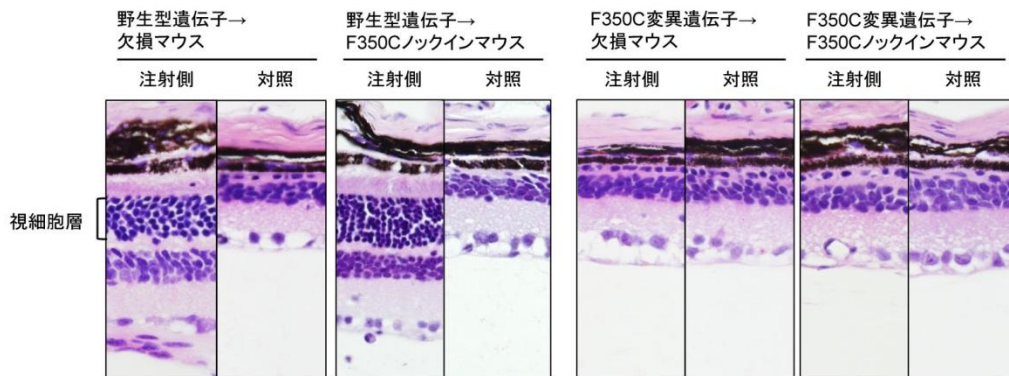


図3: 野生型(正常)Sema4A遺伝子ないしF350C変異Sema4A遺伝子をそれぞれSema4A欠損マウス、F350Cノックインマウスに導入した後の4週齢での網膜組織。野生型Sema4A遺伝子にて遺伝子治療を行うことにより視細胞の変性が有意に抑制できており、遺伝子治療が成功していると考えられる。