

審査の結果の要旨

氏名 小野 喬

網膜色素変性症は日本における視覚障害の原因の第2位を占める難病であり、遺伝性網脈絡膜疾患で最も頻度が高い。近年、全身性神経疾患を伴う遺伝性網膜色素変性症の複数家系で共通して、細胞内酵素 iPLA₂/PNPLA ファミリーのうちオーファン酵素である PNPLA6 の点変異が報告され、PNPLA6-related disorders と位置付けられ注目されている。これらの患者に共通して認められる PNPLA6 点変異の大部分は酵素活性の阻害型変異に相当することから、本病態は PNPLA6 の機能喪失に基づくものと推察される。PNPLA6 は他の PLA₂ 分子種とは異なり、PLA₂ の産物であるリゾリン脂質を基質として分解するリゾホスホリパーゼ活性を示すことが報告されていたが、その細胞内での酵素活性ならびに網膜における機能や生物学的意義は明らかではなかった。本研究は、PNPLA6 が始動する未知の脂質代謝と網膜機能維持のための調節機構について解析したものである。

(1) PNPLA6 の酵素活性

ヒトおよびマウスの眼において、PNPLA6 はヒト網膜色素上皮細胞に主に発現していた。ヒト網膜色素上皮細胞 ARPE-19 を用いたリポドミクス解析により、本酵素はリン脂質からリゾリン脂質を経てグリセロホスホコリンを生じるホスホリパーゼ B 活性（ホスホリパーゼ A+リゾホスホリパーゼ）を持つことが示唆された。すなわち、PNPLA6 過剰発現細胞では、ホスホリパーゼ A+リゾホスホリパーゼ活性によりホスファチジルコリン（PC）とリゾホスファチジルコリン（LPC）がともに対照細胞と比べて著減した。一方で、PNPLA6 のノックダウン細胞ではリゾホスホリパーゼ活性の低下のため LPC が増加し、その下流の代謝物であるグリセロホスホコリン、コリン、ホスホコリン、CDP-コリンが減少した。

(2) *Pnpla6* 欠損マウスにおける網膜変性

全身および眼局所的な *Pnpla6* 欠損マウスにおいて、網膜色素変性症様の網膜変性が生じ、光に対する応答能の低下が認められた。すなわち、*Pnpla6* 欠損マウスの眼において、網膜色素上皮細胞と視細胞の形態異常やミトコンドリア異常を認め、網膜が菲薄化した。コリン溶液を点眼することで *Pnpla6* 欠損マウスが呈する網膜変性は病態が改善したことから、PNPLA6 の下流で動員されるコリンが網膜の恒常性の維持に関わることが示唆された。さらに、このマウスは酸化ストレスによる網膜変性を起こしやすく、網膜が脆弱化していた。これらの結果から、PNPLA6 は網膜の恒常性維持や適応修復に関わり、本酵素の機能不全により網膜は脆弱化し、変性が進行すると推察された。

(3) PNPLA6 欠損による網膜色素上皮細胞の異常

PNPLA6 は網膜色素上皮細胞において細胞増殖や細胞接着に関与しており、PNPLA6 のノックダウン細胞は細胞増殖が抑制され、タイトジャンクションが異常を示して接着能が低下した。これらの異常は培養液へのコリンの補充によりレスキューされた。本ノックダウン細胞ではミトコンドリアの形態異常も認められ、ATP 合成が低下していた。コリンから PC を生合成する Kennedy 経路に関わる酵素群をノックダウンすると、PNPLA6 ノックダウン細胞の場合と同様に細胞増殖が抑制された。以上の結果から、PNPLA6 による PC の分解により取り出された内因性コリンが PC の新規合成にリサイクルされることが網膜色素上皮細胞の増殖に関与するものと考えられた。

(4) PNPLA6 による視細胞の調節

本研究では、PNPLA6 により動員されるコリンが、網膜色素上皮細胞から隣接する視細胞へと供給されることを想定した。マウス視細胞 661W は、培地に含まれるコリンの欠乏により数多くの遺伝子発現が変化し、細胞死の亢進と増殖の低下を生じた。このことから、PNPLA6 は網膜色素上皮細胞から視細胞へのコリンの供給を通じて視細胞の恒常性を調節すること、および *Pnpla6* 欠損マウスではこのコリンの細胞間供給が途絶えることにより視細胞が変性する可能性が示唆された。

(5) PNPLA6 の疾患変異による機能喪失

ヒトにおける網膜色素変性症 (PNPLA6-related disorders) で認められる PNPLA6 の疾患変異により、PNPLA6 の機能が喪失することが示唆された。ホモロジーモデリング法による立体構造解析から、PNPLA6 の変異体では、酵素活性ドメインを調節する lid 構造や、セカンドメッセンジャーの結合ドメインが影響されて活性が失われることが予測された。

結論として、PNPLA6 はホスホリパーゼ B 活性を有するユニークな脂質代謝酵素であり、PC から内因性コリンの動員を介して上皮細胞と視細胞の相互作用に関わり、網膜の恒常性の維持に重要な役割を担うものと推察された。本研究は、現在は治療手段の無い網膜色素変性症に対するコリン投与の治療応用性を示唆するものであり、眼科学領域の新しい治療シーズ創出における学問的基盤となると考えられる。

よって本論文は博士 (医 学) の学位請求論文として合格と認められる。