

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第724号	氏名	宮崎周也
審査委員会委員	主査氏名	小林隆志 (印)	
	副査氏名	山本恭子 (印)	
	副査氏名	木村成志 (印)	
論文題目			
DHCR7 links cholesterol synthesis with neuronal development and axonal integrity (DHCR7によるコレステロール合成は神経細胞の発生および軸索の安定性に関与する)			
論文掲載雑誌名			
Biochemical and Biophysical Research Communications			
論文要旨			
<p>コレステロールはステロイドホルモンやビタミン D などの原料となるだけでなく、細胞膜タンパク質の集積に関わる脂質ラフトを調節し、細胞機能を制御するシグナル伝達においても重要とされる。スミス・レムリ・オピッツ症候群 (SLOS) は、7-デヒドロコレステロール (7-DHC) をコレステロールに変換する酵素である DHCR7 の遺伝子変異による常染色体劣性遺伝疾患で、小頭症を伴う精神発達遅滞を発症するが、神経発生・機能の病態メカニズムには不明な点も多い。DHCR7 欠損マウスは呼吸不全により致死的であり詳細な解析は限られる。</p> <p>そこで本研究において体の透明性に優れたゼブラフィッシュを用いて、DHCR7 遺伝子欠損モデルを作製し、SLOS 神経障害の機序を解明することとした。CRISPR/Cas9 システムを用いて、dhcr7 遺伝子ノックアウト (dhcr7^{-/-}) と日本人に多い点変異 (R352Q) に対応するノックインゼブラフィッシュ (dhcr7^{R352Q}) を作製した。dhcr7^{-/-} 個体は脳内コレステロール低下と 7-DHC 上昇を認め、成長障害と小頭症を示した。さらに、神経細胞と神経幹細胞の減少も認め、ミエリン鞘の形成不全が確認された。軸索内にはリソソームが多数観察され、リソソームと密接に関連するオートファジー機構の障害も認められた。dhcr7^{-/-} 個体は、質量分析によりノルエピネフリン、ドーパミン、セロトニンなどの神経伝達物質の増加・蓄積が明らかとなり、行動解析において不安の低下、ADHD に類似した多動性の行動異常の増加、攻撃性の低下が観察された。一方、dhcr7^{R352Q} 個体は脳内 7-DHC 蓄積を認めるも、脳内コレステロール低下、成長障害、小頭症は観察されなかった。本研究によりコレステロールと 7-DHC のバランスが神経幹細胞の維持に重要であることが示された。</p> <p>本研究は、DHCR7 変異ゼブラフィッシュが、SLOS の病態形成機構を解明するための有用な in vivo モデルとなる可能性を示しており、今後のコレステロール代謝の研究に新たな方法論を示したと言える。そのため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 ①・論	第724号	氏名	宮崎周也
審査委員会委員	主査氏名	小林隆志 	
	副査氏名	山本恭子 	
	副査氏名	木村成志 	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. DHCR7ノックアウト (KO) マウスは呼吸不全で出生後まもなく死んでしまうが、SLOS患者でも呼吸障害がおこるのか。おこるのであればその機序を説明しなさい。 2. SLOS患者における、肉眼的および病理組織学的変化の特徴を説明しなさい。 3. ゲノム編集で変異を入れたDHCR7の領域は機能的に重要な部分なのか？また、R355Qとの位置関係を説明しなさい。 4. ADHDモデルのゼブラフィッシュとはどの部分を変異させたものか。DHCR7KOマウスとの違いを説明しなさい。 5. DHCR7KOゼブラフィッシュのDHCR7タンパク質の欠損を示すデータはあるか？ 6. DHCR7 mRNAの発現レベルのデータはKOで発現していないことを証明できているか？ 6. 行動実験において認知機能の評価を行ったか？ 7. 組織学的に軸索の評価を行ったか？その所見を説明しなさい。 8. DHCR7KOゼブラフィッシュの神経細胞やグリア細胞に形態学的変化は認められたか？ 9. DHCR7KOゼブラフィッシュの神経幹細胞の減少は幹細胞の増殖、分化のどちらに影響したか？ 10. コレステロールの低下と7-DHCの増加は、オートファジー・ライソソーム系の機能異常に関連があるのか？ 11. <i>dchr7^{R355Q}</i>では7DHCは蓄積したがコレステロールは低下していなかったことから、魚類にはDHCR7非依存的なコレステロール生合成経路の存在が考えられるのか？ 12. 髄鞘の異常はコレステロールの低下によるものなのか？ 13. シナプス間隙が不明瞭になり、神経伝達物質が増えていることは、多動性の増加、不安の低下、攻撃性の低下を説明できるか？ <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 宮崎 周也

