

59. コレステロール代謝破綻による繊毛病発症機構の解明

松浦 伸也

広島大学 原爆放射線医科学研究所 放射線ゲノム疾患研究分野

Key words : コレステロール, 繊毛病, シグナル伝達, Sonic Hedgehog

緒言

一次繊毛は、静止期の細胞表面に1本の毛様に発達する微小管性の突起構造であり、細胞増殖や細胞分化を担う細胞外シグナルのセンサーとして、個体発生や組織幹細胞の維持などを司る細胞小器官である。一次繊毛に関連する遺伝子群の先天的欠損症、多発性腎嚢胞や多指症などの発生異常に特徴づけられる一連の繊毛病 (Ciliopathy) を発症する。繊毛病は約 200 存在することが概算されているが¹⁾、現在病因・病態が未解明な繊毛病 (オーファン繊毛病) は 130 程度ある。我々は、これまでにオーファン繊毛病の細胞生物学研究を通じて、有糸分裂に必要な分子群による繊毛形成制御機構を明らかにしてきた²⁻⁴⁾。

Smith-Lemli-Opitz (SLO) 症候群は、コレステロール欠乏に起因する性腺発達不全や精神遅滞を伴う小頭症に特徴づけられる先天奇形症候群である。1998 年に本疾患の原因遺伝子としてコレステロール生合成経路の最終段階を担う 7-デヒドロコレステロール還元酵素をコードする *DHCR7* 遺伝子が同定され^{5,6)}、その後、我々は日本人症例に特徴的な *DHCR7* 遺伝子のミスセンス変異を報告した⁷⁾。本疾患は臨床的な重篤度によって典型 SLOS-I と重症型 SLOS-II に分類される。SLOS-II は性腺発達不全などに加えて多発性腎嚢胞や多指症を合併しており、その臨床症状が代表的な繊毛病である Meckel-Gruber 症候群と酷似しており鑑別診断が必要となる。これらの知見から、われわれは、SLO 症候群が繊毛病の一つであることの着想を得て、繊毛におけるコレステロールの生理機能とその破綻による繊毛病発症機構の解明を研究目的として本研究を実施した。

方法

健常者および SLO 症候群患者から採取した初代皮膚線維芽細胞を 48 時間血清飢餓培養して、一次繊毛形成を誘導した。コレステロール欠乏による繊毛形成への効果を評価する目的で、一次繊毛マーカーである抗アセチル化チューブリン抗体による蛍光免疫染色を行い、一次繊毛形成集団を計測した。次に、繊毛関連シグナルである Sonic Hedgehog (Shh) シグナルに着目して、コレステロール欠乏による繊毛機能への影響を評価した。具体的には、各細胞を $1\mu\text{M}$ SAG (Shh agonist) で 24 時間処理した後に、Shh シグナルの活性化受容体 Smoothened (Smo) の繊毛への局在を抗 Smo 抗体による免疫染色により解析した。また、Shh シグナル応答遺伝子である *Gli1* 遺伝子の転写量を定量的 RT-PCR 法により測定した。さらに、SLO 症候群患者細胞の培養液中にコレステロールを添加して、Smo の繊毛局在に対する効果を免疫染色によって検討した。

結果

1. SLO 症候群の繊毛形成

48 時間の血清飢餓培養を行い G0 期に同調した健常者および SLO 症候群患者由来皮膚線維芽細胞を抗アセチル化チューブリン抗体 (一次繊毛マーカー) と抗 Pericentrin 抗体 (中心体マーカー) を用いた免疫染色により、繊毛形成率を計測した結果を図 1 に示す。

