

氏名(本籍)	ほんだ めぐみ(茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博乙第1644号		
学位授与年月日	平成12年7月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	7-Dehydrocholesterol down-regulates cholesterol biosynthesis in cultured:Smith-Lemli-Opitz syndrome skin fibroblasts (7-デヒドロコレステロールによるコレステロール合成系の抑制:Smith-Lemli-Opitz症候群培養皮膚線維芽細胞での検討)		
主査	筑波大学教授	医学博士	山田 信博
副査	筑波大学教授	医学博士	松井 陽
副査	筑波大学教授	理学博士	坂内 四郎
副査	筑波大学助教授	医学博士	川上 康

論文の内容の要旨

(目的)

Smith-Lemli-Opitz症候群(SLOS)は、コレステロール(CHOL)生合成系の最終ステップである7-デヒドロコレステロール(7-DHC) Δ^7 -レダクターゼの欠損症である。血清ステロール分析、メバロン酸の定量、肝生検標本での酵素活性測定などの結果から、SLOSではCHOL合成の低下があるにもかかわらず、律速酵素であるHMG-CoAレダクターゼ活性が亢進していないと考えられている。本研究は、その理由を明らかにすることを目的として行われた。

(対象と方法)

生後1日から34歳までの83人のSLOS患者から得られた血清を用いて、ガスクロマトグラフィー(GC)法によりステロール分析を行った。次に、軽症型(タイプI)のSLOS患者7例、重症型(タイプII)5例、およびCHOL代謝に異常を認めないコントロール14例から得られた培養皮膚線維芽細胞を、10% fetal bovine serum (FBS)を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)中で継代培養した。培養液中LDL CHOLの量を増減させるために、必要に応じて10%FBSの代わりに20%FBSまたは5% delipidated FBSを使用した。また、CHOL、7-DHCおよびケトコナゾールはエタノールに溶解して培養液に添加し、最終エタノール濃度が0.9%になるようにした。細胞中ステロール分析はガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)法により、HMG-CoAレダクターゼ、HMG-CoAシクターゼ、LDLレセプターの活性はラジオアイソトープ(RI)法により測定した。

(結果)

SLOS患者の血清では、CHOL濃度の低下と7-および8-DHCの異常な増加を認めたが、これら3つのステロールを合計した総ステロール濃度は 85 ± 4 mg/dlと同年齢正常者の150-160mg/dlよりかなり低く、総ステロール濃度と7-DHC濃度との間には有意な負の相関関係を認めた。SLOS患者の線維芽細胞中7-DHC濃度は、10%FBSを含む培養液中で継代培養した場合、総ステロールの僅か数%に過ぎなかった。しかし5% delipidated FBSを含む培

養液中で7日間培養, または20 μ g/mlの7-DHCを添加後24時間培養すると, 細胞中7-DHC濃度は総ステロールの20%前後と患者組織と同レベルまで増加した。Delipidatedの培養液中で7日間培養した時の患者細胞のHMG-CoA レダクターゼ活性は, コントロール細胞の21%に低下していた。また20 μ g/mlの7-DHCを患者細胞に添加すると, HMG-CoA レダクターゼ活性は非添加時の17%まで抑制され, その抑制効果は同濃度のCHOLを添加した場合(42%)よりも有意に強かった。HMG-CoA シンターゼおよびLDLレセプター活性もそれぞれ66%, 68%と低下傾向を示したが, その低下は同濃度のCHOL添加時と比べて有意差がなかった。一方, 培養液中にケトコナゾールを添加すると, 7-DHCによるHMG-CoA レダクターゼ活性の抑制効果は消失した。

(考察)

SLOS患者の血清総ステロール濃度は正常者よりかなり低く, また血清7-DHCの比率が高いほど血清総ステロール濃度が低い傾向を認め, SLOSでは7-DHCによってコレステロール合成系が抑制されている可能性が示唆された。そこで患者の培養線維芽細胞に7-DHCの蓄積を再現させてHMG-CoA レダクターゼ活性を測定した。その結果, 7-DHCはHMG-CoA レダクターゼ活性を抑制し, その抑制効果はCHOLよりも強かった。CHOLのHMG-CoA レダクターゼ活性抑制作用は, CHOLそのものによるのではなく, CHOLから代謝された酸化CHOLによるとの報告がある。7-DHCも同様に酸化7-DHCに代謝された後にHMG-CoA レダクターゼを抑制している可能性を検討するため, チトクロームP450阻害作用を持つケトコナゾールを培養液中に添加したところ, 7-DHCによるHMG-CoA レダクターゼ活性抑制効果は消失し, 酸化7-DHCがHMG-CoA レダクターゼを抑制している可能性が示唆された。近年, HMG-CoA レダクターゼ, HMG-CoA シンターゼおよびLDLレセプター遺伝子のプロモーター領域にはsterol regulatory element (SRE) という共通の配列があり, これら3つの遺伝子の転写活性はミクロソームに存在するsterol regulatory element-binding protein (SREBP) という転写因子によって同時に制御されていることが明らかにされた。7-DHCとCHOL添加による活性抑制に差が見られたのはHMG-CoA レダクターゼのみであったことより, 7-DHCがCHOLより強くHMG-CoA レダクターゼ活性を抑制する機序として, 転写後調節機構の関与が考えられた。

(結論)

7-DHCは, 細胞内で酸化7-DHCに代謝された後に, HMG-CoA レダクターゼに強力にフィードバックをかけているものと考えられた。そのことがCHOL合成の低下にあるにもかかわらずSLOSでHMG-CoA レダクターゼ活性が亢進していない理由の一つと考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では, SLOS患者の血清ステロール分析の結果から, 血清総ステロール濃度と7-DHCの間に負の相関を認め, 本症候群で蓄積する7-DHCがコレステロール合成を抑制しているとの仮説がたてられた。そして, SLOS培養線維芽細胞に7-DHCの蓄積を再現させて, 7-DHCがCHOLよりも強力にHMG-CoA レダクターゼ活性を抑制することを証明した。さらにその抑制機序を明らかにするための実験が行われ, post-transcriptionalな機序による抑制効果が7-DHCがCHOLよりも強いこと, また7-DHCそのものよりも代謝された酸化7-DHCが抑制作用を持つという2つの新知見が得られた。SLOS患者における多発奇形, 精神発達遅滞などの発生機序を解明する上で, これまで低CHOL血症のみが注目され, 高7-DHC血症の代謝に及ぼす影響については全くわかっていなかったが, 本研究は高7-DHC血症自体が代謝に悪影響を及ぼし得ることをはじめて明らかにした。本論文は著者がこれまでに遂行してきた, SLOSとCHOL代謝に関する一連の研究の根幹をなす内容で構成されており, 博士(医学)学位論文としての価値を有する。

よって, 著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。