

博士論文（要約）

リン脂質代謝酵素 PNPLA6 は
網膜の恒常性維持と適応修復に関与する

小野 喬

【目的】

難病指定されている網膜色素変性症は、視細胞と網膜色素上皮細胞の機能がともに障害され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、有効な治療法は確立されていない。本疾病はこれまでに 100 種類以上の原因遺伝子が同定されている。私は本研究において、この中に本病態解明の鍵を握る分子機序が隠れていることを想定し、脂質代謝酵素の一群のうち、グロセロリン脂質を加水分解して脂肪酸とリゾリン脂質を遊離するホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) を基軸に、脂質の視点から網膜色素変性症の病態解明に取り組んだ。

PLA₂ 分子群には、類縁分子を含めると 50 種類を超える分子種が存在する。このうち、カルシウム非依存性 PLA₂ (iPLA₂/PNPLA) ファミリーに属する PNPLA6 の遺伝子多型が、網膜色素変性症や神経障害、運動失調などを伴う複数の遺伝性網膜変性疾患で報告され、PNPLA6-related disorders と総称されている。マウスにおける *Pnpla6* の全身的欠損は胎生期に致死的な異常をもたらし、神経特異的欠損は神経変性を生じることが報告され、PNPLA6 は生命活動を営む上で不可欠な脂質代謝を担うことが示唆されているものの、生体内において本酵素の基質となる脂質やその代謝産物、さらにそれが担う細胞応答制御の分子機序はほとんど未解明である。そこで本研究では、網膜において PNPLA6 が関与する未知の脂質代謝と網膜制御メカニズム、ならびに、本酵素の機能異常が網膜変性をもたらす分子機序を解明することを目的とした。

【方法】

本研究では、①網膜における PNPLA6 の発現、②酵素レベルにおいて PNPLA6 の担う脂質代謝、③細胞レベルにおける PNPLA6 の過剰発現あるいは発現抑制、④個体レベルにおいて *Pnpla6* 欠損マウスが呈する網膜に関する表現型について、多角的に解析を行った。

① PNPLA6 の発現： ヒト及びマウスの網膜における PNPLA6 の発現を、免疫染色や定量的 PCR により解析した。

② PLPLA6 の酵素活性： PNPLA6 の過剰発現や発現抑制、欠損させた細胞・組織を用いた脂質または低分子化合物のメタボローム解析により、PNPLA6 の基質や産物を探索した。

③ 細胞レベルの解析： ヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19) やマウス視細胞株 (661W) の細胞形態、増殖などの細胞応答に対する PNPLA6 の過剰発現や発現抑制の影響、PNPLA6 により動員される候補産物の添加の効果について、電子顕微鏡、定量的 PCR、免疫染色、などにより解析した。さらに、遺伝子発現、細胞内代謝、脂質プロファイリングに関する統合的オミクス解析を行い、PNPLA6 が関わる代謝系の包括的解析を行った。

④ *Pnpla6* 欠損マウスの解析： タモキシフェン誘導性の *Pnpla6* 欠損マウス

(*Pnpla6*^{fl/fl}*CAG-CreER*) 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、全身性もしくは眼局所で *Pnpla6* を欠損させ、ヒストロジーや免疫染色、電子顕微鏡を用いた網膜組織の構造解析により網膜変性を評価した。

【結果】

(1) PNPLA6 の発現： ヒト及びマウス網膜を用いた免疫染色において、PNPLA6 は主に網膜色素上皮細胞に発現していた。マウス眼組織の分画を作成して *Pnpla6* mRNA を定量的 PCR により解析した結果、*Pnpla6* の発現は網膜色素上皮細胞に最も高く認められた。これらの結果から、網膜において PNPLA6 は主に網膜色素上皮細胞において機能していると考えられた。

(2) PNPLA6 の酵素活性： PNPLA6 を強制発現またはノックダウンさせた ARPE-19 細胞を用いて、LC-MS/MS によるリポミクス解析を行った。その結果、過剰発現細胞では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) のほぼ全ての分子種が対照細胞よりも減少し、*sn*-1 位及び *sn*-2 位に結合しているいずれの脂肪酸も切り出されているものと考えられた。反対に、ノックダウン細胞では脂肪酸種によらず PC の全分子種が増加し、LPC の代謝産物であるグロセロホスホコリン (GPC) やそのさらなる代謝物であるコリン、そしてこのコリンを原料にグリセロリン脂質の新規合成を担う Kennedy 経路の中間産物であるホスホコリンや CDP-コリンがいずれも減少した。これらの結果から、PNPLA6 はグリセロリン脂質 PC あるいは LPC の *sn*-1 位と *sn*-2 位の脂