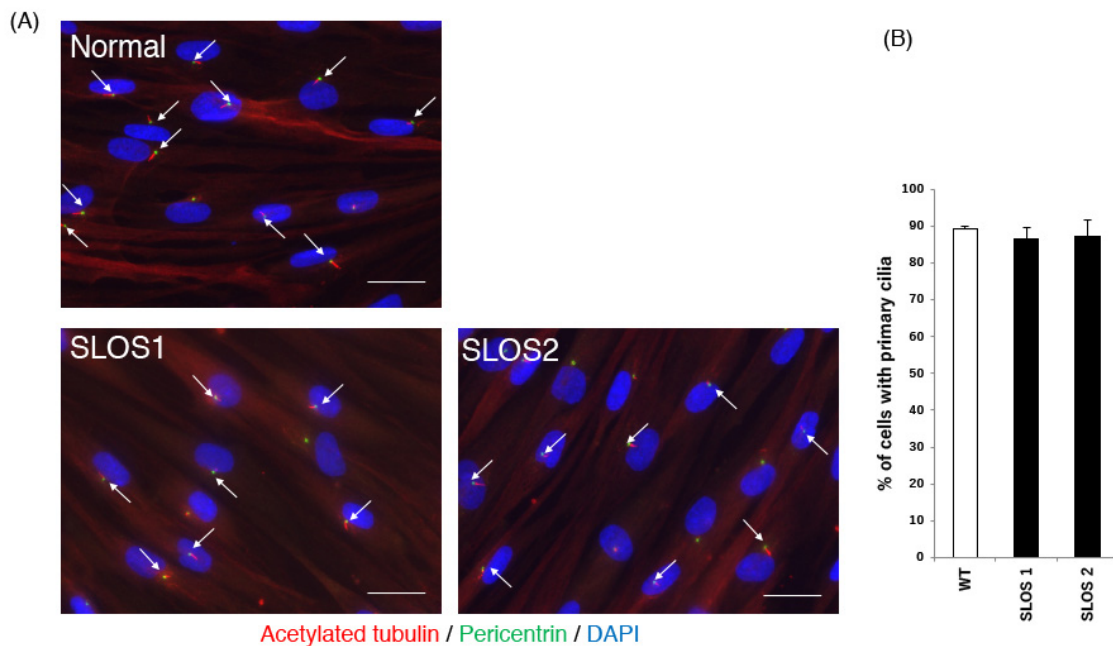


図1. 健常者および SLO 症候群患者細胞の繊毛形成率

(A) G0 期に同調した健常者 (Normal) および SLO 症候群患者細胞 (SLOS1 および SLOS2) の一次繊毛の免疫染色像。スケールバー: $10\ \mu\text{m}$ 。

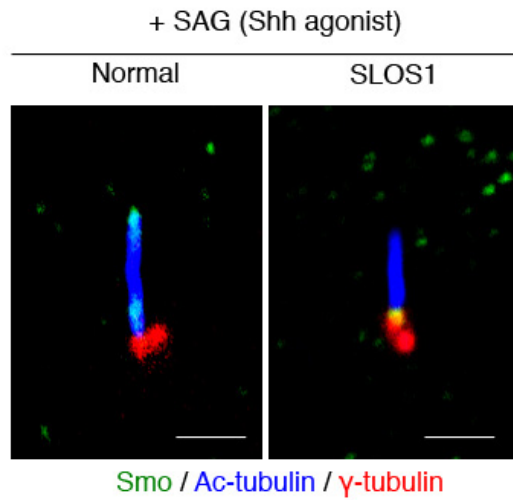
(B) 繊毛形成率。エラーバー: 標準偏差 (SD)。

SLO 症候群の繊毛形成率は健常者細胞と同程度であることが確認された。また、走査型電子顕微鏡を用いた超微細形態観察から、健常者細胞と SLO 症候群細胞の繊毛構造に大きな違いは認められなかった。これらの結果から、コレステロールは繊毛形成には必須ではないことが示された。

2. SLO 症候群患者細胞の Shh シグナル応答能の低下

Shh シグナルのアゴニスト SAG ($1\ \mu\text{M}$) を 24 時間処理した健常者および SLO 症候群患者細胞の Smo 受容体の細胞内局在を免疫染色によって評価した結果を図 2 に示す。健常者細胞は SAG 依存的に Smo 受容体が一次繊毛に局在した。一方、SLO 症候群患者細胞では、Smo 受容体への一次繊毛の集積が著しく阻害されていた。

