

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 胎仔発生および肝コレステロール代謝におけるスクアレン合成酵素の役割  
-スクアレン合成酵素欠損マウスの作出とその性状解析-

氏 名 兎澤 隆一

コレステロールは動物細胞膜の主要構成要素として体内に広く分布するとともに、ステロイドホルモンやビタミン D、胆汁酸合成の前駆体として利用されるなど、生体機能を維持する上で必須な脂質成分である。さらに近年、コレステロールが形態形成、特に神経系の発生において重要な役割を果たしていることも明らかとなっている。すなわち、ヒトにおける奇形症候群や神経系障害の原因として先天性コレステロール合成異常症（メバロン酸キナーゼ欠損症や **Smith-Lemli-Opitz** 症候群、デスモステロール血症など）が同定されるとともに、脊椎動物の体節パターン形成に関与するヘッジホッグ蛋白の機能発現にコレステロールが必須であることが明らかとなっている。その一方で、コレステロールの過度な増加が新たな疾病の原因になることも示されている。例えば、高コレステロール血症は動脈硬化巣の形成や進展を惹起し、心筋梗塞や狭心症といった冠動脈疾患の発症リスクを増大させることが、種々の疫学的調査や薬物介入試験によって明らかにされている。

生体内コレステロールの多くが体内にて生合成されることから、内因性コレステロールの生理的意義を明確化することは、上記の奇形症候群や高コレステロール血症に対するさらなる理解や治療戦略を考慮する上で極めて重要と考えられる。しかしながら、既知のコレステロール合成異常症はいずれもコレステロール合成系の上流あるいは末端酵素に変異

を有するために（下図）、イソプレノイド代謝産物の減少やステロール性中間体の蓄積を伴うことから、病態形成と内因性コレステロール欠乏の関連性は不明確であった。また、コレステロール合成系の上流に作用する HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン薬）は高コレステロール血症治療薬の第一選択薬として頻用されているが、同薬剤はコレステロールのみならず生体にとって重要なイソプレノイド産物の合成も抑制することから、副作用発現との関連が懸念されており、新たな機序を有する治療薬が期待されている。スクアレン合成酵素（以下 SS）は、ファルネシル 2 リン酸よりスクアレンを生成する小胞体膜酵素である。SS はコレステロール合成に特異的な経路の初発酵素であり、コレステロールとイソプレノイド産物を生成する経路の分岐点の直後に位置する。したがって、その特異的欠損および阻害は、イソプレノイド産物の減少やステロール性中間体の蓄積を伴わずにコレステロール合成の低下をもたらすものと考えられる。

以上のような背景から、本研究では遺伝子ターゲティング法を用いた発生工学的手法により SS 欠損マウスを作製することで、胚発生や形態形成における内因性コレステロールの意義を再検証した。また、肝臓および血漿中コレステロール代謝に対する SS 欠損の影響を検討し、SS 阻害薬の有用性について考察をおこなった。

