

Title	Cathepsin D Deficiency Induces Lysosomal Storage with Ceroid Lipofuscin in Mouse CNS Neurons
Author(s)	小池, 正人
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43713">https://hdl.handle.net/11094/43713</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	小池 正人
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16798 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Cathepsin D Deficiency Induces Lysosomal Storage with Ceroid Lipofuscin in Mouse CNS Neurons (カテプシンDの欠損により中枢神経系においてセロイドリポフスチンが蓄積する)
論文審査委員	(主査) 教授 内山 安男  (副査) 教授 津本 忠治 教授 三木 直正

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

リソゾームにおける代表的なアスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシンDは、中枢神経系に豊富に存在するものの、その役割については不明な点が多い。1995年 Saftig らがカテプシンD遺伝子欠損マウス（以下CD-/-マウス）を作製し、発育遅滞、リンパ球の減少、小腸領域の壊死を伴い、日齢26±1日で死亡することを報告したが、他の臓器については異常が認められないとした。そこで本研究では同酵素の中枢神経系での機能を探るため、CD-/-マウスの中枢神経系の解析を行った。

#### 【方法ならびに成績】

CD-/-マウスはドイツゲッティンゲン大学の von Figura 教授より譲り受けた。同マウスの行動を詳細に観察した結果、上記性質に加え生後20日頃より低成長に加えて体幹の震え・尾の硬直・歩行異常などの神経症状を有することが明らかとなった。海馬のスライス標本を作製し細胞外電位を測定したところCD-/-マウスのCA3領域を源とする自発的なburst dischargeが出現することが分かった。さらに光に対する反応性に乏しいことより視覚異常の存在も示唆された。

終末期のCD-/-マウスと対照群（以下CD+/-マウス）の間での中枢神経の肉眼レベルでの差異は見出されなかった。次にCD-/-マウスの終末期より得た中枢組織を光学顕微鏡により観察したところ大脳皮質・海馬・視床・小脳・脊髄・網膜のいずれの部位の神経細胞にも細胞質に顆粒状の封入体が蓄積しているのが観察された。このことより、中枢組織全体の神経細胞が変化を受けていることが示唆された。また、終末期の同マウスの網膜は厚さが対照群の半分にまで萎縮しており、光受容体の消失・外顆粒層の薄層化が顕著であった。外顆粒層では生後9日より典型的なアポトーシスに陥った細胞が出現し、日齢と共にその数も増加することが薄層化の原因であることが明らかとなった。

次にこの細胞内封入体の本態を探るため終末期の大脳皮質や海馬をはじめ様々な領域の神経細胞を電子顕微鏡にて観察した。神経細胞の細胞質にはオートファジー小体やリソゾーム様構造物が過剰に蓄積した像が観察された。神経細胞内の同構造物の数は少ないが出生直後から認められ、日齢とともに増加することが分かった。リソゾーム様構造物は自家蛍光を有し、神経病理学的には、GORD (granular osmiophilic deposits)、あるいはFP (fingerprint

profile) と言われる形態を示した。これは CD-/-マウス脳の神経細胞にセロイドリポフスチンが蓄積することを示唆するものである。近年の研究からセロイドリポフスチンの主要な構成物質はミトコンドリア内膜のF<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATPaseのサブユニットcであることから、同物質の局在を免疫組織細胞化学的に解析した。その結果対照群のパラフィン切片では免疫反応性が全く認められなかったのに対し、CD-/-マウスの神経細胞中に顆粒状の強い免疫陽性反応が見られた。凍結超薄切片を用いた免疫電顕により、同欠損マウスの神経細胞内の電子密度が高くカテプシンB陽性のリソゾームにサブユニットcが局在することが明らかとなった。脳組織の抽出物のウエスタンブロットにより、生後20日以後欠損マウス脳にサブユニットcが有意に上昇することが分かった。また、サブユニットcの蓄積は脳組織ばかりでなく肝、腎、心組織の細胞にも陽性であった。サブユニットcの分解に必須とされるリソゾーム酵素 tripeptidyl peptidase I の中枢組織における活性と蛋白濃度を検討したところ、CD-/-マウス脳では対照群に比べて有意に高いことが分かった。

#### 【総括】

Saftig らは同マウスの解析よりカテプシンDが非特異的な蛋白分解にとって必ずしも必須ではなく、むしろ生理活性分子のプロセッシングに必須であると結論付けたが、本研究における一連の解析により同酵素が早期より中枢神経組織における蛋白分解系において必須であることが明らかとなった。更にカテプシンDが tripeptidyl peptidase I とともにサブユニットcの分解に直接関与すること、網膜光受容体の生存維持に必須であることが示唆され、CD-/-マウスに認められる所見はリソゾーム病の一種である神経性セロイド様リポフスチン蓄積症 (NCLs/Batten 病) と全く同じ症状を呈することが明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

カテプシンDはリソゾームの代表的な蛋白分解酵素であり、中枢神経系に豊富に存在することが知られていたが、その役割は良く分かっていない。1995年に報告されたカテプシンD欠損マウスの解析結果では、免疫系と消化管の異常が指摘されたのみで、他の臓器では別の酵素がカテプシンDの働きを補っていると推測された。本研究は、中枢神経系での同酵素の役割について、カテプシンD欠損マウスを用いて検討を加えたものである。

同マウスを詳細に観察することにより、生後20日前後より体幹の震えなどの神経症状が認められ、電気生理学的にも海馬 CA3に由来するてんかん波の存在が確認された。詳細な形態学的解析の結果、網膜光受容体の消失、神経細胞体へのオートファゴソームやセロイドリポフスチンの蓄積が明らかとなった。セロイドリポフスチンの構成成分であるミトコンドリアの ATP synthase の subunit c のリソゾームへの蓄積も認められた。以上は小児の代表的な神経変成疾患である神経性セロイドリポフスチン蓄積症 (NCLs/Batten 病) に見い出される特徴と一致していた。また、生化学的解析により subunit c の代謝には、これまで知られていたリソゾーム酵素 tripeptidyl peptidase I のみならずカテプシンDも必須であることが明らかとなった。

本研究は、カテプシンDが中枢神経系のバルクタンパク質分解において必須であることを in vivo で初めて指摘した。同酵素の欠損が小児の代表的な神経変成疾患である神経性セロイドリポフスチン蓄積症と同様の病態を呈し、カテプシンD欠損マウスが同疾患のモデルマウスとして利用できることを示している。

本研究は、中枢神経系におけるリソゾームのもつ役割を考える上で新たな視点を提供するものと評価でき、学位論文として十分な価値があると認められる。