(A)



(B)

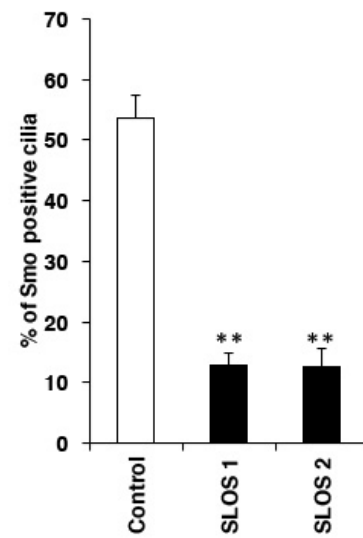


図 2. 健常者および SLO 症候群患者細胞の Smo 受容体の一次繊毛への集積

(A) $1 \mu\text{M}$ SAG 処理した健常者細胞および SLO 症候群患者細胞の Smo 受容体の免疫染色像。スケールバー： $3 \mu\text{m}$ 。

(B) Smo 受容体の一次繊毛への集積率。エラーバー：標準偏差 (SD)。 t -TEST。

** : $p < 0.01$ 。

Smo 受容体の一次繊毛の局在は、Shh シグナルの活性化に必要であることが知られている。そこで、Shh シグナル応答遺伝子 *Gli1* 遺伝子の転写量を定量的 RT-PCR 法で測定した結果を図 3 に示す。

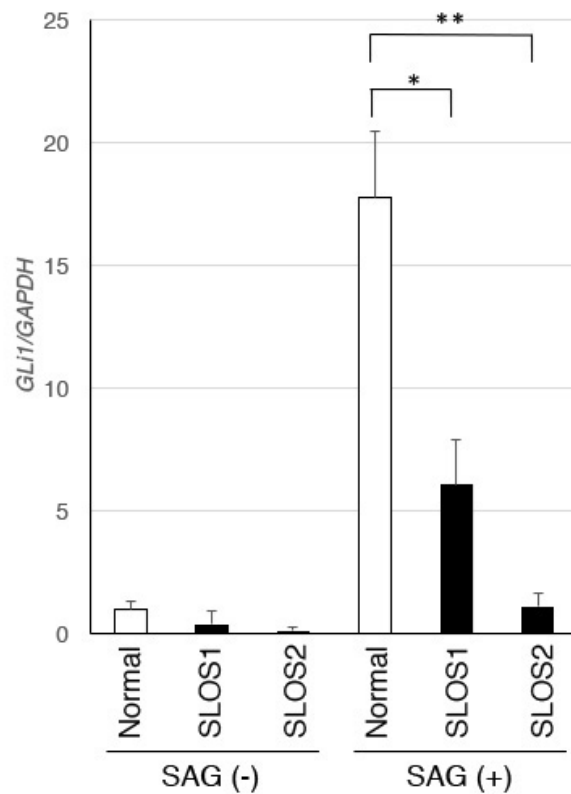


図3. 健常者およびSLO症候群患者細胞のShhシグナル応答遺伝子の定量的RT-PCR
 エラーバー：標準偏差 (SD)。tTEST。*: $p < 0.05$ 、 **: $p < 0.01$ 。

健常者細胞ではSAG依存的に*Gli1*遺伝子の発現が17.7倍に亢進するのに対して、SLO症候群患者細胞では1.1~6.1倍の発現誘導にとどまっていた。これらのことから、SLO症候群患者細胞はShhシグナルの応答能が低下していることが明らかになった。