論 文 題 目

DHCR7 links cholesterol synthesis with neuronal development and axonal integrity

(DHCR7によるコレステロール合成は神経細胞の発生および軸索の安定性に関与する)

要 旨

(ア. 緒言)

DHCR7は7-デヒドロコレステロール(7-DHC)をコレステロールに変換する、コレステロール合成の最終段階を担う酵素である。コレステロールはステロイドホルモンやビタミンDなどの原料となるだけでなく、細胞膜タンパク質の集積に関わる脂質ラフトを調節し、細胞機能を制御するシグナル伝達においても重要とされる。スミス・レムリ・オピッツ症候群(SLOS)は、DHCR7遺伝子変異による常染色体劣性遺伝疾患で、小頭症を伴う精神発達遅滞を発症する。SLOSでは自閉的行動、睡眠障害、注意欠陥・多動性障害(ADHD)といった行動異常を頻繁に伴うが、その神経発生・機能の病態メカニズムには不明な点も多い。そこで、体の透明性に優れた小型動物ゼブラフィッシュを用いて、DHCR7遺伝子欠損モデルを作製し、SLOS神経障害の機序を解明することを目的とした。

(イ. 研究対象及び方法 ウ. 結果)

CRISPR/Cas9システムを用いて、*dchr7*遺伝子ノックアウト(*dchr7^{-/-}*)と日本人に多い点変異

(R352Q) に対応するノックインゼブラフィッシュ (*dchr7^{R355Q}*) を作製した。*dchr7^{-/-}* 個体は脳内コレステロール低下と 7-DHC 上昇を認め、成長障害と小頭症を示した。その一方で、*dchr7^{-/R355Q}* 個体は脳内 7-DHC 蓄積を認めるも、脳内コレステロール低下、成長障害、小頭症は観察されなかった。そこでさらに *dchr7^{-/-}* ゼブラフィッシュの解析を進め、神経細胞、神経幹細胞が蛍光標識されたトランスジェニックゼブラフィッシュを用いた解析により神経細胞と神経幹細胞の減少を認め、髄鞘染色および電子顕微鏡を用いた解析ではミエリン鞘の形成不全が確認された。また、電子顕微鏡では軸索内にリソソーム様の異常構造物が多数観察され、実際、リソソーム染色によってリソソームであることが確認された。さらに、ウェスタンブロットによる解析でリソソームと密接に関連するオートファジー機構の障害が示めされた。最後に、質量分析で神経伝達物質の増加・蓄積を認め、行動解析において不安や恐怖への感受性低下、多動性などの ADHD に類似した行動異常が確認された。

(エ. 考察)

コレステロール減少と 7-DHC 上昇により、*in vitro* において神経幹細胞が減少することが報告されており、我々の *in vivo* モデルも同様の表現型を示した。一方で、7-DHC 上昇のみでは表現型が観察されず、コレステロールと 7-DHC のバランスが神経幹細胞の維持に重要であることが示された。SLOS では細胞膜のステロール分画に異常を生じ、膜構造や機能が障害されると報告されている。本モデルにおけるリソソーム蓄積やオートファジー障害も、膜の変性に起因している可能性が考えられる。また、神経伝達物質蓄積と行動異常からは、ADHD と脳内コレステロール合成との関連性も考えられる。

(オ. 結語)

今回我々は DHCR7 変異ゼブラフィッシュを作製し、解析した。このゼブラフィッシュは、SLOS の病態形成におけるメカニズムを解明するために、有用な *in vivo* モデルとなる可能性がある。