

博士論文（要約）

論文題目 Pathogenic mechanism of Lenz-Majewski syndrome caused
by dominant gain-of-function mutations of PS synthase 1
(ホスファチジルセリン合成酵素の機能獲得型顕性変異に
よる Lenz-Majewski syndrome 発症機構の解析)

氏 名 菅原 小莉

【序論】

生体膜を構成するリン脂質の一種であるホスファチジルセリン (PS) は極性頭部に負電荷を持ち、アポトーシス細胞の貪食や血小板凝集などの様々な生理現象に関与する。また細胞内では特徴的な分布を示すことが知られ、細胞膜及びエンドソーム膜の脂質二重層内層に局限して存在する。PS の合成酵素には PS synthase(PSS) 1/2 が存在し、それぞれホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE) を基質として極性頭部の塩基交換反応により PS を合成する。PSS1/2 の活性は、合成産物の PS によって負のフィードバック調節を受けることが知られ、培養細胞に PS を添加すると抑制されることも報告されている。

近年、PSS1 のヘテロ顕性変異が、先天性希少疾患である Lenz-Majewski syndrome(LMS)の原因であることが報告された。LMS 患者は、頭蓋・四肢の骨格形態異常、進行性の骨硬化症、皮膚弛緩、精神遅滞等の症状を示す。文献での報告は 20 例ほどで、10 人の患者で 6 種類の変異が報告されている。いずれも機能獲得型変異であり、患者由来線維芽細胞では PS 合成活性が亢進し、また PS 添加によるフィードバック抑制に対して耐性となっていた。PS の過剰合成により多様な症状を示す興味深い症例である一方、疾患発症メカニズムは未だ不明である。そこで本研究では、LMS 患者の進行性骨硬化症の症状に着目し、PS 合成亢進による疾患発症機構の解明を目指した。

【方法と結果】

1. LMS 型 PSS1 により破骨細胞の多核化・骨吸収活性が抑制される

破骨細胞は生体内で骨を分解する主要な細胞であり、骨を産生する骨芽細胞と協調して絶えず骨の局所的な分解・産生を繰り返すことで、骨の量や質を一定に維持する。一方、破骨細胞の骨吸収活性の低下は骨硬化症を導く。破骨細胞は造血幹細胞に由来し、サイトカイン MCSF (Macrophage-colony stimulating factor) と RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) の作用によって分化する。マウス由来骨髓細胞をサイトカイン存在下で 4-5 日培養することで成熟破骨細胞を *in vitro* で得ることができ、分化初期には破骨細胞特異的な遺伝子群が発現上昇し、後期には破骨前駆細胞同士が融合して多核の破骨細胞を形成する。

LMS における PSS1 の変異は顕性であるため、野生型マウスの骨髓細胞にレトロウイルスを用いて LMS 型 PSS1 (Q353R 変異体、以降 PSS1*と表記) を導入する系を採用した。まず破骨細胞の PS 合成活性を ¹⁴C-Serine の取込により評価したところ、PSS1*発現により PS 合成活性の亢進が認められた。さらに PS を添加した際には、PSS1 発現細胞 (コントロール細胞) ではフィードバック抑制が見られたが、PSS1*発現細胞では PS 合成が抑制されないことが確認された。この時、破骨細胞を特異的に染色する TRAP 染色により破骨細胞形成を評価したところ、PSS1*発現により多核細胞の減少が認められた。さらに骨吸収活性を評価したところ、PSS1*発現時には吸収孔の面積が減少し、骨吸収活性も減弱していることがわかった。

破骨細胞分化初期に発現上昇する遺伝子群には破骨細胞の融合・多核化や骨吸収に重要な遺伝子が含まれる。定量 PCR 解析の結果、代表的な破骨細胞マーカー遺伝子の発現には影響がなかった。さらに、マイクロアレイにより遺伝子発現を網羅的に比較した際にも、PSS1*発現時に大きく発現変動する遺伝子は認められなかった。以上から、破骨前駆細胞に PSS1*を発現すると、PS の合成が促進すること、破骨細胞の多核化と骨吸収活性が抑制されること、破骨細胞特異的な遺伝子の発現には影響しないことが明らかとなった。