3. コレステロール補充によるSLO症候群の繊毛機能の回復

健常者細胞およびSLO症候群患者細胞の培養液中にコレステロールを添加して、Smo受容体の一次繊毛への集積を免疫染色によって評価した結果を図4に示す。

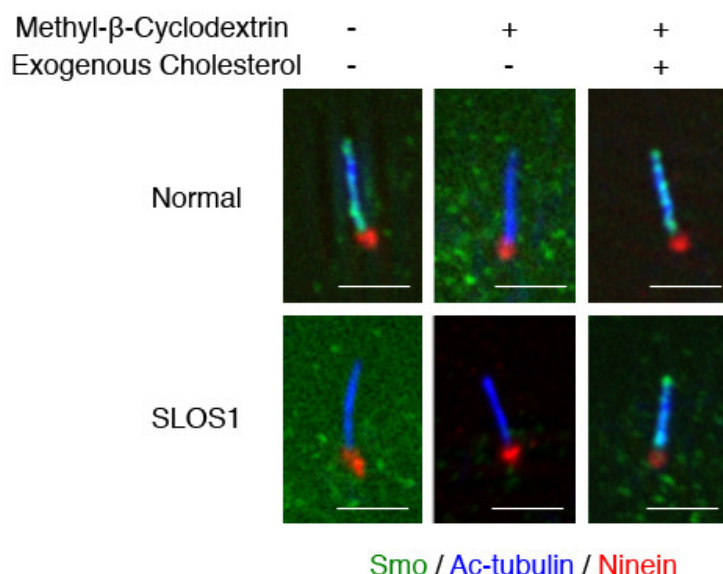


図4. コレステロール添加による Smo 受容体の一次繊毛への集積

Methyl- β -cyclodextrin 処理した後、100 μ M コレステロールを添加した際の健常者細胞および SLO 症候群患者細胞の Smo 受容体の免疫染色像。スケールバー：6 μ m。

細胞内コレステロールを除去する methyl- β -cyclodextrin で処理した場合、健常者細胞の Smo 受容体の一次繊毛への局在も阻害された。しかし、100 μ M コレステロールを培養液に補充することによって、methyl- β -cyclodextrin 処理した健常者細胞、SLO 症候群細胞においても Smo の一次繊毛への集積が回復することが示された。

考 察

本研究の結果、SLO 症候群におけるコレステロール欠乏は、Smo 受容体の一次繊毛への集積を阻害して Shh シグナル応答能の低下を引き起こすことで繊毛病を発症することが示唆された。興味深いことに、最近、SLO 症候群のモデルマウス (*DHCR7* 遺伝子ノックアウトマウス) を用いた研究でも Smo 受容体の一次繊毛への局在障害が報告され⁸⁾、コレステロール欠乏による繊毛病発症の新たな疾患概念が提唱されつつある。繊毛におけるコレステロールの直接的な標的の一つとして考えられる Smo 受容体は7回膜貫通ドメインをもつ GPCR (G protein-coupled receptor) として知られているが、最近 Smo 受容体の細胞外側に位置するシステインリッチドメイン (CRD) が直接的にコレステロールに結合することが報告された⁹⁾。Smo 受容体の一次繊毛への集積機序として、コレステロールに結合した Smo 受容体が繊毛膜に侵入するのか、Smo 受容体が繊毛膜に侵入した後にコレステロールと結合して繊毛膜内に停滞するのかについての直接的な証明はなされておらず、今後解決すべき問題であると考えられる。しかし、細胞内のコレステロール量は一定に保たれており、その90%は形質膜に存在していることを考えると、コレステロール結合型 Smo 受容体が積極的に繊毛膜に侵入していることは考えにくい。高速度の分子イメージング技術を用いることによって Smo 受容体の挙動を直接的に追跡することができれば、Smo 受容体の繊毛集積を介した Shh シグナルの活性化機構が明らかになると考えられる。