肪酸を切り出すホスホリパーゼ B (PLB)としての活性を持ち、この下流でコリンの動員に関わることが示唆された。

(3) *Pnpla6* 欠損マウスの表現型: *Pnpla6* 全身欠損マウスは胎生致死であるため、タモキシフェン誘導型 *Pnpla6* 欠損マウスを利用した。タモキシフェンの腹腔内または点眼投与により *Pnpla6* を成体において全身的または眼局所で欠損させた場合、いずれも網膜色素上皮細胞層と視細胞層の異常が認められた。電子顕微鏡により欠損マウスの網膜の超微細形態を観察すると、網膜の菲薄化、網膜色素細胞の縮小やミトコンドリアの変性、視細胞(内節・外節)の変性、外節の disc 構造の解離、ミトコンドリアの変性などの異常を生じていた。さらに、ヨウ素酸ナトリウム点眼による酸化ストレスにより網膜損傷を人為的に惹起した場合、欠損マウスでは進行性の網膜変性が対照マウスと比較して増悪した。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、本酵素の機能不全は網膜の脆弱化と進行性の変性を招くものと推察された。さらに、欠損マウスが呈するこれらの網膜変性はコリンの点眼により病態が改善し、PNPLA6 の下流で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。

(4) PNPLA6 による網膜上皮細胞の調節: マイクロアレイ解析の結果、PNPLA6 のノックダウンにより網膜色素上皮細胞 (ARPE-19) の細胞増殖や接着に関わる遺伝子群の発現が主に変化した。ノックダウン細胞では細胞内コリンが減少するとともに、増殖

が低下した。このノックダウン細胞におけるコリンの減少と増殖の低下は、培養液中にコリンを過剰供給することにより対照細胞と同程度まで回復した。ノックダウン細胞ではミトコンドリアの形態に異常を生じ、膜電位が低下していた。細胞外フラックスアナライザーを用いて検討したところ、ノックダウン細胞ではミトコンドリア呼吸が低減していた。このことと合致して、低分子メタボローム解析より、ノックダウン細胞では細胞内代謝が大きく変化しており、ミトコンドリアの TCA 回路に関連する代謝物や、解糖系、ペントースリン酸回路、核酸代謝に関わる代謝物が減少していた。これらの結果から、網膜色素上皮細胞において PNPLA6 は膜グリセロリン脂質 (PC) の異化作用を通じて内因性のコリンの動員に関わり、エネルギー産生、増殖や上皮機能を制御することが示唆された。

(5) PNPLA6 下流の代謝フロー： GPC を代謝してコリンを生じる GDE (GDE1-7) の全アイズアインについて、それぞれノックダウン細胞を解析した結果、GDE1、GDE2、GDE5 のノックダウンにより細胞内コリンの減少と増殖の低下が認められ、培地へのコリンの補充によりレスキューされた。このことから、網膜色素上皮細胞においてこれらの GDE が PNPLA6 の下流で内因性コリンの動員に関わることを示唆された。コリンは Kennedy 経路を介してグリセロリン脂質の *de novo* 合成に利用される。Kennedy 経路に関わる ChK α (コリンリン酸化酵素)、PCYT1/CCT- α (CDP-コリン合成酵素)、CHPT1 (コリンリン酸基転移酵素) のノックダウン ARPE-19 細胞では、いずれも細胞増

殖の低下が認められた。この時、細胞内にはコリンが滞留し、培地にコリンを補充しても細胞増殖の低下は回復しなかった。したがって、PNPLA6の下流で動員されるコリンが Kennedy 経路を通じて PC の新規合成(膜の新陳代謝)に利用されることが細胞増殖に重要であることが示唆された。

(6) PNPLA6による視細胞の調節： 視細胞周囲には栄養血管が存在しないため、視細胞が必要とする多くのイオンや代謝物質は網膜色素上皮細胞から供給される。私は、網膜色素上皮細胞において PNPLA6 がグリセロリン脂質 PC の異化作用を通じて動員されるコリンが、細胞間相互作用により隣接する視細胞へと供給されることを想定し、これを検証した。視細胞(661W)は、培地中のコリンを欠乏させることにより、数多くの遺伝子の発現が変化するとともに、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、*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ことが予想された。

【考察】

網膜において、PNPLA6 は網膜色素上皮細胞において PLB として働き、PC の異化作用を通じて内因性コリンを動員し、PC の新規合成を促すことにより、上皮細胞の機能と視細胞との相互作用を調節することが明らかとなった。PNPLA6 の機能不全により

コリンの供給が途絶えると、網膜色素上皮細胞及び視細胞の恒常性が乱れ、進行性の網膜変性を生じるものと考えられた。本研究は、未解明であった PNPLA6-related disorders の分子機序の一端を解明したものであると同時に、PNPLA6 によるグリセロリン脂質の新陳代謝の重要性を初めて明らかにしたものである。