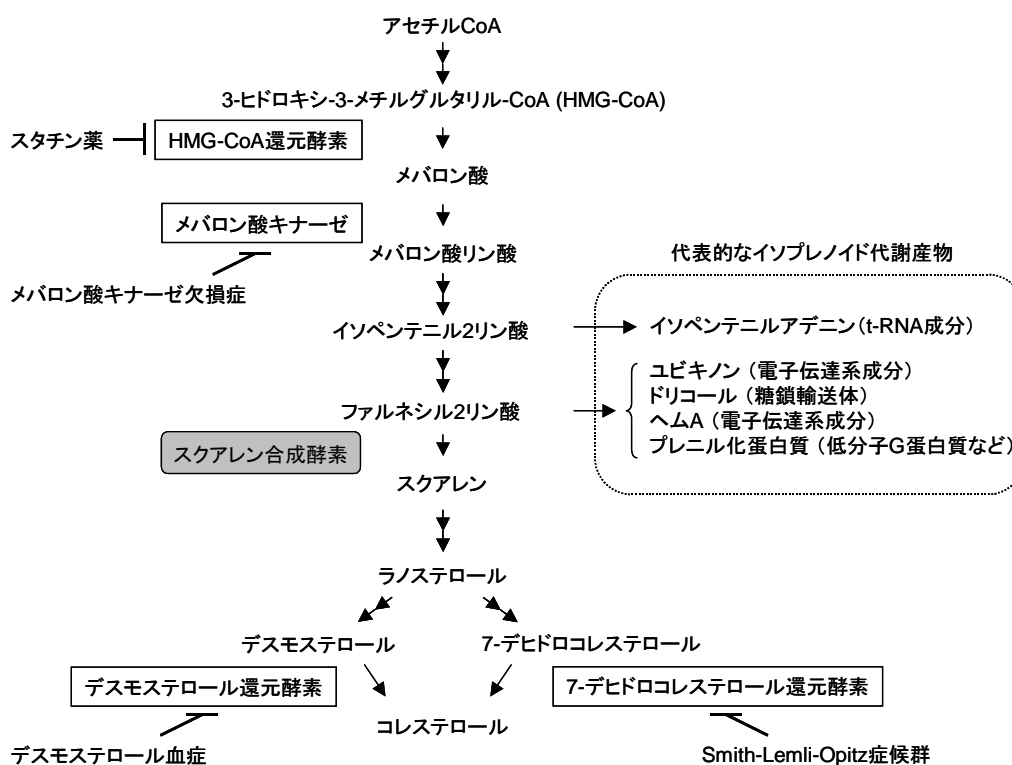


図 コレステロール合成経路とその欠損症

## 【研究結果】

### 結果 1. SSホモ型欠損は胎生致死性であり、神経管閉塞不全を含む形態奇形を惹起する。

SS の酵素活性中心をコードするエクソン 4-5 をネオマイシン耐性遺伝子カセットで置換したターゲティングベクターを構築し、マウス ES 細胞に導入することで SS ヘテロ型欠損マウスを取得した。ヘテロ型接合体同士の交配で得られた産仔にホモ型接合体は認められなかったことから、SS のホモ型欠損は胎生致死性と考えられた。子宮内の胎仔を解析したところ、胎生 9.5-10.5 日までにホモ型接合体が確認された。すなわち、マウスにおいては、内因性コレステロールの合成が抑制された状態においても、妊娠中期まで胎仔発生が維持できる可能性が示唆された。なお、ホモ型接合体胎仔は著しい成長遅延と神経管閉鎖不全による前脳の形成不全を呈していた。病理学的には神経提部に凝集した核を有する神経細胞を認め、アポトーシスの関与が示唆された。これらの観察から、SS 活性が正常な胚発生、特に神経系発生に必須であることが示された。

### 結果 2. SSホモ接合体の胎生致死性は、母体へのスクアレン補充や食餌性および遺伝性高コレステロール血症の導入によって回復しない。

ホモ型接合体の胎生致死性がコレステロール欠乏に起因している可能性を検証する目的で、高コレステロール食負荷あるいはアポ E 欠損変異導入により妊娠親に高コレステロール血症を惹起し、ホモ型接合体産仔の取得を試みた。これらの条件において、妊娠親の血漿総コレステロール値は、普通食を負荷した SS ヘテロ型/アポ E 野生型マウスに比べ 3~17 倍まで上昇したが、いずれの条件においても、ホモ型接合体産仔は得られなかった。これらの成績は、妊娠中期以降の胎仔発生に利用されるコレステロールは母体由来コレステロールのみでは不十分であることを示唆した。一方、高スクアレン食を負荷したヘテロ型接合体マウスの交配においてもホモ型接合体が得られなかったことから、ホモ型欠損マウスで観察される胎生致死性は、内因性コレステロール欠乏に由来するだけではなく、SS 欠損に起因して蓄積するファルネシル 2 リン酸およびその代謝物が胎仔に致死的に作用した可能性も推察された。

### 結果 3. SSヘテロ型欠損は肝臓中SS活性を半減させるが、肝臓中のコレステロール合成活性およびコレステロール反応性遺伝子群の発現に影響を与えない。

ヘテロ型接合体における肝臓および精巣中 SS 酵素活性は、野生型の約 50%に低下していたが、外見上正常であり、生殖能にも異常は認められなかった。また、肝臓中のコレステロール合成活性にも変化は認められなかった。さらに、ヘテロ型接合体肝臓におけるコレステロール感受性遺伝子群について mRNA 発現量を検討したところ、SS mRNA 発現量は野生型の約 50%に減少していたが、その他の脂質代謝関連遺伝子 (LDL 受容体、HMG-CoA 還元酵素、HMG-CoA 合成酵素、FPP 合成酵素、脂肪酸合成酵素、アセチル CoA カルボキシ

ラーゼ、ステロール 7 $\alpha$ 水酸化酵素、SREBP-1、SREBP-2) には顕著な変動が認められなかった。これらの観察から、SS ヘテロ型欠損は肝臓中 SS 活性を半減させるものの、肝臓におけるコレステロール代謝の恒常性に影響しないことが示された。

#### **結果 4. SSヘテロ型欠損は血漿脂質値およびリポ蛋白質組成に影響を与えない。**

血漿総コレステロール値およびトリグリセリド値、リポ蛋白質組成に関し、野生型とヘテロ型接合体に有意な差異は認められなかった。また、高脂血症を惹起する LDL 受容体欠損変異を導入した場合にも、SS 野生型とヘテロ型接合体の血漿総コレステロール値およびトリグリセリド値に有意な差異は認められなかった。これらの結果より、SS ヘテロ型欠損は血漿脂質代謝に影響しないことが示された。

以上、SS 欠損マウスを用いた研究により、SS がマウスの正常な胎仔発生、特に神経系器官形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、SS ヘテロ型欠損で肝臓中の SS 酵素活性が半減した場合においても、肝コレステロール合成活性や血漿中脂質組成に影響が認められなかったことから、SS 阻害薬に血漿コレステロール低下作用を期待するためには、酵素活性を 50%以上阻害する必要があることが示唆された。