本研究では、SLO 症候群患者細胞にコレステロールを補充することによって Smo 受容体の一次繊毛への局在が回復することから、コレステロール補充療法は SLO 症候群の繊毛病治療にとって有望なアプローチと考えられる。コレステロールの分子標的として Smo 受容体以外の繊毛膜タンパク質の探索は、安全なコレステロール補充療法の開発にとって重要な研究課題であると考えられる。これまでにコレステロール結合ドメインをもつ繊毛膜タンパク質として Shh シグナル抑制型受容体 Patched1 が知られているが、SLO 症候群患者細胞での Patched1 受容体の局在および量的変化は確認されなかった。最近、アルキンとアジド化合物を利用した Click-Chemistry を用いて、コレステロール結合分子の探索が行われて Smo 受容体が単離された¹⁰⁾。このような新たな手法を用いることによって、新たなコレステロールの標的となる繊毛膜タンパク質の探索を行っていく予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、広島大学原爆放射線医科学研究所の宮本達雄講師、細羽康介研究員である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Baker K, Beales PL. Making sense of cilia in disease: the human ciliopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2009 ;151C (4):281-95. doi: 10.1002/ajmg.c.30231. PMID:19876933
- 2) Miyamoto T, Porazinski S, Wang H, Borovina A, Ciruna B, Shimizu A, Kajii T, Kikuchi A, Furutani-Seiki M, Matsuura S. Insufficiency of BUBR1, a mitotic spindle checkpoint regulator, causes impaired ciliogenesis in vertebrates. *Hum Mol Genet.* 2011;20(10):2058-70. doi: 10.1093/hmg/ddr090. PMID:21389084
- 3) Miyamoto T, Hosoba K, Ochiai H, Royba E, Izumi H, Sakuma T, Yamamoto T, Dynlacht BD, Matsuura S. The Microtubule-Depolymerizing Activity of a Mitotic Kinesin Protein KIF2A Drives Primary Cilia Disassembly Coupled with Cell Proliferation. *Cell Rep.* 2015; 10:664-673. doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.003. PMID:25660017
- 4) Miyamoto T, Matsuura S. Ciliopathy in PCS (MVA) syndrome. *Oncotarget.* 2015;6(28):24582-3. doi: 10.18632/oncotarget.5244. PMID:26309087
- 5) Wassif CA, Maslen C, Kachilele-Linjewile S, Lin D, Linck LM, Connor WE, Steiner RD, Porter FD. Mutations in the human sterol delta7-reductase gene at 11q12-13 cause Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Hum Genet.* 1998;63(1):55-62. PMID:9634533
- 6) Fitzky BU, Witsch-Baumgartner M, Erdel M, Lee JN, Paik YK, Glossmann H, Utermann G, Moebius FF. Mutations in the Delta7-sterol reductase gene in patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 ;95(14):8181-6. PMID:9653161
- 7) Matsumoto Y, Morishima K, Honda A, Watabe S, Yamamoto M, Hara M, Hasui M, Saito C, Takayanagi T, Yamanaka T, Saito N, Kudo H, Okamoto N, Tsukahara M, Matsuura S. R352Q mutation of the DHCR7 gene is common among Japanese Smith-Lemli-Opitz syndrome patients. *J Hum Genet.* 2005;50(7):353-6. PMID:16044199
- 8) Blassberg R, Macrae JL, Briscoe J, Jacob J. Reduced cholesterol levels impair Smoothed activation in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Hum Mol Genet.* 2016;25(4):693-705. doi: 10.1093/hmg/ddv507. PMID:26685159
- 9) Huang P, Nedelcu D, Watanabe M, Jao C, Kim Y, Liu J, Salic A. Cellular Cholesterol Directly Activates Smoothed in Hedgehog Signaling. *Cell.* 2016;166(5):1176-1187.e14. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.003.PMID:27545348
- 10) Xiao X, Tang JJ, Peng C, Wang Y, Fu L, Qiu ZP, Xiong Y, Yang LF, Cui HW, He XL, Yin L, Qi W, Wong CC, Zhao Y, Li BL, Qiu WW, Song BL. Cholesterol Modification of Smoothed Is Required for Hedgehog Signaling. *Mol Cell.* 2017;66(1):154-162.e10. doi:10.1016/j.molcel.2017.02.015. PMID:28344083