2. LMS 型 PSS1 により破骨細胞のアクチン骨格パターンが異常となる

破骨細胞は分化過程の形態変化に伴い、そのアクチン骨格を大きく変化させることが知られている。破骨細胞はポドソームと呼ばれるアクチン構造を持ち、ドット状構造（コア）とそれを囲むリング状構造（クラウド）からなる。*In vitro*の破骨前駆細胞ではポドソームが集合してクラスターを複数形成し、破骨細胞へと成熟が進むにつれリング状に変化し拡大しながら辺縁部まで広がり、アクチンベルトと呼ばれる構造を形成する。ポドソームのクラスター形成、リング形成は、細胞の遊走・融合に関与し、またアクチンベルトは破骨細胞が骨基質上で形成するアクチン骨格 Sealing zone と構造が類似し、骨吸収を行うための重要な構造である。

PSS1*によるアクチン細胞骨格への影響を観察した結果、コントロール群ではアクチンベルトを持つ細胞や小さなポドソームクラスターを多数持つ細胞が観察された。一方、PSS1*を発現した場合には、少数のポドソームクラスターを持つ細胞のみが認められ、またクラスターサイズが増大しておりアクチン骨格パターンが異常となることがわかった。F-アクチン蛍光プローブを用いてポドソームクラスターのライブイメージングを行ったところ、コントロール細胞ではクラスターが形成・消失を繰り返し経時的に変化するのに対して、PSS1*発現時に見られるクラスターは長時間残存しており、ポドソームクラスターの動態に異常があることがわかった。一方、ポドソームクラスター内における G-アクチンの代謝及び運動性を FRAP 実験により解析したところ、コントロール細胞群と PSS1*発現細胞において、蛍光の回復速度・割合は同程度であり、G-アクチンの代謝異常は認められなかった。以上より PSS1*発現時には、局所的なアクチン重合には影響がないが、アクチン骨格パターンが異常となることがわかった。

3. LMS 型 PSS1 は PS の脂肪酸鎖組成変化および PI の減少を引き起こす

次に PSS1*によるリン脂質組成への影響を解析した。まず総量を比較すると、PSS1*発現時には PS 合成が亢進しているにもかかわらず PS 量には変化がなかった。一方、予想外にホスファチジルイノシトール (PI) の減少が認められた。次に PS の脂肪酸鎖組成を比較すると、PSS1*発現時には PS の特定の分子種で増減が認められた。

PSS1 は *in vitro*では serine, ethanolamine, choline 全てを基質として利用できる。過去に PSS1 活性欠失変異として、塩基交換活性完全欠失変異 (E200A) および serine 特異的塩基交換活性減弱変異 (N209A) が報告されており、PSS1*にこれらの変異を導入した際のリン脂質組成を調べた。まず、PSS1*(E200A)と PSS1*(N209A)のいずれでも PSS1*の PS 過剰産生能は消失することが確認された。次に、PS, PI のリン脂質組成を比較すると、PSS1*(E200A)では PS の脂肪酸組成および PI 量はコントロールと比べ変化がなかった。一方、PSS1*(N209A)では PSS1*と同様に PI 量の減少が認められたが、PS の脂肪酸組成変化は起こらなかった。以上から、PSS1*の発現により、PS 量には変化が無いが PS の脂肪酸組成に変化が見られること、N209A 変異は PSS1*による PS の脂肪酸組成変化と PI 量の変化を分離できることがわかった。

4. LMS 型 PSS1 によるアクチン骨格パターン異常は、PS の脂肪酸鎖組成変化に起因する

アクチン骨格関連分子は PS や PI phosphates(PIPs)と相互作用することが知られる。PSS1*によるアクチン骨格パターン異常がどのリン脂質変化に起因するか、PSS1*(E200A)および PSS1*(N209A)を用いて検証した。その結果、いずれの変異体でもアクチンベルトや多数のポドソームクラスターが認められ、アクチン骨格パターンは正常であった。PSS1*(N209A)では PI 量が

減少していたが PS の脂肪酸鎖組成は正常であったことから、PSS1*が引き起こすリン脂質への影響のうち、PS の脂肪酸組成変化によってアクチン骨格パターンの異常が誘導されることが明らかとなった。

【まとめと考察】

本研究において私は、PSS1 のヘテロ顕性変異による PS 分子種の変化が、アクチン骨格パターンの制御を通じて破骨細胞の機能を抑制していることを明らかにし、LMS の発症に破骨細胞の機能破綻が関与している可能性を初めて見出した。

PSS1*発現時には、基質である PC の主要分子種に由来すると考えられる 32:0 や 34:1 等が増加していた。一方で PS の分子種のうち 36:1 は膜内で他の脂質とドメインを形成し、その直下でアクチン骨格形成が制御されることが報告されている。PSS1*発現時には 32:0, 34:1 等が増加し相対的に 36:1 が減少することで、アクチン骨格パターンの制御が破綻している可能性がある。